

TAMOXIFEN TERÁPIÁT BEFOLYÁSOLÓ GÉNEK INTERETNIKAI KÜLÖNBSÉGEI MAGYAR ÉS ROMA POPULÁCIÓS MINTÁKBAN

PhD értekezés tézisei

Dr. Wéber Ágnes

PTE KK Orvosi Genetikai Intézet

Témavezető: Prof. Dr. Melegh Béla



Pécs

2020

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke
2. Bevezetés
 - 2.1 A gyógyszerekre adott válasz egyéni és etnikai különbségei
 - 2.2 A tamoxifen szerepe az emlőrák hormonkezelésében
 - 2.3 A tamoxifen kezelés farmakogenetikája
 - 2.4 Citokróm P450 2D6 (CYP2D6) gén genetikája
 - 2.5 Citokróm P450 2B6 (CYP2B6) gén genetikája
 - 2.6 Citokróm P450 2C19 (CYP2C19) gén genetikája
 - 2.7 A roma populáció: történelmi, genetikai perspektíva
3. Célkitűzések
4. Anyagok és módszerek
 - 4.1 Vizsgált populációk
 - 4.2 Molekuláris módszerek
 - 4.3 Statisztikai elemzés
5. Eredmények
 - 5.1 CYP2D6 gén vizsgálata
 - 5.2 CYP2B6 gén vizsgálata
 - 5.3 CYP2C19 gén vizsgálata
6. Eredmények megbeszélése és következtetések
7. Eredmények összefoglalása
8. Közlemények jegyzéke
9. Irodalomjegyzék
10. Köszönetnyilvánítás

1. Rövidítések jegyzéke

AI	aromatázinhibitor
ATLAS	Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter
BBMRI	Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure
CPIC	Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium
CSM	Committee on the Safety of Medicines
CYP	citokróm P450
DMBA	7,12-dimetilbenz(a)antracén
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (etilén-diamin-tetraecetsav)
EM	extenzív metabolizáló
EMA	European Medicines Agency
ER	ösztrogén receptor
ETT-TUKEB	Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság
FDA	Food and Drug Administration (Élelmiszer- és Gyógyszerbiztonsági Hivatal)
GWAS	genome-wide association study (genomszintű asszociációs tanulmány)
IM	intermedier metabolizáló
LHRH	luteinizáló hormon releasing hormon-analóg
NIH	National Institutes of Health
NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
NSAID	nonsteroidal anti-inflammatory drug (nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszer)
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PM	poor metabolizer (gyengén metabolizáló)
PR	progeszteron receptor
RBC	red blood cell (vörösvértest)
RFLP	restriction fragment length polymorphism (restrikciós fragmenthossz polimorfizmus)
RT-PCR	real-time polimeráz láncreakció
SDS	sodium dodecyl sulfate (nátrium-dodecil-szulfát)

SERM	szelektív ösztrogén receptor modulátornak
SNP	single nucleotide polymorphism (egy pontos nukleotid polimorfizmus)
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitors (szelektív szerotonin visszavétel gátlók)
SV	splice variáns
TAM	tamoxifen
TCGA	The Cancer Genome Atlas
UM	ultragyors metabolizáló

2. Bevezetés

2.1. A gyógyszerekre adott válasz egyéni és etnikai különbségei

A szervezetünkbe kerülő tápanyagokhoz hasonlóan a gyógyszerek is biotranszformáció útján kerülnek feldolgozásra, amelynek hatékonysága és sebessége egyéni eltéréseket mutat. A gyógyszer targetek (pl. enzimek, receptorok) szintjén is egyéni különbségeket figyeltek meg a hatóanyagra adott reakciójukban, ami ezek metabolizmusa, a kezelésre adott válasz, valamint az esetleges nem kívánt mellékhatások kialakulása szempontjából egyaránt döntő jelentőségű. Az egyéni különbségek háttérben álló azon genetikai variánsok vizsgálata, amelyek a szervezet gyógyszerekre adott reakcióját módosíthatja, a farmakogenetika tárgyát képezi. A folyamatban részt vevő gének együttes hatásának megállapítása a farmakogenomika, azaz az egyéni DNS profil farmakogenetikai módszerekkel való feltárása, és az eredmények alapján a különféle gyógyszerek alkalmazásakor várható egyéni reakciók predikciója.

A gyógyszeres terápiák többségében a megfelelő reakció aránya a kezelt betegek körében 25% és 75% közé tehető. Példaként az ACE gátlók és a béta blokkolók említhetők: ebben a gyógyszer csoportban a magas vérnyomással küzdők mintegy 70%-ánál vagy csupán részleges terápiás hatás tapasztalható, vagy pedig hatástalan a kezelés. Az ilyen betegek esetében, akiknél a terápia nem éri el a kívánt célt, magasabb lehet a nem kívánt mellékhatások előfordulásának aránya. Sok olyan gyógyszer van forgalomban, amelyek lehetséges mellékhatásai közt súlyos klinikai következményekkel járó is ismert. Az Egyesült Államokban alkalmazott kb. 1200 gyógyszer mintegy 15%-ánál a súlyos, nem kívánt mellékhatások incidenciája jelentős. Egy gyakran idézett tanulmány szerint, amely az 1990-es évek közepén készült, az USA-ban évente közel 2 millió ember szorul kórházi ellátásra a gyógyszeres terápia következtében fellépő adverz reakciók miatt, és mintegy 100 000 a halálos kimenetelű esetek száma, annak ellenére, hogy mind az alkalmazott gyógyszer, mind a felírt dózis megfelelő. Az Európában és Ausztráliában elvégzett hasonló vizsgálat érdemben azonos eredményre jutott. A gyógyszerek hatásosságának és biztonságos alkalmazásának szempontjából nagy jelentőségű tehát a kezelésre adott várható egyéni reakció megítélése a háttérben álló genetikai profil meghatározása alapján.

A farmakogenetikai teszt ma már számos olyan variáns esetében rendelkezésre áll, amelyek megléte esetén a hordozókban súlyos, nem kívánt mellékhatások kialakulására lehet számítani. Ennek egyik példája a tiopurin-metil-transzferáz (TPMT): az enzim a tiopurin származékok (pl. 6-merkaptopurin, azatioprin) lebontásában játszik szerepet, amelyeket

gyakran használnak akut lymphoid leukémia kezelése során, valamint szervátültetéskor a kilöködés megelőzésére. Az enzimet kódoló *TPMT* gén egyik mutációja csökkent enzim aktivitást okoz. Európában 300 személy közül egy homozigóta formában hordozza ezt a mutációt, az ő esetükben a tiopurin tartalmú készítmény alkalmazása súlyos, életveszélyes csontvelő szupressziót okoz, a genotipizálás tehát a terápia megkezdése előtt mindenképpen szükséges.

A gyógyszer hatásosságát befolyásoló genetikai variánsokra sok példát lehetne felsorolni. A teljesség igénye nélkül, csupán példaként említek néhányat ezek közül: 1. Antihipertenzív kezelést befolyásoló variánsokat ismerünk az I-es és II-es típusú angiotenzin receptorok génjeiben, vagy az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) génben is. Ez utóbbi tartalmaz egy 190 bázispár méretű szekvenciát, amely jelenlétében *I* allélról, hiányában *D* allélról beszélünk. A *D/D* homozigóta személyek sokkal erőteljesebben reagálnak az ACE inhibitorokra. 2. A β -adrenerg receptor alegységeit kódoló gének (pl. *ADRB2*) variánsai szintén befolyásolják az antihipertenzív β -blokkolókra adott választ. 3. Egy jóval régebben ismert példa a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PD) defektusa, amely a primakvin nevű, malária kezelésben használt gyógyszerrel szembeni túlzott érzékenységet, ezáltal akut hemolitikus anémiát okoz, és világszerte 200 millió embert érint. 4. A tuberkulózis terápiában használt izoniazid lebontását az N-acetil-transzferáz 2 (*NAT2*) gén egyik allélja befolyásolja, a homozigóták a hatóanyag lassú inaktivációja miatt mellékhatások kialakulására számíthatnak. Az európai és afrikai eredetű populációk fele érintett, a kelet-ázsiaiak körében a homozigóták aránya alacsonyabb. 5. Az anesztéziában elterjedt, átmeneti izombénulást okozó szukcinilkolin hatása jellemzően néhány perc után megszűnik, mivel a plazmában keringő butiril-kolinészteráz lebontja. Az enzimet kódoló gén néhány allélja csökkent enzim aktivitást okoz, homozigóta és compound heterozigóta személyekben emiatt elhúzódó lélegzébénulásra, órákig tartó gépi lélegeztetésre kell számítani.

A fenti példák olyan variánsokat mutattak be, amelyek hatása mindaddig észrevétlen marad, amíg az érintett a kérdéses hatóanyaggal egy kezelés során nem találkozik. Hasonló variánsok azonban olyan enzimek génjeiben is megtalálhatóak, amelyek több gyógyszer metabolizmusában is szerepet játszanak. A citokróm P450 (CYP) enzimcsalád génjeiben (pl. *CYP2D6*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*) előforduló variánsok azért kiemelkedő jelentőségűek, mert a gyógyszerek 25%-ának átalakulásában érintettek. A disszertációban bemutatott vizsgálatok is ezen enzimcsalád három tagjához kapcsolódnak.

Régóta ismert tény, hogy egyes betegségek előfordulása a különböző rasszokhoz (afrikai,ázsiai, európai, natív amerikai és csendes-óceáni) tartozó csoportokban eltérő

gyakoriságot mutat (pl. prosztatata karcinóma - incidenciája az afrikai amerikai férfiak körében kétszerese az európai amerikai férfiak körében tapasztaltnak-, magas vérnyomás, 2-es típusú diabétesz). A genetikai variánsok szerepe a betegségekre való hajlam és a gyógyszerekre adott reakciók meghatározásában maga után vonja annak igényét is, hogy az egyes variánsok gyakoriságát a különböző populációkra vonatkozóan is megállapítsuk.

2.2. A tamoxifen szerepe az emlőrák hormonkezelésében

Történelmi áttekintés

Napjainkban Magyarországon 7500 új emlőrákos beteget regisztrálnak, és 2300 beteg évente meghal a betegség következtében. A nők leggyakoribb daganatos megbetegedését már i.e.1600-ban az ókori Egyiptomban is ismerték, és azt is leírták, hogy „Az emlő levágható, de nem gyógyítható a betegség”. Sajnos évszázadokon keresztül nem sikerült az amputáción kívül egyéb kezelési lehetőséget felmutatni. A XVIII-XIX. században viszont hatalmas lépésekben fejlődött a sebészet, ezen belül az emlőrák sebészet is, pl. a nyirokcsomók eltávolításával.

Ebben a folyamatban külön mérföldkőnek számít, amikor Beatson 1895-ben műtétilag eltávolította egy 33 éves emlőrákos nőbeteg petefészket és ezzel akkor csodának beillő módon 42 hónapig tartó javulást ért el [1]. Ez a tapasztalati tény nagyban hozzájárult ahhoz, hogy az elvárt pozitív eredmények miatt számos endokrin kezelést próbáltak ki. Tették ezt úgy, hogy ekkor még azt sem tudta senki, hogy mi az a hormon. Ezt csak később sikerült definiálni [2]. A kezdeti drasztikus beavatkozásokat és az erősen toxikus kezeléseket (nagy dóziszú ösztrogén, adrenalectomia, hypophysectomia, androgének, stb.) idővel igyekeztek a beteg általános egészségi állapotát kevésbé romboló kezelésekre váltani, hogy az elvárt pozitív terápiás hatás mellett a legkevesebb problémát okozza a kezelés maga. Így csak a legkevésbé toxikus kezelések maradtak meg úgy az előrehaladott emlőrákban, mint az adjuváns kezelésben, valamint a prevencióban (kardiovaszkuláris hatás, csontokra-, uterusra gyakorolt hatás, stb.) Az emlőrák kezelésével kapcsolatban fontossá vált, mivel a betegek 75%-a 50 év feletti, hogy lehetőleg ne legyenek az idős nőbetegeket terhelő problémák. Olyan terápiát kellett keresni, amelyik megfelelő tumor ellenes hatású, de nem fokozza a menopauzális problémákat. A hormon receptorok felfedezése, és a trifeniletilénre hasonlító anyagok aktivitásának felismerése is az 1940-es évekre vezethető vissza [3, 4].

A leghatásosabb, nem szteroid ösztrogént, a dietil-stilbösztrolt Sir Charles Dodds fedezte fel az 1930-as évek végén. Szerkezeti analógjai, a trifeniletilének, később hosszú hatású ösztrogéneknek bizonyultak. A kutatásnak új lendületet adott a II. világháborúban a mustárgáz kifejlesztése és alkalmazása, a mustárnitrogén hatásának, alkiláló szereknek, antimetabolitoknak a kutatása. Ez idő tájt paradox módon éppen ezeket adták nagy dózisban az emlőrák kezelésére [3].

Az ebbe a csoportba tartozó tamoxifen ugyanolyan aktív volt (csak nem annyira toxikus), mint az ösztrogének és az androgének, ezért előbb az előrehaladott emlőrák kezelésében, majd az emlőrák adjuváns kezelésében és a prevencióban is előtérbe került. A tamoxifen (TAM) továbbfejlesztése két úton lehetséges: kémiai meg lehet változtatni a trifeniletilén gyűrűs szerkezetét és új, nem szteroid gyűrűs szerkezeteket [(pl. benzotiafenek kell tervezni (toremifen, droloxifen, raloxifen, idoxifen)], vagy az ösztrogén szteránvázas, növekedésgátló analógjait kell létrehozni. A nem szteroid és szteroid típusú antiösztrogének mind hatásmechanizmusukban, mind mellékhatásaikban különböznek.

1958-ban Lerner és munkatársai előállították a MER 25-öt, az első nem szteroid antiösztrogént (etamoxi-trifetolt), ezután az antiösztrogének felé fordult a figyelem. Az elképzelésük az volt, hogy az antiösztrogének használatosak lehetnek a nőgyógyászatban és az emlőrák kezelésében is. Azt azonban a kutatók sem gondolták, hogy egy antiösztrogén meggátolja a terhesség kialakulását. A vizsgálatok gyenge tumor ellenes hatást, és sok mellékhatást igazoltak. Ezt követte az ösztrogénszerű trifeniletilén analógja, a klomifen, ami erősebb hatásúnak bizonyult, ezért ezzel már klinikai vizsgálatokat indítottak. Érdekes, hogy a klomifen nemhogy gátolta volna a terhességet, ezzel szemben ovulációt indukált. A molekula transz-izomerje antiösztrogén, cisz-izomerje ösztrogén, ennek a keverékét használják hosszú távú toxicitása miatt rövid idejű kezelésre, mint ahogy a nafoxidint is. Ebben a korszakban a fogamzásgátlás és az antiösztrogének kutatása szorosan összefüggött. Ekkor már tudták, hogy a petefészek működése összefügg a reprodukív folyamatokkal, csak még azt nem, hogy hogyan. Ezt sikerült 1962-ben Elwood Jensennek és Herb Jacobsonnak radioaktív ösztradiol alkalmazásával kiderítenie. A radioaktív ösztradiolt éretlen nőtény patkányoknak adták be és vizsgálták, hogy hová került az ösztradiol. A fiatal patkányok esetében az uterusban és a vaginában, az ösztrogén célszöveiben dúsult fel a radioaktivitás. Arra a következtetésre jutottak, hogy ezeknek a szerveknek a szöveteiben olyan receptoroknak kell lenniük, amelyek visszatartják, megkötik az ösztrogént. A kutatások eredményeként az ösztrogén receptor (ER) proteint 1966-ban izolálták patkány uterusból.

Jensen úgy gondolta, hogy ahogyan az uterusban az ösztrogén az ösztrogén receptorokon keresztül szabályozza az ösztrogénhatást, ugyanilyen módon hatva befolyásolja az emlőrák növekedését is. Mivel voltak esetek, amikor talált receptorokat emlőrákos szövetekben, volt, amikor nem, azt jósolta, hogy a receptor hiányos tumorban szenvedő betegek nem fognak reagálni az endokrin beavatkozásokra [5].

A 60-as években a kémiai kutatás lendületében számos trifeniletilén-analógot szintetizáltak. Az áttörés akkor következett be, amikor Harper és Walpole felfedezte, hogy az egyik új trifeniletilén az ICI 46474 transz-izomerje antiösztrogén, míg a cisz-izomerje ösztrogén hatású [6].

1967-ben, amikor megjelent dr. Arthure Walpole dolgozata az új antiösztrogénről, az ICI 46474-ről, a későbbi tamoxifenről (a tiszta transz izomer Nolvadex néven került forgalomba) Jordan doktor Cheshireben éppen a receptorok izolálásával, majd az antiösztrogének struktúrájával foglalkozott. Ekkor már tudták a patkány kísérletekből, hogy a tamoxifen hatásos postcoitalis fogamzásgátló, és felmerült az alkalmazása emlőrákban is. Sajnos ekkor még az antiösztrogének kutatását sokan nem tartották fontosnak. 1972-től Massachusettsbe került, ahol Michael Harperrel és Dr. Elwood V. Jensennel és Lois Trenchhel dolgozott együtt, aki a tamoxifen vizsgálatok klinikai koordinátoraként felismerte Jordan anyagának jelentőségét és előbb az ECOG-ba (Eastern Cooperative Oncology Group), majd az NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) munkába javasolta a tamoxifent. Bár a prevenció témájáról is elhangzott 1974-ben előadás, de még alig jelentek meg közlemények, ennek ellenére 1973-ban Nagy-Britanniában, és 1978-ban az Amerikai Egyesült Államokban is elkezdték előrehaladott emlőrákban alkalmazni és megkezdődött a hosszú idejű (több mint egy év) adjuváns kezelés vizsgálata is.

Az eredmény nem maradt el. A National Cancer Institute 1974-es ülése új korszakot nyitott a rákgyógyászatban: elhangzott a receptorok prognosztikai jelentőségének ismertetése, a receptorok és az endokrin kezelésre adott válasz összefüggésének bizonyítása [7]. Az ER-pozitív betegnek 60% az esélye, hogy reagáljon a kezelésre, míg az ER-negatív betegnek csak 10%.

A tamoxifen klinikai fejlesztése

Először Nagy-Britanniában, 1973-ban a CSM (Committee on the Safety of Medicines), majd az Amerikai Egyesült Államokban, 1979-ben az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerbiztonsági Hivatal (Food and Drug Administration, FDA) kiadta az engedélyt a tamoxifen alkalmazására emlőrákban.

Lippman írta le először az emberi MCF-7 (ER-pozitív) emlőrákos sejtekre kifejtett gátló hatását [8]. Körülbelül egy évtizeddel később, egymástól függetlenül Osborne (San Antonio) és Sutherland (Ausztrália) észlelték, hogy a tamoxifen blokkolja az emlőráksejteket a G1 fázisban. Míg a DMBA-val (7,12-Dimetilbenz(a)antracén) indukált patkány emlőrák esetén az egyhónapos tamoxifen adagolás csak késleltette a tumorok megjelenését, a hathónapos adagolás viszont 90%-ban gátolta az állatok megbetegedését [9, 10]. A tamoxifen abbahagyásakor a tumorok megjelentek, tehát a szer tumor statikus hatású [11]. Mivel a tamoxifen minden metabolitja antiösztrogén hatású, mindegyik szerepet játszik az antitumoros hatásban (N-dezmetil-tamoxifen, 4-hidroxi-tamoxifen, metabolit-Y, metabolit-Z, 4-hidroxi-N-dezmetil-tamoxifen). Az N-dezmetil-tamoxifen az alapvető metabolit, a vérplazmában 2:1 arányban található a tamoxifenhez képest (félélet tartam; 14 nap vs. 7 nap).

Induláskor egy éves adagolást javasoltak adjuváns céllal, mert azt gondolták, hogy az ER-negatív tumorok ennyi idő alatt recidiválnak és alkalom lesz más palliatív módszert bevezetni a további kezelésre. Később aztán folytak vizsgálatok éveig tartó adjuváns kemoterápiás kezelésekkel is, aminek az eredményeként kiderült, hogy ez nem befolyásolja kedvezően a túlélést, a megfelelően hatékony hat hónapos kezelés is elegendő. Fontos viszont, hogy a hosszú (kettőtől öt évig tartó) tamoxifen kezelés sem járt toxikus-, vagy metabolikus mellékhatással, ezért a hosszú adjuváns tamoxifen kezelést ajánlották nyirokcsomó-pozitív esetekben [12]. Később aztán több multicentrikus vizsgálat során bizonyították a hosszabb tamoxifen adagolás előnyeit [13].

Hatásmechanizmus

Onkológiai szerepe a hormonok közül elsősorban az ösztrogéneknek, progesztogéneknek és az androgéneknek van. A szervezetben mindegyik előállításához koleszterin kell: ebből először progeszteron lesz, majd a progeszteronból tesztoszteron, és végül aromatázok segítségével készül az ösztradiol. Hatásukat receptorokon keresztül képesek kifejteni, a megfelelő receptorokhoz ligandként kapcsolódnak.

A tamoxifen - mint nem szteroid antiösztrogén - hatása a szervekben, szövetekben markánsan eltérő: az emlő és az agy szöveteiben antagonistá, míg a csont, máj, kardiovaszkuláris rendszer szöveteiben agonista hatású, ugyanakkor az uterus esetében kevert hatásról beszélhetünk. Ezért a tamoxifent szelektív ösztrogén receptor modulátornak (SERM) tekintik. Ösztrogén antagonistá és agonista is egyszerre, mivel az ösztrogénnel versenyezve kötődik az ösztrogén receptorokhoz. Ösztrogéntartalmú környezetben a receptorokhoz kötődve gátolja az emlőrák sejtek növekedését. Ugyanakkor alacsony ösztrogénkoncentráció esetén ösztrogén agonistaként hat és elősegíti a sejtek proliferációját.

A sejtosztódásra gyakorolt hatását a sejtmembránon átjutva a nukleólusz ER-ához kötődve fejti ki. Az ösztradiol a receptorhoz kötődve receptor-ligand komplexet képez, ami konformációs változáson megy át, a receptor fehérjék az ösztradiolt körbeveszik, majd a hormon-receptor komplex dimerizálódik. Ez a struktúra egyéb koaktivátor fehérjékkel transzkripciós komplexet képez, ami felnyitja a DNS-t lehetővé téve annak másolását, ezzel elindítva a sejtosztódást. Az emlőrák kialakulásakor ez a folyamat a felelős a sejtek burjánzó osztódásáért. A tamoxifen úgy hat, hogy az ER-hez kötődve meggátolja azokat az átalakulásokat a receptor molekula struktúrájában, aminek az eredményeként az ösztradiol nem tudja ligandként kötve fehérjébe burkolni, mert beékelődik a receptorba. Így a DNS másoláshoz elengedhetetlen koaktivátor fehérjék sem tudnak kapcsolódni a hormon-receptor komplexéhez, így blokkolt a sejtosztódás folyamata [14, 15].

A tamoxifen klinikai alkalmazása napjainkban

Az emlőrák a leggyakoribb daganatos megbetegedés a nőknél világszerte, évente mintegy 1,4 millió eset fordul elő. Jelenlegi adataink szerint a fejlett társadalmakban minden nyolcadik nőnél várható az emlőrák kialakulása. A megbetegedések számának előfordulása az 1990-es évekig emelkedő tendenciát mutatott, de mára stabilizálódni látszik. A betegség előfordulása az életkor előrehaladtával növekedést mutat. Az emlőrák 45%-a 65 év felett, több mint 80% 50 év felett alakul ki. A megbetegedések száma 40 éves kortól fokozatosan emelkedik, majd 65 éves kornál éri el a legmagasabb számot, innen csökkenő tendenciát mutat. Hetven éves kor felett az előfordulás növekedése megáll [16].

A férfiaknál előforduló emlőrák ritka betegségnek számít (minden 100. női emlődaganatra jut 1 férfi emlődaganat), mindösszesen a férfi daganatok 1%-át adja. A férfi emlődaganat leggyakrabban 65 éves kor felett alakul ki. A betegség előfordulásának

valószínűsége a kor előrehaladtával fokozatosan emelkedik. Kockázati tényezőként szerepelnek a reprodukciós faktorok is. A kockázatot emeli a korai menarche, késői menopauza, a posztmenopauzában alkalmazott hormonpótló terápia (ezen nők esetében 60%-kal nő a betegség előfordulásának kockázata), obesitás, magas zsírbevitel. Csökkenti a betegség kialakulásának rizikóját a graviditás, a szoptatás, a fiatal korban történő szülés, rendszeres fizikai aktivitás.

Örökletes tényezők is szerepet játszanak az emlődaganat kialakulásában (*BRCA1* és *BRCA2* gének), bár ez a szám az összes megbetegedéshez képest alacsony. Ezeknek a géneknek a mutációja 45-65%-os valószínűséggel okoz emlőrákot 70 éves kor előtt, ez a mutáció kb. 0,2%-ban fordul elő a populációban. Összességében 450 nőből 1 hordozza ezt a gént, mely mindössze az emlőrákok 2%-áért, de az öröklött emlőrákok 20%-áért felelős [16].

A már kialakult emlődaganatok kezelésének négy alappilléret a következőkben határozhatjuk meg (multimodális terápia): a sebészeti ellátás, kemoterápiás kezelések, melyek kiegészülnek a célzott biológiai terápiával, a sugárterápiás kezelés, végül, de nem utolsó sorban a hormonkezelés. Minden beteg esetében a kezelési terv létrehozásakor több szempontot is figyelembe kell venni. Elsősorban a daganat szövettani típusát, annak prognosztikai (a diagnózis időpontjában meghatározott paraméter, amely kapcsolatba hozható a betegségmentes vagy abszolút túléléssel szisztémás-adjuváns kezelés nélkül) és prediktív faktorait (bármely mért adat, amely kapcsolatban van a terápiára adott válasszal vagy a válasz hiányával), melyek következtetni engednek a daganat biológiai viselkedésére, illetve a várható gyógyszerérzékenységre. Elengedhetetlen a diagnózis felállításakor a részletes kivizsgálás, annak érdekében, hogy meg tudjuk állapítani a daganat kiterjedését (TNM status). A daganat kiterjedtsége szempontjából beszélhetünk korai-, illetve lokálisan kiterjedt, vagy metasztatikus emlődaganatról. A kezelési terv meghatározását befolyásolja még a beteg kísérő betegségei, általános állapota (ECOG status), menopauzális státusza.

Az emlődaganatok vonatkozásában különböző célzattal adhatjuk a kezeléseket. Korai emlőrák műtét utáni adjuváns kezelésekként, lokálisan előrehaladott emlődaganat neoadjuváns kezelésekként, vagy metasztatikus, előrehaladt emlődaganat palliatív kezelésekként.

Korai emlődaganat adjuváns szisztémás kezelésének célja a diagnózis idején fennálló mikrometasztázisok eliminálása a szervezetből, ennek következtében csökkenthető a helyi kiújulás kockázata, megelőzhető a távoli áttétek kialakulása és javítható a betegek túlélése. Az adjuváns kezelés során kemoterápiát, hormonterápiát és HER2-receptor gátló terápiát, illetve ezek kombinációját alkalmazzák előre meghatározott sorrendben. Az EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group) által publikált áttekintő analízisek eredményei

azt mutatják, hogy a recidívák és a halálozások aránya egyértelműen csökkenhető az adjuváns szisztémás kezeléssel.

A szakmai irányelvek szerint különböző kezelési modalitások meghatározott sorrendben követik egymást, bár ez változhat is, ha ezt bármi inokolja. Az adjuváns szisztémás kemoterápiát a sugárkezelés követi. A kemoterápiát a műtét után legkésőbb 8 héten belül kezdjük el, bár ma már léteznek megengedőbb vélemények is, melyek a 3 hónapon belüli kezdést is lehetőségként kezelik. A hormon érzékeny emlődaganatok esetén amennyiben kemoterápia szükséges, úgy az endokrin terápia a kemoterápia befejezése után kezdődik, de az sugárterápiával együtt alkalmazható. Az endokrin terápiát a daganat szövettanában leírt ösztrogén receptor (ER), progeszteron receptor (PR) pozitivitás határozza meg. Hormon érzékenységet az ER, PR legalább 10%-os expressziója jelent, ugyanakkor bizonyos nemzetközi ajánlások már az 1%-os pozitivitást is elfogadják és javasolják a hormonkezelést. Voltak olyan analízisek, melyek azt próbálták kidomborítani, hogy a HER2 pozitív emlődaganatok nem hormon érzékenyek, de ezt más vizsgálatok nem erősítették meg. Még a hormon érzékeny, jó prognózisú emlődaganatok esetében is előnyt jelent a hormonkezelés az azonos oldali kiújulás és az ellenoldali emlőrák megelőzésére [17].

A legszélesebb körben a tamoxifent vizsgálták adjuváns terápiában, melynek továbbra is alapvető szerepe van mind a premenopauzális, mind a posztmenopauzális emlődaganatok kezelésében. A tamoxifen posztoperatív alkalmazása 5 éven keresztül 47%-kal csökkenti a kiújulás és 26%-kal a halálozás kockázatát. Az új generációs aromatózgatatók csekély mértékben ugyan, de mind szignifikánsan hatásosabbnak bizonyultak a tamoxifennél a relapszus mentességben. A letrozol minimális előnyt mutatott a többi aromatózinhibitorral szemben.

A premenopauzális betegek endokrin kezelése

Jelenleg a vizsgálatok alapján és a mindenkori konszenzus konferenciák alapján a premenopauzális emlődaganatok kezelésének standard szere a tamoxifen. Amennyiben a kemoterápia után a beteg menstruációja visszatér, úgy luteinizáló hormon releasing hormon-analóg (LHRH-analóg) adását javasoljuk a tamoxifen kiegészítéseként 2-3 évig folyamatosan [15]. A szakmai irányelvek szerint a tamoxifen kezelési ideje 5 év, de a 2013-ban publikált ATLAS (Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter) vizsgálat eredményei azt mutatják, hogy az 5 éves tamoxifen kezelés helyett a meghosszabbított 10 éves tamoxifen kezelés előnyt mutat mind a betegség kiújulása, mind pedig a mortalitás csökkenésének

vonatkozásában [18]. Előnyben részesítjük a havi adagolású LHRH-analógot, napi 20 mg tamoxifennel. Bár csak nem rég vált világossá, hogy a tamoxifen kiterjedt metabolizmuson megy keresztül és némely formája farmakológiailag aktívabbnak bizonyult, mint maga a tamoxifen. Ellenben a betegek közötti jelentős különbségeket tekintve különböző a tamoxifen farmakokinetikája és farmakodinamikája is, de jelenleg minden betegnél ezt a napi dózist alkalmazzuk [17]. A vizsgálatok azt sugallják, hogy érdekesebb lenne a dózist egyénre szabni, genotípus, fenotípus szerint és monitorozni a gyógyszert. Az LHRH-analógok hatása reverzibilis és egyenértékű a sebészeti, vagy a sugárkezeléssel létrehozott ovariectomiával. Ha a betegnél kontraindikált a tamoxifen terápia, abban az esetben LHRH-analógot, vagy LHRH-analógot és aromatázinhibítort alkalmazunk, bár az aromatázinhibitorok előnyét premenopauzális korai emlődaganatban nem sikerült igazolni a tamoxifennel szemben [19].

