



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΔΕΙ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
“ΙΑΤΡΙΚΗ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ: ΟΙ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ
ΒΙΟ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ, ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ”.**

ΕΝΟΤΗΤΑ 4. ΟΙ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΙΟ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΑ ΣΕ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Καλλιόπη Λιαδάκη

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας

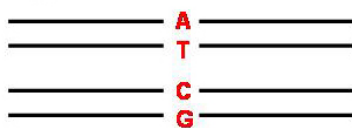
Εισαγωγή

Ο Sir William Osler είπε το 1892 «Εάν δεν υπήρχε τόσο μεγάλη ποικιλομορφία ανάμεσα στα άτομα, η εξάσκηση της ιατρικής θα μπορούσε να είναι μια επιστήμη και όχι μια τέχνη». Ο όρος φαρμακογενετική χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1959 από τον Γερμανό γενετιστή F. Vogel για να περιγράψει την ύπαρξη γενετικών διαφορών στην ανταπόκριση των διαφορετικών ατόμων στα φάρμακα. Ενώ υπάρχουν αρκετοί λόγοι που μπορούν να εξηγήσουν την ποικιλία αποκρίσεων στα φάρμακα, όπως η ηλικία, το φύλο, η σοβαρότητα της νόσου και η παράλληλη χρήση άλλων φαρμάκων, οι γενετικές διαφορές μεταξύ των ατόμων φαίνεται πως παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ποικιλότητα αυτή. Ο απώτερος στόχος του τομέα της φαρμακογενετικής είναι, με τον προσδιορισμό των γονοτύπων, να γίνεται δυνατή η επιλογή/παραγωγή του κατάλληλου φαρμάκου και ο καλύτερος σχεδιασμός της δοσολογίας για κάθε ασθενή (εξατομίκευση δόσης), με αποτέλεσμα τη βελτιωμένη αποτελεσματικότητα και την ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων ενεργειών. Το ενδιαφέρον από φυσιολόγους, γενετιστές και τη φαρμακευτική βιομηχανία γύρω από τη φαρμακογενετική έρευνα έχει ενταθεί τα τελευταία χρόνια καταδεικνύει η μεγάλη αύξηση του αριθμού των δημοσιεύσεων, που περιλαμβάνουν αυτό τον όρο. Η αυξανόμενη χρήση του όρου “φαρμακογονιδιοματική” αντικατοπτρίζει την εξέλιξη της φαρμακογενετικής στην έρευνα όλου του φάσματος των γονιδίων, που καθορίζουν τη δράση των φαρμάκων. Για την ακρίβεια, η φαρμακογονιδιοματική είναι η επιστήμη, που κάνει χρήση της γονιδιοματικής για την εύρεση νέων θεραπειών.

Γενετική ποικιλότητα και απόκριση σε φάρμακα

Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου 3 δισεκατομμύρια νουκλεοτίδια και 25,000 - 40,000 γονίδια, που μέσω εναλλακτικού ματίσματος και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων μπορεί να κωδικοποιούν 100.000 ή περισσότερες πρωτεΐνες. Ο πιο κοινός τύπος γενετικής ποικιλότητας μεταξύ ατόμων είναι ο πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). Κάθε SNP αντιπροσωπεύει μια διαφορά σε ένα νουκλεοτίδιο σε μια ορισμένη θέση της αλυσίδας του DNA. Η συχνότητα τέτοιων αλλαγών στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι περίπου 1 ανά 1.330 βάσεις. Κάθε άνθρωπος χαρακτηρίζεται από ένα διαφορετικό πρότυπο SNP. Με βάση την παρατηρούμενη συχνότητα των SNP ανά γονιδίωμα εκτιμάται ότι στο σύνολο του ανθρώπινου πληθυσμού περιέχονται >10 εκατομμύρια SNP. Ήδη έχουν αναγνωρισθεί > 1 εκατομμύριο τέτοιοι πολυμορφισμοί. Ένα γονίδιο θεωρείται λειτουργικά πολυμορφικό όταν οι παραλλαγές του, που μεταβάλλουν τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης βρίσκονται σε έναν πληθυσμό με μια συχνότητα >1%.

πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου (SNP)



Στον πολυμορφισμό μονού νουκλεοτιδίου ένα τμήμα της αλληλουχίας DNA απαντάται με διαφορετικές παραλλαγές

Οι SNP και άλλες αλλαγές στην αλληλουχία του DNA μπορούν να συμβούν οπουδήποτε στο γονιδίωμα, δηλαδή σε περιοχές που είτε κωδικοποιούν είτε δεν

κωδικοποιούν γονίδια. Αν ένα SNP αλλάξει το κωδικοποιούμενο αμινοξύ καλείται μη-συνώνυμο κωδικό SNP. Οι υπόλοιπες διαφορές στην αλληλουχία του DNA αφορούν ενθέσεις, ελλείμματα, διπλασιασμούς, μερικές φορές ενός ή μερικών νουκλεοτιδίων αλλά σποραδικά ολόκληρων γονιδίων ή μεγάλων κομματιών DNA, που περιλαμβάνουν πολλά γονίδια.

Οι πολυμορφισμοί, που είναι υπεύθυνοι για τη διαφορετική απόκριση των ατόμων σε φάρμακα (πολυμορφισμοί κλινικής σημασίας) έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: 1) τροποποιούν την αμινοξική αλληλουχία (και συνεπώς τη δραστικότητα) της παραγόμενης πρωτεΐνης, 2) παρατηρούνται κατά προτίμηση μέσα στο εξώνιο ή την περιοχή του υποκινητή, του ενισχυτή, ή στα όρια εξωνίων /ιντρονίων ή σε άλλες αλληλουχίες που ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου ή τη σταθερότητα του mRNA και 3) εμφανίζουν σχετική επικράτεια στον υπό μελέτη πληθυσμό (συχνότητα >1%) (διαφάνεια 3).

Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων (ή το γενετικό προφίλ του κάθε ατόμου) μπορούν να εξηγήσουν γιατί ένας μικρός αριθμός ατόμων ενός συγκεκριμένου πληθυσμού, που λαμβάνει ένα συγκεκριμένο φάρμακο δεν μπορεί να αποκριθεί στο φάρμακο αυτό ή παρουσιάζει αποτελέσματα αντίθετα από τα επιθυμητά. Στόχος της φαρμακογονιδιοματικής είναι η «εξατομικευμένη θεραπεία», δηλαδή η παραγωγή/ανάπτυξη φαρμάκων σύμφωνα με το γενότυπο του κάθε ασθενούς με σκοπό τη βέλτιστη απόκρισή του στη θεραπεία.

Γενικές αρχές της δράσης των φαρμάκων

Για να γίνει κατανοητό πώς το γενετικό προφίλ ενός ατόμου μπορεί να επηρεάσει την απόκρισή του σε κάποιο φάρμακο είναι σημαντικό να προηγηθεί μια σύντομη εισαγωγή για τα φάρμακα και τον τρόπο δράσης τους. Συνήθως, με τον όρο φάρμακο αναφερόμαστε σε μια χημική ουσία, που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ασθενειών. Ειδικότερα, το φάρμακο ορίζεται ως μία βιολογικά δραστική ουσία (χημικός παράγοντας) που αλληλεπιδρά με ένα ειδικό μόριο-στόχο και παράγει ένα βιολογικό αποτέλεσμα. Με την έννοια αυτή ο όρος φάρμακο περιλαμβάνει ουσίες καθημερινής χρήσης (καφεΐνη, νικοτίνη, αλκοόλη), εξαρτησιογόνες ουσίες (κάνναβη, ηρωίνη, κοκαΐνη), προσθετικά τροφίμων και καλλυντικά. Η πλειοψηφία των φαρμάκων προέρχεται από φυτά και το πρώτο παράδειγμα απομόνωσης ενός καθαρού φαρμάκου είναι η εκχύλιση της μορφίνης από το όπιο, που πραγματοποιήθηκε από τον Friedrich Serturmer το 1805 (διαφάνεια 4).

Για την κατανόηση της δράσης των φαρμάκων είναι απαραίτητος ο ορισμός των εννοιών “φαρμακοκινητική” και “φαρμακοδυναμική”. Η φαρμακοκινητική (pharmacokinetics) είναι η μελέτη των επιδράσεων του οργανισμού σε ένα φάρμακο. Συγκεκριμένα, ασχολείται με τον προσδιορισμό παραμέτρων όπως ο ρυθμός απορρόφησης του φαρμάκου από τον οργανισμό, η κατανομή του, ο μεταβολισμός και η απομάκρυνσή του. Η φαρμακοδυναμική (pharmacodynamics) είναι η μελέτη των επιδράσεων ενός φαρμάκου στον οργανισμό. Ασχολείται με μετρήσεις της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (καμπύλες δόσης-απόκρισης), περιγράφει, δηλαδή, τη σχέση της συγκέντρωσης και της βιοχημικής ή φυσιολογικής δράσης ενός φαρμάκου, που δεσμεύεται σε ένα υποδοχέα.

A. Φαρμακοκινητική: απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός και απέκκριση φαρμάκων

Η φαρμακοκινητική (διαφάνεια 6) περιγράφει την πορεία του φαρμάκου στο σώμα. Η ταχύτητα έναρξης της δράσης ενός φαρμάκου, η διάρκεια της δράσης του καθώς και η ένταση του θεραπευτικού αποτελέσματος ρυθμίζονται από τις 4 βασικές οδούς διακίνησης του φαρμάκου:

1. **Απορρόφηση:** το φάρμακο από τη θέση χορήγησής του εισέρχεται στο πλάσμα.

2. **Κατανομή:** το φάρμακο αφήνει την κυκλοφορία του αίματος και κατανέμεται στο διάμεσο και το ενδοκυττάριο υγρό.

3. **Μεταβολισμός:** το φάρμακο μπορεί να μεταβολιστεί από το ήπαρ, τους νεφρούς ή άλλους ιστούς.

4. **Απέκκριση:** το φάρμακο και οι μεταβολίτες του απεκκρίνονται από τον οργανισμό με τα ούρα, τη χολή, τα κόπρανα, τον ιδρώτα, καθώς και άλλες εκκρίσεις.

1. Απορρόφηση

Τα φάρμακα φτάνουν στο στόχο τους μέσω της φλεβικής κυκλοφορίας του αίματος. Η οδός χορήγησης καθορίζεται από τις ιδιότητες του φαρμάκου (υδατοδιαλυτότητα, λιποδιαλυτότητα, ιονισμός) και από τους θεραπευτικούς στόχους (άμεση έναρξη της δράσης του φαρμάκου, περιορισμός σε καθορισμένη θέση). Ανάλογα με το αν το φάρμακο διέρχεται ή όχι από το γαστρεντερικό σωλήνα πριν μεταφερθεί στην κυκλοφορία διακρίνεται η εντερική και η παρεντερική χορήγηση. Κατά την παρεντερική χορήγηση (ενδοφλέβια, ενδομυϊκή, διαδερμική, υποδόρια, υπογλώσσια) παρακάμπτεται το πεπτικό σύστημα και το φάρμακο εισέρχεται απευθείας στην κυκλοφορία. Κατά την εντερική χορήγηση (από το στόμα ή από το ορθό σε μορφή υπόθετου) το φάρμακο διέρχεται από το γαστρεντερικό σύστημα προτού μεταφερθεί στη φλεβική κυκλοφορία. Η πορεία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη διέλευση του φαρμάκου από το ήπαρ, που αποτελεί το κύριο όργανο του μεταβολισμού (όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια), με αποτέλεσμα το φάρμακο να υποστεί μεταβολισμό πρώτης διόδου ή προ-συστηματική απομάκρυνση (first-pass effect, presystemic elimination).