A posztmenopauzális betegek endokrin kezelése

Hosszú évtizedeken keresztül a posztmenopauzális emlődaganat standard endokrin kezelése a tamoxifen volt. A modern aromatázinhibitorok (AI) megjelenésével új kezelési sémák állnak az onkológusok rendelkezésére. A hosszú távú követés eredményei megerősítették azt a tényt, hogy a tamoxifen kezelés hatására az endokrin kezelésre érzékeny daganatok mind premenopauzában, mind pedig posztmenopauzában jelentősen növelték a túlélést, illetve 50%-kal csökkentették az ellenoldali emlődaganatok előfordulását. De miután megjelentek a harmadik generációs aromatázinhibitorok a vizsgálatok kedvezőbb hatást mutattak mind relapszus mentességben, mind az ellenoldali emlődaganat előfordulása tekintetében. Szignifikáns túlélési előnyt mutatott a szekvenciális terápia (2-3 év után TAM 2-3 évig - AI 2-3 évig, vagy fordított szekvenciában) és a meghosszabbított tamoxifen kezelés (5 év) után adott aromatázinhibitor terápia [20, 21].

A jelenlegi szakmai állásfoglalás szerint a posztmenopauzális emlőrák kezelési sémája többféle lehet. Nem kétséges napjainkban, hogy az aromatázinhibitorok hatásosabbak a tamoxifennél, ezért a kezelésnek mindig tartalmaznia kell egy aromatázinhibítort [19].

A lehetséges variációk:

1. 5 éven keresztül aromatázinhibitor,
2. 2-3 év tamoxifen kezelés után váltunk aromatázinhibitorra,
3. 2-3 év aromatázinhibitor után váltunk tamoxifenre,
4. 5 év tamoxifen kezelés után 4-5 év aromatázinhibitor meghosszabbított kezelés.

Neoadjuváns endokrin kezelés

A neoadjuváns szisztémás kezelést már az 1970-es évek óta alkalmazzák. Eredeti célja az volt, hogy a lokálisan/regionálisan előrehaladott emlődaganatokat műthetővé tegyék, illetve lehetőséget nyújtsanak ezen daganatok esetében az emlőmegtartó műtétek kivitelezéséhez. Az évtizedek során összegyűlt tapasztalatok alapján a neoadjuváns terápia indikációs területe bővült, mely számos előnnyel jár: csökkenhet a műtét radikalitása, jobb kozmetikai eredményeket érhetünk el, a szentinel nyirokcsomó-biopsziája segíti az axilláris blockdisszekció elkerülését, javul a lokális kontroll, hamarabb elkezdődik a szisztémás kezelés, elsődleges gyógyszeres kezelés hatását lemérhetjük a primer daganaton, illetve a nyirokcsomó-metasztázison. Ha úgy észleljük, hogy az adott terápia nem eléggé hatásos, úgy módunk van a terápiát lecserélni. Jó terápiás válasz esetén nem csak a műtéti radikalitás csökkenthető, hanem a sugárterápia radikalitása is. A felsorolt előnyök miatt minden olyan esetben szóba jön a neoadjuváns kezelés, amikor a diagnózis felállításakor egyértelmű, hogy majd műtét után adjuváns kezelésre lesz szükség. A neoadjuváns szisztémás kezelés egyenértékű az adjuváns kezeléssel, feltéve hogy a kezelés után kuratív műtét történik. A neoadjuváns terápia lehet kemoterápia, hormonterápia és molekuláris célzott terápia, ez utóbbit csak HER2 pozitív emlődaganatok esetén alkalmazzuk [20].

A neoadjuváns terápiás terv felállításához elengedhetetlen a komplex emlővizsgálat (fizikális vizsgálat, mammográfia, emlő ultrahang), ahol felvetődik a lokálisan előrehaladott emlődaganat diagnózisa: T2 és/vagy N1-3, M0 stádium. Ezt szövettani mintavétel követi a primer daganatból, melyből minden olyan fontos információt megtudunk (szövettani típus, grade, ER, PR, HER2, Ki67), melyekből következtetni tudunk a daganat várható gyógyszerérzékenységére. Ha a nyirokcsomó érintettsége felmerül, abból mintavétel javasolt vékony vagy vastagtűvel [22].

A neoadjuváns hormonkezelésre a kemoterápiára rezisztens emlődaganatok esetében gondolunk, ez a típus viszont hormonkezelésre jól reagál. Ezek az alacsony proliferációjú, ER-, PR pozitív, lassú lefolyást mutató daganatok, melyek általában idősebb betegeknél fordulnak elő, de fiatalabb betegeknél is lehetségesek [22]. Különösen jól reagálnak hormonkezelésre az invazív lobuláris carcinómák. A hormonkezelés a hatását jóval lassabban fejti ki, mint a kemoterápia, ezért jó hatékonyság esetén hosszú ideig alkalmazzuk (legalább 4-8 hónap). Minél hosszabb ideig alkalmazzuk, annál nagyobb a valószínűsége, hogy elérjük patológiai komplett regressziót. Az aromatázinhibitorok a vizsgálatok szerint jó eredményeket produkáltak a menopauzális emlődaganatok csoportjában, hatékonyságuk meghaladták a

tamoxifenét. Ezek közül is a letrozol bizonyult a leghatékonyabbnak. A premenopauzális emlődaganatok kezelésében a választható terápia az LHRH-analógok (ovárium abláció) mellé adott tamoxifen vagy aromatázinhibitor. A neoadjuváns célzattal adott hormonkezelésnél az esetek 30-100%-ában észlelnek regressziót, és több mint 50%-ában teszi lehetővé az emlőmegtartó műtétek végzését [23].

Palliatív kezelés

A metasztatikus emlődaganat kezelése általában nem kuratív, így a terápia célja a lehető leghosszabb túlélés biztosítása, a tünetek megjelenésének késleltetése a megfelelő életminőség mellett. A kezelés sratégiáját az életkor, a kísérőbetegségek, a folyamat kiterjedése, a metasztázisok lokalizációja, a daganat hormonreceptor-statusza, HER2-státusza és persze a beteg általános állapota határozza meg. Az utóbbi években a palliatív kezelések területén is bővültek a terápiás lehetőségek. A hormonérzékeny daganatok várhatóan jól reagálnak az endokrin kezelésre, ezért elsődleges szerepe lehet a hormonkezelésnek még a metasztatikus esetekben is. Kis kockázatú esetekben (hosszú betegségmentes periódus, több mint 2 év, csak csontáttétek, csak lágyrész áttétek, tünetmentesség vagy csak enyhe tünetek) választható első vonalbeli kezelésként a hormonkezelés. Viszcerális áttétek esetében a prognózis rosszabb, így az esetek nagy részében elsődlegesen választandó kezelés a kemoterápia. Rendelkezésre állnak már olyan irodalmi adatok is, hogy bizonyos esetekben, korlátozott számú viszcerális áttétek esetében az endokrin kezelés is megfelelő lehet. Az ER-pozitív, HER2-pozitív esetekben HER2-inhibitor és endokrin terápia kombinációja, hormonreceptor-negatív és HER2-negatív betegeknél kemoterápia, míg HER2-pozitív esetekben HER2-inhibitor és kemoterápia választandó. Az utóbbi időben új nomenklátúra született: viszcerális krízis, mely a közeljövőben bekövetkező életet veszélyeztető állapotot jelent a beteg számára. Ebben az esetben azonnali, gyors terápiás választ adó kemoterápiás kezelés elkezdésére van szükség. Az endokrin kezelések jobb mellékhatás profillal bírnak, jobban tolerálhatóak, mint a kemoterápia, ezért elfogadhatóak a kis kockázatú metasztatikus emlődaganatok kezelésében [23].

Ha a beteg az adjuváns kezelés során már részesült hormonkezelésben, ami a menopauzális betegek többségét illetően aromatázinhibitort jelent, akkor progresszió esetén a következő gyógyszerek jönnek szóba: tamoxifen, exemesztán, fulvesztrán, progesztogének. Felvetődik a kérdés, hogy az adjuváns célzattal adott aromatázinhibitorok után hatékony lesz-

e a progresszió esetén adott tamoxifenkezelés? Irodalmi adatok alapján megszületett irányelvek kimondják, hogy mind pre-, mind posztmenopauzában metasztatikus emlődaganat esetén alkalmazott endokrin terápia hatékonyan bizonyul azoknál a betegeknél is, akik adjuváns hormonkezelésben részesültek [24, 25]. Másodvonalbeli kezelésként alkalmazhatjuk a fulvesztránt, tamoxifen utáni progresszió esetén, majd harmadvonalban exemesztánt adhatunk. A menopauzális betegeknél nincs elegendő információ a második vonalban alkalmazott gyógyszerek optimális sorrendjéről. Ha korábban nem kapott a beteg aromatázinhibítort, kezdetünk azzal, majd folytathatjuk az előbb felsoroltakkal. Premenopauzában a betegek tamoxifennel való előkezeltségével szembesülhetünk, ezen kívül az aktuális hormonális státusz meghatározása elengedhetetlen. Természetesen számolnunk kell a kezelés során fellépő hormonrezisztenciával, mely a transzmembrán tirozin-kinázok (IGFR, EGFR-HER2) mellett az egyéb jelátviteli utak (PIK3, AKT, TOR, MEK, MAPK) játszanak közvetítő szerepet. Hormonrezisztencia esetén mTOR-gátló kezelés áttörheti a rezisztenciát, így késleltethetjük a kemoterápia alkalmazását a megfelelő életminőség biztosításával [24, 26].

Az endokrin kezelés mellékhatásai

Az emlődaganatok kezelésében nagyon fontos stratégiai szereplők a hormonkészítmények, de egyben a mellékhatásokkal is számolni kell, melyek miatt a terápiát esetlegesen kénytelenek vagyunk akár meg is szakítani. Így természetesen elmarad a várt jótékony hatás. Egyes vizsgálatok kimutatták, hogy a betegek akár fele is abbahagyja az adjuváns endokrin terápiát a mellékhatások megjelenésével. Ezért a mellékhatásokra való felkészítés javíthatja a beteg együttműködési hajlandóságát. A premenopauzában adott LHRH-analógok, tamoxifen, a posztmenopauzában adott aromatázinhibitorok mellékhatás profilja különböző ugyan, de ezen gyógyszerek használata során tapasztaljuk a menopauzális jellegű tünetek megjelenését, amit valószínűleg az ösztrogénszint csökkenése okoz. A kívülről bevitt ösztrogén pótlása az emlődaganatok esetében nem ajánlott a kiújulás veszélye miatt. Az endokrin kezelés ideje alatt számolnunk kell hőhullámok megjelenésével, atrófiás vaginitisz megjelenésével, mozgásszervi panaszokkal, aromatázinhibitor kezelés alatt megjelenő csontvesztéssel [23, 26]. Ellenben jótékony hatást gyakorol a kardiovaszkuláris rendszerre és az osteoporózisra. Egyetlen súlyos mellékhatással, még pedig az endometriumrákok gyakoribb előfordulásával kell számolnunk, ezért a rendszeres nőgyógyászati kontroll

elengedhetetlen. A vizsgálatok szerint évenként körülbelül 0,2% (2/1000 beteg) a méhestrák valószínűsége a tamoxifen szedése mellett. A tromboembóliás szövődmények a tamoxifen csoportban gyakoribbak voltak (1,3% vs. 0,4%) [24, 27].

Gyógyszerinterakció miatt a tamoxifen adása alatt, ha egy mód van rá, kerülni kell a szelektív szerotoninvisszavétel-gátlók (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI) alkalmazását, mint például paroxetine, fluoxetine, mert ezek a gyógyszerek csökkentik a tamoxifen aktív metabolitjának szintjét, hiszen mindkét gyógyszer csoport a CYP2D6 enzimrendszeren keresztül metabolizálódik.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az utóbbi évtizedek alatt rohamosan fejlődő endokrin kezelés még mindig alapvető kezelési lehetősége a tamoxifen, bár a kezelési palettán újabb fejlesztésű gyógyszerek jelentek meg. A vizsgálati eredményeket végiggondolva, a szakmai irányelveket betartva még napjainkban is sok beteg életét menti meg a tamoxifen, vagy nyújtja meg az emlődaganatos betegek élethosszát, miközben fontos tényező az életminőség figyelembe vétele.

2.3. A tamoxifen kezelés farmakogenetikája

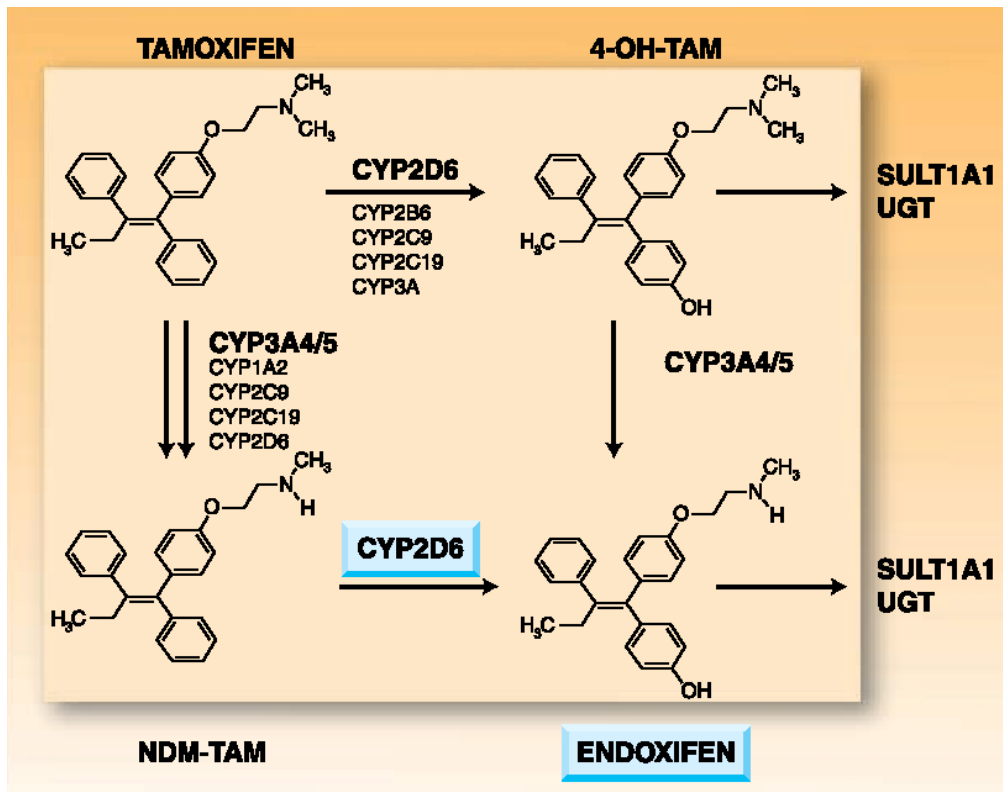
Az onkológiai kezelések között a szelektív ösztrogén receptor modulátorként ható tamoxifen képviselte elsőként a célzott terápiát a személyre szabott orvoslás előfutáraként [28]. Az adjuváns endokrin terápia jellemzően 5 éves kezelést jelent, de az ATLAS trial eredményei alapján már inkább 10 évig tartó terápia javasolt, ami a mortalitást 50%-kal csökkentheti [18]. A tamoxifenre irányuló farmakogenomikai kutatások az emlőrák/betegség klinikai kimenetelének predikcióját célozzák meg a beteg *CYP2D6* genotípusa alapján, így elkülönítve azt a csoportot, akiknél a tamoxifen kezelés várhatóan eredménytelen lesz, és akiknél emiatt alternatív endokrin terápiára van szükség [29, 30].

A jelenlegi cél tehát az érintettek számára olyan, a betegség kimenetelének megítélésére alkalmas prediktor biztosítása, amely a számukra legmegfelelőbb kezelési lehetőség kiválasztását segíti elő. A *CYP2D6* variánsainak megállapítása, azaz a genotipizálás a megfelelő eszköz erre, mivel ez – a National Institutes of Health (NIH) definíciója szerint – objektíven megállapítható és értékelhető biomarker.

Goetz és munkatársai arról számoltak be, hogy a *CYP2D6* *4 és *6 genotípusú, gyengén metabolizáló (PM) fenotípusú betegek számára a tamoxifen kezelés kevésbé előnyös, mint az extenzív metabolizáló (EM) csoport számára [31]. Ez a megközelítés a *CYP2D6* egyéni variánsain alapuló fenotípus csoportokat alkalmazza, úgy, mint a normál enzim aktivitással jellemezhető extenzív metabolizálók, a csökkent aktivitást mutató intermedier metabolizálók (IM), a minimális vagy nulla funkcióval rendelkező gyengén metabolizáló csoportot, valamint a normálhoz képest nagyobb aktivitású, ezért ultragyors metabolizálónak (UM) nevezett személyeket [32, 33].

A több mint 100 ismert *CYP2D6* variáns közül a funkcióvesztéssel járó PM allélek a *CYP2D6**3, a *4, *5 és *6, a legfontosabb IM allélek a *CYP2D6**10, a *17 és *41, az UM fenotípussal asszociált allélek pedig a *1xN és a *2xN. A tamoxifen metabolizmusa során 4-OH-tamoxifen és endoxifen keletkezik. Különösen ez utóbbi folyamatot határozza meg a *CYP2D6* enzim, illetve közvetve ennek genetikai variánsai [34, 35].

A tamoxifen kezelésben részesülő emlőtumoros betegek szérum mintáiban kevesebb 4-OH-tamoxifen (a standard 20mg/nap dózis mellett az endoxifen koncentráció 10-20%-ának megfelelő) mutatható ki, ezért tekintik az endoxifent a fő metabolitnak [36]. Az endoxifen koncentrációja az UM és EM fenotípusú betegekben a legmagasabb (77 nmol/L, illetve 36,9 nmol/L), a PM fenotípusúakban pedig a legalacsonyabb (9,9 nmol/L), ami az EM fenotípusnál megfigyelhető koncentrációnak csupán 25%-a [37].



1. ábra A *CYP2D6* szerepe a tamoxifen metabolizmusában [38]

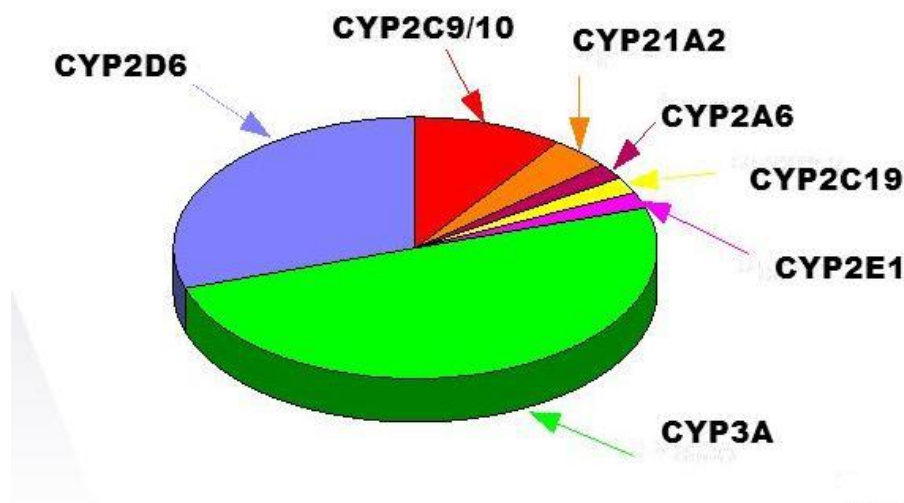
A *CYP2D6* genomi környezetének komplexitását a genotipizálás során figyelembe kell venni: a gén közvetlen közelében két pszeudogén található, ami a gént érintő gyakori kópiaszám eltérések kialakulásához vezet. A funkcionális allélek számának növekedésével a mért szérumban endoxifen koncentráció is magasabb, ami a gén-dózis hatást támasztja alá. Az emlő- és vastagbél-tumor minták genotipizálásakor gyakran észlelt allél-vesztés a 22q13 lókuszon rosszabb prognózissal asszociált, mint a deléciót nem mutató eseteknél várható [38, 39]. A kezdeti tanulmányokban a régióban található mikroszatellita markerek vizsgálatával, a normál és a tumorból származó DNS összehasonlításával az esetek 53%-ában írtak le allél-vesztést [40]. A teljes genomot átfogó tanulmányok eredményei szerint, amelyek a tumor altípusát is figyelembe vették, az ösztrogén receptor-pozitív invazív lobuláris, illetve invazív ductalis carcinomák több mint 25%-ában állapították meg allél-vesztést, ezek a vizsgálatok azonban nem magának a *CYP2D6* génnek a kópiaszámát elemezték. A The Cancer Genome Atlas (TCGA) adatai megerősítették, hogy a *CYP2D6* lókuszt az ösztrogén receptor-pozitív tumorok 35%-ában deletálták. A tumorból nyert DNS genotípus eredménye ezért csak a beteg genom adataival történt összehasonlítás után értelmezhető: a tumorszövet és a genomi DNS genotípusának simeretében adható meg pontosan a *CYP2D6* fenotípus is [29, 30].

A tamoxifen fő metabolitjának, az endoxifennek a transzkripciót és a proliferációt gátló hatása koncentráció-függő: a PM fenotípus esetén mérhető <20 nmol/L koncentráció mellett minimális, az IM és EM fenotípussal rendelkezőknél tapasztalt 40-60 nmol/L hatóanyag koncentráció mellett azonban szignifikánsan nagyobb hatású a kezelés. A magas endoxifen koncentráció 26%-kal csökkenti az emlőtumor kiújulásának kockázatát egy 1370 beteg bevonásával végzett retrospektív tanulmány szerint. Ugyanezen vizsgálat megállapította, hogy a betegség kiújulására a tamoxifen, a 4-OH-tamoxifen és az N-dezmetil-tamoxifen koncentrációja nincs hatással [41].

A genotípus alapján módosított tamoxifen dózis, amely az IM és PM fenotípusú betegek esetében 20 mg-ról 40 mg-ra emelt napi dózist jelent, mindkét csoportban emelte a mérhető endoxifen koncentrációt a szervezetben. Ez az emelkedés azonban csak az IM fenotípus csoportban volt az extenzív metabolizáló fenotípusúaknál mért értékhez hasonló. A PM csoportban a kimutatható endoxifen koncentráció emelkedés nem volt jelentős [42]. Mindazonáltal a beteg életkorát, a lehetséges gyógyszer interakciókat, szervi diszfunkciót, is figyelembe véve ajánlott a tamoxifen terápia megkezdése előtt a napi dózis megállapításához a genotipizálást elvégezni, hogy a gyógyszer hatását befolyásoló egyéni különbségek hatása mérsékelhető legyen, elkerülve ezáltal a túl alacsony dózis alkalmazásából eredő kockázatokat [43].

2.4. Citokróm P450 2D6 (CYP2D6) gén genetikája

A CYP2D6 enzimet kódoló *CYP2D6* gén a 22-es kromoszóma 22q13.1-13.2 régiójában helyezkedik el két pszeudogénje, a *CYP2D7* és a *CYP2D8* közelében. Ez a fázis I enzim a gyógyszerek mintegy 25%-ának metabolizmusában játszik szerepet (2. Ábra), úgy, mint triciklusos antidepresszánsok (amitriptilin, fluoxetin, nortriptilin), antipszichotikumok (klórpromazin, klozapin, haloperidol, perfenazin, risperidon), opioid analgetikumok (kodein, dihidrokodein, morfin, tramadol), antivirális szerek (efavirenz), antihisztaminok, antiaritmias- (spartein, propafenon) és daganatellenes gyógyszerek (debrizokvin, gefitinib, spartein, tamoxifen) és β -blokkolók (metoprolol, propranolol).



2. ábra Citokróm P450 enzimek relatív hozzájárulása a hepatikus gyógyszermetabolizmushoz [44]

A mai napig több mint 100 allélikus variánst írtak le a *CYP2D6* génben (*1A-*114), melyeket a PharmVar weboldal összegez (<https://www.pharmvar.org/>). Funkciójukat tekintve megkülönböztetünk nem funkcionáló (pl.:*3-*8, *11-*13), csökkent- (*9, *10, *14, *17, *29) normál- (*1, *2) és fokozott funkciójú (*2xN) alléleket, szekvencia és strukturális variánsokat, melyek jelenlétének és eloszlásának köszönhetően az enzimaktivitás figyelemreméltó egyéni és populációs különbségeket mutat. A *CYP2D6* polimorfizmusok ismeretében határozhatjuk meg az egyénre szabott terápiát, mivel ezek alakítják ki a beteg metabolizáló státuszát az alkalmazott szubsztrát gyógyszerekkel kapcsolatban. Négy különböző metabolizáló fenotípust különböztethetünk meg, nevezetesen; az ultrarapid metabolizálókat (UM), a normál vagy extenzív metabolizálókat (EM), az intermedier metabolizálókat (IM) és a gyengén (poor) metabolizálókat (PM).

EM fenotípusú egyének legalább egy funkcionálisan aktív (vad típusú) *CYP2D6* alléllal rendelkeznek, az eredeti szekvencia szerinti teljes, funkcionális fehérjét kódolják, normál gyógyszer választ mutatnak a szubsztrát gyógyszer alkalmazása során. IM fenotípus esetében 2 csökkent funkciójú allél, vagy egy csökkent funkciójú és egy nem funkcionáló allél van jelen, így a metabolizmus kismértékű csökkenése emelkedett hatóanyagszinthez és mérsékelt toxicitáshoz vezethet. Az ilyen genotípussal rendelkezők körében a szokásosnál alacsonyabb dózisban kezdve a gyógyszerelést a mellékhatások kivédhetőek. PM fenotípus esetében 2 nem funkcionáló allél jelenlétéről beszélünk, hiányzik az aktív allél, gyakrabban

kell számolnunk a csökkent metabolizmus miatt emelkedett gyógyszer koncentrációval és toxicitás kialakulásával. Az UM-ek a funkcionálisan aktív gént kettő vagy több kópiában hordozzák génduplikáció eredményeképpen, ezáltal nagyobb mennyiségű enzimet expresszálnak [44].

Míg az aktív gyógyszer normál dózisban adva egy ultragyors metabolizáló (UM) fenotípusú egyénben hatástalan, addig IM és PM fenotípus esetén számolnunk kell a kívántnál magasabb gyógyszer plazma koncentrációval és mellékhatások megjelenésével. Ingelman-Sundberg összefoglaló közleményéből kiderül, hogy a PM fenotípus leginkább Európában jellemző, ultragyors metabolizálók Észak-Afrikában és Óceániában gyakoriak, az IM fenotípus pedig Ázsiában a leggyakoribb [45, 46].

A CYP2D6 fehérje expresszióját döntően befolyásolják a génben előforduló nukleotid variánsok, amelyek közt van aminosav cserét okozó, splicing defektust előidéző, valamint ismeretes deléció és frameshift mutáció egyaránt [47]. A c.1846G>A (rs3892097) a *4 allél meghatározó variánsa, amely az okozott splicing defektus révén nem funkcionáló allélt hoz létre, amely szintén PM fenotípussal asszociált [48, 49]. A homozigóta egyének fokozott toxicitás kockázattal rendelkeznek az enzimaktivitás hiánya miatt [44, 50].

A *CYP2D6* másik fontos variánsa, a c.100C>T (p.Pro34Ser, rs1065852) szintén megváltoztatja a fenotípust, és része mind a nem funkcionáló *CYP2D6**4 allélnak, mind pedig a csökkent aktivitással járó *CYP2D6**10 allélnak [51]. Az ázsiai populációkban a *CYP2D6**10 allél prevalenciája különösen magas (38-50%) [52, 53].

A homozigóta *10/*10 genotípus IM fenotípussal társul, ezért az érintettekben a nem kívánt mellékhatások és a terápia hatástalansága egyaránt gyakori, bár a *CYP2D6**10 alléllal járó reziduális aktivitásnak köszönhetően ezek nem vezetnek olyan súlyos tünetekhez, mint a PM fenotípus esetében [54].

2.5. Citokróm P450 2B6 (CYP2B6) gén genetikája

A citokróm P450 2B6 (CYP2B6) és 2D6 (CYP2D6) enzimek szerepe számos gyógyszer metabolizmusában ismertté vált, nevezetesen több antidepresszáns (pl. anandamid), szorongásoldók (pl. szertralin), opioid fájdalomcsillapítók (pl. metadon), és rákellenes terápiában alkalmazott gyógyszerek (pl. a tamoxifen vagy a ciklofoszfamid) anyagcseréjében [55-58]. Ezen enzimek génjeire jellemző az egyénenkénti eltérő gyógyszer dózist, terápiára adott választ, illetve lehetséges mellékhatásokat befolyásoló genetikai variabilitás [59-61].