2. Κατανομή

Η κατανομή αφορά στη μεταφορά του φαρμάκου από την κυκλοφορία του αίματος στο διάμεσο χώρο (εξωκυττάριο υγρό) ή/και στα κύτταρα των ιστών, όπου θα ασκήσει τη δράση του. Για παράδειγμα, ο σχεδιασμός του φαρμάκου θα πρέπει να γίνει με βάση τους παράγοντες που επηρεάζουν την κατανομή του, ώστε να επιτευχθεί θεραπευτική δράση σε συγκεκριμένο πάσχων ιστό. Η κατανομή εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως

α) οι ιδιότητες του φαρμάκου (υδατοδιαλυτότητα, λιποδιαλυτότητα),

β) η αιματική ροή (όσο περισσότερο αιματώνεται ένας ιστός, τόσο μεγαλύτερη είναι η κατανομή του φαρμάκου, δηλαδή η μεταφορά του μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στον ιστό),

γ) η διαπερατότητα των τριχοειδών, η οποία ποικίλλει ανάλογα με τον ιστό και αποτελεί ένα είδος φραγμού για τη διέλευση ουσιών από την κυκλοφορία του αίματος στους ιστούς. Επί παραδείγματι, στον εγκέφαλο η δομή των τριχοειδών είναι συνεχής, διότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα που απαντώνται στο εσωτερικό των τριχοειδών είναι πολύ στενά δεμένα μεταξύ

τους και δε διαθέτουν ανοίγματα (αιματοεγκεφαλικός φραγμός), ενώ τα τριχοειδή στο ήπαρ έχουν μεγάλους πόρους και επιτρέπουν τη δίοδο ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους.

δ) Τέλος, η κατανομή ενός φαρμάκου επηρεάζεται από τη σύνδεσή του με πρωτεΐνες του πλάσματος (π.χ. αλβουμίνη) καθώς η σύνδεση αυτή μετατρέπει το φάρμακο σε μια μη διαχεόμενη μορφή και καθυστερεί την έξοδό του από τα αγγεία. Η μείωση της συγκέντρωσης του ελεύθερου φαρμάκου (λόγω της πρόσδεσής του στην αλβουμίνη) επιδρά όχι μόνο στην ένταση της δράσης του αλλά και στο μεταβολισμό και την απέκκρισή του, καθώς μόνο το ελεύθερο φάρμακο μπορεί να εισέλθει σε θέσεις ηπατικού μεταβολισμού και να απεκκριθεί.

3. Μεταβολισμός

Ο οργανισμός “θεωρεί” σχεδόν όλα τα φάρμακα ξένες ουσίες, οι οποίες πρέπει να υποβάλλονται σε ορισμένες χημικές διεργασίες όπως ο μεταβολισμός, ώστε να είναι δυνατή η κατάλληλη χρησιμοποίηση και η φυσιολογική απέκκρισή τους. Το ήπαρ αποτελεί το κυριότερο όργανο για την αδρανοποίηση και την εξουδετέρωση των φαρμάκων. Αρκετοί ιστοί του ανθρώπινου οργανισμού (π.χ. στομάχι, έντερο, πνεύμονες) διαθέτουν ικανότητα μεταβολισμού αλλά το ενδοπλασματικό δίκτυο του ήπατος αποτελεί την κυριότερη τοποθεσία επεξεργασίας ενδογενών χημικών ουσιών (π.χ. χοληστερόλη, στεροειδείς ορμόνες, πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα) αλλά και εξωγενών ουσιών (π.χ. τοξίνες και φάρμακα). Τα περισσότερα φάρμακα είναι λιπόφιλα, ώστε να μπορούν να διαπεράσουν τις λιπιδικές μεμβράνες και να εισέλθουν στα κύτταρα. Οι νεφροί, όμως, δεν αποβάλλουν ικανοποιητικά τα λιπόφιλα φάρμακα διότι αυτά διαπερνούν εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα να επαναρροφώνται στα άπω νεφρικά σωληνάρια. Ο μεταβολικός μετασχηματισμός των φαρμάκων καταλύεται από ένζυμα. Τα μεταβολικά ένζυμα τροποποιούν τα φάρμακα με τέτοιο τρόπο ώστε να αυξάνουν τη διαλυτότητά τους στο νερό και οι υδατοδιαλυτοί μεταβολίτες τους να μπορούν να απεκκριθούν ευκολότερα.

Οι αντιδράσεις του μεταβολισμού των φαρμάκων περιλαμβάνουν τις αντιδράσεις Φάσεις I και II (διαφάνεια 9). Στη φάση I πραγματοποιούνται αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής και υδρόλυσης, οι οποίες προσθέτουν στο φάρμακο μια πολική λειτουργική ομάδα (π.χ. -OH ή -NH₂) με σκοπό να αυξηθεί η πολικότητά του και ταυτόχρονα να υποστεί τις αντιδράσεις της Φάσης II. Ο μεταβολισμός σε αυτή τη φάση μπορεί να αυξήσει, να μειώσει ή να αφήσει αμετάβλητη τη φαρμακολογική δραστηριότητα του φαρμάκου. Οι αντιδράσεις της Φάσης II είναι αντιδράσεις σύζευξης. Μια αντίδραση σύζευξης με υπόστρωμα το γλυκουρονικό οξύ, τοθειϊκό οξύ ή το οξικό οξύ οδηγεί στο σχηματισμό πολικών, υδατοδιαλυτών ουσιών, οι οποίες συνήθως είναι θεραπευτικά αδρανείς και απεκκρίνονται εύκολα από τους νεφρούς. Αξίζει να αναφερθεί ότι δεν ακολουθούν όλα τα φάρμακα τις αντιδράσεις των Φάσεων I και II με την κανονική σειρά. Η ισονιαζίδη, για παράδειγμα πρώτα ακετυλιώνεται (αντίδραση Φάσης II) και στη συνέχεια υδρολύεται (αντίδραση Φάσης I). Στη διαφάνεια 10 δίνονται παραδείγματα των κυριότερων ενζυμικών αντιδράσεων των Φάσεων I και II και των ενζύμων που τις επιτελούν. Οι αντιδράσεις των Φάσεων I και II συνήθως αδρανοποιούν τα φάρμακα, ενδέχεται όμως οι μεταβολίτες να είναι φαρμακολογικά ενεργοί. Τα προφάρμακα (prodrugs) είναι αδρανείς χημικές ενώσεις, που μετατρέπονται σε φαρμακολογικά δραστικές ουσίες αφού πρώτα μεταβολιστούν.