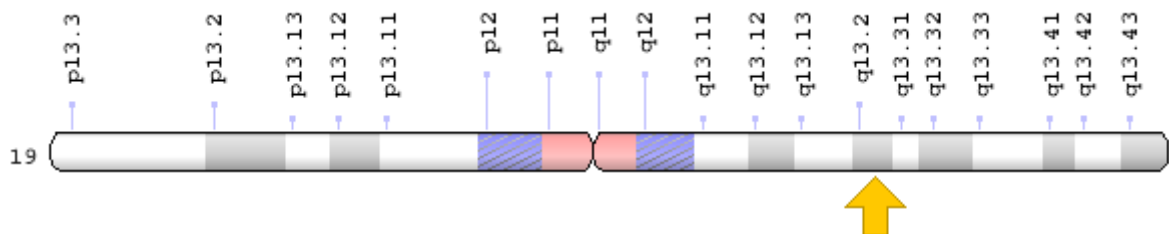
A CYP2B6 enzim a gyógyszerek és xenobiotikumok 3-12%-ának metabolizmusát befolyásolja. A klinikumban használt számos fontos gyógyszert metabolizálja (ciklofoszfamid, bupropion, propofol, metadon, efavirenz), emellett több endogén és környezetből származó szubsztrátja ismert [62]. A CYP2B6 elsődlegesen a májban expresszálódik, a máj összes CYP enzimjének kb. 2-10%-át adja. Jelentős – 20-250-szeres - interindividuális különbséggel jellemezhető [63]. Az enzim expressziójában jelentkező nagy variabilitás különböző faktoroknak köszönhető, úgy, mint genetikai polimorfizmusok jelenléte, társult betegségek, nem, az enzim transzkripcionális indukciója és szupressziója citokinek és más xenobiotikumok által. A májon kívül az agyban is expresszálódik a CYP2B6 enzim, így fontos szerepet tölt be a központi idegrendszer működését befolyásoló gyógyszerek és más vegyületek metabolizmusában és a gyógyszeres kezelés neurológiai mellékhatásainak kialakulásában egyaránt [57]. A CYP2B6 játszik szerepet a fiatalok által gyakran használt kábítószer, az ecstasy (3,4-metiléndiox-metil-amfetamin) biotranszformációjában is, melynek demetilációja vezet a potenciálisan neurotoxikus metabolit kialakulásához. Extrahepatikus expressziójáról továbbá elmondható, hogy kisebb mértékben a bőrben, vesében, légzőszervrendszerben és a gasztrointesztinális traktusban is jelen van, de a CYP2B6 jelentősége e szervek szöveteiben máig ismeretlen. Feltételezhetően különböző környezetből származó toxinok, pl. peszticidek ellen nyújt védelmet [59]. Több gyógyszer, mely a CYP2B6-on keresztül metabolizálódik, egyben indukálja is annak expresszióját PXR (pregnane X receptor) és CAR (constitutive androstane receptor) receptorokon keresztül. Korábbi tanulmányok számolnak be arról, hogy az enzim májban történő expressziójának nemenkénti eloszlása is fontos különbségeket mutat. Lamba és munkatársainak egy 2003-as tanulmánya szerint a nőkben mért CYP2B6 mRNS (3,9-szeres), fehérje (1,7-szeres) és enzimaktivitás (1,6-szoros) szintje is emelkedett volt a férfiakéhoz képest [64]. Az enzimet kódoló *CYP2B6* gén a 19-es kromoszóma 19q13.2 régiójában található (3. Ábra). A humán *CYP2B6* gén funkcionális, vad típusú alléljában (*CYP2B6*1*)

több egy pontos nukleotid polimorfizmusról (SNP) és splice variánsról tudjuk, hogy az mRNS funkció és a protein expresszió befolyásolása révén csökkent enzimaktivitást okoz. [59, 63, 65]. A *CYP2B6* c.516G>T (p.Gln172His, rs3745274) polimorfizmus a gén 4-es exonjában található, és egy glutamin aminosav hisztidinre történő cseréjét okozza a 172-es pozícióban [66].

Ez az SNP felelős az eltérő splicingért, ami a *CYP2B6* csökkent expresszióját és funkcióját okozhatja [65]. Korábban megjelent tanulmányok szerzői szerint a gyakori *6 allél két nem-szinoním variánsa (c.516G>T, p.Gln172His és a c.785A>G, p.Lys262Arg) csökkent fehérje expresszióhoz vezet, továbbá az 1-es splice variánssal (SV1), amelyre a 4-6 exonok hiánya jellemző, szoros asszociációt mutat [65, 67].

A *CYP2B6**6 allél klinikai jelentősége a cyclophosphamid és efavirenz terápiában bizonyított [68, 69].

A különböző etnikai csoportokban a *6 allél előfordulási gyakoriságára nézve meglehetősen eltérő adatok állnak rendelkezésre, frekvenciája 15% és 60% közé esik [59].



3. ábra A *CYP2B6* gén kromoszómális pozíciója

(<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CYP2B6>)

A csökkent enzimaktivitást előidéző polimorfizmusok kívül ismert továbbá a *CYP2B6**22 allélt meghatározó g.-82T>C (rs34223104) gain-of-function variáns, mely a *CYP2B6* gén promóter régiójában, a TATA boxban helyezkedik el és fokozott *in vivo* enzimaktivitással és fokozott *in vitro* transzkripcióval jellemezhető [70].

2.6. Citokróm P450 2C19 (CYP2C19) gén genetikája

A citokróm P450 2C19 (CYP2C19) enzim hatással van a klopidozregel (a vérlemezkék ellen ható, vérrögzépződést gátló gyógyszer), az omeprazol (protonpumpa gátló gyógyszer), a legtöbb antiepileptikum, mint a mefenitoin, bizonyos antidepresszánsok és a malária ellen alkalmazott proguanil metabolizmusára [71].

A *CYP2C19* génben több mint 20 szekvencia variáns ismert, amelyekről a Pharmacogene Variation Consortium (PharmVar) honlapján (<https://www.pharmvar.org/>) található részletes információ. Az ezen variánsok által okozott, az enzim aktivitását befolyásoló egyéni különbségek alapján a populáció három csoportra osztható. Ezek az extenzív metabolizálók (extensive metabolizer, EM), az intermediér (intermediate metabolizer, IM) és a gyengén metabolizálók (poor metabolizer, PM).

A PM fenotípus túlzott terápiás hatásra és nem kívánt mellékhatások kialakulására hajlamosít abban az esetben is, ha a normál dózishoz megfelelő mennyiségű hatóanyag kerül az érintett szervezetébe. A CPIC (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium) érvényben lévő ajánlása és a szakirodalmi adatok szerint a genotipizálás alapján CYP2C19 PM csoportba tartozóként azonosított személy esetében más hatóanyag alkalmazása szükséges, amennyiben ennek nincs klinikai kontraindikációja [72-75].

A *CYP2C19* génben található két legfontosabb polimorfizmus, amelyek az enzim aktivitására gyakorolt hatásuk révén a gyógyszer hatásáért és a toxicitásért felelős intra- és interindividuális különbségekkel kapcsolatba hozhatók, a *CYP2C19* c.681G>A és a *CYP2C19* c.636G>A. Az előbbi variáns egy, a splicing folyamat során fellépő defektust okoz, amely korai stop kodon kialakulásához, ezáltal pedig csonka, nem működő fehérje képződéséhez vezet [76]. Ez az SNP felel meg a *CYP2C19**2 allélnak. A c.636G>A báziscsere a cDNS-ben korai terminációs kodont hoz létre. Ez az SNP a meghatározó a *CYP2C19**3 allélban. A klopidozregelre vonatkozó CPIC ajánlás, a European Medicines Agency (EMA) által előírt beteg tájékoztató, valamint néhány, az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerbiztonsági Hivatal (FDA) által javasolt gyógyszer tájékoztató (pl. a klopidozregel, a prasugrel, a diazepam, az ezomeprazol, a lansoprazol, az omeprazol, valamint a citalopram nevű gyógyszereket illetően) tartalmazzák a klinikailag releváns funkcióvesztéssel járó allélokra és a PM fenotípusúakra vonatkozó farmakogenetikai információkat, amelyek a kezelésre adott csökkent- vagy gyengébb válaszreakcióval asszociáltak. Ezen adatok a www.fda.gov oldalon mindenki számára elérhetőek [72, 73, 75].

A funkciószertő allélek azonban, mint pl. a *CYP2C19*17*, nem kerülnek említésre a jelenleg érvényben lévő gyógyszer tájékoztatókban, mivel a fenotípusra gyakorolt hatásuk megítéléséhez egyelőre nem áll rendelkezésre elegendő klinikai információ. A jövőben ezekre valószínűleg jóval nagyobb figyelmet kell majd fordítani.

A *CYP2C19* gén fent említett két leggyakoribb funkcióvesztéssel járó allélja a különböző vizsgált etnikumokban eltérő gyakorisággal fordul elő. Az „1000 Genom Projekt” adatai szerint a *CYP2C19*2* allél frekvenciája a különböző populációkban és rasszokban széles tartományban mozog: 0,133 az Utah állambeli, észak- és nyugat-európai származású lakosság (CEU) körében, 0,308 a Pekingben élő „Han Chinese” kínaiakban és a Tokióban élő japánokban (CHB+JPT), 0,169 Nigériában (YRI, Yoruba in Ibadan, Nigeria). A *CYP2C19*3* allél gyakorisága 0,058 a vizsgált kínai és japán (CHB+JPT) populációkban. A HapMap projekt allélfrekvencia-adatai a *CYP2C19*2*-re vonatkozóan a következők: CEU 0.155, CHB 0.256, JPT 0.284, YRI 0.144 (www.ensembl.org). A *CYP2C19*2* és a *CYP2C19*3* allélek frekvenciája magasabb az ázsiai populációkban, mint a kaukázusiak, a feketék vagy a spanyol populáció esetében. Fontos kiemelni a csendes óceáni (Pacific Islander) szigetek, Pápua Új-Guinea és Vanuatu populációit, ahol a *2 és *3 allélek igen nagy gyakorisága komoly klinikai jelentőséggel bír a malária profilaxisban, amely során a proguanil nevű gyógyszert használják, amely szintén a *CYP2C19* szubsztrátja. A két funkcióvesztő allél, a *CYP2C19*2* és a *CYP2C19*3* található meg az ázsiai populációk PM fenotípusú tagjainak 99%-ában, és a fehér (kaukázusi) PM egyének mintegy 87%-ában. Mindazonáltal a PM fenotípus a kaukázusiak és afrikaiak 2-5%-ára, valamint a kelet-ázsiai populációk 10-23%-ára jellemző.

Tekintettel a *CYP2C19* gén óriási klinikai jelentőségére, egy 429 Amish személy bevonásával elvégzett teljes genomot átfogó asszociációs tanulmány (GWAS) megerősítette, hogy *CYP2C19*2* funkcióvesztő variáns jelenléte a klopidozrel kezelésre adott csökkent vérlemezke válasszal és rosszabb kardiovaszkuláris kimenettel társul. Ennek megfelelően a *CYP2C19* csökkent funkcióval járó alléljainak jelentőségét a klinikai farmakogenetikában alátámasztja az a tény, hogy az FDA néhány *CYP2C19* szubsztrát esetében farmakogenetikai adatokon alapuló ajánlást tett közzé a gyógyszer adandó dóziséra vonatkozóan. Erről a – fentebb már említett – www.fda.gov oldalon tájékozódhatnak az érintettek. Az FDA-hoz hasonlóan az Európai Kardiológiai Társaság és az EMA a PM fenotípussal asszociált *CYP2C19* genotípusra vonatkozó információt tüntet fel a klopidozrelhez mellékelt gyógyszer tájékoztatóban 2010 márciusától.

A *CYP2C19* gén klinikai jelentőségének vizsgálata szempontjából nem csupán az érintettek genotipizálása fontos, hanem az is, hogy variánsainak gyakoriságát eltérő etnikai

csoportok reprezentatív populációs mintáiban meghatározzuk. A szakirodalom tanulmányozása révén megállapítható, hogy a gyakori *CYP2C19* allél variánsok prevalenciája a világszerte elterjedt roma populációkban nem ismeretes.

2.7. A roma populáció: történelmi, genetikai perspektíva

A roma népcsoport megjelenése Európában mintegy 900-1100 évvel ezelőttre tehető, amikor vándorlásaik során a Bizánci Birodalomba jutottak el. Az európai országok területén napjainkban élő roma népességet a Balkán területéről Nyugat-Európa felé történt korai roma migráció során érkezők leszármazottai alkotják. Bevándorlásuk a 15. századig tartott, amelyet később három nagyobb hullám követett: az első a 19. század végén, a romániai rabszolga felszabadítást követő időszakban, a második az 1960-as, 1970-es évek során az akkori Jugoszlávia felől, a harmadik pedig mintegy másfél-két évtizede, a kelet-európai gazdasági és politikai változások következtében.

A roma populáció méretét jelenleg 12-15 millió főre becsülik a világon. Közülük 10-12 millió él Európában, 70%-uk Közép- és Dél-Kelet Európában. Magyarország a 700 000-1 millió fővel Európa negyedik legnagyobb roma népességének ad otthont [77]. A magyarországi romák megyénkénti eloszlását a 4. ábra szemlélteti. A népcsoport az eddig rendelkezésre álló adatok alapján Észak-Nyugat Indiából származik [78, 79]. Írott történelem híján az eredetükre és migrációjukra vonatkozó elméletek a legendáikon, a nyelvi és kulturális antropológiai kutatási eredményeken alapulnak. A roma etnikum Európa meglehetősen alacsony szocio-ökónómiai státusszal rendelkező csoportja, körükben a képzettség, és ennek megfelelően a foglalkoztatottak aránya is alacsony. A várható élettartam mintegy tíz évvel marad el a közép- és kelet-európai populációkhoz mérten [79]. A halálozási arány magasabb az európai átlaghoz képest, különösen az újszülöttek között (az európai átlag négyszerese), a krónikus betegségek (kardiovaszkuláris betegségek, daganatos megbetegedések, asztma), pszichológiai problémák és a depresszió szintén gyakoribbak [80].

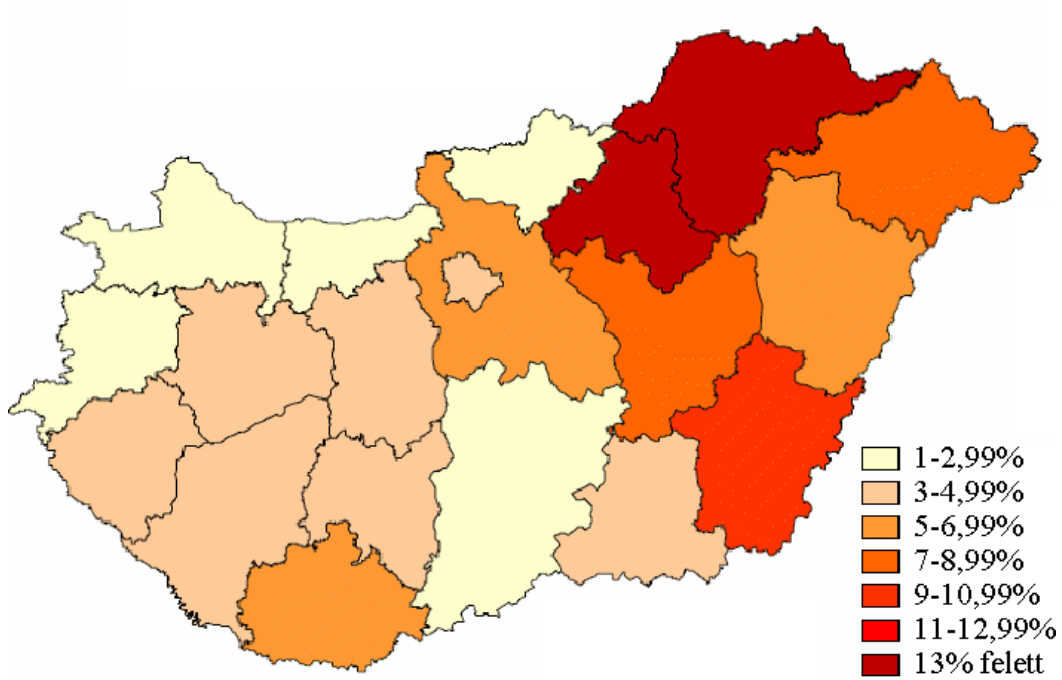
Az európai populáció és az itt élő roma népcsoport esetében eltérő epidemiológiai adatok ismertek pl. egyes pszichiátriai kórképek, a Parkinson betegség, vagy a sclerosis multiplex prevalenciájára vonatkozóan is. A roma népességre irányuló populációgenetikai kutatások az európai populációtól való genetikai különbözőségüket támasztották alá. Ugyanakkor egyértelműen kiderült az is, hogy a Balkán félszigeten élő romák között a legnagyobb a szociális és kulturális diverzitás, számos roma csoport él jól definiálható társadalmi határok között, amit a csoportokon belül észlelhető endogámia és saját nyelvjárás

is erősít, illetve fenntart. Az egyes roma csoportok közötti genetikai távolság jóval nagyobb is lehet, mint az európai populáció és a roma népesség között [78]. Egyes founder mutációkra irányuló orvosi genetikai kutatások eredménye rámutatott, hogy egy-egy mutáció jelen lehet társadalmilag elhatárolt, földrajzi szempontból is távol élő roma csoportokban, míg az egymás közelében (akár azonos településen) élő csoportok is jelentősen eltérő gén frekvencia adatokat mutathatnak. Ez is eltérő vonás más európai populációkhoz képest, amelyek genetikai struktúrája szempontjából a földrajzi távolság a meghatározó elem, még a nyelvi és kulturális jellemzőkhöz viszonyítva is.

David Gresham és munkatársai (2001) a roma populáció 14 csoportjában vizsgált mitokondriális DNS és Y kromoszóma markereket a női, illetve férfiágon öröklődő haplocsoportok megállapítása céljából. Mind az Y kromoszómán, mind a mitokondriális DNS-ben ázsiai eredetre utaló (VI-68, illetve M jelű) haplocsoportokat mutattak ki, amelyek mind a 14 vizsgált csoportra jellemzőek voltak (a férfiak 44,8%-ában, illetve a nők 26,5%-ában voltak kimutathatók). Az eredmények az indiai szubkontinens egyetlen populációjától különvált, kis létszámú alapító csoportra engednek következtetni [77].

A romák vándorlása Európán belül három fő irányt követett: a többség az Oszmán Birodalom balkáni provinciáiban telepedett le, a második legnépesebb csoport Havasalföld és Moldávia területén, a Dunától északra, a mai Románia területén. A Nyugat-Európából ismert korai történelmi beszámolók egy kis létszámú, 50-300 főnyi bevándorló csoportra utalnak. A ma ismert genetikai struktúra a korán különvált, majd Európában eltérő irányban vándorló roma csoportokat tükrözi. Az egyes populációk ma észlelhető eltéréseihez a random genetikai drift mellett a környező népcsoportokkal történő keveredés járult hozzá.

Morar és munkatársai (2004) a roma populáció reprezentatív mintáin öt olyan betegség lókuszt vizsgáltak el, amelyekről korábbi tanulmányok igazolták a roma populációra jellemző founder mutációk jelenlétét [81-85]. A mutáció analízis magas hordozó arányt mutatott: nyolc vizsgált személy közül egy heterozigóta volt valamelyik mutációra nézve, az egyes csoportokon belül pedig 5%-ot meghaladó hordozó rátát észleltek. Ezek az arányok az ashkenazi zsidó populációra jellemző leggyakoribb mutációk adatainak feleltek meg [86, 87]. A Morar és munkatársai által választott egyik mutáció a congenitalis myasthenia szindrómát (CMS, MIM 254210) okozó 1267delG variáns volt, amely a roma és az indiai/pakisztáni populáció között eddig kimutatott legszorosabb kapcsolat, amely az indiai származás egyik legerősebb bizonyítéka egyben [88].



4. ábra *A romák megyénkénti aránya Magyarországon 2003-ban [89]*

3. Célkitűzések

Munkám fő célkitűzése a tamoxifen terápiát befolyásoló citokróm P450 enzimcsalád három génjében előforduló öt, farmakogenetikai szempontból fontos variánsának a genetikai vizsgálata roma és magyar populációban annak tanulmányozása céljából, hogy mutatkoznak-e olyan jelentős genetikai különbségek a két népcsoport között, melyek a tamoxifen kezelésre adott terápiás választ befolyásolhatják.

1. Vizsgálataink célja volt egyrészt a *CYP2D6* gén rs1065852 és rs3892097 variánsok előfordulási gyakoriságának megállapítása roma és a magyar populációs mintákban.
2. További célunk a *CYP2D6* gén vizsgált polimorfizmusai által meghatározott fenotípusok eloszlásainak meghatározása volt roma és magyar populációban.
3. Vizsgálni kívántuk továbbá a *CYP2B6* gén csökkent expressziójáért felelős rs3745274 variáns allélfrekvenciáját a rendelkezésre álló roma és magyar etnikumból származó mintákban.
4. Célunk volt továbbá a *CYP2C19* gén két variánsának (rs4244285 és rs4986893) és az általuk meghatározott allélok (*CYP2C19**2, *CYP2C19**3) gyakoriságának a vizsgálata.
5. Célul tűztük ki a kapott *CYP2C19* genotípus adatok alapján a várható fenotípusok eloszlásának a meghatározását a roma és magyar populációkban.
6. Célunk volt végezetül, hogy a *CYP2D6*, *CYP2B6* és *CYP2C19* gének vizsgált polimorfizmusai kapott allélfrekvencia értékeket összehasonlítsuk más, a szakirodalomban leírt populációs adatokkal, különös tekintettel az indiai és a kaukázusi populációkra.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Vizsgált populációk

Vizsgálatainkat tekintve magyarországi magyar és roma személyek DNS mintájával dolgoztunk. Valamennyi minta a Pécsi Tudományegyetem központi biobankjából származott, amely a Páneurópai nemzetközi biobankhálózat (BBMRI; Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure) része. A vizsgálatainkban résztvevő egészséges személyek előzetes tájékoztatást követően valamennyien beleegyezésüket adták a vizsgálatok elvégzéséhez. A minták gyűjtésében és tárolásában az 1975-ben Orvos-világszövetség Helsinki deklarációjában megfogalmazott etikai alapelvek voltak irányadók, a biobank fenntartásában és vezetésében az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT-TUKEB) által jóváhagyott elveket követtük (ÁNTSZ engedély száma: 666-34/2009).

Kutatásunk összesen 3 citokróm P450 gén (*CYP2C19*, *CYP2B6*, *CYP2D6*) 5 funkcionálisan jelentős polimorfizmusának vizsgálatára terjedt ki. A *CYP2B6* gén c.516G>T (rs3745274; p.Gln172His) és a *CYP2D6* gén c.100C>T (rs1065852; p.Pro34Ser) és c.1846G>A (rs3892097) polimorfizmusokat illetően 426 roma (151 férfi, 275 nő; átlag életkor 43,3±10 év) és 431 magyar személy (248 férfi, 183 nő; átlag életkor 37,6±13 év) DNS mintája került genotipizálásra.

A *CYP2C19* gén *CYP2C19**2 (rs4244285; c.681G>A; p.Pro227Pro) és *CYP2C19**3 (rs4986893; c.636G>A; p.Trp212Ter) variánsai kapcsán 370 magyar (176 férfi; 194 nő, átlag életkor 50±19 év) és 500 roma (178 férfi; 322 nő, átlag életkor 39±16 év) DNS mintáját vizsgáltuk.

4.2. Molekuláris módszerek

DNS izolálás

A DNS-izolálást EDTA-val alvadásgátolt vérmintákból végeztük az alább részletezett kisózásos technika segítségével. A vérminták 4°C-os RBC lízis pufferrel lettek kiegészítve 50 mL-es térfogatra centrifugacsőben, melyet 30 perces jeges inkubáció követett, közben 4-5-ször lettek megforgatva. Ezután 30 perces centrifugálás (5000 rpm, 4°C), majd a felülúszó gondos eltávolítása következett. A térfogatot ismét kiegészítettük lízis pufferrel és a fenti folyamatot még 4 alkalommal megismételtük. Az utolsó lépésnél 5 ml SE puffert (pH=8, 4,39g NaCl + 8,41g Na-EDTA), 25 µl proteináz-K-t (10mg/ml) és 500 µl 10%-os SDS-t adtunk az üledékhez, majd vortexelést követően 37°C hőmérsékleten egy éjszakán át 200 rpm-en rázógépen inkubáltuk a mintákat. Másnap kiegészítettük az oldatot 3 ml telített nátrium-klorid-oldattal (6 M), majd 15 másodpercig tartó vortexelést követően 15 percig 3000 rpm-en centrifugáltuk. Majd a DNS-t tartalmazó felülúszót egy másik 50 ml térfogatú csőbe óvatosan átöntöttük és 40 ml térfogatra kiegészítettük 96%-os etanollal, majd 5-10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, amíg a DNS ki nem csapódott. A kivált DNS-t egy Eppendorf-csőbe helyeztük, majd 200 ml 70%-os etanolt adtunk hozzá és 20 percig inkubáltuk, később az etanolt eltávolítottuk. Ezt követően a DNS-t 30 percig száradni hagytuk szobahőmérsékleten, majd hozzáadtunk 500 ml TE puffer oldatot (pH=8, 0,78 g Tris-HCl + 0.14 EDTA) a DNS-hez és egy éjszakán át 37°C-os hőmérsékleten inkubáltuk, így lehetővé tettük a DNS teljes beoldódását.

PCR

A rutin kisózásos módszerrel extrahált genomi DNS vizsgálni kívánt, target szakaszát első lépésben polimeráz láncreakcióval (Polymerase Chain Reaction; PCR) amplifikáltuk. A PCR reakció 50 µl-es végtérfogatban történt. A PCR-t minden esetben saját tervezésű, szekvencia-specifikus oligonukleotidokkal - forward és reverse primerrel – végeztük. Az egyes vizsgálatokhoz használt primerek szekvenciáit az **1. Táblázat** foglalja össze.

A *CYP2C19*2* (rs4244285) és *CYP2C19*3* (rs4986893) SNP-k PCR amplifikációja a következő kondíciók mellett zajlott, MJ Research PTC 200 thermal cycler PCR készülékkel: elődenaturáció 2 min 96°C-on, ezt követte 35 cikluson keresztül 30 s denaturálás 95°C-on,

primerkötődés 30 s 60°C-on (*CYP2C19*; rs4244285) és 54°C-on (*CYP2C19*; rs4986893) ez után a primer extenzió 30 s 72°C-on, melyet 5 perc végső lánchosszabbítás követett 72°C-on. A keletkezett PCR termékek detektálása gélelektroforézissel (2%-os agaróz gélben), etídium-bromidos festéssel és UV megvilágítással történt.

1. táblázat A *CYP2C19* polimorfizmusainak vizsgálatához alkalmazott primer szekvenciák

Gén	Allél	SNP	Primerek (5'-3')
<i>CYP2C19</i>	*2	rs4244285	Forward: AATTTTCCCACTATCATTGATTATTTCTC
			Reverse: TCTGTTCATATCCTTCACTCACTTTTT
	*3	rs4986893	Forward: ATTGTTTCCAATCATTTAGCTTCAC
			Reverse: ACTTCAGGGCTTGGTCAATA

RFLP

A *CYP2C19* rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19**2) és rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19**3) polimorfizmusok genotípusainak meghatározásához restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) módszert használtunk. A vizsgálatok során alkalmazott restrikciós endonukleázok, hasítási mintázatuk és a hozzátartozó genotípusok a **2. táblázat**ban kerültek feltüntetésre. Az emésztést követően a PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk szét. A genotípusok elkülönítése 3%-os agaróz gélben etídium-bromid festéssel, UV megvilágítással történt DNS létra mellett.

2. táblázat *CYP2C19*2 és CYP2C19*3 SNP-k vizsgálatához használt restrikciós endonukleázok és hasítási mintázatuk*

Gén	Allél	PCR termék (bp)	Endonukleáz	Fragmenthossz (bp)	Genotípus
<i>CYP2C19</i>	*2	530	HpyF3I (DdeI)	187, 343	G/G
				27, 160, 187, 343	G/A
				27, 160, 343	A/A
	*3	269	BamHI	96, 173	G/G
				96, 173, 269	G/A
				269	A/A

Real-time PCR

A *CYP2B6* c.516G>T, *CYP2D6* c.100C>T és c.1846G>A polimorfizmusokat real-time polimeráz lánreakció (RT-PCR) módszerrel vizsgáltuk. Minden esetben TaqMan Drug Metabolism Genotyping RT-PCR Assayt (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) alkalmaztunk a használati utasítás szerint. A PCR amplifikáció a három SNP esetén Chromo4 Real-Time PCR Detectorral (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) valósult meg a következő kondíciók szerint: inkubáció 30 s 95°C-on, majd 40 cikluson keresztül; denaturáció 10 s 95°C-on, annealing és primer extenzió 30 s 60°C-on. A genotípusok elemzéséhez MJ Opticon Monitor Analysis Software v3.1-et használtunk. A real-time PCR-ral vizsgált variánsokat és a gyári TaqMan próbákat a **3. táblázat** foglalja össze.

3. táblázat *A CYP2B6 és CYP2D6 polimorfizmusok genotipizálásához használt TaqMan RT-PCR próbák*

Gén	Variáns	SNP	TaqMan
<i>CYP2B6</i>	c.516G>T	rs3745274	[C_7817765_60]
<i>CYP2D6</i>	c.100C>T	rs1065852	[C_11484460_40]
	c.1846G>A	rs3892097	[C_27102431_D0]

Sanger-szekvenálás

Az általunk tervezett PCR-RFLP és RT-PCR módszerek specificitására, és eredményeink confirmálására mintáinkon random módon végeztünk Sanger-féle bidirekcionális szekvenálást BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing kit alkalmazásával, ABI 3500 Genetic Analyser szekvenátor segítségével.

4.3. Statisztikai elemzés

A két populációban vizsgált genetikai variánsok allélfrekvenciái között fennálló összefüggések feltárására χ^2 -tesztet alkalmaztunk SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 20.0 programcsalád felhasználásával, a szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél állapítottuk meg.

5. Eredmények

5.1. A CYP2D6 gén vizsgálata

A vizsgált *CYP2D6* allélok gyakorisága és genotípus aránya Hardy-Weinberg egyensúlyt mutatott mindkét népcsoportban. Az elemzett *CYP2D6* gén variánsainak frekvencia adatait a **4. és 5. táblázat** tartalmazza.

A roma és magyar csoportok adatait összehasonlítva fény derült arra, hogy a roma populációs mintákban mindkét *CYP2D6* variáns vizsgálatakor szignifikánsan magasabb variáns allél frekvenciát találtunk a magyarokhoz képest. A *CYP2D6* 100T minor allél frekvencia 26,6% volt a romák esetében, míg 20,5% a magyar mintákban ($p=0,003$). Hasonló eredményt kaptunk, amikor a két népcsoportot a *CYP2D6* c.1864G>A polimorfizmus szempontjából hasonlítottuk össze. Nagyobb gyakorisággal volt jelen a variáns 1864A allél a roma mintákban, a magyar mintákhoz képest (22,5% vs. 18,1%, $p=0,022$). A *CYP2D6* polimorfizmusokat illetően ugyancsak szignifikánsan nagyobb ($p=0,017$) prevalenciát állapítottunk meg a c.100C>T variáns TT homozigóta genotípusára vonatkozóan a roma populációban, mint a magyarok esetében (10,8%, illetve 6,3%). Ezzel szemben a c.1846G>A polimorfizmus AA homozigóta genotípusának aránya alacsonyabb volt a roma mintákban, mint a magyar populációban (4,2% vs. 5,3%, $p=0,446$).

A *CYP2D6* genotípusokat és ezzel összefüggésben a várható fenotípusokat a **6. táblázat** foglalja össze. A roma népcsoport tagjaiban a következő *CYP2D6* genotípusokat azonosítottuk a zárójelben feltüntetett előfordulási gyakorisággal: *1/*1 (55,4%), *1/*4 (2,1%), *1/*10 (3,1%), *4/*10 (38,7%), *10/*10 (0,7%). A *4/*4 genotípus viszont nem volt kimutatható. A magyar minták genotípusai: *1/*1 (62,6%), *1/*4 (1,6%), *1/*10 (5,1%), *4/*10 (28,3%), *10/*10 (1,4%) és *4/*4 (0,9%).

4. táblázat A CYP2D6 c.100C>T polimorfizmus genotípus és minor allél frekvenciája

CYP2D6 c.100C>T	Roma minták n=426 (%)	Magyar minták n=431 (%)
CC	245 (57,5)	281 (65,2)
CT	135 (31,7)	123 (28,5)
TT	46 (10,8)*	27 (6,3)
T allél frekvencia	26,6 %*	20,5%

*p<0.05 vs magyar populáció

5. táblázat A CYP2D6 c.1846G>A polimorfizmu genotípus és minor allél frekvenciája

CYP2D6 c.1846G>A	Roma minták n=426 (%)	Magyar minták n=431 (%)
GG	252 (59,2)	298 (69,1)
GA	156 (36,6)	110 (25,5)
AA	18 (4,2)	23 (5,3)
A allél frekvencia	22,5%*	18,1%

*p<0.05 vs magyar populáció

6. táblázat A CYP2D6 genotípusok és a várható fenotípusok frekvenciája

Fenotípusok	Genotípusok	Genotípus frekvencia	
		Roma minták n=426 (%)	Magyar minták n=431 (%)
EM	*1/*1	236 (55,4)	270 (62,6)
	*1/*10	13 (3,1)	22 (5,1)
IM	*10/*10	3 (0,7)	6 (1,4)
	*1/*4	9 (2,1)	7 (1,6)
	*4/*10	165 (38,7)	122 (28,3)
PM	*4/*4	-	4 (0,9)

EM, extenzív metabolizáló; IM, intermedier metabolizáló; PM, gyengén metabolizáló

5.2. CYP2B6 gén vizsgálata

A vizsgált *CYP2B6* allélok frekvenciája és genotípus aránya Hardy-Weinberg egyensúlyt mutatott mind a magyar, mind a roma népcsoportban. Az elemzett citokróm P450 gén variáns frekvencia adatait a **7. táblázat** tartalmazza.

A *CYP2B6* c.516G>T variánst illetően a T allél frekvenciája szignifikánsan nagyobbak bizonyult a roma mintákban, mint a magyar populációs mintákban (33,6%, illetve 21,4%, $p<0.001$). A minor allélt homozigóta formában hordozók genotípus frekvenciája szignifikánsan magasabb volt a roma résztvevők esetében (9,9%) összevetve a magyarok adataival (5,6%) ($p=0,018$).

7. táblázat A *CYP2B6* vizsgált polimorfizmusának genotípus- és minor allél frekvenciája.

<i>CYP2B6</i> c.516G>T	Roma minták n=426 (%)	Magyar minták n=431 (%)
GG	182 (42,7)	271 (62,9)
GT	202 (47,4)	136 (31,6)
TT	42 (9,9)*	24 (5,6)
T allél frekvencia	33,6 % *	21,4 %

* $p<0,05$ vs magyar populáció

5.3. CYP2C19 gén vizsgálata

A roma és magyar populációban kapott *CYP2C19* c.681G>A polimorfizmus genotípus- és allélfrekvencia értékek eloszlását a **8. táblázat** tartalmazza. Mind az allél és mind a genotípus frekvencia adatok Hardy-Weinberg egyensúlyt mutattak a roma és a magyar populációban egyaránt. Az általunk vizsgált roma és magyar populációban senki sem hordozta a *CYP2C19* c.636G>A SNP-t (*CYP2C19**3 allélt).

8. táblázat A *CYP2C19**2 polimorfizmus genotípus- és allélfrekvencia eloszlásainak összehasonlítása egészséges magyar és roma populációs mintákban

CYP2C19 polimorfizmus	Genotípus	Roma n=500 (%)	Magyar n=370 (%)	p
<i>CYP2C19</i> *2	GG	318 (63,6)	281 (75,9)	<0,001
(c.681G>A)	GA	159 (31,8)	85 (23,0)	0,004
(Pro227Pro)	AA	23 (4,6)	4 (1,1)	0,003
	GA+AA	182 (36,4)	89 (24,1)	<0,001
	A allélfrekvencia	20,5	12,6	<0,001

Összehasonlítva a roma és magyar populációt szignifikáns különbséget találtunk a *CYP2C19* 681 variáns genotípus frekvenciáiban: a GG genotípus előfordulása 63,6% volt a roma és 75,9% a magyar populációban, a GA genotípus 31,8%-ban fordult elő a roma és 23,0%-ban a magyar populációban, a homozigóta mutáns AA genotípus 4,6%-ban volt jelen a roma és 1,1%-ban a magyar populációban, a GA+AA genotípusok együttes előfordulása 36,4% volt a roma és 24,1% a magyar mintákban. További szignifikáns eltérést észleltünk a variáns 681A allél frekvenciájában a roma és magyar populáció között (20,5% vs. 12,5%, $p<0,004$).

Ezt követően összehasonlítottuk a *CYP2C19* allél-, genotípus- és a várható fenotípus frekvenciákat az általunk vizsgált két populációban és a kapott adatokat összehasonlítottuk az irodalomban közzétett egyéb etnikai népcsoportok adataival (**11. Táblázat**). Meglepő különbségeket találtunk a roma és magyar populációkban a *CYP2C19**1 és *CYP2C19**2 allélok eloszlásában. Míg a roma populációban a *CYP2C19**1 allél előfordulása 79,5% volt, addig a magyar populációban 87,4%, ezzel szemben a *CYP2C19**2 allél előfordulása a roma populációban 20,5% a magyar populációban 12,6% értéket mutatott $p<0,001$ szignifikancia szint mellett.

A leggyakrabban előforduló *CYP2C19* genotípus a magyar és a roma populációban egyaránt a vad típusú *1/*1 volt, ami várhatóan az EM fenotípust határozza meg. Ezen genotípus előfordulása 63,6% volt a roma és 75,9% a magyar populációban ($p<0,001$). Az IM fenotípust meghatározó *1/*2 genotípus frekvenciája szignifikánsabban magasabb volt a roma populációban (31,8%) a magyar populációhoz viszonyítva (23,0%). A PM fenotípust meghatározó *2/*2 genotípus előfordulása 4,6% a roma és 1,1% a magyar populációs mintákban. A *1/*3, *2/*3 és a *3/*3 genotípusok nem fordultak elő az általunk vizsgált roma és magyar minták egyikében sem.

Vizsgálataink egyik fontos felismerése, hogy a genotípus adatoknak megfelelően a várható PM fenotípus előfordulása a roma populációban négyszer gyakoribb volt, mint a magyar populációban. Továbbá a várható IM fenotípus is szignifikánsan gyakrabban fordult elő a roma mintákban a magyarokhoz viszonyítva.

6. Eredmények megbeszélése és következtetések

6.1. CYP2B6 és CYP2D6 gén

Számos gyógyszer a citokróm P450 enzimeken keresztül metabolizálódik. Az etnikai hovatartozás, a genetikai és környezeti faktorok egyaránt hozzájárulnak a gyógyszer metabolizmusban és a terápiára adott válaszban megfigyelt egyénekenkénti variabilitáshoz [62, 90, 91]. Az enzimrendszer két tagjának génjei, a *CYP2B6* és *CYP2D6* alléljai jelentősen különböző eloszlást mutatnak az egyes etnikumok között [60, 92].

A különböző populációk genotípus profilja meghatározó az igényelt gyógyszer dózis szempontjából. A *CYP2B6* és *CYP2D6* gének polimorfizmusainak jelenléte klinikai jelentőséggel bír azon személyekben, akik szűk terápiás indexű gyógyszereket szednek, mint pl. a ciklofoszfamid vagy a tamoxifen [52, 58, 93, 94].

A *CYP2B6* génben található c.516G>T variáns a felelős egy splicing defektusért, amely csökkent *CYP2B6* expressziót okoz, ezáltal a ciklofoszfamid nagyobb clearance-éhez és rövidebb fél-életidejéhez vezet [92, 95]. A vizsgált roma és magyar minták között szignifikáns különbséget találtam az *516T* allél gyakorisága és a TT homozigóta genotípus tekintetében. A *CYP2B6* gén c.516G>T variánsának előfordulása sokkal gyakoribb a roma csoportban, mint a magyarok között, így közöttük nagyobb a valószínűsége az eltérő splicingnak, a csökkent enzim aktivitásnak és a mellékhatások kialakulásának a gyengébb *CYP2B6*-mediálta gyógyszer metabolizmus következtében. A roma populáción belül a homozigóta *CYP2B6 516TT* genotípus frekvenciája 9,9%-nak bizonyult. Más népcsoportok adatai közül a kenyai populációé áll ehhez a legközelebb (10,1%), ami alacsonyabb, mint az afrikai és amerikai származásúaké, azonban háromszorosa a kelet-ázsiai népcsoportokénak (3,5%) (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=19:4151234-41513341;v=rs3745274;vdb=variation;vf=2821587). A magyar minták elemzésével nyert *CYP2B6 516T* allél frekvencia (21,4%) a más európai populációkban (német, spanyol, svájci és brit) ismert prevalenciához képest alacsonyabb. A roma népcsoportban ez a prevalencia alacsonyabb az Indiában élő népességhez viszonyítva (**10. Táblázat**) [96, 97].

9. táblázat A roma és magyar CYP2D6 *4 és *10 allél frekvencia adatok összehasonlítása korábban publikált adatokkal

Populáció	n	CYP2D6		Referenciák
		*4 (%)	*10 (%)	
Roma	426	22,5	26,6	Jelen tanulmány
Magyar	431	18,1	20,5	Jelen tanulmány
Tamil	106	6,6	20,3	[98]
Tamil	30	6,7	35,0	[51]
Maláj Indiai	86	8,0	15,0	[99]
Maláj	107	2,8	49,5	[100]
Szingaléz	30	21,7	40,0	[51]
Dél-Indiai	447	7,3	10,2	[101]
Amerikai indián	187	20,8	1,34	[102]
Indiai	125	10,0	26,8	[103]
Észak-Indiai	300	15,8	NV	[104]
Dán	228	21,9	NV	[105]
Norvég	151	20,5	NV	[106]
Svéd	254	18,5	NV	[107]
Német	323	18,6	NV	[108]
Holland	765	18,4	NV	[109]
Orosz	290	18,2	4,2	[110]
Kaukázusi	454	18,8	2,8	[111]
Kaukázusi	142	18,2	19,6	[112]

NV, nem vizsgált

10. táblázat A roma és magyar minták CYP2B6 516T allél frekvenciái összehasonlítva más populációk adataival

Populáció	n	c.516G>T (%)	Referenciák
Roma	426	33,6	Jelen tanulmány
Magyar	431	21,4	Jelen tanulmány
Török	172	28,0	[96]
Német	215	28,0	[113]
Spanyol	180	23,0	[114]
Svájci	141	24,8	[115]
Brit	135	28,1	[116]
Dél-Indiai	72	44,0	[97]
Közép-Amerikai	181	25,0	[114]

A tamoxifen kezelésben részesülők számára a *CYP2D6* genotipizálás és az alapján a várható metabolizáló fenotípus megállapítása klinikailag nagy jelentőségű [52, 58, 93].

A *CYP2D6* gén két vizsgált variánsának eltérő prevalenciája a különböző populációk eltérő származásával magyarázható. Ázsiai populációkban a *CYP2D6*4* allél előfordulásának valószínűsége sokkal kisebb, ellenben a *CYP2D6*10*-é sokkal nagyobb. A kaukázusiak körében ezzel szemben a **4* allélt meghatározó variáns az egyik leggyakoribb. A roma és magyar populációkban kimutatott *CYP2D6*4* és **10* allél frekvencia adatok más népcsoportok hasonló adataival történt összehasonlítását a **9. Táblázat**ban mutatom be. Mint a táblázatból kitűnik, a **4* és **10* allélok gyakorisága a roma csoportban jóval magasabb, mint a déli és maláj indián populációkban. A **4* allél frekvenciája enyhén emelkedett a romáknál a szingaléz és az amerikai indián népcsoportokhoz képest. Ezzel szemben a vizsgált magyar mintákban kapott eredmények megfelelnek a más tanulmányokban közölt európai és kaukázusi népesség adataival, különösen a **4* allél tekintetében. A **10* allélt nem minden korábbi tanulmány vizsgálta.

Megvizsgáltam a *CYP2D6* gén variánsainak genotípus változatait és a társuló fenotípus eloszlást a roma és a magyar mintákban. Az eredményeket a **6. Táblázat**ban foglaltam össze. Mint azt már korábban publikált tanulmányok is leírták, a kaukázusi populációkban megfigyelt fenotípus csoportok gyakorisága a következő: ~70% EM, ~20%

IM, és 8% PM [117]. A vizsgálataimban szereplő magyar (kaukázusi) mintáknál kapott fenotípus eloszlás: 67,7% EM, 31,3% IM, 0,9% PM. Ezzel szemben a roma minták eredménye 58,5% EM, illetve 41,5% IM. A PM fenotípus (*4/*4 genotípus) a vizsgált csoportban nem volt jelen.

Mindezekből az a következtetés vonható le, hogy a vizsgált genetikai variánsok gyakorisága a roma csoportban eltérő a magyar, a kaukázusi és az indiai populációkhoz képest. Elsőként ebben a vizsgálatban határoztuk meg a *CYP2B6* és *CYP2D6* fő variánsai alapján az allél, a genotípus és a fenotípus frekvenciák eloszlását a roma és a magyar populációkban. A kapott eredmények a különböző etnikai csoportok közötti különbségeket egyértelműen alátámasztják. Összefoglalva megállapítható, hogy a roma származásúak kockázata a csökkent *CYP2B6* és *CYP2D6* protein expresszióra a májban és a csökkent enzim aktivitásra jóval nagyobb a magyarokhoz képest, aminek a hátterében a csökkent vagy hiányzó enzim aktivitással társuló variánsok gyakoribb előfordulása áll. Eredményeink arra utalnak, hogy a genetikai és etnikai tényezőket figyelembe kell venni olyan súlyos betegségek kezelése előtt, mint a HIV vagy a rák. Következésképpen a heterozigóta és homozigóta genotípusok meghatározása hasznos információt nyújthat a klinikai gyakorlatban a hatástalan terápia, a nem kívánt mellékhatások és a toxicitás elkerülésének szempontjából, különös tekintettel a szűk terápiás indexű gyógyszerek csoportjára.

6.2. CYP2C19 gén

A *CYP2C19* gyógyszer metabolizáló enzim számos klinikailag fontos gyógyszer aktiválásáért és detoxifikálásáért felelős. A *CYP2C19* különböző alléljainak frekvenciájában mutatkozó inter-etnikai különbségek, mely allélok a normál, közepes és lassú metabolizáló klinikai fenotípust határozzák meg (EM, IM, PM), igen fontosak klinikai szempontból, mivel a különböző csoportokba tartozó betegek esetében eltérő gyógyszerdózis alkalmazására van szükség ahhoz, hogy a legjobb terápiás választ, illetve a legkisebb mellékhatást érjük el. Ezért aztán kutatásaink során megvizsgáltuk a *CYP2C19* metabolizáló enzim major funkcióvesztéssel járó alléljainak az előfordulását egészséges roma és magyar populációban. A két populáció elkülönült történelme és az eltérő házasságkötési szokásaik magyarázhatják a vizsgálatok során talált hasonlóságokat és különbségeket egyaránt.

A *CYP2C19**2 allélfrekvencia legmagasabb értékeit a kelet-ázsiai (23,0-45,5%) [118-128] és az indiai (29,7-41,7%) [129-134] populációban találták, míg a legalacsonyabb frekvenciák az európai (9,1-18,8%) [109, 110, 135-143] és a nyugat-ázsiai (12,0-15,0%) populációkban fordulnak elő [118, 139, 144, 145]. Fontos azonban megemlíteni, hogy az a tény, hogy a *CYP2C19**2 variáns a különböző etnikai csoportokban hasonlóan relatíve nagy frekvenciával fordul elő, arra utal, hogy ez a mutáció meglehetősen régi, kialakulása a negroid, mongoloid és kaukázoid rasszok szétválása előtti időkre tehető.

A *CYP2C19**3 variáns a különböző populációkban eltérő gyakorisággal fordul elő. Növekvő sorrendben a frekvencia adatok a következők: európai populációban 0,0-0,9%, észak-amerikai populációban (0,0-0,2%) [118, 146-151], nyugat-ázsiai (0,0-0,1%), indiai (0,0-2,2%), afrikai (0,0-3,0%) [152-155] és a kelet-ázsiai populációban 1,0-14,0%. Ezzel szemben a *CYP2C19**3 allél nagyon alacsony frekvenciája vagy teljes hiánya a különböző kaukázusi populációban és relatíve magas előfordulása (25%) a mongoloid rassz csoportban arra utal, hogy ez a mutáció nemrég alakult ki a kaukázusi és a mongoloid rassz csoportok differenciálódását követően.

A különböző tanulmányok a *CYP2C19* PM fenotípus előfordulását 0-25,6%-ban írták le a különböző populációkban. A PM fenotípus legmagasabb incidenciával a kelet-ázsiai (5,60-24,0%) és az indiai (9,8-20,2%) populációban fordult elő. Ezzel szemben a PM átlagban sokkal alacsonyabb frekvenciával fordul elő az észak-amerikaiakban (1,3-9,0%), afrikaiakban (0,0-5,3%), európaiakban (0,7-4,3%) és a nyugat-ázsiaiakban (0,7-3,1%) (lásd **11. Táblázat**).

Összehasonlítva a roma és magyar populációt, a roma populációban a *CYP2C19**2 variáns frekvenciája szignifikánsan magasabb, az IM fenotípus előfordulása magasabb és figyelemre méltó a PM fenotípus négyszeres emelkedése. Mindezek arra utalnak, hogy a romák körében emelkedett a kockázata annak, hogy káros mellékhatás alakuljon ki *CYP2C19* szubsztráttal történő kezelés esetében.

A gyakran megfigyelt *CYP2C19* allél variánsok, genotípusok és a várható EM, IM és PM fenotípusok előfordulása a roma populációban összhangban van az észak-indiai populációban megfigyelt értékekkel, kivéve a klinikailag releváns *CYP2C19**2 allélt, ugyanis ezen allél frekvenciája szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott a roma populációban [129]. A *CYP2C19* gén genotípus és a hozzá tartozó fenotípus eloszlása a roma populációban egy átmeneti értéket mutat az India különböző részeiről származó populációk és a kaukázusi populáció értékei között.

Érdekes módon az európai kaukázusi populációkban a *CYP2C19**2 allél frekvencia értéke egy enyhe csökkenést mutat északról dél felé haladva. Ebben a perspektívában a

magyar populáció a gradiens közepére helyezhető. Az egyedi etnikai eredete ellenére a vizsgált magyar populációban a *CYP2C19**2 és *CYP2C19**3 allélok frekvenciája hasonló a többi kaukázusi populáció allélfrekvencia értékeihez.

Összefoglalásként elmondható, hogy az irodalomban elsőként mi végeztük el a klinikailag fontos *CYP2C19* gén funkcióvesztéssel járó alléljainak az analízisét egészséges roma populációban. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a roma populáció szignifikánsan különbözik a magyar és a kaukázusi populációtól, azonban összehasonlítva az Indiából származó populációs mintákkal nem találtunk különbséget, kivéve a *CYP2C19**2 allélt. Ezzel szemben a mai magyar emberek nem különböznek szignifikánsan az egyéb európai kaukázusi populációktól a gyakori *CYP2C19* variáns előfordulásának tekintetében. Eredményeink arra utalnak, hogy a roma emberek fokozott veszélynek vannak kitéve a *CYP2C19* szubsztrát metabolikus és gyógyszerválasz variabilitása tekintetében összehasonlítva a magyar populációval. Tekintettel arra, hogy a *CYP2C19* variánsok, melyek meghatározzák a terápiás kezelés hatékonyságát, a jelen kutatási adataink tovább hangsúlyozzák olyan terápiás stratégiák szükségességét, melyek figyelembe veszik a farmakogenomikai faktorokat és azok populációs-specifikus tulajdonságait, hogy ezáltal fokozza a klinikai eredményességet és csökkentse a káros hatásokat.

11. táblázat A CYP2C19 gén allél-, genotípus- és várható fenotípus frekvenciáinak összehasonlítása a különböző etnikai csoportokban

Populáció	n	CYP2C19											Ref	
		Allélok			Genotípusok						Várható fenotípus			
		*1	*2	*3	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3	EM	IM		PM
Magyar roma	500	79,5 *	20,5 *	0,0	63,6*	31,8*	0,0	4,6*	0,0	0,0	63,6*	31,8*	4,6*	jelen vizsg.
Magyar	370	87,4	12,6	0,0	75,9	23,0	0,0	1,1	0,0	0,0	75,9	23,0	1,1	jelen vizsg.
Magyar Európa	112	82,6	16,5	0,9	-	-	-	-	-	-	67,0	31,2	1,8	[156]
Holland	765	86,5	13,3	0,2	-	-	-	-	-	-	74,8	22,4	2,8	[109]
Svéd	83	85,0	14,0	0,1	71,0	27,0	1,0	1,0	0,0	0,0	71,0	28,0	1,0	[136]
Dán	239	84,0	16,0	0,0	71,5	24,7	0,0	3,8	0,0	0,0	71,5	24,7	3,8	[157]
Feröeri	310	81,8	18,8	0	66,2	31,2	0	3,2	0,0	0,0	66,2	31,2	3,2	[137]
Belga	121	90,9	9,1	0,0	83,5	14,9	0,0	1,6	0,0	0,0	83,5	14,9	1,6	[138]
Német	140	85,0	15,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[140]
Orosz	290	88,3	11,4	0,3	78,7	19,0	0,3	1,7	0,3	0,0	78,7	19,3	2,0	[110]
Horvát	200	85,0	15,0	0,0	73,0	24,0	0,0	3,0	0,0	0,0	73,0	24,0	3,0	[141]
Olasz	360	88,9	11,1	0,0	79,4	18,9	0,0	1,7	0,0	0,0	79,4	18,9	1,7	[142]
Görög	283	86,9	13,1	0,0	75,9	21,9	0,0	2,2	0,0	0,0	75,9	21,9	2,2	[135]
Portugál	153	87,0	13,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	[143]
India														
Árja (észak)	121	70,3	29,7	0,0	47,9	44,6	0,0	7,4	0,0	0,0	47,9	44,6	7,4	[129]
Tamil (dél)	112	59,8	37,9	2,2	29,5	58,0	2,7	8,0	1,8	0,0	29,5	60,7	9,8	[130]
Tamil (dél)	292	-	-	-	34,9	44,2	0,7	19,5	0,7	0,0	34,9	44,9	20,2	[131]
Andhra pradesh (dél)	115	67,0	33,0	0,0	46,0	42,0	0,0	12,0	0,0	0,0	46,0	42,0	12,0	[132]
Dravida (dél)	220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32,2	52,8	15,0	[133]
Kerala (dél)	118	68,0	31,0	1,0	47,0	42,0	1,0	9,0	1,0	0,0	47,0	43,0	10,0	[132]
Karnataka (dél)	108	60,0	39,0	1,0	39,0	43,0	0,0	17,0	1,0	0,0	39,0	43,0	18,0	[132]
Maharashtrian (nyugat)	139	57,1	41,7	1,2	33,8	45,3	1,4	18,7	0,7	0,0	33,8	46,7	19,4	[134]
Gujrati és Marwadi (nyugat)	164	-	-	-	-	-	-	-	-	-	89,6	0,0	10,4	[158]
Afrika														
Tanzániai (Bantu)	251	81,0	18,0	1,0	66,0	30,0	1,0	3,0	0,0	0,0	66,0	31,0	3,0	[152]
Egyiptomi	247	88,8	11,0	0,2	78,6	20,2	0,4	0,8	0,0	0,0	78,6	20,6	0,8	[153]
Etióp	114	85,0	14,0	3,0	75,0	19,0	1,0	3,0	3,0	0,0	75,0	20,0	5,2	[154]

Populáció	n	CYP2C19										Várható fenotípus			Ref
		Allélok			Genotípusok							EM	IM	PM	
		*1	*2	*3	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3					
Zimbabwei (Shona)	168	87,0	13,0	0,0	77,0	19,0	0,0	4,0	0,0	0,0	77,0	19,0	4,0	[155]	
Venda	152	78,3	21,7	0,0	61,8	32,9	0,0	5,3	0,0	0,0	61,8	32,9	5,3	[155]	
Benini	111	87,0	13,0	0,0	73,9	26,1	0,0	0,0	0,0	0,0	73,9	26,1	0,0	[138]	
Kelet Ázsia															
Japán	53	67,0	23,0	10,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[118]	
Japán	217	61,8	27,4	10,8	-	-	-	-	-	-	-	-	15,2	[119]	
Japán	186	59,0	29,0	12,0	-	-	-	-	-	-	-	-	18,8	[120]	
Kínai Han	101	55,9	36,6	7,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[121]	
Kínai Bai	202	69,0	26,0	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	13,4	[121]	
Kínai	121	50,0	45,5	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	24,0	[122]	
Kínai Dai	193	66,3	30,3	3,4	-	-	-	-	-	-	-	-	9,3	[123]	
Mongol kínai	280	72,0	24,0	4,0	51,0	35,0	6,0	6,0	1,0	1,0	51,0	41,0	8,0	[124]	
Tajvani kínai	118	63,0	32,0	5,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[118]	
Malajziai kínai	68	59,0	31,0	10,0	36,8	38,2	5,9	5,9	11,8	1,5	36,8	44,1	19,2	[125]	
Maláj	142	66,0	28,0	6,0	42,0	40,0	6,0	6,0	6,3	1,0	42,0	46,0	13,4	[125]	
Maláj	54	72,0	23,0	5,0	50,0	37,0	7,4	3,7	1,9	0,0	50,0	44,4	4,6	[125]	
Malajziai indiai	20	63,0	38,0	0,0	35,0	55,0	0,0	10,0	0,0	0,0	35,0	55,0	10,0	[125]	
Tajvani	179	62,6	32,4	5,0	36,5	44,9	6,7	8,4	3,4	0,0	36,5	51,6	11,8	[126]	
Filippino	52	54,0	39,0	8,0	-	-	-	-	-	-	-	-	23,0	[118]	
Koreai	103	67,5	20,9	11,7	-	-	-	-	-	-	-	-	11,7	[127]	
Burmai	127	66,0	30,0	4,0	44,1	39,4	5,5	9,4	1,6	0,0	44,1	44,9	11,0	[128]	
Burmai thai	774	68,0	29,0	3,0	44,5	42,6	3,7	6,7	2,1	0,4	44,5	46,3	9,2	[128]	
Burmai karen	131	71,0	28,0	1,0	51,1	39,7	0,8	7,6	0,8	0,0	51,1	40,5	8,4	[128]	
Vietnámi	90	62,0	24,0	14,0	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0	[122]	
Nyugat Ázsia															
Török	404	87,0	12,0	0,4	76,0	22,3	0,74	0,9	0,0	0,0	76,0	23,0	1,0	[139]	
Izraeli zsidó	140	84,0	15,0	1,0	70,7	26,4	1,4	2,0	0,0	0,0	70,7	27,8	2,0	[145]	
Szauz-arábiai	97	85,0	15,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	[118]	
Iráni	147	86,0	13,0	1,0	74,1	25,2	0,6	0,0	0,6	0,0	74,1	2,52	0,68	[144]	
Iráni	200	86,0	14,0	0,0	75,0	22,0	0,0	3,0	0,0	0,0	75,0	22,0	3,0	[159]	
Észak Amerika															
Kanadai benszülött indian	115	80,9	19,1	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	7,0	[146]	
Kanadai eszkimó	152	88,0	12,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[147]	
Afro-amerikai	517	81,0	19,0	0,0	66,0	30,0	0,0	3,0	0,1	0,0	66,0	30,0	3,1	[148]	
Afro-amerikai	76	80,9	19,1	0,0	48,0	27,0	0,0	1,0	0,0	0,0	48,0		1,3	[149]	
Afro-amerikai	100	84,0	16,0	0,0	70,0	28,0	0,0	2,0	0,0	0,0	70,0	28,0	2,0	[150]	
Afro-amerikai	108	75,0	25,0	0,0	61,0	40,0	0,0	7,0	0,0	0,0	61,0	40,0	6,5	[118]	

Populáció	n	CYP2C19										Várható fenotípus			Ref
		Allélok			Genotípusok							EM	IM	PM	
		*1	*2	*3	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3					
Mexikói amerikai Dél Amerika	346	90,2	9,7	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[151]
Kolumbiai mesztic	189	91,2	8,8	0,0	83,6	15,3	0,0	1,1	0,0	0,0	83,6	15,3	1,1	[160]	
Brazíliai banszilott indán	183	89,6	10,4	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[161]	
Kaukázusi brazil	615	83,1	16,9	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[161]	
Afrikai brazil	99	79,8	20,2	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[161]	
Mulatt brazil	315	83,5	16,5	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[161]	
Bolíviai Óceánia	778	92,1	7,8	0,1	85,3	13,5	0,1	1,0	0,0	0,0	85,3	13,6	1,0	[162]	
Vanuatu csendes óceáni szigetek	553 8	22,3	63,3	14,4	-	-	-	-	-	-	-	-	61,0	[72]	
Ausztráliai	227	50,1	35,5	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	25,6	[163]	

7. Eredmények összefoglalása

1. Mindkét *CYP2D6* variánst vizsgálva szignifikánsan emelkedett variáns allélfrekvenciát találtunk a roma populációs mintákban a magyarokhoz képest, míg a homozigóta variáns genotípus csak a c.100C>T polimorfizmus esetén volt szignifikánsan emelkedett a roma csoportban.
2. A *CYP2D6* genotípusok alapján a várható leggyakoribb fenotípus mindkét csoportban az extenzív metabolizáló fenotípus volt. A gyengén metabolizáló fenotípust meghatározó *CYP2D6* *4/*4 genotípus a roma populációban nem volt detektálható. Az intermedier metabolizáló fenotípust meghatározó leggyakoribb genotípus mindkét vizsgált populációban a *CYP2D6* *4/*10 volt.
3. A *CYP2B6* gén c.516G>T polimorfizmusának vizsgálata során kiderült, hogy a roma csoportban mind a homozigóta variáns TT genotípus, mind pedig az 516T SNP gyakorisága szignifikánsan magasabb a romákban, mint a magyar populációból származó mintákban.
4. A *CYP2C19**3 allél sem a roma, sem a magyar mintákban nem volt kimutatható. A *CYP2C19**2 polimorfizmus tekintetében a variáns allél hordozása és a homozigóta variáns genotípus gyakorisága is a roma mintákban volt szignifikánsan magasabb, mint a magyarokban.
5. A *CYP2C19**2 variáns által definiált intermedier fenotípust meghatározó *1/*2 genotípus és a gyengén metabolizáló fenotípust eredményező *2/*2 genotípus szintén romákban volt szignifikánsan magasabb.
6. A kapott *CYP2D6* variánsok gyakorisága roma populációban az indiai értékekhez közelít, magyar mintákban pedig a kaukázusi populációkhoz. *CYP2B6* tekintetében a roma minták eredményei a kaukázusi értékekhez közelítenek, magyar minták értékei viszont alacsonyabbnak bizonyultak más kaukázusi populációhoz képest. A *CYP2C19**2 és *3 allélok frekvenciája magyar populációban hasonló a többi kaukázusi populáció allélfrekvencia értékeihez, a roma populációs érték a kaukázusi és az indiai értékek között helyezkedik el.