Η πλειοψηφία των αντιδράσεων της Φάσης I επιτελείται από ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (ή μικροσωμιακή οξειδάση μικτής λειτουργίας). Το κυτόχρωμα περιλαμβάνει μια υπερ-οικογένεια από ισομορφές ενζύμων, που περιέχουν αίμη και καταλύουν τον οξειδωτικό μεταβολισμό πολλών ενδογενών ουσιών (π.χ. λιπίδια, στεροειδή) και τη βιομετατροπή εξωγενών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων και των φαρμάκων. Το όνομά του προέρχεται από τη φασματοφωτομετρική κορυφή, που εμφανίζει στα 450 nm (μερικά ισόενζυμα παρουσιάζουν κορυφή στα 448 nm). Το κυτόχρωμα P450 περιλαμβάνει 57 διαφορετικά ενεργά γονίδια, τα οποία χωρίζονται σε 17 διαφορετικές οικογένειες και καταλύουν αντιδράσεις όπως η αλειφατική οξείδωση, η αρωματική υδροξυλίωση, ο σχηματισμός σουλφοοξειδίων, η N-οξείδωση, η N-υδροξυλίωση και η N-/O-/S-απαλκυσίωση. Όσον αφορά στην ονοματολογία τους, το CYP1A2 αναφέρεται στην οικογένεια 1, υπο-οικογένεια A, γονιδιακό προϊόν 2. Αν στη συνέχεια υπάρχει αστερίσκος και ένας αριθμός προσδιορίζει το μετάλλαγμα (CYP2C19*3). Εκτός από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, στη Φάση I συμμετέχουν εστεράσες, αμινο-οξειδάσες και αφυδρογονάσες, οι οποίες επιτελούν αντιδράσεις όπως οξείδωση αμινών (π.χ. οξείδωση των κατεχολαμινών), αφυδρογόνωση αλκοολών και υδρόλυση.

Τα ένζυμα που συμμετέχουν στις αντιδράσεις της Φάσης II είναι κυρίως τα εξής: οι UDP-γλυκουρονοζυλτρανσφεράσες (UGTs), οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (Glutathione S-transferases, GSTs) που καταλύουν τη σύζευξη της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης σε ξενοβιοτικά υποστρώματα με σκοπό την αποτοξίνωση, οι N-ακετυλοτρανσφεράσες (N-Acetyl-transferases, NATs), που καταλύουν τη μεταφορά μιας ακετυλομάδας από το ακετυλο CoA σε αμίνες (π.χ. σουλφοναμίδες, ισονιαζίδη) και η θειοπουρινο-μεθυλτρανσφεράση (Thiopurine methyltransferase, TPMT), η οποία μεθυλιώνει και αδρανοποιεί φάρμακα θειοπουρίνης. Η γλυκουρονίωση είναι η πιο συνηθισμένη και σημαντική αντίδραση σύζευξης. Το β-γλυκουρονικό οξύ στην ενεργή του μορφή, συνδεδεμένο με διφωσφορική ουριδίνη συνδέεται σε μια υδροξυλομάδα του φαρμάκου με τη βοήθεια της γλυκουρονοζυλοτρανσφεράσης. Στα ένζυμα UGTs και TPMT θα αναφερθούμε στη συνέχεια.

Η δραστηριότητα των μεταβολικών ενζύμων είναι δυνατόν να αυξάνεται (επαγωγή) ή να μειώνεται (αναστολή) παρουσία εξωγενών παραγόντων, όπως η διατροφή, διάφοροι χημικοί παράγοντες ή η παρουσία άλλων φαρμάκων. Η επαγωγή, η αύξηση δηλαδή των επιπέδων κάποιων ισομορφών του κυτοχρώματος P450 μπορεί να προκληθεί από το κάπνισμα, τη χρόνια κατανάλωση αλκοόλ ή τη χρήση άλλων φαρμάκων και έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ταχύτητα μεταβολισμού των φαρμάκων. Η αναστολή κάποιων ισομορφών του P450 μπορεί να προκληθεί από χρήση συγκεκριμένων φαρμάκων όπως το αντιβιοτικό ερυθρομυκίνη και το αντιισταμινικό σιμετιδίνη ή άλλους εξωγενείς παράγοντες (π.χ. κατανάλωση χυμού γκρέιπ φρουτ). Η αναστολή των ισομορφών αυτών έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της δράσης άλλων φαρμάκων, που μεταβολίζονται από τις συγκεκριμένες ισομορφές του P450.

Παράγοντες που επηρεάζουν το μεταβολισμό των φαρμάκων

Α. Γενετικοί παράγοντες. Τα μεταβολικά ένζυμα υπάρχουν σε πολλές ισομορφές. Οι ατομικές διαφορές στη γενετική έκφραση των ενζύμων είναι ένας παράγοντας, που συντελεί στις διαφορές στο μεταβολισμό των φαρμάκων. Γονιδιακές μεταλλάξεις μπορούν να προκαλέσουν μειωμένη έκφραση ενός συγκεκριμένου ενζύμου, με αποτέλεσμα την εκδήλωση μη αναμενόμενης τοξικότητας κατά τη χορήγηση ενός φαρμάκου στη συνήθη δόση του λόγω του μειωμένου μεταβολισμού του. Αντίστροφα, οι γονιδιακές μεταλλάξεις μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση παραγωγής κάποιου μεταβολικού ενζύμου, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση του μεταβολισμού συγκεκριμένου φαρμάκου λόγω της οποίας ο ασθενής μπορεί να εμφανίζει ανθεκτικότητα σε αυτό το φάρμακο. Έχουν βρεθεί φυλετικές διαφοροποιήσεις στην έκφραση της γενετικής ποικιλομορφίας ως προς τις ισομορφές του κυτοχρώματος P450. Συγκεκριμένα, οι Καυκάσιοι είναι κατά 50% βραδείς ακετυλιωτές, ενώ οι Ασιάτες μόνο κατά 5%.