8. Közlemények jegyzéke

ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Weber A, Szalai R, Sipeky C, Magyar L, Melegh M, Jaromi L, Matyas P, Duga B, Kovesi E, Hadzsiev K, Melegh B.

Increased prevalence of functional minor allele variants of drug metabolizing CYP2B6 and CYP2D6 genes in Roma population samples.

Pharmacol Rep. 2015;67(3):460-4.

IF: 2,251

Sipeky C, Weber A, Szabo M, Melegh BI, Janicsek I, Tarlos G, Szabo I, Sumegi K, Melegh B. **High prevalence of CYP2C19*2 allele in Roma samples: study on Roma and Hungarian population samples with review of the literature.**

Mol Biol Rep. 2013;40(8):4727-35.

IF: 1,958

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Safrany E, Szabo M, Szell M, Kemeny L, Sumegi K, Melegh BI, Magyar L, Matyas P, Figler M, Weber A, Tulassay Z, Melegh B.

Difference of interleukin-23 receptor gene haplotype variants in ulcerative colitis compared to Crohn's disease and psoriasis.

Inflamm Res. 2013;62(2):195-200.

IF: 2,143

Sipeky C, Weber A, Melegh BI, Matyas P, Janicsek I, Szalai R, Szabo I, Varnai R, Tarlos G, Ganczer A, Melegh B.

Interethnic variability of CYP4F2 (V433M) in admixed population of Roma and Hungarians.

Environ Toxicol Pharmacol. 2015;40(1):280-3.

IF: 2,187

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: **4,209**

Egyéb közlemények összesített impakt faktora: **4,33**

Összesített impakt faktor: **8,539**

9. Irodalomjegyzék

1. Beatson GT: **On the Treatment of Inoperable Cases of Carcinoma of the Mamma: Suggestions for a New Method of Treatment, with Illustrative Cases.** *Transactions Medico-Chirurgical Society of Edinburgh* 1896, **15**:153-179.
2. Bayliss WM, Starling EH: **The mechanism of pancreatic secretion.** *The Journal of physiology* 1902, **28**(5):325-353.
3. Haddow A, Watkinson JM, Paterson E, Koller PC: **Influence of Synthetic Oestrogens on Advanced Malignant Disease.** *British medical journal* 1944, **2**(4368):393-398.
4. Walpole AL, Paterson E: **Synthetic oestrogens in mammary cancer.** *Lancet* 1949, **2**(6583):783-786.
5. Jensen EV, Block GE, Smith S, Kyser K, DeSombre ER: **Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy.** *National Cancer Institute monograph* 1971, **34**:55-70.
6. Harper MJ, Walpole AL: **A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats.** *Journal of reproduction and fertility* 1967, **13**(1):101-119.
7. McGuire WL: **Estrogen receptors in human breast cancer.** *The Journal of clinical investigation* 1973, **52**(1):73-77.
8. Lippman ME, Bolan G: **Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture.** *Nature* 1975, **256**(5518):592-593.
9. Sutherland RL, Reddel RR, Green MD: **Effects of oestrogens on cell proliferation and cell cycle kinetics. A hypothesis on the cell cycle effects of antioestrogens.** *European journal of cancer & clinical oncology* 1983, **19**(3):307-318.
10. Osborne CK, Boldt DH, Clark GM, Trent JM: **Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in early G1 phase.** *Cancer research* 1983, **43**(8):3583-3585.
11. Jordan VC, Dix CJ, Prestwich G: **Inhibition of cell division and stimulation of progesterone receptor synthesis in rat oestrogen target tissues by non-steroidal antioestrogens.** *Advances in experimental medicine and biology* 1979, **117**:133-155.
12. Tormey DC, Jordan VC: **Long-term tamoxifen adjuvant therapy in node-positive breast cancer: a metabolic and pilot clinical study.** *Breast cancer research and treatment* 1984, **4**(4):297-302.
13. Fritsch M, Jordan VC: **Long-term Tamoxifen Therapy for the Treatment of Breast Cancer.** *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 1994, **1**(4):356-366.
14. Nagykálnai T: **Tamoxifen az ezredfordulón** In. Edited by Igazvölgyi KC, G.; Lipták, J.: Springer Tudományos Kiadó Kft.; 2001.
15. Jager NGL, Linn SC, Schellens JHM, Beijnen JH: **Tailored Tamoxifen Treatment for Breast Cancer Patients: A Perspective.** *Clin Breast Cancer* 2015, **15**(4):241-244.
16. Bokody GK, L.: **Emlő- és nőgyógyászati onkológia.** Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2012.
17. Cardoso F, Harbeck N, Fallowfield L, Kyriakides S, Senkus E, Group EGW: **Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2012, **23 Suppl 7**:vii11-19.
18. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, Abraham M, Medeiros Alencar VH, Badran A, Bonfill X *et al*: **Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen**

- receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* 2013, **381**(9869):805-816.
19. Rubovszky GH, Zs.: **Az emlődaganat során fellépő egyes menopauzális jellegű panaszok és azok kezelési lehetőségei.** *Magyar Onkológia* 2011.
 20. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, Senn HJ, Panel M, Andre F *et al*: **Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2015, **26**(8):1533-1546.
 21. Tóth ÉKN, Cs.; Szabó, B.; Urbancsek, H.; Mészáros, E.; Nagykálnai, T.; Pesti, L.; Markó, L.; Nagy, B.; Landherr, L.: **Korai stádiumú emlőcarcinómában szenvedő posztmenopauzális korú nőbetegek letrozolkezelése négy-hat éves tamoxifen terápia után: tolerálhatóság és életminőség.** *Lege Artis Medicinae* 2013.
 22. Kahán Zs, O.; Uhercsák, G.; Nikolényi, A.: **Az emlőrák korszerű neoadjuváns kezelése.** *Klinikai Onkológia* 2014.
 23. Ellis M, Naughton, M.J.: **Kezelési megközelítések áttétes, hormonreceptor-pozitív emlődaganatokban: endokrin terápia.** 2015.
 24. Kásler M: **A komplex onkodiagnosztika és onkoterápia irányelvei, Az emlő daganatainak ellátása.** Budapest: Semmelweis; 2008.
 25. Nagykálnai TL, L.; Laczó, I.; Pikó, B.: **Fulvestrant (Faslodex) hormonérzékeny emlőrákban.** *Magyar Onkológia* 2015.
 26. Kopper LT, J.; Becságh, P.; Nagy, Zs.: **Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában 3.** Budapest: Semmelweis; 2013.
 27. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, Zackrisson S, Cardoso F, Committee EG, Cervantes A *et al*: **Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2015, **26 Suppl 5**:v8-30.
 28. Jordan VC: **Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy.** *European journal of cancer* 2008, **44**(1):30-38.
 29. Schroth W, Goetz MP, Hamann U, Fasching PA, Schmidt M, Winter S, Fritz P, Simon W, Suman VJ, Ames MM *et al*: **Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen.** *Jama* 2009, **302**(13):1429-1436.
 30. Brauch H, Schroth W, Goetz MP, Murdter TE, Winter S, Ingle JN, Schwab M, Eichelbaum M: **Tamoxifen use in postmenopausal breast cancer: CYP2D6 matters.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013, **31**(2):176-180.
 31. Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, Reynolds C, Couch FJ, Lingle WL, Flockhart DA *et al*: **Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005, **23**(36):9312-9318.
 32. Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mikus G, Morike K, Stuken T, Eichelbaum M: **Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population.** *Pharmacogenetics* 1998, **8**(1):15-26.
 33. Zanger UM, Fischer J, Raimundo S, Stuken T, Evert BO, Schwab M, Eichelbaum M: **Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6.** *Pharmacogenetics* 2001, **11**(7):573-585.

34. Dehal SS, Kupfer D: **CYP2D6 catalyzes tamoxifen 4-hydroxylation in human liver.** *Cancer research* 1997, **57**(16):3402-3406.
35. Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA: **Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2004, **310**(3):1062-1075.
36. Wu X, Hawse JR, Subramaniam M, Goetz MP, Ingle JN, Spelsberg TC: **The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells.** *Cancer research* 2009, **69**(5):1722-1727.
37. Murdter TE, Schroth W, Bacchus-Gerybadze L, Winter S, Heinkele G, Simon W, Fasching PA, Fehm T, German T, Group AIC *et al*: **Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma.** *Clinical pharmacology and therapeutics* 2011, **89**(5):708-717.
38. Nakamura Y, Ratain MJ, Cox NJ, McLeod HL, Kroetz DL, Flockhart DA: **Re: CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the Breast International Group 1-98 trial.** *Journal of the National Cancer Institute* 2012, **104**(16):1264; author reply 1266-1268.
39. Hirano A, Emi M, Tsuneizumi M, Utada Y, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Haga S, Kajiwara T *et al*: **Allelic losses of loci at 3p25.1, 8p22, 13q12, 17p13.3, and 22q13 correlate with postoperative recurrence in breast cancer.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2001, **7**(4):876-882.
40. Castells A, Gusella JF, Ramesh V, Rustgi AK: **A region of deletion on chromosome 22q13 is common to human breast and colorectal cancers.** *Cancer research* 2000, **60**(11):2836-2839.
41. Madlensky L, Natarajan L, Tchu S, Pu M, Mortimer J, Flatt SW, Nikoloff DM, Hillman G, Fontecha MR, Lawrence HJ *et al*: **Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes.** *Clinical pharmacology and therapeutics* 2011, **89**(5):718-725.
42. Irvin WJ, Jr., Walko CM, Weck KE, Ibrahim JG, Chiu WK, Dees EC, Moore SG, Olajide OA, Graham ML, Canale ST *et al*: **Genotype-guided tamoxifen dosing increases active metabolite exposure in women with reduced CYP2D6 metabolism: a multicenter study.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011, **29**(24):3232-3239.
43. McLeod HL: **Cancer pharmacogenomics: early promise, but concerted effort needed.** *Science* 2013, **339**(6127):1563-1566.
44. Gardiner SJ, Begg EJ: **Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice.** *Pharmacological reviews* 2006, **58**(3):521-590.
45. Ingelman-Sundberg M: **Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity.** *The pharmacogenomics journal* 2005, **5**(1):6-13.
46. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C: **Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects.** *Pharmacology & therapeutics* 2007, **116**(3):496-526.
47. Cacabelos R, Martinez R, Fernandez-Novoa L, Carril JC, Lombardi V, Carrera I, Corzo L, Tellado I, Leszek J, McKay A *et al*: **Genomics of Dementia: APOE- and CYP2D6-Related Pharmacogenetics.** *International journal of Alzheimer's disease* 2012, **2012**:518901.

48. Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Lo Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ, Meyer UA, Broly F: **Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution.** *Pharmacogenetics* 1997, **7**(3):193-202.
49. Evans WE, Relling MV, Rahman A, McLeod HL, Scott EP, Lin JS: **Genetic basis for a lower prevalence of deficient CYP2D6 oxidative drug metabolism phenotypes in black Americans.** *The Journal of clinical investigation* 1993, **91**(5):2150-2154.
50. Shams ME, Arneith B, Hiemke C, Dragicevic A, Muller MJ, Kaiser R, Lackner K, Hartter S: **CYP2D6 polymorphism and clinical effect of the antidepressant venlafaxine.** *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 2006, **31**(5):493-502.
51. Tharanga TD, Jinadasa CM, Risama MF, Galappathy P, Jayakody RL, Dissanayake VH: **Genetic variants in the cytochrome P450 2D6 gene in the Sri Lankan population.** *Indian journal of human genetics* 2013, **19**(4):392-396.
52. Teh LK, Mohamed NI, Salleh MZ, Rohaizak M, Shahrin NS, Saladina JJ, Shia JK, Roslan H, Sood S, Rajoo TS *et al*: **The risk of recurrence in breast cancer patients treated with tamoxifen: polymorphisms of CYP2D6 and ABCB1.** *The AAPS journal* 2012, **14**(1):52-59.
53. Kubota T, Yamaura Y, Ohkawa N, Hara H, Chiba K: **Frequencies of CYP2D6 mutant alleles in a normal Japanese population and metabolic activity of dextromethorphan O-demethylation in different CYP2D6 genotypes.** *British journal of clinical pharmacology* 2000, **50**(1):31-34.
54. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M: **Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry.** *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2004, **369**(1):23-37.
55. Ekins S, Iyer M, Krasowski MD, Kharasch ED: **Molecular characterization of CYP2B6 substrates.** *Current drug metabolism* 2008, **9**(5):363-373.
56. Sridar C, Snider NT, Hollenberg PF: **Anandamide oxidation by wild-type and polymorphically expressed CYP2B6 and CYP2D6.** *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2011, **39**(5):782-788.
57. Thorn CF, Lamba JK, Lamba V, Klein TE, Altman RB: **PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP2B6.** *Pharmacogenetics and genomics* 2010, **20**(8):520-523.
58. Collier JK, Krebsfaenger N, Klein K, Endrizzi K, Wolbold R, Lang T, Nussler A, Neuhaus P, Zanger UM, Eichelbaum M *et al*: **The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver.** *British journal of clinical pharmacology* 2002, **54**(2):157-167.
59. Zanger UM, Klein K: **Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance.** *Frontiers in genetics* 2013, **4**:24.
60. Qumsieh RY, Ali BR, Abdulrazzaq YM, Osman O, Akawi NA, Bastaki SM: **Identification of new alleles and the determination of alleles and genotypes frequencies at the CYP2D6 gene in Emiratis.** *PloS one* 2011, **6**(12):e28943.
61. Sipeky C, Lakner L, Szabo M, Takacs I, Tamasi V, Polgar N, Falus A, Melegh B: **Interethnic differences of CYP2C9 alleles in healthy Hungarian and Roma population samples: relationship to worldwide allelic frequencies.** *Blood cells, molecules & diseases* 2009, **43**(3):239-242.
62. Wang H, Tompkins LM: **CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme.** *Current drug metabolism* 2008, **9**(7):598-610.
63. Hedrich WD, Hassan HE, Wang H: **Insights into CYP2B6-mediated drug-drug interactions.** *Acta pharmaceutica Sinica B* 2016, **6**(5):413-425.

64. Lamba V, Lamba J, Yasuda K, Strom S, Davila J, Hancock ML, Fackenthal JD, Rogan PK, Ring B, Wrighton SA *et al*: **Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2003, **307**(3):906-922.
65. Hofmann MH, Blievernicht JK, Klein K, Saussele T, Schaeffeler E, Schwab M, Zanger UM: **Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2008, **325**(1):284-292.
66. Powers V, Ward J, Gompels M: **CYP2B6 G516T genotyping in a UK cohort of HIV-positive patients: polymorphism frequency and influence on efavirenz discontinuation.** *HIV medicine* 2009, **10**(8):520-523.
67. Desta Z, Saussele T, Ward B, Blievernicht J, Li L, Klein K, Flockhart DA, Zanger UM: **Impact of CYP2B6 polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro.** *Pharmacogenomics* 2007, **8**(6):547-558.
68. Burger D, van der Heiden I, la Porte C, van der Ende M, Groeneveld P, Richter C, Koopmans P, Kroon F, Sprenger H, Lindemans J *et al*: **Interpatient variability in the pharmacokinetics of the HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz: the effect of gender, race, and CYP2B6 polymorphism.** *British journal of clinical pharmacology* 2006, **61**(2):148-154.
69. Ariyoshi N, Ohara M, Kaneko M, Afuso S, Kumamoto T, Nakamura H, Ishii I, Ishikawa T, Kitada M: **Q172H replacement overcomes effects on the metabolism of cyclophosphamide and efavirenz caused by CYP2B6 variant with Arg262.** *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2011, **39**(11):2045-2048.
70. Zukunft J, Lang T, Richter T, Hirsch-Ernst KI, Nussler AK, Klein K, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM: **A natural CYP2B6 TATA box polymorphism (-82T--> C) leading to enhanced transcription and relocation of the transcriptional start site.** *Molecular pharmacology* 2005, **67**(5):1772-1782.
71. Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA: **Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism.** *Clinical pharmacokinetics* 2002, **41**(12):913-958.
72. Kaneko A, Lum JK, Yaviong L, Takahashi N, Ishizaki T, Bertilsson L, Kobayakawa T, Bjorkman A: **High and variable frequencies of CYP2C19 mutations: medical consequences of poor drug metabolism in Vanuatu and other Pacific islands.** *Pharmacogenetics* 1999, **9**(5):581-590.
73. Ferguson RJ, De Morais SM, Benhamou S, Bouchardy C, Blaisdell J, Ibeanu G, Wilkinson GR, Sarich TC, Wright JM, Dayer P *et al*: **A new genetic defect in human CYP2C19: mutation of the initiation codon is responsible for poor metabolism of S-mephenytoin.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1998, **284**(1):356-361.
74. Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, Damcott CM, Pakyz R, Tantry US, Gibson Q *et al*: **Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy.** *Jama* 2009, **302**(8):849-857.
75. Scott SA, Sangkuhl K, Gardner EE, Stein CM, Hulot JS, Johnson JA, Roden DM, Klein TE, Shuldiner AR, Clinical Pharmacogenetics Implementation C: **Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450-2C19 (CYP2C19) genotype and clopidogrel therapy.** *Clinical pharmacology and therapeutics* 2011, **90**(2):328-332.
76. De Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Meyer UA, Nakamura K, Goldstein JA: **Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-**

- mephenytoin metabolism in Japanese.** *Molecular pharmacology* 1994, **46**(4):594-598.
77. Gresham D, Morar B, Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Wise C, Angelicheva D, Calafell F, Oefner PJ, Shen P *et al*: **Origins and divergence of the Roma (gypsies).** *American journal of human genetics* 2001, **69**(6):1314-1331.
 78. Kalaydjieva L, Gresham D, Calafell F: **Genetic studies of the Roma (Gypsies): a review.** *BMC medical genetics* 2001, **2**:5.
 79. Hajioff S, McKee M: **The health of the Roma people: a review of the published literature.** *Journal of epidemiology and community health* 2000, **54**(11):864-869.
 80. Kaneva R, Milanova V, Onchev G, Stoyanova V, Chakarova CH, Nikolova A, Hallmayer J, Belezmezova M, Milenska T, Kirov G *et al*: **A linkage study of affective disorders in two Bulgarian Gypsy families: results for candidate regions on chromosomes 18 and 21.** *Psychiatric genetics* 1998, **8**(4):245-249.
 81. Kalaydjieva L, Hallmayer J, Chandler D, Savov A, Nikolova A, Angelicheva D, King RH, Ishpekova B, Honeyman K, Calafell F *et al*: **Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24.** *Nature genetics* 1996, **14**(2):214-217.
 82. Kalaydjieva L, Gresham D, Gooding R, Heather L, Baas F, de Jonge R, Blechschmidt K, Angelicheva D, Chandler D, Worsley P *et al*: **N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom.** *American journal of human genetics* 2000, **67**(1):47-58.
 83. Piccolo F, Jeanpierre M, Leturcq F, Dode C, Azibi K, Toutain A, Merlini L, Jarre L, Navarro C, Krishnamoorthy R *et al*: **A founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene of gypsies possibly predating their migration out of India.** *Human molecular genetics* 1996, **5**(12):2019-2022.
 84. Abicht A, Stucka R, Karcagi V, Herczegfalvi A, Horvath R, Mortier W, Schara U, Ramaekers V, Jost W, Brunner J *et al*: **A common mutation (epsilon1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin.** *Neurology* 1999, **53**(7):1564-1569.
 85. Rogers T, Chandler D, Angelicheva D, Thomas PK, Youl B, Tournev I, Gergelcheva V, Kalaydjieva L: **A novel locus for autosomal recessive peripheral neuropathy in the EGR2 region on 10q23.** *American journal of human genetics* 2000, **67**(3):664-671.
 86. Pastinen T, Perola M, Ignatius J, Sabatti C, Tainola P, Levander M, Syvanen AC, Peltonen L: **Dissecting a population genome for targeted screening of disease mutations.** *Human molecular genetics* 2001, **10**(26):2961-2972.
 87. Risch N, Tang H, Katzenstein H, Ekstein J: **Geographic distribution of disease mutations in the Ashkenazi Jewish population supports genetic drift over selection.** *American journal of human genetics* 2003, **72**(4):812-822.
 88. Morar B, Gresham D, Angelicheva D, Tournev I, Gooding R, Guerguelcheva V, Schmidt C, Abicht A, Lochmuller H, Tordai A *et al*: **Mutation history of the roma/gypsies.** *American journal of human genetics* 2004, **75**(4):596-609.
 89. Kemény IJ, B.; Lengyel, G.: **A magyarországi cigányság 1971-2003: Gondolat Kiadó Kör Kft.;** 2005.
 90. Xie HG, Kim RB, Wood AJ, Stein CM: **Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response.** *Annual review of pharmacology and toxicology* 2001, **41**:815-850.
 91. Jin Y, Desta Z, Stearns V, Ward B, Ho H, Lee KH, Skaar T, Storniolo AM, Li L, Araba A *et al*: **CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment.** *Journal of the National Cancer Institute* 2005, **97**(1):30-39.

92. Li J, Menard V, Benish RL, Jurevic RJ, Guillemette C, Stoneking M, Zimmerman PA, Mehlotra RK: **Worldwide variation in human drug-metabolism enzyme genes CYP2B6 and UGT2B7: implications for HIV/AIDS treatment.** *Pharmacogenomics* 2012, **13**(5):555-570.
93. Lim JS, Chen XA, Singh O, Yap YS, Ng RC, Wong NS, Wong M, Lee EJ, Chowbay B: **Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients.** *British journal of clinical pharmacology* 2011, **71**(5):737-750.
94. Cronin-Fenton DP, Lash TL: **Clinical epidemiology and pharmacology of CYP2D6 inhibition related to breast cancer outcomes.** *Expert review of clinical pharmacology* 2011, **4**(3):363-377.
95. Rofaiel S, Muo EN, Mousa SA: **Pharmacogenetics in breast cancer: steps toward personalized medicine in breast cancer management.** *Pharmacogenomics and personalized medicine* 2010, **3**:129-143.
96. Yuce-Artun N, Kose G, Suzen HS: **Allele and genotype frequencies of CYP2B6 in a Turkish population.** *Molecular biology reports* 2014, **41**(6):3891-3896.
97. Ramachandran G, Ramesh K, Hemanth Kumar AK, Jagan I, Vasantha M, Padmapriyadarsini C, Narendran G, Rajasekaran S, Swaminathan S: **Association of high T allele frequency of CYP2B6 G516T polymorphism among ethnic south Indian HIV-infected patients with elevated plasma efavirenz and nevirapine.** *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2009, **63**(4):841-843.
98. Adithan C, Gerard N, Naveen AT, Koumaravelou K, Shashindran CH, Krishnamoorthy R: **Genotype and allele frequency of CYP2D6 in Tamilian population.** *European journal of clinical pharmacology* 2003, **59**(7):517-520.
99. Ismail R, Teh LK: **Genetic polymorphism of CYP2D6: Malaysian Indians have the highest frequency for CYP2D6*4 in Asia.** *European journal of clinical pharmacology* 2001, **57**(8):617-618.
100. Teh LK, Ismail R, Yusoff R, Hussein A, Isa MN, Rahman AR: **Heterogeneity of the CYP2D6 gene among Malays in Malaysia.** *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 2001, **26**(3):205-211.
101. Naveen AT, Adithan C, Soya SS, Gerard N, Krishnamoorthy R: **CYP2D6 genetic polymorphism in South Indian populations.** *Biological & pharmaceutical bulletin* 2006, **29**(8):1655-1658.
102. Fohner A, Muzquiz LI, Austin MA, Gaedigk A, Gordon A, Thornton T, Rieder MJ, Pershouse MA, Putnam EA, Howlett K *et al*: **Pharmacogenetics in American Indian populations: analysis of CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, and CYP2C9 in the Confederated Salish and Kootenai Tribes.** *Pharmacogenetics and genomics* 2013, **23**(8):403-414.
103. Singh M, Khanna VK, Shukla R, Parmar D: **Association of polymorphism in cytochrome P450 2D6 and N-acetyltransferase-2 with Parkinson's disease.** *Disease markers* 2010, **28**(2):87-93.
104. Parveen F, Faridi RM, Das V, Tripathi G, Agrawal S: **Genetic association of phase I and phase II detoxification genes with recurrent miscarriages among North Indian women.** *Molecular human reproduction* 2010, **16**(3):207-214.
105. Vangsted AJ, Soeby K, Klausen TW, Abildgaard N, Andersen NF, Gimsing P, Gregersen H, Vogel U, Werge T, Rasmussen HB: **No influence of the polymorphisms CYP2C19 and CYP2D6 on the efficacy of cyclophosphamide, thalidomide, and bortezomib in patients with Multiple Myeloma.** *BMC cancer* 2010, **10**:404.
106. Gjerde J, Hauglid M, Breilid H, Lundgren S, Varhaug JE, Kisanga ER, Mellgren G, Steen VM, Lien EA: **Effects of CYP2D6 and SULT1A1 genotypes including**

- SULT1A1 gene copy number on tamoxifen metabolism.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2008, **19**(1):56-61.
107. Zackrisson AL, Lindblom B, Ahlner J: **High frequency of occurrence of CYP2D6 gene duplication/multiduplication indicating ultrarapid metabolism among suicide cases.** *Clinical pharmacology and therapeutics* 2010, **88**(3):354-359.
 108. Stamer UM, Bayerer B, Wolf S, Hoeft A, Stuber F: **Rapid and reliable method for cytochrome P450 2D6 genotyping.** *Clinical chemistry* 2002, **48**(9):1412-1417.
 109. Tamminga WJ, Wemer J, Oosterhuis B, de Zeeuw RA, de Leij LF, Jonkman JH: **The prevalence of CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in a population of healthy Dutch volunteers.** *European journal of clinical pharmacology* 2001, **57**(10):717-722.
 110. Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmoller J, Frotschl R, Kopke K, Gerloff T, Chernov JN, Roots I: **Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population.** *European journal of clinical pharmacology* 2003, **59**(4):303-312.
 111. Man M, Farmen M, Dumauval C, Teng CH, Moser B, Irie S, Noh GJ, Njau R, Close S, Wise S *et al*: **Genetic variation in metabolizing enzyme and transporter genes: comprehensive assessment in 3 major East Asian subpopulations with comparison to Caucasians and Africans.** *Journal of clinical pharmacology* 2010, **50**(8):929-940.
 112. Myrand SP, Sekiguchi K, Man MZ, Lin X, Tzeng RY, Teng CH, Hee B, Garrett M, Kikkawa H, Lin CY *et al*: **Pharmacokinetics/genotype associations for major cytochrome P450 enzymes in native and first- and third-generation Japanese populations: comparison with Korean, Chinese, and Caucasian populations.** *Clinical pharmacology and therapeutics* 2008, **84**(3):347-361.
 113. Lang T, Klein K, Fischer J, Nussler AK, Neuhaus P, Hofmann U, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM: **Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver.** *Pharmacogenetics* 2001, **11**(5):399-415.
 114. Arenaz I, Vicente J, Fanlo A, Vasquez P, Medina JC, Conde B, Gonzalez-Andrade F, Sinues B: **Haplotype structure and allele frequencies of CYP2B6 in Spaniards and Central Americans.** *Fundamental & clinical pharmacology* 2010, **24**(2):247-253.
 115. Rotger M, Tegude H, Colombo S, Cavassini M, Furrer H, Decosterd L, Bliedernicht J, Saussele T, Gunthard HF, Schwab M *et al*: **Predictive value of known and novel alleles of CYP2B6 for efavirenz plasma concentrations in HIV-infected individuals.** *Clinical pharmacology and therapeutics* 2007, **81**(4):557-566.
 116. Jacob RM, Johnstone EC, Neville MJ, Walton RT: **Identification of CYP2B6 sequence variants by use of multiplex PCR with allele-specific genotyping.** *Clinical chemistry* 2004, **50**(8):1372-1377.
 117. Stearns V, Rae JM: **Pharmacogenetics and breast cancer endocrine therapy: CYP2D6 as a predictive factor for tamoxifen metabolism and drug response?** *Expert Rev Mol Med* 2008, **10**:e34.
 118. Goldstein JA, Ishizaki T, Chiba K, de Morais SM, Bell D, Krahn PM, Evans DA: **Frequencies of the defective CYP2C19 alleles responsible for the mephenytoin poor metabolizer phenotype in various Oriental, Caucasian, Saudi Arabian and American black populations.** *Pharmacogenetics* 1997, **7**(1):59-64.
 119. Takakubo F, Kuwano A, Kondo I: **Evidence that poor metabolizers of (S)-mephenytoin could be identified by haplotypes of CYP2C19 in Japanese.** *Pharmacogenetics* 1996, **6**(3):265-267.

120. Kubota T, Chiba K, Ishizaki T: **Genotyping of S-mephenytoin 4'-hydroxylation in an extended Japanese population.** *Clinical pharmacology and therapeutics* 1996, **60**(6):661-666.
121. Xiao ZS, Goldstein JA, Xie HG, Blaisdell J, Wang W, Jiang CH, Yan FX, He N, Huang SL, Xu ZH *et al*: **Differences in the incidence of the CYP2C19 polymorphism affecting the S-mephenytoin phenotype in Chinese Han and Bai populations and identification of a new rare CYP2C19 mutant allele.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1997, **281**(1):604-609.
122. Yamada S, Onda M, Kato S, Matsuda N, Matsuhisa T, Yamada N, Miki M, Matsukura N: **Genetic differences in CYP2C19 single nucleotide polymorphisms among four Asian populations.** *J Gastroenterol* 2001, **36**(10):669-672.
123. He N, Yan F-X, Huang S-L, Wang W, Xiao Z-S, Liu Z-Q, Zhou H-H: **CYP2C19 genotype and S-mephenytoin 4'-hydroxylation phenotype in a Chinese Dai population.** *European journal of clinical pharmacology* 2002, **58**(1):15-18.
124. Yang ZF, Cui HW, Hasi T, Jia SQ, Gong ML, Su XL: **Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes 2C9 and 2C19 in a healthy Mongolian population in China.** *Genet Mol Res* 2010, **9**(3):1844-1851.
125. Pang YS, Yang YS, Wong LP, Lee TC, Mustafa AM, Mohamed Z, Lang CC: **Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C19 in healthy Malaysian subjects.** *British journal of clinical pharmacology* 2004, **58**(3):332-335.
126. Liou Y-H, Lin C-T, Wu Y-J, Wu LS-H: **The high prevalence of the poor and ultrarapid metabolite alleles of CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, and CYP3A5 in Taiwanese population.** *J Hum Genet* 2006, **51**(10):857-863.
127. Roh HK, Dahl ML, Tybring G, Yamada H, Cha YN, Bertilsson L: **CYP2C19 genotype and phenotype determined by omeprazole in a Korean population.** *Pharmacogenetics* 1996, **6**(6):547-551.
128. Tassaneeyakul W, Mahatthanatrakul W, Niwatananun K, Na-Bangchang K, Tawalee A, Krikreangsak N, Cykleng U, Tassaneeyakul W: **CYP2C19 genetic polymorphism in Thai, Burmese and Karen populations.** *Drug Metab Pharmacokinet* 2006, **21**(4):286-290.
129. Lamba JK, Dhiman RK, Kohli KK: **CYP2C19 genetic mutations in North Indians.** *Clinical pharmacology and therapeutics* 2000, **68**(3):328-335.
130. Adithan C, Gerard N, Vasu S, Rosemary J, Shashindran CH, Krishnamoorthy R: **Allele and genotype frequency of CYP2C19 in a Tamilian population.** *British journal of clinical pharmacology* 2003, **56**(3):331-333.
131. Kesavan R, Narayan SK, Adithan C: **Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on phenytoin-induced neurological toxicity in Indian epileptic patients.** *European journal of clinical pharmacology* 2010, **66**(7):689-696.
132. Jose R, Chandrasekaran A, Sam SS, Gerard N, Chanolean S, Abraham BK, Satyanarayanamoorthy K, Peter A, Rajagopal K: **CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms: frequencies in the south Indian population.** *Fundamental & clinical pharmacology* 2005, **19**(1):101-105.
133. Siddapuram SP, Banerjee R, Tandan M, Prathap N, Mitnal S, Duvvuru NR: **CYP2C19 polymorphism as a predictor of personalized therapy in South Indian population.** *J Assoc Physicians India* 2011, **59**:490-493.
134. Ghodke Y, Joshi K, Arya Y, Radkar A, Chiplunkar A, Shintre P, Patwardhan B: **Genetic polymorphism of CYP2C19 in Maharashtrian population.** *Eur J Epidemiol* 2007, **22**(12):907-915.
135. Arvanitidis K, Ragia G, Iordanidou M, Kyriaki S, Xanthi A, Tavridou A, Manolopoulos VG: **Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes**

- CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A5 in the Greek population.** *Fundamental & clinical pharmacology* 2007, **21**(4):419-426.
136. Yamada H, Dahl ML, Lannfelt L, Viitanen M, Winblad B, Sjoqvist F: **CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in an elderly Swedish population.** *European journal of clinical pharmacology* 1998, **54**(6):479-481.
137. Halling J, Petersen MS, Damkier P, Nielsen F, Grandjean P, Weihe P, Lundgren S, Lundblad MS, Broesen K: **Polymorphism of CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 and CYP2C8 in the Faroese population.** *European journal of clinical pharmacology* 2005, **61**(7):491-497.
138. Allabi AC, Gala J-L, Desager J-P, Heusterspreute M, Horsmans Y: **Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 in the Beninese and Belgian populations.** *British journal of clinical pharmacology* 2003, **56**(6):653-657.
139. Aynacioglu AS, Sachse C, Bozkurt A, Kortunay S, Nacak M, Schroder T, Kayaalp SO, Roots I, Brockmoller J: **Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population.** *Clinical pharmacology and therapeutics* 1999, **66**(2):185-192.
140. Brockmoller J, Rost KL, Gross D, Schenkel A, Roots I: **Phenotyping of CYP2C19 with enantiospecific HPLC-quantification of R- and S-mephenytoin and comparison with the intron4/exon5 G-->A-splice site mutation.** *Pharmacogenetics* 1995, **5**(2):80-88.
141. Bozina N, Granic P, Lalic Z, Tramisak I, Lovric M, Stavljenic-Rukavina A: **Genetic polymorphisms of cytochromes P450: CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian population.** *Croat Med J* 2003, **44**(4):425-428.
142. Scordo MG, Caputi AP, D'Arrigo C, Fava G, Spina E: **Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population.** *Pharmacol Res* 2004, **50**(2):195-200.
143. Ruas JL, Lechner MC: **Allele frequency of CYP2C19 in a Portuguese population.** *Pharmacogenetics* 1997, **7**(4):333-335.
144. Azarpira N, Namazi S, Hendijani F, Banan M, Darai M: **Investigation of allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and VKORC1 in Iran.** *Pharmacol Rep* 2010, **62**(4):740-746.
145. Sviri S, Shpizen S, Leitersdorf E, Levy M, Caraco Y: **Phenotypic-genotypic analysis of CYP2C19 in the Jewish Israeli population.** *Clinical pharmacology and therapeutics* 1999, **65**(3):275-282.
146. Nowak MP, Sellers EM, Tyndale RF: **Canadian Native Indians exhibit unique CYP2A6 and CYP2C19 mutant allele frequencies.** *Clinical pharmacology and therapeutics* 1998, **64**(4):378-383.
147. Jurima-Romet M, Goldstein JA, LeBelle M, Aubin RA, Foster BC, Walop W, Rode A: **CYP2C19 genotyping and associated mephenytoin hydroxylation polymorphism in a Canadian Inuit population.** *Pharmacogenetics* 1996, **6**(4):329-339.
148. Xie HG, Stein CM, Kim RB, Wilkinson GR, Flockhart DA, Wood AJ: **Allelic, genotypic and phenotypic distributions of S-mephenytoin 4'-hydroxylase (CYP2C19) in healthy Caucasian populations of European descent throughout the world.** *Pharmacogenetics* 1999, **9**(5):539-549.
149. Edeki TI, Goldstein JA, de Morais SM, Hajiloo L, Butler M, Chapdelaine P, Wilkinson GR: **Genetic polymorphism of S-mephenytoin 4'-hydroxylation in African-Americans.** *Pharmacogenetics* 1996, **6**(4):357-360.
150. Marinac JS, Balian JD, Foxworth JW, Willsie SK, Daus JC, Owen R, Flockhart DA: **Determination of CYP2C19 phenotype in black Americans with omeprazole:**

- correlation with genotype.** *Clinical pharmacology and therapeutics* 1996, **60**(2):138-144.
151. Luo H-R, Poland RE, Lin K-M, Wan Y-JY: **Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C19 in Mexican Americans: a cross-ethnic comparative study.** *Clinical pharmacology and therapeutics* 2006, **80**(1):33-40.
 152. Herrlin K, Massele AY, Jande M, Alm C, Tybring G, Abdi YA, Wennerholm A, Johansson I, Dahl ML, Bertilsson L *et al*: **Bantu Tanzanians have a decreased capacity to metabolize omeprazole and mephenytoin in relation to their CYP2C19 genotype.** *Clinical pharmacology and therapeutics* 1998, **64**(4):391-401.
 153. Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, El-Enany M, Moursi N, Ahmed MS-E, Mizugaki M: **Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P450 (CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) in the Egyptian population.** *British journal of clinical pharmacology* 2002, **53**(6):596-603.
 154. Persson I, Aklillu E, Rodrigues F, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M: **S-mephenytoin hydroxylation phenotype and CYP2C19 genotype among Ethiopians.** *Pharmacogenetics* 1996, **6**(6):521-526.
 155. Dandara C, Masimirembwa CM, Magimba A, Sayi J, Kaaya S, Sommers DK, Snyman JR, Hasler JA: **Genetic polymorphism of CYP2D6 and CYP2C19 in east- and southern African populations including psychiatric patients.** *European journal of clinical pharmacology* 2001, **57**(1):11-17.
 156. Rideg O, Haber A, Botz L, Szucs F, Varnai R, Miseta A, Kovacs GL: **Pilot study for the characterization of pharmacogenetically relevant CYP2D6, CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms in the Hungarian population.** *Cell Biochem Funct* 2011, **29**(7):562-568.
 157. Bathum L, Hansen TS, Horder M, Brosen K: **A dual label oligonucleotide ligation assay for detection of the CYP2C19*1, CYP2C19*2, and CYP2C19*3 alleles involving time-resolved fluorometry.** *Ther Drug Monit* 1998, **20**(1):1-6.
 158. Panchabhai TS, Noronha SF, Davis S, Shinde VM, Kshirsagar NA, Gogtay NJ: **Evaluation of the activity of CYP2C19 in Gujrati and Marwadi subjects living in Mumbai (Bombay).** *BMC Clin Pharmacol* 2006, **6**:8.
 159. Zand N, Tajik N, Moghaddam AS, Milanian I: **Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes 2C9 and 2C19 in a healthy Iranian population.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007, **34**(1-2):102-105.
 160. Isaza C, Henao J, Martinez JHI, Sepulveda Arias JC, Beltran L: **Phenotype-genotype analysis of CYP2C19 in Colombian mestizo individuals.** *BMC Clin Pharmacol* 2007, **7**:6.
 161. Santos PCJL, Soares RAG, Santos DBG, Nascimento RM, Coelho GLLM, Nicolau JC, Mill JG, Krieger JE, Pereira AC: **CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population.** *BMC medical genetics* 2011, **12**:13.
 162. Bravo-Villalta HV, Yamamoto K, Nakamura K, Baya A, Okada Y, Horiuchi R: **Genetic polymorphism of CYP2C9 and CYP2C19 in a Bolivian population: an investigative and comparative study.** *European journal of clinical pharmacology* 2005, **61**(3):179-184.
 163. Griese EU, Ilett KF, Kitteringham NR, Eichelbaum M, Powell H, Spargo RM, LeSouef PN, Musk AW, Minchin RF: **Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P450 2D6, 2C19 and 2E1 in aborigines from western Australia.** *Pharmacogenetics* 2001, **11**(1):69-76.

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Melegh Béla Professor Úrnak, aki lehetővé tette, hogy doktori disszertációm alapjául szolgáló munkámat a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Orvosi Genetikai Intézetében a Multidiszciplináris Orvostudományok keretén belül „Humán molekuláris genetika” témában végezhessem.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Szalai Renátának, Dr. Berenténé Dr. Bene Juditnak és Dr. Czakó Mártának a szakmai és tudományos segítségért, amit tőlük kaptam.

Köszönettel tartozom továbbá az Orvosi Genetikai Intézet minden asszisztensnőjének, akik szakmai tapasztalatukkal és munkájukkal segítettek vizsgálataim kivitelezését. Szeretném megköszönni azoknak a kollégáknak az együttműködését, akik a minták gyűjtésével járultak hozzá, hogy dolgozatom elkészülhessen.



Original research article

Increased prevalence of functional minor allele variants of drug metabolizing CYP2B6 and CYP2D6 genes in Roma population samples



Agnes Weber^c, Renata Szalai^{a,b}, Csilla Sipeky^{a,b}, Lili Magyari^{a,b}, Marton Melegh^a, Luca Jaromi^{a,b}, Petra Matyas^a, Balazs Duga^{a,b}, Erzsebet Kovsesdi^{a,b}, Kinga Hadzsiev^a, Bela Melegh^{a,b,*}

^a Department of Medical Genetics, University of Pecs, Pecs, Hungary

^b Szentagotai Research Centre, University of Pecs, Pecs, Hungary

^c B.A.Z. County Hospital and University Teaching Hospital, Miskolc, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2014

Received in revised form 4 November 2014

Accepted 13 November 2014

Available online 27 November 2014

Keywords:

CYP2B6

CYP2D6

Pharmacogenetics

Roma

Hungarian

ABSTRACT

Background: Cytochrome P450 2B6 and 2D6 are important enzymes in human drug metabolism. These phase I enzymes are known to contribute the biotransformation of clinically important pharmaceuticals, including antidepressants, anticancer and anxiolytic drugs. The aim of this work was to determine the pharmacogenetic profile of CYP2B6 and CYP2D6 in Roma and Hungarian population samples.

Methods: A study population of 426 healthy Roma and 431 healthy Hungarian subjects were characterized for CYP2B6 c.516G>T, CYP2D6 c.100C>T and c.1846G>A polymorphisms using predesigned TaqMan Drug Metabolism Genotyping Real Time-PCR assays.

Results: We found significant differences in the presence of CYP2B6 c.516G>T ($p < 0.001$), CYP2D6 c.100C>T ($p = 0.003$) and c.1846G>A ($p = 0.022$) between Hungarian and Roma population. The 516T allele frequency was 33.6% in the Roma group, 21.4% in Hungarians, whereas the minor CYP2D6 100T allele was present in 26.6% in Romas and 20.5% in Hungarians. The 1864A allele frequency was 22.5% in Roma and 18.1% in Hungarian samples. A significant increase was found in genotype frequencies for homozygous minor allele carrier Roma participants compared to Hungarians for CYP2B6 516TT and CYP2D6 100TT. The following CYP2D6 genotypes were identified in Roma samples: *1/*1 (55.4%), *1/*4 (2.1%), *1/*10 (3.1%), *4/*10 (38.7%), *10/*10 (0.7%).

Conclusion: Our results demonstrate an increased minor allele frequency for CYP2B6 and CYP2D6 polymorphisms in Roma samples that implies clinical significance in this ethnic group.

© 2014 Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

Introduction

Cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) and 2D6 (CYP2D6) play a role in several metabolic pathways of numerous medications, such as antidepressants (anandamide), anxiolytics (sertraline), opioid analgesic (methadone) and anticancer drugs (tamoxifen and cyclophosphamide) [1–4]. These genes are characterized by significant genetic variability causing inter-individual differences in required dose, drug response and side effects [5–8].

CYP2B6 enzyme influences the metabolism of 3–12% of drugs and xenobiotics [9]. The CYP2B6 gene maps on chromosome 19, at 19q13.2. In the human CYP2B6, the functional wild-type allele (CYP2B6*1) multiple single nucleotide polymorphisms (SNPs) and splice variants are known to influence the mRNA function and protein expression leading to decreased enzyme activity [5,9,10]. The c.516G>T (p.Gln172His, rs3745274) polymorphism is located in exon 4 of the CYP2B6 gene and results in an amino acid change from glutamine to histidine at position 172 in the amino acid sequence [11]. This SNP is responsible for aberrant splicing, may be the causal variant for decreased CYP2B6 expression and function [10]. It has been previously reported that the common *6 allele with two non-synonymous variants (c.516G>T, p.Gln172His and c.785A>G, p.Lys262Arg) results in low protein expression, furthermore it is closely associated with the splice variant 1 (SV1) lacking exons 4–6 [10,12]. Clinical significance of CYP2B6*6 allele

* Corresponding author.

E-mail addresses: weber.onkorad@bazzmkorhaz.hu (A. Weber), szalai.renata@pte.hu (R. Szalai), sipeky.csilla@pte.hu (C. Sipeky), magyari.lili@pte.hu (L. Magyari), kioll@freemail.hu (M. Melegh), jaromi.luca@pte.hu (L. Jaromi), matyas.petra@pre.hu (P. Matyas), duga.balazs@pte.hu (B. Duga), kovesdi.erzsebet@pte.hu (E. Kovsesdi), hadzsiev.kinga@pte.hu (K. Hadzsiev), melegh.bela@pte.hu (B. Melegh).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2014.11.006>

1734-1140/© 2014 Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

has been implicated in cyclophosphamide and efavirenz therapy [13,14]. The *CYP2B6**6 allele is observed at considerably different frequencies (about 15 to over 60%) in various ethnic groups [5].

The *CYP2D6* gene is located on human chromosome 22 at 22q13.1-13.2 encoding *CYP2D6* enzyme. This phase I enzyme is responsible for the metabolism of approximately 25% of all drugs [15]. Nucleotide variations of this CYP have various effects on *CYP2D6* protein expression *via* amino acid changes, splicing defect, gene deletion, frameshift mutation. [16]. The c.1846G>A (rs3892097) polymorphism as a characteristic component of *4 non-functional allele leading to splicing defect contributes to the poor metabolizer (PM) phenotype [17–19]. The homozygous individuals for *4 are at increased risk for toxicities or lack of efficacy due to enzyme inactivity [20,21]. Another major SNP in *CYP2D6* responsible for the altered phenotype is c.100C>T (p.Pro34Ser, rs1065852) as part of both the non-functional *CYP2D6**4 and the reduced function *CYP2D6**10 allele [22]. In populations with Asian ancestry *10 allele have extremely great prevalence (38–50%) [23,24]. Homozygous *10/*10 genotype results in the intermediate metabolizer (IM) phenotype, which are also at risk for adverse events and lack of effectiveness, although not as severe as PMs due to the residual activity of *CYP2D6**10 [25].

The Roma (Gypsy) population size is estimated to be about 12–15 million in the world. From this, 10–12 million people reside in Europe [26]. Seventy percent of European Roma population is concentrated in Central and South-Eastern Europe. Hungary has the fourth largest Roma population in Europe, around 70,000–1 million people [26]. Evidence suggests that the Roma people descend from northwest India [27–29]. The Roma population is an ethnic group in Europe with considerably low socioeconomic status, life expectancy, education level, employment rate [30]. The general morbidity and infant mortality rate is increased, they more often suffer from long-term illnesses (cardiovascular diseases, cancers, asthma), discomfort, anxiety and depression compared to the general European population [30–33].

The aim of this study was to determine the frequencies of *CYP2B6* (c.516G>T) and *CYP2D6* (c.100C>T and c.1846G>A) polymorphisms in Roma and Hungarian population samples and to assess the interethnic differences between the two groups and to compare to other populations.

Materials and methods

Study population

A total of 426 Roma (151 males, 275 females; mean age 43.3 ± 10 years) and 431 Hungarian (248 males, 183 females; mean age 37.6 ± 13 years) samples were recruited in this study. DNA samples with accompanying personal data were derived from healthy Caucasian Hungarians and healthy Roma subjects from Hungary. Informed consent was obtained from all subjects. Roma people declared their same Roma ethnicity and origin and the Hungarian people made a pronouncement were not a member of any minor ethnic group. Both populations belong to the same generation. The DNA samples were from the central Biobank of the University of Pecs, which is the part of the National Biobank Network of Hungary. The maintenance and governance principles of the Biobank has approved by the National Scientific Research Ethics Committee (ETT TUKEB, Budapest, Hungary). During the sample collection and management of data the 1975 Helsinki Declaration was followed.

Molecular methods

Genomic DNA was isolated from peripheral EDTA-anticoagulated blood samples using desalting technique. We applied

predesigned TaqMan Drug Metabolism Genotyping RT-PCR assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to identify the following three CYP single nucleotide polymorphisms: *CYP2B6* c.516G>T (rs3745274) [C_7817765_60], *CYP2D6* c.100C>T (rs1065852) [C_11484460_40] and *CYP2D6* c.1846G>A (rs3892097) [C_27102431_DO]. The PCR amplification was carried out using a Chromo4 Real-Time PCR Detector (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with the following conditions: incubation for 30 s at 95 °C, then 40 cycles of denaturation for 10 s 95 °C, annealing and primer extension for 30 s at 60 °C. The genotypes were analyzed using MJ Opticon Monitor Analysis Software Version 3.1. Direct sequencing was performed by ABI PRISM 3100 AVANT Genetic Analyser (Applied Biosystems, CA, USA) on random samples to confirm our results.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS Statistics 20.0 package for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). We applied Chi-square test to compare the differences between studied groups, $p \leq 0.05$ value was considered as statistically significant.

Results

All *CYP2B6* and *CYP2D6* allele frequencies and genotype rates were in Hardy-Weinberg equilibrium in both of Hungarian and Roma groups. The prevalence rates of the examined three cytochrome P-450 gene variants are presented in Tables 1 and 2.

For *CYP2B6* c.516G>T the T allele frequency was significantly higher in the Roma group than in Hungarian population (33.6% vs. 21.4%, respectively, $p < 0.001$). A significant increase was found in genotype frequencies for homozygous minor allele carrier in Roma participants (9.9%) compared to Hungarians (5.6%) ($p = 0.018$).

Furthermore, a significant increase was found in minor allele frequencies for both *CYP2D6* variants when comparing Roma subjects to Hungarians. The minor *CYP2D6* 100T allele frequency was 26.6% in Roma and 20.5% in Hungarian samples ($p = 0.003$). The same result was observed when we compared the two groups for *CYP2D6* c.1846G>A polymorphism. We found higher frequency

Table 1
Genotypes and minor allele frequencies of *CYP2B6* polymorphisms.

<i>CYP2B6</i> c.516G>T	Roma n = 426 (%)	Hungarian n = 431 (%)
GG	182 (42.7)	271 (62.9)
GT	202 (47.4)	136 (31.6)
TT	42 (9.9) ^a	24 (5.6)
T allele frequency	33.6% ^a	21.4%

^a $p < 0.05$ vs. Hungarians.

Table 2
Genotypes and minor allele frequencies of *CYP2D6* polymorphisms.

	Roma n = 426 (%)	Hungarian n = 431 (%)
<i>CYP2D6</i> c.100C>T		
CC	245 (57.5)	281 (65.2)
CT	135 (31.7)	123 (28.5)
TT	46 (10.8) ^a	27 (6.3)
T allele frequency	26.6% ^a	20.5%
<i>CYP2D6</i> c.1846G>A		
GG	252 (59.2)	298 (69.1)
GA	156 (36.6)	110 (25.5)
AA	18 (4.2)	23 (5.3)
A allele frequency	22.5% ^a	18.1%

^a $p < 0.05$ vs. Hungarians.

Table 3
Genotype frequencies and the predicted phenotype of *CYP2D6* polymorphisms.

Phenotypes	Genotypes	Genotype frequency	
		Roma, n=426 (%)	Hungarian, n=431 (%)
EM	*1/*1	236 (55.4)	270 (62.6)
	*1/*10	13 (3.1)	22 (5.1)
IM	*10/*10	3 (0.7)	6 (1.4)
	*1/*4	9 (2.1)	7 (1.6)
	*4/*10	165 (38.7)	122 (28.3)
PM	*4/*4	–	4 (0.9)

EM, extensive metabolizer; IM, intermediate metabolizer; PM, poor metabolizer.

of the detrimental 1864A allele in Roma population compared to Hungarians (22.5% vs. 18.1%, $p = 0.022$). Regarding the *CYP2D6* polymorphisms we found significantly ($p = 0.017$) increased prevalence for TT homozygous genotype for c.100C>T in Roma population compared with Hungarians (10.8% vs. 6.3%), for c.1846G>A polymorphism the homozygous AA genotype rate was lower in Roma samples compared with Hungarians (4.2% vs. 5.3%, $p = 0.446$).

The *CYP2D6* genotypes and the related predicted phenotypes are presented in Table 3. In Roma subjects the following *CYP2D6* genotypes were identified with the following occurrence: *1/*1 (55.4%), *1/*4 (2.1%), *1/*10 (3.1%), *4/*10 (38.7%), *10/*10 (0.7%) and *4/*4 was not detectable. In Hungarian samples the genotypes were: *1/*1 (62.6%), *1/*4 (1.6%), *1/*10 (5.1%), *4/*10 (28.3%), *10/*10 (1.4%) and *4/*4 (0.9%).

Discussion

Ethnicity, genetic and environmental factors contribute to inter-individual variability in drug metabolism and response [34]. Several drugs are metabolized through cytochrome P450 enzymes [8,9,35]. Two members of this enzyme system including *CYP2B6* and *CYP2D6* show marked interethnic differences in allele distribution [7,36]. Genotype profile defines distinct dose requirements in different populations [37]. The presence of polymorphisms in *CYP2B6* and *CYP2D6* has clinical relevance in patients treated with medications with narrow therapeutic window such as cyclophosphamide and tamoxifen [4,23,38–43].

The c.516G>T polymorphism in *CYP2B6* gene is responsible for a splicing defect resulting in low *CYP2B6* expression, higher clearance and shorter half-life of cyclophosphamide [36,44]. We found significant differences between Roma and Hungarian samples in 516T allele frequencies and TT homozygous genotype. The occurrence of *CYP2B6* c.516G>T polymorphism is more common in Roma people than in Hungarians, thus they have a greater likelihood for aberrant splicing, reduced protein activity and side effects through impaired *CYP2B6*-mediated drug metabolism. Homozygous *CYP2B6* 516TT genotype was found with a frequency of 9.9% in Roma population. This rate is the closest to data from Kenya (10.1%), lower than in African and American people, but almost threefold higher than in East Asian populations (3.5%) [45]. The obtained Hungarian *CYP2B6* 516T allele frequency (21.4%) is less than in other European populations (German, Spanish, Swiss and British). In Romas this prevalence is lower than the reported data from India (Table 4) [46,47].

Genotyping of *CYP2D6* and prediction of a metabolizer phenotype have clinical relevance in tamoxifen treated patients [4,23,38]. In *CYP2D6* the examined two SNPs have altered prevalence in dissimilar populations because of various descents [41]. Asian populations are less likely to possess *CYP2D6**4 allele, but have a higher likelihood for *CYP2D6**10 [48]. In contrast, *4 is one of the most common variant alleles in Caucasian people

Table 4
CYP2B6 516T allele frequencies in Roma and Hungarian samples compared other population data.

Population	n	c.516G>T (%)	References
Roma	426	33.6	Current study
Hungarian	431	21.4	Current study
Turkish	172	28.0	[46]
German	215	28.0	[49]
Spaniard	180	23.0	[50]
Swiss	141	24.8	[51]
British	135	28.1	[52]
South Indian	72	44.0	[47]
Central American	181	25.0	[50]

[48]. The observed *CYP2D6* *4 and *10 allele frequencies in Roma and Hungarian populations compared to other nations are shown in Table 5. As Table 5 presents, our Roma results for *4 and *10 allele are markedly higher than South and Malay Indian population rates. For *4 we obtained a slightly elevated allele frequency in Roma samples compared to Sinhalese and American Indian populations. In contrast, our Hungarian results reflect other European and Caucasian population data in particular for *4. The *10 allele was not determined in several studies.

We also investigated the genotypical alterations and the predicted phenotype distribution in point of *CYP2D6* polymorphisms between Roma and Hungarian samples. The obtained *CYP2D6* genotypes and predicted phenotypes are presented in Table 3. As reported, in Caucasians the occurrence of phenotype groups is ~70% are EMs, ~20% are IMs and 8% are PMs [41]. In our investigation of Hungarian Caucasian samples the following frequencies were obtained: 67.7% were EMs, 31.3% were IMs, 0.9% were PMs. In contrast, in Roma samples the rates were 58.5%, 41.5% for EMs and IMs, respectively. The PM phenotype (*4/*4 genotype) was not present.

In conclusion, the examined genetic polymorphisms in Roma samples differ from Hungarian, Caucasian and Indian populations. This is the first study that determines the distribution of allele, genotype and phenotype frequencies of major variants of *CYP2B6* and *CYP2D6* in Roma and Hungarian population samples. The results of this work reveal the interethnic differences in point of various populations. Summarizing our findings, Roma people have greater risk for lower hepatic *CYP2B6* and *CYP2D6* protein

Table 5
Comparison of *CYP2D6**4 and *10 allele frequencies of Romas and Hungarians in relation to previously published data.

Population	n	<i>CYP2D6</i>		References
		*4 (%)	*10 (%)	
Roma	426	22.5	26.6	Current study
Hungarian	431	18.1	20.5	Current study
Tamil	106	6.6	20.3	[53]
Tamil	30	6.7	35.0	[22]
Malay Indian	86	8.0	15.0	[54]
Malay	107	2.8	49.5	[23]
Sinhalese	30	21.7	40.0	[22]
South Indian	447	7.3	10.2	[55]
American Indian	187	20.8	1.34	[56]
Indian	125	10.0	26.8	[57]
North Indian	300	15.8	ND	[58]
Danish	228	21.9	ND	[59]
Norwegian	151	20.5	ND	[60]
Swedish	254	18.5	ND	[61]
German	323	18.6	ND	[62]
Netherlands	765	18.4	ND	[63]
Russian	290	18.2	4.2	[64]
Caucasian	454	18.8	2.8	[65]
Caucasian	142	18.2	19.6	[66]

ND, not determined.

expression and activity due to the more frequent presence of reduced and non-functional variants when compared to Hungarians. Our results suggest, one should consider the genetic and ethnic background before treating severe diseases such as cancer or HIV. We conclude, identification of heterozygous and homozygous genotypes may provide useful information in clinical practise to avoid resistance, adverse side effects and toxicity particularly with medications of narrow therapeutic range.

Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest to disclose.

Funding

This work was supported by the grant of the Hungarian Science Foundation OTKA K103983.