Β. Διατροφικοί παράγοντες και η ταυτόχρονη λήψη άλλων φαρμάκων μπορεί να επάγουν ή να αναστείλλουν συγκεκριμένα μεταβολικά ένζυμα. Το κάπνισμα, το αλκοόλ και τα ψημένα σε κάρβουνο φαγητά, τα οποία περιέχουν υψηλό ποσοστό πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων λόγω της καύσης του ξυλάνθρακα, επάγουν τη σύνθεση μεταβολικών ενζύμων (κυρίως του CYP1A). Αντίθετα, τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης που περιέχουν φλαβονοειδή και ο χυμός γκρέιπ φρουτ αποτελούν χαρακτηριστικούς αναστολείς του CYP3A4. Όπως αναφέρθηκε, πολλά φάρμακα μπορούν να επάγουν ενώ άλλα να αναστείλουν συγκεκριμένες ισομορφές του κυτοχρώματος P450. Συνεπώς η ταυτόχρονη πρόσληψη δύο ή περισσότερων φαρμάκων μπορεί να επηρεάσει το ρυθμό μεταβολισμού ενός ή περισσότερων από αυτά, με κλινικές συνέπειες.

Γ. Ηλικία. Στα ηλικιωμένα άτομα ο μεταβολισμός ορισμένων φαρμάκων μπορεί να μειωθεί. Κατ'αναλογία, σε βρέφη ηλικίας κάτω των 6 μηνών, ιδιαίτερα στα πρόωρα νεογνά παρατηρείται μικρότερη ικανότητα μεταβολισμού ορισμένων φαρμάκων. Και στις δύο περιπτώσεις, ευθύνεται η μειωμένη δράση των ηπατικών μεταβολικών ενζύμων.

Δ. Νόσοι. Ηπατικές και νεφρικές νόσοι επηρεάζουν το μεταβολισμό των φαρμάκων.

Η φαρμακοκινητική περιγράφει τις μεταβολές της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα και της συνολικής ποσότητας του φαρμάκου στον οργανισμό, σε συνάρτηση με το χρόνο. Στη διαφάνεια 13 απεικονίζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα σε συνάρτηση με το χρόνο κατά την εφάπαξ ενδοφλέβια, ενδομυϊκή, υποδόρια και από το στόμα (per os) χορήγηση. Ανάλογα με την οδό χορήγησης παρατηρείται διαφορετική φαρμακοκινητική. Κατά την ενδοφλέβια χορήγηση, επιτυγχάνεται άμεσα (χρόνος μηδέν) το 100% της μέγιστης συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα, η οποία μειώνεται με την πάροδο του χρόνου μέχρι να μηδενιστεί πλήρως όταν απεκκριθεί ολόκληρη η ποσότητα του φαρμάκου από τον οργανισμό. Κατά τη χορήγηση μέσω των άλλων οδών (ενδομυϊκή, υποδόρια, per os) απαιτείται κάποιος χρόνος, μέχρι να επιτευχθεί η μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα, που είναι πάντα μικρότερη από το 100% της δόσης που χορηγήθηκε, και μειώνεται με την πάροδο του χρόνου λόγω απομάκρυνσης από το πλάσμα.

B. Φαρμακοδυναμική

Η φαρμακοδυναμική (pharmacodynamics) είναι η μελέτη των επιδράσεων ενός φαρμάκου στον οργανισμό. Ασχολείται με μετρήσεις της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, από τις οποίες προκύπτουν οι καμπύλες δόσης-απόκρισης. Η δράση ενός φαρμάκου μπορεί να ασκείται σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα (διαφάνεια 14):

- σε μοριακό επίπεδο: αναφέρεται στη σύνδεση του φαρμάκου με ένα μόριο-στόχο
- σε κυτταρικό επίπεδο: αναφέρεται στη μεταγωγή σήματος μετά από τη σύνδεση του φαρμάκου στο μόριο-στόχο, δηλαδή στις βιοχημικές ουσίες που συνδέονται με το μόριο-στόχο και προκαλούν μια κυτταρική επίδραση
- σε επίπεδο ιστών: αναφέρεται στην επίδραση του φαρμάκου στη λειτουργία κάποιου ιστού, όπως συστολή, έκκριση, μεταβολική δραστηριότητα ή πολλαπλασιασμός
- σε επίπεδο συστημάτων: αναφέρεται στην επίδραση του φαρμάκου στη λειτουργία ενός ή περισσοτέρων συστημάτων

Καθώς η δράση ενός φαρμάκου ορίζεται σε τέσσερα επίπεδα, οι αποκρίσεις στο φάρμακο μπορούν επίσης να οριστούν με τον ίδιο τρόπο. Επομένως, ένα φάρμακο μπορεί να προκαλέσει μοριακές, κυτταρικές, ιστικές και συστημικές αποκρίσεις.

Η δράση του φαρμάκου σε μοριακό επίπεδο περιλαμβάνει τη σύνδεση με μόρια-στόχους, που μπορεί να είναι υποδοχείς, ένζυμα, μόρια-φορείς (συμμεταφορείς ή αντιμεταφορείς), κανάλια ιόντων και νουκλεϊνικά οξέα. Οι υποδοχείς αποτελούν την μεγαλύτερη κατηγορία στόχων φαρμάκων και μπορεί να είναι διαμεμβρανικοί και ενδοκυττάριοι (intracellular). Στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς περιλαμβάνονται κανάλια ιόντων, που ελέγχονται από πρόσδεμα (ligand gated ion channel receptors), υποδοχείς που συζεύγγονται με G πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors, GPCRs) και υποδοχείς που συνδέονται με ένζυμο (enzyme-linked receptors) και συνήθως διαθέτουν ενεργότητα κινάσης-τυροσίνης.

Οι καμπύλες δόσης-απόκρισης περιγράφουν το βιολογικό αποτέλεσμα, που προκαλούν διαφορετικές συγκεντρώσεις ενός φαρμάκου (διαφάνεια 15). Από τις καμπύλες δόσης-απόκρισης μπορούν να προσδιοριστούν δύο σημαντικές ιδιότητες των φαρμάκων. Η πρώτη είναι η ισχύς, ως μέτρο της ποσότητας του φαρμάκου, που απαιτείται για να παραχθεί ένα αποτέλεσμα δεδομένης έντασης. Για τη μέτρηση της ισχύος ενός φαρμάκου χρησιμοποιείται η συγκέντρωση, που προκαλεί το 50% του μεγίστου δυνατού αποτελέσματος (EC_{50} , Effective Concentration 50%). Η συγγένεια του φαρμάκου με τον στόχο του αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα, που συμμετέχει στη διαμόρφωση του μεγέθους της EC_{50} . Συχνά χρησιμοποιούνται ημιλογαριθμικές γραφικές παραστάσεις, επειδή το εύρος των συγκεντρώσεων του φαρμάκου μπορεί να εκτείνεται σε αρκετές τάξεις μεγέθους. Παριστάνοντας γραφικά το λογάριθμο της συγκέντρωσης μπορεί να απεικονιστεί ολόκληρη η σειρά των πιθανών δόσεων και οι καμπύλες έχουν σιγμοειδές σχήμα που επιτρέπει εύκολα την οπτική εκτίμηση της EC_{50} . Στη διαφάνεια 15 σημειώνονται οι EC_{50} διαφόρων φαρμάκων (Α, Β και Γ).

Η δεύτερη ιδιότητα ενός φαρμάκου που μπορεί να υπολογισθεί από τις καμπύλες δόσης-απόκρισης είναι η αποτελεσματικότητά του (efficacy). Η αποτελεσματικότητα εξαρτάται από το πλήθος των συμπλόκων φαρμάκου-στόχου (π.χ. υποδοχέα), που θα σχηματιστούν και από το πόσο αποδοτικά συνδέεται η ενεργοποίηση του υποδοχέα με τις κυτταρικές απαντήσεις. Η μέγιστη απόκριση ή αποτελεσματικότητα είναι πιο σημαντική από την ισχύ του φαρμάκου καθώς ένα φάρμακο με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα είναι πιο χρήσιμο θεραπευτικά από ένα άλλο που είναι πιο ισχυρό. Στη διαφάνεια 15 το φάρμακο Α έχει μεγαλύτερη ισχύ από το φάρμακο Β αλλά ίδια αποτελεσματικότητα, ενώ το φάρμακο Γ έχει μικρότερη ισχύ και μικρότερη αποτελεσματικότητα από τα φάρμακα Α και Β.

Οι καμπύλες δόσης-απόκρισης χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του θεραπευτικού δείκτη ενός φαρμάκου, ο οποίος αποτελεί μέτρο της ασφάλειάς του. Κατά τον υπολογισμό του θεραπευτικού δείκτη, διαφορετικά άτομα σε ένα πληθυσμό εκτίθεται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του φαρμάκου και μελετώνται οι επί τοις εκατό επιθυμητές και ανεπιθύμητες ενέργειες στους ασθενείς. Ο θεραπευτικός δείκτης είναι ο λόγος της τοξικής προς την αποτελεσματική δόση, όπου η τοξική δόση είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου που προκαλεί τοξικό αποτέλεσμα στο 50% των ασθενών, ενώ η αποτελεσματική δόση είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου που προκαλεί το επιθυμητό αποτέλεσμα στο 50% των ασθενών. Στη διαφάνεια 16 φαίνεται το παράδειγμα ενός φαρμάκου με μικρό θεραπευτικό δείκτη (το αντιπηκτικό φάρμακο βαρφαρίνη) και ενός φαρμάκου με μεγάλο θεραπευτικό δείκτη (το αντιμικροβιακό φάρμακο πενικιλίνη). Φαίνεται ότι όσο αυξάνεται η δόση της βαρφαρίνης, ανταποκρίνεται όλο και μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών. Ωστόσο, στις υψηλότερες δόσεις βαρφαρίνης παρατηρείται τοξική απόκριση, δηλαδή έντονη αντιπηκτική ενέργεια που οδηγεί σε αιμορραγία. Επομένως, όταν ο θεραπευτικός δείκτης είναι μικρός, είναι πιθανό να υπάρχει μια περιοχή συγκεντρώσεων όπου τα θεραπευτικά και τα τοξικά αποτελέσματα αλληλεπικαλύπτονται, μερικοί ασθενείς δηλαδή παρουσιάζουν επιθυμητή απόκριση, ενώ σε άλλους προκαλείται αιμορραγία. Κατά τη χορήγηση, λοιπόν, φαρμάκων με μικρό θεραπευτικό δείκτη, είναι πιθανό να παρουσιαστούν μια διαφορετικές αποκρίσεις καθώς οι τοξικές και οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις είναι πολύ κοντά. Στα φάρμακα με μεγάλο θεραπευτικό δείκτη (π.χ. πενικιλίνη) υπάρχει μεγάλο περιθώριο μεταξύ των αποτελεσματικών και των τοξικών δόσεων. Τα φάρμακα αυτά είναι σχετικά ασφαλή και συνηθίζεται να χορηγούνται σε δόσεις, που ξεπερνούν την ελάχιστη απαιτούμενη δόση για να επιτευχθεί θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Πώς ξεκίνησε η φαρμακογενετική