References

- [1] Ekins S, Iyer M, Krasowski MD, Kharasch ED. Molecular characterization of CYP2B6 substrates. *Curr Drug Metab* 2008;9(5):363–73.
- [2] Sridar C, Snider NT, Hollenberg PF. Anandamide oxidation by wild-type and polymorphically expressed CYP2B6 and CYP2D6. *Drug Metab Dispos* 2011;39(5):782–8.
- [3] Thorn CF, Lamba JK, Lamba V, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP2B6. *Pharmacogenet Genomics* 2010;20(8):520–3.
- [4] Collier JK, Krebsfaenger N, Klein K, Endrizzi K, Wolbold R, Lang T, et al. The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver. *Br J Clin Pharmacol* 2002;54(2):157–67.
- [5] Zanger UM, Klein K. Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Front Genet* 2013;4:24.
- [6] Buntjen H, Liang WJ, Pounder DJ, Seneviratne C, Osselson D. Interindividual variability in the prevalence of OPRM1 and CYP2B6 gene variations may identify drug-susceptible populations. *J Anal Toxicol* 2011;35(7):431–7.
- [7] Qumsieh RY, Ali BR, Abdulrazzaq YM, Osman O, Akawi NA, Bastaki SM. Identification of new alleles and the determination of alleles and genotypes frequencies at the CYP2D6 gene in Emiratis. *PLoS ONE* 2011;6(12):e28943.
- [8] Sipeky C, Lakner L, Szabo M, Takacs I, Tamasi V, Polgar N, et al. Interethnic differences of CYP2C9 alleles in healthy Hungarian and Roma population samples: relationship to worldwide allelic frequencies. *Blood Cells Mol Dis* 2009;43(3):239–42.
- [9] Wang H, Tompkins LM. CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme. *Curr Drug Metab* 2008;9(7):598–610.
- [10] Hofmann MH, Bliervnicht JK, Klein K, Saussele T, Schaeffeler E, Schwab M, et al. Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;325(1):284–92.
- [11] Powers V, Ward J, Gompels M. CYP2B6 G516T genotyping in a UK cohort of HIV-positive patients: polymorphism frequency and influence on efavirenz discontinuation. *HIV Med* 2009;10(8):520–3.
- [12] Desta Z, Saussele T, Ward B, Bliervnicht J, Li L, Klein K, et al. Impact of CYP2B6 polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro. *Pharmacogenomics* 2007;8(6):547–58.
- [13] Burger D, van der Heiden I, la Porte C, van der Ende M, Groeneveld P, Richter C, et al. Interpatient variability in the pharmacokinetics of the HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz: the effect of gender, race, and CYP2B6 polymorphism. *Br J Clin Pharmacol* 2006;61(2):148–54.
- [14] Ariyoshi N, Ohara M, Kaneko M, Afuso S, Kumamoto T, Nakamura H, et al. Q172H replacement overcomes effects on the metabolism of cyclophosphamide and efavirenz caused by CYP2B6 variant with Arg262. *Drug Metab Dispos* 2011;39(11):2045–8.
- [15] Niewinski P, Orzechowska-Juzwenko K, Hurkacz M, Rzemislawska Z, Jazwinska-Tarnawska E, Milejski P, et al. CYP2D6 extensive, intermediate, and poor phenotypes and genotypes in a Polish population. *Eur J Clin Pharmacol* 2012;58(8):533–5.
- [16] Cacabelos R, Martinez R, Fernandez-Novoa L, Carril JC, Lombardi V, Carrera I, et al. Genomics of dementia: APOE- and CYP2D6-related pharmacogenetics. *Int J Alzheimers Dis* 2012;2012:518901.
- [17] Helleboid-Chapman A, Nowak M, Helleboid S, Moitrot E, Rommens C, Dehondt H, et al. Apolipoprotein A-V modulates insulin secretion in pancreatic beta-cells through its interaction with midkine. *Cell Physiol Biochem* 2009;24(5–6):451–60.
- [18] Marex D, Legrand M, Sabbagh N, Lo Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ, et al. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics* 1997;7(3):193–202.
- [19] Evans WE, Relling MV, Rahman A, McLeod HL, Scott EP, Lin JS. Genetic basis for a lower prevalence of deficient CYP2D6 oxidative drug metabolism phenotypes in black Americans. *J Clin Invest* 1993;91(5):2150–4.
- [20] Gardiner SJ, Begg EJ. Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice. *Pharmacol Rev* 2006;58(3):521–90.
- [21] Shams ME, Arneht B, Hiemke C, Dragicic A, Muller MJ, Kaiser R, et al. CYP2D6 polymorphism and clinical effect of the antidepressant venlafaxine. *J Clin Pharm Ther* 2006;31(5):493–502.
- [22] Tharanga TD, Jinadasa CM, Risama MF, Galappathy P, Jayakody RL, Dissanayake VH. Genetic variants in the cytochrome P450 2D6 gene in the Sri Lankan population. *Indian J Hum Genet* 2013;19(4):392–6.
- [23] Teh LK, Mohamed NI, Salleh MZ, Rohaizak M, Shahrun NS, Saladina JJ, et al. The risk of recurrence in breast cancer patients treated with tamoxifen: polymorphisms of CYP2D6 and ABCB1. *AAPS J* 2011;14(1):52–9.
- [24] Kubota T, Yamaura Y, Ohkawa N, Hara H, Chiba K. Frequencies of CYP2D6 mutant alleles in a normal Japanese population and metabolic activity of dextromethorphan O-demethylation in different CYP2D6 genotypes. *Br J Clin Pharmacol* 2000;50(1):31–4.
- [25] Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;369(1):23–37.
- [26] Gresham D, Morar B, Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Wise C, et al. Origins and divergence of the Roma (Gypsies). *Am J Hum Genet* 2001;69(6):1314–31.
- [27] Kalaydjieva L, Gresham D, Calafell F. Genetic studies of the Roma (Gypsies): a review. *BMC Med Genet* 2001;2:5.
- [28] Morar B, Gresham D, Angelicheva D, Tournev I, Gooding R, Guergueltcheva V, et al. Mutation history of the Roma/Gypsies. *Am J Hum Genet* 2004;75(4):596–609.
- [29] Zeman CL, Depken DE, Senchina DS. Roma health issues: a review of the literature and discussion. *Ethn Health* 2003;8(3):223–49.
- [30] Paulik E, Nagymajtenyi L, Easterling D, Rogers T. Smoking behaviour and attitudes of Hungarian Roma and non-Roma population towards tobacco control policies. *Int J Public Health* 2011;56(5):485–91.
- [31] Kosa Z, Szeles G, Kardos L, Kosa K, Nemeth R, Orszagh S, et al. A comparative health survey of the inhabitants of Roma settlements in Hungary. *Am J Public Health* 2007;97(5):853–9.
- [32] Parry G, Van Cleemput P, Peters J, Walters S, Thomas K, Cooper C. Health status of Gypsies and travellers in England. *J Epidemiol Community Health* 2007;61(3):198–204.
- [33] Hajioff S, McKee M. The health of the Roma people: a review of the published literature. *J Epidemiol Community Health* 2000;54(11):864–9.
- [34] Xie HG, Kim RB, Wood AJ, Stein CM. Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:815–50.
- [35] Jin Y, Desta Z, Stearns V, Ward B, Ho H, Lee KH, et al. CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(1):30–9.
- [36] Li J, Menard V, Benish RL, Jurevic RJ, Guillemette C, Stoneking M, et al. Worldwide variation in human drug-metabolism enzyme genes CYP2B6 and UGT2B7: implications for HIV/AIDS treatment. *Pharmacogenomics* 2012;13(5):555–70.
- [37] Vuilleumier PH, Stamer UM, Landau R. Pharmacogenomic considerations in opioid analgesia. *Pharmacogenomics Pers Med* 2012;5:73–87.
- [38] Lim JS, Chen XA, Singh O, Yap YS, Ng RC, Wong NS, et al. Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 2011;71(5):737–50.
- [39] Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, et al. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol* 2005;23(36):9312–8.
- [40] Cronin-Fenton DP, Lash TL. Clinical epidemiology and pharmacology of CYP2D6 inhibition related to breast cancer outcomes. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2011;4(3):363–77.
- [41] Stearns V, Rae JM. Pharmacogenetics and breast cancer endocrine therapy: CYP2D6 as a predictive factor for tamoxifen metabolism and drug response? *Expert Rev Mol Med* 2008;10:e34.
- [42] Bray J, Sludden J, Griffin MJ, Cole M, Verrill M, Jamieson D, et al. Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *Br J Cancer* 2010;102(6):1003–9.
- [43] Yao S, Barlow WE, Albain KS, Choi JY, Zhao H, Livingston RB, et al. Gene polymorphisms in cyclophosphamide metabolism pathway, treatment-related toxicity, and disease-free survival in SWOG 8897 clinical trial for breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16(24):6169–76.
- [44] Rofaiei S, Muo EN, Mousa SA. Pharmacogenetics in breast cancer: steps toward personalized medicine in breast cancer management. *Pharmacogenomics Pers Med* 2010;3:129–43.
- [45] http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=19:41512341-41513341;v=rs3745274;vdb=variation;vf=2821587.
- [46] Yuce-Artun N, Kose G, Suzen HS. Allele and genotype frequencies of CYP2B6 in a Turkish population. *Mol Biol Rep* 2014;41:3891–6.
- [47] Ramachandran G, Ramesh K, Hemanth Kumar AK, Jagan I, Vasantha M, Padmapriyadarisani C, et al. Association of high T allele frequency of CYP2B6 G516T polymorphism among ethnic south Indian HIV-infected patients with elevated plasma efavirenz and nevirapine. *J Antimicrob Chemother* 2009;63(4):841–3.
- [48] Ma MK, Woo MH, McLeod HL. Genetic basis of drug metabolism. *Am J Health Syst Pharm* 2002;59(21):2061–9.

- [49] Lang T, Klein K, Fischer J, Nussler AK, Neuhaus P, Hofmann U, et al. Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics* 2001;11(5):399–415.
- [50] Arenaz I, Vicente J, Fanlo A, Vasquez P, Medina JC, Conde B, et al. Haplotype structure and allele frequencies of CYP2B6 in Spaniards and Central Americans. *Fundam Clin Pharmacol* 2010;24(2):247–53.
- [51] Rotger M, Tegude H, Colombo S, Cavassini M, Furrer H, Decosterd L, et al. Predictive value of known and novel alleles of CYP2B6 for efavirenz plasma concentrations in HIV-infected individuals. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81(4):557–66.
- [52] Jacob RM, Johnstone EC, Neville MJ, Walton RT. Identification of CYP2B6 sequence variants by use of multiplex PCR with allele-specific genotyping. *Clin Chem* 2004;50(8):1372–7.
- [53] Adithan C, Gerard N, Naveen AT, Koumaravelou K, Shashindran CH, Krishnamoorthy R. Genotype and allele frequency of CYP2D6 in Tamilian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;59(7):517–20.
- [54] Ismail R, Teh LK. Genetic polymorphism of CYP2D6: Malaysian Indians have the highest frequency for CYP2D6*4 in Asia. *Eur J Clin Pharmacol* 2001;57(8):617–8.
- [55] Naveen AT, Adithan C, Soya SS, Gerard N, Krishnamoorthy R. CYP2D6 genetic polymorphism in South Indian populations. *Biol Pharm Bull* 2006;29(8):1655–8.
- [56] Fohner A, Muzquiz LI, Austin MA, Gaedigk A, Gordon A, Thornton T, et al. Pharmacogenetics in American Indian populations: analysis of CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, and CYP2C9 in the Confederated Salish and Kootenai Tribes. *Pharmacogenet Genomics* 2013;23(8):403–14.
- [57] Singh M, Khanna VK, Shukla R, Parmar D. Association of polymorphism in cytochrome P450 2D6 and N-acetyltransferase-2 with Parkinson's disease. *Dis Markers* 2010;28(2):87–93.
- [58] Parveen F, Faridi RM, Das V, Tripathi G, Agrawal S. Genetic association of phase I and phase II detoxification genes with recurrent miscarriages among North Indian women. *Mol Hum Reprod* 2010;16(3):207–14.
- [59] Vangsted AJ, Soeby K, Klausen TW, Abildgaard N, Andersen NF, Gimsing P, et al. No influence of the polymorphisms CYP2C19 and CYP2D6 on the efficacy of cyclophosphamide, thalidomide, and bortezomib in patients with multiple myeloma. *BMC Cancer* 2010;10:404.
- [60] Gjerde J, Hauglid M, Breilid H, Lundgren S, Varhaug JE, Kisanga ER, et al. Effects of CYP2D6 and SULT1A1 genotypes including SULT1A1 gene copy number on tamoxifen metabolism. *Ann Oncol* 2008;19(1):56–61.
- [61] Zackrisson AL, Lindblom B, Ahlner J. High frequency of occurrence of CYP2D6 gene duplication/multiduplication indicating ultrarapid metabolism among suicide cases. *Clin Pharmacol Ther* 2010;88(3):354–9.
- [62] Stamer UM, Bayerer B, Wolf S, Hoeft A, Stuber F. Rapid and reliable method for cytochrome P450 2D6 genotyping. *Clin Chem* 2002;48(9):1412–7.
- [63] Tamminga WJ, Wemer J, Oosterhuis B, de Zeeuw RA, de Leij LF, Jonkman JH. The prevalence of CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in a population of healthy Dutch volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2001;57(10):717–22.
- [64] Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmoller J, Frotschl R, Kopke K, et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;59(4):303–12.
- [65] Man M, Farmen M, Dumaul C, Teng CH, Moser B, Irie S, et al. Genetic variation in metabolizing enzyme and transporter genes: comprehensive assessment in 3 major East Asian subpopulations with comparison to Caucasians and Africans. *J Clin Pharmacol* 2010;50(8):929–40.
- [66] Myrand SP, Sekiguchi K, Man MZ, Lin X, Tzeng RY, Teng CH, et al. Pharmacokinetics/genotype associations for major cytochrome P450 enzymes in native and first- and third-generation Japanese populations: comparison with Korean, Chinese, and Caucasian populations. *Clin Pharmacol Ther* 2008;84(3):347–61.

High prevalence of CYP2C19*2 allele in Roma samples: study on Roma and Hungarian population samples with review of the literature

Csilla Sipeky · Agnes Weber · Melinda Szabo ·
Bela I. Melegh · Ingrid Janicsek · Greta Tarlos ·
Istvan Szabo · Katalin Sumegi · Bela Melegh

Received: 11 October 2012 / Accepted: 29 April 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract The purpose of our study was to characterise the CYP2C19*2 and CYP2C19*3 alleles in healthy Roma and Hungarian populations. DNA of 500 Roma and 370 Hungarian subjects were genotyped for CYP2C19*2 (G681A, rs4244285) and CYP2C19*3 (G636A, rs4986893) by PCR–RFLP assay and direct sequencing. Significant differences were found comparing the Roma and Hungarian populations in CYP2C19 681 GG (63.6 vs. 75.9 %), GA (31.8 vs. 23.0 %), AA (4.6 vs. 1.1 %), GA+AA (36.4 vs. 24.1 %) and A allele frequencies (0.205 vs. 0.125) ($p < 0.004$). Striking differences were found between Roma and Hungarian samples in CYP2C19*1 (79.5 vs. 87.4 %) and CYP2C19*2 (20.5 vs. 12.6 %) alleles, respectively ($p < 0.001$). None of the subjects was found to carry the CYP2C19*3 allele. Frequencies of the intermediate metabolizer phenotype defined by the *1/*2 genotype (0.318 vs. 0.230, $p < 0.005$) and poor metabolizer predicted by the *2/*2 genotype (0.046 vs. 0.011, $p < 0.005$) was significantly higher in Roma than in Hungarians, respectively. Genotype distribution of the Roma population was similar to those of the population of North India,

however, a major difference was found in the frequency of the CYP2C19*2 allele, which is likely a result of admixture with European lineages. In conclusion, the frequencies of the CYP2C19 alleles, genotypes and corresponding extensive, intermediate and poor metabolizer phenotypes studied here in the Hungarian population are similar to those of other European Caucasian populations, but display clear differences when compared to the Roma population.

Keywords CYP2C19*2 (G681A) · CYP2C19*3 (G636A) · Hungarian · Interethnic differences · Roma

Introduction

Cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) is responsible for the metabolism of the antiplatelet drug clopidogrel, proton-pump inhibitors such as omeprazole, most of antiepileptics like mephenytoin, certain antidepressants and the antimalarial drug proguanil [1, 2]. The CYP2C19 gene is highly variable and has over 20 variants, which are listed on Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee website (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm>). Inter-individual differences in enzyme activity caused by these variants divide the population into extensive (EM), intermediate (IM) and poor (PM) metabolizer phenotypes [2, 3]. The PM phenotype confers a genetic predisposition to excessive therapeutic effect and adverse effects when using a normal dosage. According to CPIC guideline, if clinical genotyping identifies a patient as a CYP2C19 PM, current literature supports the use of an alternative compound, provided it is not contraindicated clinically [4–8].

Two most important functional polymorphisms of the CYP2C19 gene are responsible for intra- and inter-individual variability in drug effect and toxicity. The CYP2C19

C. Sipeky (✉) · B. I. Melegh · I. Janicsek · G. Tarlos ·
I. Szabo · K. Sumegi · B. Melegh
Department of Medical Genetics, University of Pecs, Szigeti 12,
Pecs 7624, Hungary
e-mail: csilla.sipeky@aok.pte.hu

B. I. Melegh
e-mail: bela.melegh@aok.pte.hu

A. Weber
B.A.Z. County Hospital and University Teaching Hospital,
Szentpeteri Gate 72-76, Miskolc 3526, Hungary

M. Szabo
Robert Koch Hospital, Danko Pista 80, Edeleny 3780, Hungary

G681A variant introduces a splicing defect and produces a premature stop codon which results in a truncated, non-functional protein [2]. This SNP (single nucleotide polymorphism) defines the *CYP2C19**2 allele. The G636A change in the cDNA results in a premature termination codon and this is the defining SNP of the *CYP2C19**3 allele [2].

The clinical pharmacogenetics implementation consortium (CPIC) guideline for clopidogrel, several food and drug administration (FDA) drug labels (e.g. clopidogrel, prasugrel, diazepam, esomeprazole, lansoprazole, omeprazole, citalopram) and the European Medicines Agency's (EMA) drug label on clopidogrel contains pharmacogenetics information regarding the clinically most relevant loss-of-function alleles and poor metabolizers, which are associated with diminished responses to treatment (www.fda.gov) [4, 9]. Gain-of-function alleles, like *CYP2C19**17, are not mentioned in current drug labels, since there are no sufficient clinical data on their practical significance. However, they may require more attention in the future.

The frequencies of above mentioned two most common loss-of-function alleles of *CYP2C19* gene exhibit ethnic differences. The 1,000 Genome Project reports a wide range of allele frequencies of the *CYP2C19**2 allele in different populations and races: 0.133 CEU (Utah residents with ancestry from northern and western Europe), 0.308 CHB+JPT (Han Chinese in Beijing, China+ Japanese in Tokyo, Japan), 0.169 YRI (Yoruba in Ibadan, Nigeria), and 0.058 for the *CYP2C19**3 allele in CHB+JPT. According to HapMap data the population frequencies for *CYP2C19**2 are the following: CEU 0.155, CHB 0.256, JPT 0.284, YRI 0.144 (www.ensembl.org). Asian populations have higher frequencies of the *CYP2C19**2 and *CYP2C19**3 alleles than Caucasian White, Black or Hispanic populations. Of particular note are the Pacific Islander populations of Papua New Guinea and Vanuatu, where very high frequencies of the *2 and *3 alleles may be of strong clinical significance for the prophylaxis of malaria with the *CYP2C19* substrate drug proguanil [10]. The two loss-of-function, *CYP2C19**2 and *3, alleles account for 99 % of PM subjects in Asians and approximately 87 % of White PMs [11]. Besides, the prevalence of the PM phenotype is 2–5 % in Caucasians and Africans and 10–23 % of East Asian populations [12].

Regarding the great clinical importance of *CYP2C19* gene, a genome-wide association study (GWAS) of 429 healthy Amish people confirmed that the *CYP2C19**2 loss of function variant was associated with diminished platelet response to clopidogrel treatment and poorer cardiovascular outcomes [13]. According to this, the importance of *CYP2C19* loss-of-function alleles in clinical pharmacogenetics is underlined by the fact that the FDA has released guidelines with pharmacogenetics-

based recommendations on the dosage of several *CYP2C19* substrates (www.fda.gov). Similarly to FDA, the European Society of Cardiology and the EMA has incorporated *CYP2C19* genetic information about PM predicting genotype into the updated clopidogrel medicine label (2010 March).

Regarding the high clinical importance of *CYP2C19* gene in drug therapy, it is important not only to evaluate the *CYP2C19* genotype of the volunteers, but also the general frequency of its polymorphisms in representative population samples from different ethnic groups. The Roma (Gypsy/Romani) minority forms the largest ethnic group in Hungary with specific genetic background [14]. It is well known, Roma minorities are dispersed everywhere, and by estimations the Roma population is as high as 8–10 million in Europe and ~12 million in the world [15]. Studies on Y-chromosome markers and mitochondrial DNA lineages supported North–West India as the likely origin for the Roma group [15–27]. A low rate of inter-ethnic marriages in Roma population is present, and it is most probably responsible for preserved ancient genetic structure of this ethnic group. In contrast, Hungarians live in Europe for thousands of years, however they are originated from the Eastern-Ural region [28–30]. Several studies have shown that Hungarians are genetically heterogenous, which reflects recent admixture events with neighbouring populations do to wars and migrations [31].

In accordance with this, the ancestry and the genetic composition of Roma and Hungarian populations differ from the European Caucasians. Previous studies of several pharmacogenetically relevant genes already revealed differences in genetic structure of Roma and Hungarian populations [32–34]. According to the literature, there is no report on the prevalence of the common *CYP2C19* allelic variants in the world-wide spread populations of Roma people. In a study on the Hungarian population several *CYP2C19* alleles were characterized, however an unrepresentative sample size was examined and methods different from the present study were used [35]. The objective of this study was to determine the frequencies of *CYP2C19**2 and *CYP2C19**3 variant alleles in Roma and Hungarian populations, to compare our data to other populations, mainly to Indians and Caucasians studied, and review the population distribution of *CYP2C19* alleles, genotypes and predicted phenotype.

Materials and methods

Study population

The DNA samples were obtained from the central Biobank of the University of Pecs that is part of the National Biobank

Network of Hungary (www.biobank.hu), as well as the pan-European Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (BBMRI) (<http://www.bbMRI.eu/bbMRI/>). The governance principles and maintenance management of the Biobank had been approved by the Hungarian National Research Ethics Committee. During the collection and analysis of DNA samples and processing of the accompanying clinical and personal data the guidelines and regulations of the Helsinki Declaration in 1975 and the currently operative national regulations were followed. Informed consent was obtained from all study subjects. DNA samples from a total of 370 healthy Hungarians (176 males and 194 females, mean age 50 ± 19 years, range: 20–98 years) and 500 healthy Roma subjects (178 males and 322 females, mean age 39 ± 16 years, range: 18–94 years) were used in the study.

Molecular methods

Genomic DNA was isolated from peripheral leukocytes using routine salting out method, and was stored DNA with the volunteers informed consent. Three polymorphisms of the *CYP2C19* (MIM*124020, 10q23.33) gene including CYP2C19*2 (splicing defect, exon 5), CYP2C19*3 (exon 4) were analyzed. Genomic sequences deposited into the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) were used for primer design.

Genotyping was carried out using polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction endonuclease digestion (RFLP). For detection of the G681A (Pro227Pro, rs4244285) polymorphism the following primers were used: 5'-AATTTTCCCACTATCATTGATTATTTCTC-3' and

5'-TCTGTTTCATATCCTTCACTCACTTTTT-3'.

Underlining in the sequence indicates mismatch base introduced to generate artificial cleavage site. The G636A (Trp212Ter, rs4986893) SNP was detected using the following set of primers: 5'-ATTGTTTCCAATCATT TAGCTTCAC-3' forward and 5'-ACTTCAGGGCTTGGT CAATA-3' reverse. PCR amplification was carried out in a final volume of 50 μ l on an MJ Research PTC 200 thermal cycler. PCR conditions were as follows: pre-denaturation for 2 min at 96 °C, followed by 35 cycles of denaturation for 30 s at 95 °C, annealing for 30 s by primer specific

temperature, primer extension for 30 s at 72 °C, the final extension at 72 °C for 5 min. Annealing temperatures for the G681A and G636A primers were 60 and 54 °C, respectively.

Ten μ l PCR product of the G681A and G636A primers was digested by HpyF3I and BamHI restriction enzymes, respectively. The digested PCR products were separated by electrophoresis using a 3 % agarose gel stained with ethidium bromide and visualized by an UV transilluminator. In the amplicons of the G681A polymorphism a control obligatory cleavage site was used to monitor the efficacy of the digestion. In samples with 681 GG genotype the HpyF3I cleaves the 530-bp long PCR product into 187- and 243-bp fragments. If the 681 A allele was present in homozygous form, 27-, 160-, 343-bp fragments could be detected. The 269-bp amplicon of the G636A SNP in the samples with GG genotype was digested into 96- and 173-bp long fragments. In contrast, in AA homozygotes the recognition site of the enzyme was missing, resulting in no digestion.

As part of quality control the following procedures were carried out. All the CYP2C19*2 homozygote variant samples from the PCR–RFLP assays were direct sequenced with the same primers utilizing an ABI PRISM 3100 AVANT genetic analyzer. As internal controls we used to test the validity of RFLP assay, we used the direct sequenced normal, heterozygous and homozygous samples as internal controls by prepared agarose gels. To test the RFLP protocol applied for CYP2C19*3 allele detection we used the same re-sequencing method for 10 % of analyzed samples.

Statistical analysis of data

Statistical significance ($p < 0.05$) was assessed by χ^2 test to compare the differences between studied groups. Statistical analyses were performed applying Excel for Windows and SPSS 11.5 package for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

The allele and genotype frequencies of the *CYP2C19* G681A polymorphism in Roma and Hungarian populations are shown in Table 1. The allele and genotype frequencies

Table 1 Genotype and allele frequencies of CYP2C19*2 polymorphism in healthy Roma and Hungarian population samples

CYP2C19 polymorphism	Genotype	Roma $n = 500$ (%)	Hungarian $n = 370$ (%)	p
CYP2C19*2 (G681A) (Pro227Pro)	GG	318 (63.6)	281 (75.9)	<0.001
	GA	159 (31.8)	85 (23.0)	0.004
	AA	23 (4.6)	4 (1.1)	0.003
	GA + AA	182 (36.4)	89 (24.1)	<0.001
	A allele frequency	0.205	0.126	<0.001

were in Hardy–Weinberg equilibrium both in Roma and Hungarian subjects. None of the subjects in our study populations of Roma and Hungarian samples was found to carry the *CYP2C19* G636A SNP (*CYP2C19**3 allele).

Significant differences were found when we compared the genotype frequencies of the *CYP2C19* 681 variant in the Roma and Hungarian populations: GG 63.6 versus 75.9 %, GA 31.8 versus 23.0 %, AA 4.6 versus 1.1 %, GA+AA 36.4 versus 24.1 %. Furthermore, the A allele frequency also displayed a difference (0.205 vs. 0.125, respectively) ($p < 0.004$).

In the next step, *CYP2C19* allele, genotype and predicted phenotype frequencies were compared between the two studied groups, and with data reported from different ethnic populations (Table 2). Striking differences were found between the Roma and Hungarian samples studied in the distribution of the *CYP2C19**1 (79.5 vs. 87.4 %) and *CYP2C19**2 (20.5 vs. 12.6 %) alleles, respectively ($p < 0.001$).

The most common *CYP2C19* genotype was the EM phenotype predicting *1/*1 wild type both in Roma (0.636) and in Hungarian (0.318) samples ($p < 0.001$). The frequency of the *1/*2 genotype, which predicts the IM phenotype, was significantly higher in Roma than in Hungarians (0.318 vs. 0.230; $p < 0.005$). Furthermore, the prevalence of the *2/*2 genotype, defining PM status, was 0.046 in Roma and 0.011 in the samples from the Hungarian population ($p < 0.005$). The *1/*3, *2/*3 and *3/*3 genotypes were found neither in Roma nor in Hungarian samples studied.

An important finding of our study is, that according to the genotype data the proportion of predicted PM phenotype was more than fourfold higher in Roma population than in Hungarians ($p < 0.003$). Moreover, the predicted IMs were found also significantly more frequent in Roma than in Hungarians ($p < 0.004$).

Discussion and conclusion

The drug metabolizing enzyme *CYP2C19* is responsible for activation and detoxification of several clinically important drugs. Inter-ethnic variation in the frequency of *CYP2C19* variant alleles, that define clinical phenotypes with normal, medium and low rates of drug metabolism (EM, IM, PM) are important from clinical perspective, as patients in these groups require different drug dosage to achieve the best therapeutic response and lowest rate of adverse events. Therefore, in our study we investigated the prevalence of two major loss-of-function alleles of *CYP2C19* metabolizing enzyme in healthy Roma and Hungarian populations. The distinct history and marriage customs of these two populations might explain the similarities and differences found in our study.

The prevalence of the *CYP2C19* allele, genotype and predicted phenotype frequencies reported from different ethnic populations residing in different geographic areas are summarized in Table 2.

The highest frequency of *CYP2C9**2 allele was found in East Asian (23.0–45.5 %) [36–46] and Indian (29.7–41.7 %) [47–53] populations, however, the lowest frequency can be found in European (9.1–18.8 %) [12, 54–64] and West Asian (12.0–15.0 %) populations [36, 59, 65–68]. It should be noted that the *CYP2C19**2 variant being represented in different ethnic groups at a similar and relatively high frequency implies that this determining mutation is quite old, occurred before the Black, Oriental and Caucasian racial group split [63].

The *CYP2C9**3 variant was found in increasing order in different populations as follows: Europeans (0.0–0.9 %), North Americans (0.0–0.2 %) [36, 69–75], West Asians (0.0–1.0 %), Indians (0.0–2.2 %), Africans (0.0–3.0 %) [58, 76–79] and East Asians (1.0–14.0 %). In contrast, very low frequency or total absence of the *CYP2C19**3 variant in different Caucasian populations and its relatively high prevalence (25 %) in Oriental racial group indicate that this mutation occurred quite recently, after the differentiation of the Caucasian and Oriental racial groups [63, 68].

Various studies reported a prevalence of 0–25.6 % *CYP2C19* PM phenotype among different populations. The highest incidence of PMs has been reported among East Asians (5.60–24.0 %) and populations from India (9.8–20.2 %). In contrast, North Americans (1.3–9.0 %), Africans (0.0–5.3 %), Europeans (0.7–4.3 %) and West Asians (0.7–3.1 %) have much lower PM frequencies in average (see Table 2.).

Comparing the Roma and Hungarian populations, Roma have significantly higher frequency of the *CYP2C19**2 variant and a higher prevalence of IMs, and a remarkable fourfold increase of the PM phenotype. Therefore, this indicates, that Roma are at increased risk for developing adverse effects treated by *CYP2C19* substrates.

The prevalence of the common observed *CYP2C19* allelic variants, genotypes and predicted EM, IM and PM phenotypes in Roma population is in accordance with dose observed in the North Indian population, except the clinically relevant *CYP2C19**2 allele [47]; Roma have a significantly lower *CYP2C19**2 frequency. The genotype and the corresponding phenotype distribution of the *CYP2C19* gene in the Roma population appear to represent a transition between the values for populations from different areas of India [47–53] and the European Caucasian populations [59–63].

Interestingly, in European Caucasian populations a slight decrease in *CYP2C19**2 allele frequency can be observed from North to South. In this perspective, the Hungarian population can be placed in the middle of this gradient.