Στις αρχές του 1950, η ανακάλυψη της δράσης της δεϋδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD) έθεσε τις βάσεις της φαρμακογενετικής. Η G6PD καταλύει το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών, που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή του φωσφορικού αδενινο-δινουκλεοτιδίου (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH). Το NADPH βοηθά τα κύτταρα να αντιμετωπίσουν το οξειδωτικό στρες, μέσω του συστήματος της ανηγμένης-οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH-GSSG), που καταλήγει στη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (διαφάνεια

17). Τα ερυθροκύτταρα εξαρτώνται από το ένζυμο G6PD για την παραγωγή του NADPH λόγω της έλλειψης μιτοχονδρίων.

Η ελονοσία είναι μια λοιμώδης ασθένεια, που προκαλείται από παρασιτικά πρωτόζωα του γένους *Plasmodium* (κυρίως *P. Falciparum* και *P. malariae*) που προσβάλλει τα ερυθρά αιμοσφαίρια και οδηγεί στην καταστροφή τους (αιμόλυση). Βρέθηκε, λοιπόν, ότι άτομα, τα οποία παρουσίαζαν χαμηλή δραστηριότητα στο ένζυμο G6PD ήταν ανθεκτικά στην ελονοσία. Αυτό είναι ένα παράδειγμα, που δείχνει ότι μια μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την G6PD έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της συμπεριφοράς των ατόμων απέναντι σε μια ασθένεια. Η ανεπάρκεια της G6PD κληρονομείται με φυλοσύνδετο (συνδεμένο με το X-χρωμόσωμα), υπολειπόμενο τρόπο. Σήμερα είναι γνωστό ότι το G6PD είναι από τα πιο πολυμορφικά γονίδια. Πάνω από 400 εκατομμύρια άτομα φέρουν ένα από τα 135 χαμηλής δραστηριότητας αλληλόμορφα, που μεταβάλλουν το μεταβολισμό των ερυθροκυττάρων.

Η ιστοσελίδα, που περιέχει βάσεις δεδομένων για τη φαρμακογενετική και φαρμακογονιδιωματική είναι η <https://www.pharmgkb.org/> (διαφάνεια 18). Στην ιστοσελίδα αυτή ο περιηγητής μπορεί να αναζητήσει πληροφορίες σχετικά με συγκεκριμένα γονίδια, φάρμακα και νόσους. Με βάση το γράφημα, που απεικονίζεται στη διαφάνεια 18, στόχος είναι η ταυτοποίηση πολυμορφισμών A) σε γονίδια που επηρεάζουν τη φαρμακοκινητική και B) σε γονίδια που επιδρούν στη φαρμακοδυναμική των φαρμάκων. Οι πολυμορφισμοί που προαναφέρθηκαν επηρεάζουν και καθορίζουν το κλινικό αποτέλεσμα, δηλαδή την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα του φαρμάκου. Στη συνέχεια αναλύεται πως οι πολυμορφισμοί αυτοί σχετίζονται με τη διαφορετική απόκριση των ατόμων σε φάρμακα.

A. Πολυμορφισμοί σε ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό φαρμάκων

Όπως αναφέρθηκε τα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φαρμάκων ταξινομούνται σε κατηγορίες ανάλογα με το αν συμμετέχουν στις αντιδράσεις της Φάσης I ή της Φάσης II. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα χαρακτηρίζονται από δομικό πολυμορφισμό με αποτέλεσμα να παρατηρούνται μεταξύ των ασθενών διαφορετικές αποκρίσεις σε θεραπείες.

1. Ένζυμα της Φάσης I

I. Κυτοχρώματα P450

Τα κυτοχρώματα P450 παίζουν καθοριστικό ρόλο στους μηχανισμούς πολυμορφισμού, που τροποποιούν τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες ενός φαρμάκου. Οι CYP1, CYP2 και CYP3 συμμετέχουν κυρίως στον μεταβολισμό των φαρμάκων και συγκεκριμένα οι CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 και CYP3A4 είναι υπεύθυνες για τον μεταβολισμό του 90% των πιο συχνά χορηγούμενων φαρμάκων σε ασθενείς. Στη διαφάνεια 22 παρουσιάζονται πολυμορφισμοί σε διάφορες ισομορφές κυτοχρώματος και η επίδρασή τους στην ενζυμική ενεργότητα. Για παράδειγμα, για το *CYP2A6*2*, η αλλαγή του νουκλεοτιδίου της θυμίνης σε αδερίνη στη θέση 1799 προκαλεί αλλαγή του αμινοξέος λευκίνης σε ιστιδίνη στη θέση 160 με αποτέλεσμα την απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας. Καθώς ο πολυμορφισμός αυτός μειώνει την ενζυμική ενεργότητα, τα άτομα που τον έχουν μεταβολίζουν αργά τα φάρμακα και χαρακτηρίζονται «αργοί

μεταβολιστές». Στη διαφάνεια 22 δίνονται και άλλα παραδείγματα πολυμορφισμών, που οδηγούν σε απώλεια ή μείωση της ενζυμικής ενεργότητας. Υπάρχουν και περιπτώσεις που ο πολυμορφισμός δεν αλλάζει την ενεργότητα του ενζύμου κι έτσι τα άτομα με αυτό τον πολυμορφισμό χαρακτηρίζονται «κανονικοί μεταβολιστές». Τέλος, στην περίπτωση του *CYP1A2*, η αλλαγή της κυτοσίνης σε αδενίνη στη θέση 164 (πριν την έναρξη της μεταγραφής) επάγει την έκφρασή του (διαφάνεια 22), με αποτέλεσμα η αυξημένη ενζυμική ενεργότητα να οδηγεί σε αυξημένο μεταβολισμό φαρμάκων κι έτσι τα άτομα με τον πολυμορφισμό αυτό χαρακτηρίζονται «γρήγοροι μεταβολιστές».