Table 2 Comparison of allele, genotype and predicted phenotype frequencies of *CYP2C19* gene reported from different ethnic populations

Population	n	CYP2C19									Predicted phenotype			Ref.
		Alleles			Genotypes						EM	IM	PM	
		*1	*2	*3	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3				
Hungary														
Roma	500	79.5*	20.5*	0.0	63.6*	31.8*	0.0	4.6*	0.0	0.0	63.6*	31.8*	4.6*	Current study
Hungarian	370	87.4	12.6	0.0	75.9	23.0	0.0	1.1	0.0	0.0	75.9	23.0	1.1	Current study
Hungarian	112	82.6	16.5	0.9	–	–	–	–	–	–	67.0	31.2	1.8	[35]
Europe														
Dutch	765	86.5	13.3	0.2	–	–	–	–	–	–	74.8	22.4	2.8	[54]
Swedish	83	85.0	14.0	0.1	71.0	27.0	1.0	1.0	0.0	0.0	71.0	28.0	1.0	[55]
Danish	239	84.0	16.0	0.0	71.5	24.7	0.0	3.8	0.0	0.0	71.5	24.7	3.8	[56]
Faroese	310	81.8	18.8	0	66.2	31.2	0	3.2	0.0	0.0	66.2	31.2	3.2	[57]
Belgian	121	90.9	9.1	0.0	83.5	14.9	0.0	1.6	0.0	0.0	83.5	14.9	1.6	[58]
German	328	84.0	15.9	0.2	–	–	–	–	–	–	–	–	4.3	[59]
German	140	85.0	15.0	0.0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	[60]
Russian	290	88.3	11.4	0.3	78.7	19.0	0.3	1.7	0.3	0.0	78.7	19.3	2.0	[61]
Croatian	200	85.0	15.0	0.0	73.0	24.0	0.0	3.0	0.0	0.0	73.0	24.0	3.0	[62]
Italian	360	88.9	11.1	0.0	79.4	18.9	0.0	1.7	0.0	0.0	79.4	18.9	1.7	[63]
Greek	283	86.9	13.1	0.0	75.9	21.9	0.0	2.2	0.0	0.0	75.9	21.9	2.2	[12]
Portuguese	153	87.0	13.0	0.0	–	–	–	–	–	–	–	–	1.0	[64]
India														
Aryan (North)	121	70.3	29.7	0.0	47.9	44.6	0.0	7.4	0.0	0.0	47.9	44.6	7.4	[47]
Tamilian (South)	112	59.8	37.9	2.2	29.5	58.0	2.7	8.0	1.8	0.0	29.5	60.7	9.8	[48]
Tamilian (South)	292	–	–	–	34.9	44.2	0.7	19.5	0.7	0.0	34.9	44.9	20.2	[49]
Andhra Pradesh (South)	115	67.0	33.0	0.0	46.0	42.0	0.0	12.0	0.0	0.0	46.0	42.0	12.0	[50]
Dravidian (South)	220	–	–	–	–	–	–	–	–	–	32.2	52.8	15.0	[51]
Kerala (South)	118	68.0	31.0	1.0	47.0	42.0	1.0	9.0	1.0	0.0	47.0	43.0	10.0	[50]
Karnataka (South)	108	60.0	39.0	1.0	39.0	43.0	0.0	17.0	1.0	0.0	39.0	43.0	18.0	[50]
Maharashtrian (West)	139	57.1	41.7	1.2	33.8	45.3	1.4	18.7	0.7	0.0	33.8	46.7	19.4	[52]
Gujrati and Marwadi (West)	164	–	–	–	–	–	–	–	–	–	89.6	0.0	10.4	[53]
Africa														
Tanzanians (Bantu)	251	81.0	18.0	1.0	66.0	30.0	1.0	3.0	0.0	0.0	66.0	31.0	3.0	[76]
Egyptian	247	88.8	11.0	0.2	78.6	20.2	0.4	0.8	0.0	0.0	78.6	20.6	0.8	[77]
Ethiopians	114	85.0	14.0	3.0	75.0	19.0	1.0	3.0	3.0	0.0	75.0	20.0	5.2	[78]
Zimbabweans (Shona)	168	87.0	13.0	0.0	77.0	19.0	0.0	4.0	0.0	0.0	77.0	19.0	4.0	[79]
Venda	152	78.3	21.7	0.0	61.8	32.9	0.0	5.3	0.0	0.0	61.8	32.9	5.3	[79]
Beninese	111	87.0	13.0	0.0	73.9	26.1	0.0	0.0	0.0	0.0	73.9	26.1	0.0	[58]
East Asia														
Japanese	53	67.0	23.0	10.4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	[36]
Japanese	217	61.8	27.4	10.8	–	–	–	–	–	–	–	–	15.2	[37]
Japanese	186	59.0	29.0	12.0	–	–	–	–	–	–	–	–	18.8	[38]
Chinese Han	101	55.9	36.6	7.4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	[39]
Chinese Bai	202	69.0	26.0	5.0	–	–	–	–	–	–	–	–	13.4	[39]
Chinese	121	50.0	45.5	4.5	–	–	–	–	–	–	–	–	24.0	[40]
Chinese Dai	193	66.3	30.3	3.4	–	–	–	–	–	–	–	–	9.3	[41]
Chinese Mongolian	280	72.0	24.0	4.0	51.0	35.0	6.0	6.0	1.0	1.0	51.0	41.0	8.0	[42]
Chinese Taiwanese	118	63.0	32.0	5.5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	[36]

Table 2 continued

Population	n	CYP2C19											Ref.	
		Alleles			Genotypes						Predicted phenotype			
		*1	*2	*3	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3	EM	IM		PM
Chinese Malaysian	68	59.0	31.0	10.0	36.8	38.2	5.9	5.9	11.8	1.5	36.8	44.1	19.2	[42]
Malaysians	142	66.0	28.0	6.0	42.0	40.0	6.0	6.0	6.3	1.0	42.0	46.0	13.4	[42]
Malaysians	54	72.0	23.0	5.0	50.0	37.0	7.4	3.7	1.9	0.0	50.0	44.4	5.6	[42]
Indian (Malaysia)	20	63.0	38.0	0.0	35.0	55.0	0.0	10.0	0.0	0.0	35.0	55.0	10.0	[42]
Taiwanese	179	62.6	32.4	5.0	36.5	44.9	6.7	8.4	3.4	0.0	36.5	51.6	11.8	[44]
Filippino	52	54.0	39.0	8.0	–	–	–	–	–	–	–	–	23.0	[36]
Koreans	103	67.5	20.9	11.7	–	–	–	–	–	–	–	–	11.7	[45]
Burmese (Burma)	127	66.0	30.0	4.0	44.1	39.4	5.5	9.4	1.6	0.0	44.1	44.9	11.0	[46]
Thai (Burma)	774	68.0	29.0	3.0	44.5	42.6	3.7	6.7	2.1	0.4	44.5	46.3	9.2	[46]
Karen (Burma)	131	71.0	28.0	1.0	51.1	39.7	0.8	7.6	0.8	0.0	51.1	40.5	8.4	[46]
Vietnamese	90	62.0	24.0	14.0	–	–	–	–	–	–	–	–	20.0	[40]
West Asia														
Turkish	404	87.0	12.0	0.4	76.0	22.3	0.74	0.9	0.0	0.0	76.0	23.0	1.0	[59]
Israeli Jewish	140	84.0	15.0	1.0	70.7	26.4	1.4	2.0	0.0	0.0	70.7	27.8	2.0	[65]
Saudi Arabian	97	85.0	15.0	0.0	–	–	–	–	–	–	–	–	2.0	[36]
Lebanese	161	86.3	13.4	0.3	75.8	20.5	0.6	3.1	0.0	0.0	75.8	21.1	3.1	[66]
Iranian	147	86.0	13.0	1.0	74.1	25.2	0.6	0.0	0.6	0.0	74.1	25.2	0.68	[67]
Iranian	200	86.0	14.0	0.0	75.0	22.0	0.0	3.0	0.0	0.0	75.0	22.0	3.0	[68]
North America														
Canadian Native Indian	115	80.9	19.1	0.0	–	–	–	–	–	–	–	–	7.0	[69]
Canadian Inuit	152	88.0	12.0	0.0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	[70]
African Americans	517	81.0	19.0	0.0	66.0	30.0	0.0	3.0	0.1	0.0	66.0	30.0	3.1	[71]
African Americans	76	80.9	19.1	0.0	48.0	27.0	0.0	1.0	0.0	0.0	48.0	–	1.3	[72]
African Americans	100	84.0	16.0	0.0	70.0	28.0	0.0	2.0	0.0	0.0	70.0	28.0	2.0	[73]
African Americans	108	75.0	25.0	0.0	61.0	40.0	0.0	7.0	0.0	0.0	61.0	40.0	6.5	[36]
African Americans	233	83.3	16.5	0.2	164.0	60.0	0.0	8.0	1.0	0.0	164.0	60.0	9.0	[74]
Mexican American	346	90.2	9.7	0.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	[75]
South America														
Mestizo Comlombian	189	91.2	8.8	0.0	83.6	15.3	0.0	1.1	0.0	0.0	83.6	15.3	1.1	[80]
Amerindian (Brazilia)	183	89.6	10.4	0.0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	[81]
Caucasian Brazilian	615	83.1	16.9	0.0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	[81]
African Brazilian	99	79.8	20.2	0.0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	[81]
Mulatto Brazilian (mixed)	315	83.5	16.5	0.0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	[81]
Bolivian	778	92.1	7.8	0.1	85.3	13.5	0.1	1.0	0.0	0.0	85.3	13.6	1.0	[82]
Oceania														
Vanuatu + Pacific Islands	5538	22.3	63.3	14.4	–	–	–	–	–	–	–	–	61.0	[10]
Australian	227	50.1	35.5	14.3	–	–	–	–	–	–	–	–	25.6	[83]

*1 allele, *1/*1 genotype, EM and IM predicted phenotype frequencies were calculated according to the studied polymorphisms, other *CYP2C19* variant alleles were not included

n number of subjects, – no data are available

* $p < 0.004$, when Roma are compared with Hungarian population of our study

Despite its unique ethnic origin, the studied Hungarian population exhibited frequencies of the *CYP2C19**2 and *CYP2C19**3 variant alleles similar to those in other Caucasian populations.

In summary, this study provides the first analysis of clinically important loss-of-function alleles of the *CYP2C19* gene in healthy Roma population. We found that the Roma population differed significantly from the Hungarians and

from Caucasians, however comparing to population samples reported from India no difference could be observed, except for the *CYP2C19**2 variant allele. In contrast, contemporary Hungarian people do not differ significantly from other European Caucasian populations in relation to the prevalence of common *CYP2C19* variants. Our findings suggest that Roma people are at increased risk of variation in *CYP2C19* substrate metabolic and drug response compared to the Hungarian population. Given that *CYP2C19* variants determine the therapeutic treatment effectiveness, our present data further emphasize the need for therapeutic strategies that take pharmacogenomics factors and their population-specific features into account to maximise clinical benefit and to minimise adverse events.

Acknowledgments This study was supported by the Hungarian National Science Foundation grants (OTKA T-73430 and ETT 497) and the SROP-4.2.2/08/1/2008-0011 Science, Please! Research Team on Innovation.

References

1. Desta Z, Zhao XJ, Shin JG, Flockhart DA (2002) Clinical significance of the cytochrome P4502C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet* 41(12):913–958
2. Demorais SMF, Wilkinson GR, Blaisdell J, Meyer UA, Nakamura K, Goldstein JA (1994) Identification of a new genetic-defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol Pharmacol* 46(4):594–598
3. Nakamura K, Goto F, Ray WA, McAllister CB, Jacqz E, Wilkinson GR, Branch RA (1985) Interethnic Differences in genetic-polymorphism of debrisoquin and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. *Clin Pharmacol Ther* 38(4):402–408
4. Scott SA, Sangkuhl K, Gardner EE, Stein CM, Hulot JS, Johnson JA, Roden DM, Klein TE, Shuldiner AR (2011) Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for cytochrome P450–2C19 (*CYP2C19*) genotype and clopidogrel therapy. *Clin Pharmacol Ther* 90(2):328–332
5. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias W, Braunwald E, Sabatine MS (2009) Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 360(4):354–362. doi:10.1056/NEJMoa0809171
6. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias WL, Braunwald E, Sabatine MS (2009) Cytochrome P450 genetic polymorphisms and the response to prasugrel: relationship to pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical outcomes. *Circulation* 119(19):2553–2560. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.851949
7. Pena A, Collet JP, Hulot JS, Silvain J, Barthelemy O, Beygui F, Funck-Brentano C, Montalescot G (2009) Can we override clopidogrel resistance? *Circulation* 119(21):2854–2857. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.857722
8. Montalescot G, Sideris G, Cohen R, Meuleman C, Bal dit Sollier C, Barthelemy O, Henry P, Lim P, Beygui F, Collet JP, Marshall D, Luo J, Petitjean H (2010) Prasugrel compared with high-dose clopidogrel in acute coronary syndrome. The randomised, double-blind ACAPULCO study. *Thromb Haemost* 103(1):213–223. doi:10.1160/TH09-07-0482
9. Close SL (2011) Clopidogrel pharmacogenetics: metabolism and drug interactions. *Drug Metabol Drug Interact* 26(2):45–51. doi:10.1515/DMDI.2011.002
10. Kaneko A, Lum JK, Yaviong J, Takahashi N, Ishizaki T, Bertilsson L, Kobayakawa T, Bjorkman A (1999) High and variable frequencies of *CYP2C19* mutations: medical consequences of poor drug metabolism in Vanuatu and other Pacific islands. *Pharmacogenetics* 9(5):581–590
11. Ferguson RJ, De Morais SMF, Benhamou S, Bouchardy C, Blaisdell J, Ibeanu G, Wilkinson GR, Sarich TC, Wright JM, Dayer P, Goldstein JA (1998) A new genetic defect in human *CYP2C19*: mutation of the initiation codon is responsible for poor metabolism of S-mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 284(1):356–361
12. Arvanitidis K, Ragia G, Iordanidou M, Kyriaki S, Xanthi A, Tavridou A, Manolopoulos VG (2007) Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* and *CYP3A5* in the Greek population. *Fundam Clin Pharmacol* 21(4):419–426
13. Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, Damcott CM, Pakyz R, Tantry US, Gibson Q, Pollin TI, Post W, Parsa A, Mitchell BD, Faraday N, Herzog W, Gurbel PA (2009) Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA* 302(8):849–858
14. Irwin J, Egyed B, Saunier J, Szamosi G, O'Callaghan J, Padar Z, Parsons TJ (2007) Hungarian mtDNA population databases from Budapest and the Baranya county Roma. *Int J Legal Med* 121(5):377–383
15. Kalaydjieva L, Morar B, Chaix R, Tang H (2005) A newly discovered founder population: the Roma/Gypsies. *BioEssays* 27(10):1084–1094
16. Gusmao A, Gusmao L, Gomes V, Alves C, Calafell F, Amorim A, Prata MJ (2008) A perspective on the history of the Iberian gypsies provided by phylogeographic analysis of Y-chromosome lineages. *Ann Hum Genet* 72(Pt 2):215–227
17. Zalan A, Beres J, Pamjav H (2011) Paternal genetic history of the Vlach Roma. *Forensic Sci Int Genet* 5(2):109–113
18. Pamjav H, Zalan A, Beres J, Nagy M, Chang YM (2011) Genetic structure of the paternal lineage of the Roma People. *Am J Phys Anthropol* 145(1):21–29
19. Mendizabal I, Valente C, Gusmao A, Alves C, Gomes V, Goios A, Parson W, Calafell F, Alvarez L, Amorim A, Gusmao L, Comas D, Prata MJ (2011) Reconstructing the Indian origin and dispersal of the European Roma: a maternal genetic perspective. *PLoS One* 6(1):e15988
20. Morar B, Gresham D, Angelicheva D, Tournev I, Gooding R, Guerguelcheva V, Schmidt C, Abicht A, Lochmuller H, Tordai A, Kalmar L, Nagy M, Karcagi V, Jeanpierre M, Herczegfalvi A, Beeson D, Venkataraman V, Warwick CK, Reeve J, de Pablo R, Kucinskas V, Kalaydjieva L (2004) Mutation history of the roma/gypsies. *Am J Hum Genet* 75(4):596–609
21. Gresham D, Morar B, Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Wise C, Angelicheva D, Calafell F, Oefner PJ, Shen P, Tournev I, de Pablo R, Kucinskas V, Perez-Lezaun A, Marushiakova E, Popov V, Kalaydjieva L (2001) Origins and divergence of the Roma (gypsies). *Am J Hum Genet* 69(6):1314–1331
22. McKee M (1997) The health of gypsies. *BMJ* 315(7117):1172–1173
23. Hajoiff S, McKee M (2000) The health of the Roma people: a review of the published literature. *J Epidemiol Community Health* 54(11):864–869
24. Kalaydjieva L, Gresham D, Calafell F (2001) Genetic studies of the Roma (Gypsies): a review. *BMC Med Genet* 2:5
25. Kalaydjieva L, Calafell F, Jobling MA, Angelicheva D, de Knijff P, Rosser ZH, Hurles ME, Underhill P, Tournev I, Marushiakova

- E, Popov V (2001) Patterns of inter- and intra-group genetic diversity in the Vlach Roma as revealed by Y chromosome and mitochondrial DNA lineages. *Eur J Hum Genet* 9(2):97–104
26. Mastana SS, Papiha SS (1992) Origin of the Romany gypsies—genetic evidence. *Z Morphol Anthropol* 79(1):43–51
 27. Malyarchuk BA, Grzybowski T, Derenko MV, Czarny J, Miscicka-Sliwka D (2006) Mitochondrial DNA diversity in the Polish Roma. *Ann Hum Genet* 70(Pt 2):195–206
 28. Nadasi E, Gyurus P, Czako M, Bene J, Kosztolanyi S, Fazekas S, Domosi P, Melegh B (2007) Comparison of mtDNA haplogroups in Hungarians with four other European populations: a small incidence of descents with Asian origin. *Acta Biol Hung* 58(2):245–256
 29. Semino O, Passarino G, Quintana-Murci L, Liu A, Beres J, Czeizel A, Santachiara-Benerecetti AS (2000) MtDNA and Y chromosome polymorphisms in Hungary: inferences from the palaeolithic, neolithic and Uralic influences on the modern Hungarian gene pool. *Eur J Hum Genet* 8(5):339–346
 30. Tomory G, Csanyi B, Bogacsi-Szabo E, Kalmar T, Czibula A, Csoz A, Priskin K, Mende B, Lango P, Downes CS, Rasko I (2007) Comparison of maternal lineage and biogeographic analyses of ancient and modern Hungarian populations. *Am J Phys Anthropol* 134(3):354–368
 31. Guglielmino CR, De Silvestri A, Beres J (2000) Probable ancestors of Hungarian ethnic groups: an admixture analysis. *Ann Hum Genet* 64(2):145–159
 32. Sipeky C, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Polgar N, Lakner L, Szabo M, Takacs I, Melegh B (2009) Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) haplotypes in healthy Hungarian and Roma population samples. *Pharmacogenomics* 10(6):1025–1032
 33. Sipeky C, Lakner L, Szabo M, Takacs I, Tamasi V, Polgar N, Falus A, Melegh B (2009) Interethnic differences of CYP2C9 alleles in healthy Hungarian and Roma population samples: relationship to worldwide allelic frequencies. *Blood Cells Mol Dis* 43(3):239–242
 34. Sipeky C, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Maasz A, Takacs I, Beres J, Fodor L, Szabo M, Melegh B (2010) Genetic variability and haplotype profile of MDR1 (ABCB1) gene in Roma and Hungarian population samples with a review of the literature. *Drug Metab Pharmacokinet* 26(2):206–215
 35. Rideg O, Haber A, Botz L, Szucs F, Varnai R, Miseta A, Kovacs GL (2011) Pilot study for the characterization of pharmacogenetically relevant CYP2D6, CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms in the Hungarian population. *Cell Biochem Funct* 29(7):562–568. doi:10.1002/cbf.1788
 36. Goldstein JA, Ishizaki T, Chiba K, Demorais SMF, Bell D, Krahn PM, Evans DAP (1997) Frequencies of the defective CYP2C19 alleles responsible for the mephenytoin poor metabolizer phenotype in various Oriental, Caucasian, Saudi Arabian and American black populations. *Pharmacogenetics* 7(1):59–64
 37. Takakubo F, Kuwano A, Kondo I (1996) Evidence that poor metabolizers of (S)-mephenytoin could be identified by haplotypes of CYP2C19 in Japanese. *Pharmacogenetics* 6(3):265–267
 38. Kubota T, Chiba K, Ishizaki T (1996) Genotyping of S-mephenytoin 4'-hydroxylation in an extended Japanese population. *Clin Pharmacol Ther* 60(6):661–666
 39. Xiao ZS, Goldstein JA, Xie HG, Blaisdell J, Wang W, Jiang CH, Yan FX, He N, Huang SL, Xu ZH, Zhou HH (1997) Differences in the incidence of the CYP2C19 polymorphism affecting the S-mephenytoin phenotype in Chinese Han and Bai populations and identification of a new rare CYP2C19 mutant allele. *J Pharmacol Exp Ther* 281(1):604–609
 40. Yamada S, Onda M, Kato S, Matsuda N, Matsuhisa T, Yamada N, Miki M, Matsukura N (2001) Genetic differences in CYP2C19 single nucleotide polymorphisms among four Asian populations. *J Gastroenterol* 36(10):669–672
 41. He N, Yan FX, Huang SL, Wang W, Xiao ZS, Liu ZQ, Zhou HH (2002) CYP2C19 genotype and S-mephenytoin 4'-hydroxylation phenotype in a Chinese Dai population. *Eur J Clin Pharmacol* 58(1):15–18
 42. Yang ZF, Cui HW, Hasi T, Jia SQ, Gong ML, Su XL (2010) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes 2C9 and 2C19 in a healthy Mongolian population in China. *Genet Mol Res* 9(3):1844–1851
 43. Yang YS, Wong LP, Lee TC, Mustafa AM, Mohamed Z, Lang CC (2004) Genetic polymorphism of cytochrome P450C19 in healthy Malaysian subjects. *Br J Clin Pharmacol* 58(3):332–335
 44. Liou YH, Lin CT, Wu YJ, Wu LSH (2006) The high prevalence of the poor and ultrarapid metabolite alleles of CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, and CYP3A5 in Taiwanese population. *J Hum Genet* 51(10):857–863
 45. Roh HK, Dahl ML, Tybring G, Yamada H, Cha YN, Bertilsson L (1996) CYP2C19 genotype and phenotype determined by omeprazole in a Korean population. *Pharmacogenetics* 6(6):547–551
 46. Tassaneeyakul W, Mahatthanatrakul W, Niwatananun K, Na-Bangchang K, Tawalee A, Krikreangsak N, Cykleng U (2006) CYP2C19 genetic polymorphism in Thai, Burmese and Karen populations. *Drug Metab Pharmacokinet* 21(4):286–290
 47. Lamba JK, Dhiman RK, Kohli KK (2000) CYP2C19 genetic mutations in North Indians. *Clin Pharmacol Ther* 68(3):328–335
 48. Adithan C, Gerard N, Vasu S, Rosemary J, Shashindran CH, Krishnamoorthy R (2003) Allele and genotype frequency of CYP2C19 in a Tamilian population. *Br J Clin Pharmacol* 56(3):331–333
 49. Kesavan R, Narayan S, Adithan C (2010) Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on phenytoin-induced neurological toxicity in Indian epileptic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 66(7):689–696
 50. Jose R, Chandrasekaran A, Sam SS, Gerard N, Chanolean S, Abraham BK, Satyanarayananmoorthy K, Peter A, Rajagopal K (2005) CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms: frequencies in the south Indian population. *Fundam Clin Pharmacol* 19(1):101–105
 51. Siddapuram SP, Mahurkar S, Duvvuru NR, Mitnala S, Guduru VR, Rebala P, Mansard MJ (2011) CYP2C19 polymorphism as a predictor of personalized therapy in South Indian population. *J Assoc Physicians India* 59:490–493
 52. Ghodke Y, Joshi K, Arya Y, Radkar A, Chiplunkar A, Shintre P, Patwardhan B (2007) Genetic polymorphism of CYP2C19 in Maharashtrian population. *Eur J Epidemiol* 22(12):907–915
 53. Panchabhai TS, Noronha SF, Davis S, Shinde VM, Kshirsqatar NA, Goqtay NJ (2006) Evaluation of the activity of CYP2C19 in Gujrati and Marwadi subjects living in Mumbai (Bombay). *BMC Clin Pharmacol* 24(6):8
 54. Tamminga WJ, Wemer J, Oosterhuis B, de Zeeuw RA, De Leij LFMH, Jonkman JHG (2001) The prevalence of CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in a population of healthy Dutch volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 57(10):717–722
 55. Yamada H, Dahl ML, Lannfelt L, Viitanen M, Winblad B, Sjoqvist F (1998) CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in an elderly Swedish population. *Eur J Clin Pharmacol* 54(6):479–481
 56. Bathum L, Hansen TS, Horder M, Broesen K (1998) A dual label oligonucleotide ligation assay for detection of the CYP2C19*1, CYP2C19*2, and CYP2C19*3 alleles involving time-resolved fluorometry. *Ther Drug Monit* 20(1):1–6
 57. Halling J, Petersen M, Damkier P, Nielsen F, Grandjean P, Weihe P, Lundgren S, Lundblad M, Broesen K (2005) Polymorphism of Cyp2D6, Cyp2C19, Cyp2C9 and Cyp2C8 in the Faroese population. *Eur J Clin Pharmacol* 61(7):491–497

58. Allabi AC, Gala JL, Desager JP, Heusterspreute M, Horsmans Y (2003) Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 in the Beninese and Belgian populations. *Br J Clin Pharmacol* 56(6):653–657
59. Aynacioglu AS, Sachse C, Bozkurt A, Kortunay S, Nacak M, Schroder T, Kayaalp SO, Roots I, Brockmoller J (1999) Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population. *Clin Pharmacol Ther* 66(2):185–192
60. Brockmoller J, Rost KL, Gross D, Schenkel A, Roots I (1995) Phenotyping of Cyp2C19 with enantiospecific hplc-quantification of R-mephenytoin and S-mephenytoin and comparison with the intron4/exon5 G-JA-splice site mutation. *Pharmacogenetics* 5(2):80–88
61. Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmoller J, Frotschl R, Kopke K, Gerloff T, Chernov JN, Roots I (2003) Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol* 59(4):303–312
62. Bozina N, Granic P, Lalic Z, Tramisak I, Lovric M, Stavljenic-Rukavina A (2003) Genetic polymorphisms of cytochromes P450: cYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian population. *Croatian Med J* 44(4):425–428
63. Scordo MG, Caputi AP, D'Arrigo C, Fava G, Spina E (2004) Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population. *Pharmacol Res* 50(2):195–200
64. Ruas JL, Lechner MC (1997) Allele frequency of CYP2C19 in a Portuguese population. *Pharmacogenetics* 7(4):333–335
65. Sviri S, Shpizen S, Leitersdorf E, Levy M, Caraco Y (1999) Phenotypic-genotypic analysis of CYP2C19 in the Jewish Israeli population. *Clin Pharmacol Ther* 65(3):275–282
66. Jureidini ID, Chamseddine N, Keleshian S, Naoufal R, Zahed L, Hakime N (2011) Prevalence of CYP2C19 polymorphisms in the Lebanese population. *Mol Biol Rep* 38(8):5449–5452
67. Azarpira N, Namazi S, Hendijani F, Banan M, Darai M (2010) Investigation of allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and VKORC1 in Iran. *Pharmacol Rep* 62(4):740–746
68. Zand N, Tajik N, Moghaddam AS, Milanian I (2007) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes 2C9 and 2C19 in a healthy Iranian population. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(1–2):102–105
69. Nowak MP, Sellers EM, Tyndale RF (1998) Canadian native Indians exhibit unique CYP2A6 and CYP2C19 mutant allele frequencies. *Clin Pharmacol Ther* 64(4):378–383
70. Jurima-Romet M, Goldstein JA, LeBelle M, Aubin RA, Foster BC, Walop W, Rode A (1996) CYP2C19 genotyping and associated mephenytoin hydroxylation polymorphism in a Canadian Inuit population. *Pharmacogenetics* 6(4):329–339
71. Xie HG, Stein CM, Kim RB, Wilkinson GR, Flockhart DA, Wood AJJ (1999) Allelic, genotypic and phenotypic distributions of S-mephenytoin 4'-hydroxylase (CYP2C19) in healthy Caucasian populations of European descent throughout the world. *Pharmacogenetics* 9(5):539–549
72. Edeki TI, Goldstein JA, Demorais SMF, Hajiloo L, Butler M, Chapdelaine P, Wilkinson GR (1996) Genetic polymorphism of S-mephenytoin 4'-hydroxylation in African-Americans. *Pharmacogenetics* 6(4):357–360
73. Marinac JS, Balian JD, Foxworth JW, Willis SK, Daus JC, Owen R, Flockhart DA (1996) Determination of CYP2C19 phenotype in black Americans with omeprazole: correlation with genotype. *Clin Pharmacol Ther* 60(2):138–144
74. Martin DE, Tran JQ, Flockhart DA, Jorkasky DK (1998) Analysis of CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in large African-American (AA) and, Caucasian (C) populations. *Clin Pharmacol Ther* 63(2):206
75. Luo HR, Poland RE, Lin KM, Wan YJY (2006) Genetic polymorphism of cytochrome P450C19 in Mexican Americans: a cross-ethnic comparative study. *Clin Pharmacol Ther* 80(1):33–40
76. Herrlin K, Massele AY, Jande M, Alm C, Tybring G, Abdi YA, Wennerholm A, Johansson I, Dahl ML, Bertilsson L, Gustafsson LL (1998) Bantu Tanzanians have a decreased capacity to metabolize omeprazole and mephenytoin in relation to their CYP2C19 genotype. *Clin Pharmacol Ther* 64(4):391–401
77. Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, El Enany M, Moursi N, Ahmed MSE, Mizugaki M (2002) Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P450 (CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol* 53(6):596–603
78. Persson I, Aklillu E, Rodrigues F, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M (1996) S-mephenytoin hydroxylation phenotype and CYP2C19 genotype among ethiopians. *Pharmacogenetics* 6(6):521–526
79. Dandara C, Masimirembwa CM, Magimba A, Sayi J, Kaaya S, Sommers DK, Snyman JR, Hasler JA (2001) Genetic polymorphism of CYP2D6 and CYP2C19 in East- and Southern African populations including psychiatric patients. *Eur J Clin Pharmacol* 57(1):11–17
80. Isaza C, Henao J, Martinez JH, Sepulveda Arias JC, Beltran L (2007) Phenotype-genotype analysis of CYP2C19 in Colombian mestizo individuals. *BMC Clin Pharmacol* 7:6. doi:10.1186/1472-6904-7-6
81. Santos PCJL, Soares RAG, Santos DBG, Nascimento RM, Coelho GLLM, Nicolau JC, Mill JG, Krieger JE, Pereira AC (2011) CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. *BMC Med Genet*. doi:10.1186/1471-2350-12-13
82. Bravo-Villalta HV, Yamamoto K, Nakamura K, Baya A, Okada Y, Horiuchi R (2005) Genetic polymorphism of CYP2C9 and CYP2C19 in a Bolivian population: an investigative and comparative study. *Eur J Clin Pharmacol* 61(3):179–184
83. Griese EU, Ilett KF, Kitteringham NR, Eichelbaum M, Powell H, Spargo RM, LeSouef PN, Musk AW, Minchin RF (2001) Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P4502D6, 2C19 and 2E1 in Aborigines from Western Australia. *Pharmacogenetics* 11(1):69–76