Εκτός από την μελέτη των πολυμορφισμών του κάθε μεταβολικού ενζύμου, η κατηγοριοποίηση των ατόμων ως «κανονικοί», «αργοί» και «γρήγοροι μεταβολιστές» μπορεί να γίνει και με μια λειτουργική δοκιμή (που καλείται και μελέτη φαινοτύπου) για να αποτιμηθεί το επίπεδο δραστηριότητας ενός συγκεκριμένου ενζύμου, το οποίο εμπλέκεται στο μεταβολισμό μιας ομάδας φαρμάκων. Το CYP2D6 αποτελεί την πιο καλά μελετημένη ισομορφή P450 με πολυμορφισμούς, που επιδρούν στο μεταβολισμό φαρμάκων, είναι υπεύθυνο για την οξείδωση πάνω από 70 διαφορετικών φαρμάκων και έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 95 αλληλόμορφα του. Υποστρώματα του CYP2D6 είναι αντιαρρυθμικά (π.χ. flecainide, mexiletine, propafenone), αντικαταθλιπτικά (π.χ. amitriptyline, agoxetine, venlafaxine, fluoxetine), αντιψυχωσικά (π.χ. clorpromazine, haloperidol, thioridazine), β-αναστολείς (π.χ. labetalol, timolol, propranolol, pindolol, metoprolol) και αναλγητικά φάρμακα (π.χ. codeine, fentanyl, meperidine, oxycodone).

Για τη μελέτη του επιπέδου δραστηριότητας του CYP2D6 χορηγείται το φάρμακο και στη συνέχεια πρέπει να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του φαρμάκου ή του κύριου μεταβολίτη του στην κυκλοφορία καθώς και η συγκέντρωση που απεκκρίνεται. Ακολούθως, υπολογίζεται ο ρυθμός μεταβολισμού, ο οποίος αποτελεί ένδειξη του επιπέδου δραστηριότητας του ενζύμου που μεταβολίζει το φάρμακο. Έχουν σχεδιαστεί διάφορες δοκιμές για να προσδιοριστεί η δραστηριότητα του ενζύμου CYP2D6, από τις οποίες η πιο ευρέως διαδεδομένη είναι η δοκιμή της δεβρισοκίνης. Η δεβρισοκίνη είναι ένα αντι-υπερτασικό φάρμακο, που χορηγείται per os και σε καθορισμένα διαστήματα μετά τη χορήγηση της συλλέγονται τα ούρα των ατόμων, που πρόκειται να προσδιοριστεί ο φαινότυπός τους. Ο λόγος της συγκέντρωσης της δεβρισοκίνης προς τον κύριο μεταβολίτη της, την 4-υδροξυ-δεβρισοκίνη, χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί ο μεταβολικός δείκτης (Metabolic Ratio, MR), που προσδιορίζει το φαινότυπο του ενζύμου. Ο λόγος αυτός ποικίλλει από 0,1 έως 12,6 για τα άτομα που θεωρούνται «κανονικοί μεταβολιστές» (διαφάνεια 24). Χαμηλότερος λόγος αντιστοιχεί σε πολύ γρήγορο μεταβολισμό και παρατηρείται σε ασθενείς, που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με φάρμακα που μεταβολίζονται με αυτόν τον τρόπο («γρήγοροι μεταβολιστές»). Υψηλότερος λόγος αντιστοιχεί σε «αργούς μεταβολιστές» που συχνά εμφανίζουν παρενέργειες, σαν να τους χορηγήθηκε πολύ μεγάλη δόση του φαρμάκου (διαφάνεια 24).

Η κατηγοριοποίηση των ατόμων σε κανονικούς, αργούς και γρήγορους μεταβολιστές είναι απαραίτητη γιατί απαιτείται προσαρμογή της δοσολογίας των φαρμάκων, ανάλογα με τον τύπο του μεταβολικού δείκτη του κυτοχρώματος CYP2D6 του ασθενούς. Για παράδειγμα, το αντικαταθλιπτικό φάρμακο ιμιπραμίνη (imipramine) μεταβολίζεται από το CYP2D6

(διαφάνεια 25). Η συνήθης δόση της ιμιπραμίνης που χορηγείται σε «κανονικούς μεταβολιστές» είναι μεταξύ 75-130 mg. Στην περίπτωση που ένα άτομο είναι «γρήγορος μεταβολιστής» η συνήθης δόση των 130 mg θα μεταβολιστεί γρήγορα, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει αρκετή ποσότητα του φαρμάκου ώστε να δράσει και το άτομο να φαίνεται ότι δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία. Επομένως, απαιτείται να αυξηθεί η δόση από τα 130 mg στα 180 mg. Στην περίπτωση που ένα άτομο είναι αργός μεταβολιστής η δόση των 130 mg, λόγω του αργού μεταβολισμού, θα οδηγήσει στη συσσώρευση του φαρμάκου και θα προκληθούν παρενέργειες. Η εικόνα του ατόμου θα είναι σαν να του χορηγήθηκε πολύ μεγάλη δόση του φαρμάκου και άρα η δόση θα πρέπει να μειωθεί στα 30 mg. Συμπερασματικά, σε αργούς μεταβολιστές μειώνεται η ποσότητα του φαρμάκου σε σχέση με τους κανονικούς μεταβολιστές, ενώ σε γρήγορους μεταβολιστές η χορηγούμενη δόση αυξάνεται.

2. Ένζυμα της Φάσης II

I. Ένζυμο TPMT

Η θειοπουρινική S-μεθυλοτρανσφεράση (Thiopurine S-methyltransferase, TPMT) είναι ένα ένζυμο των αντιδράσεων της Φάσης II του μεταβολισμού των φαρμάκων. Το ένζυμο συμμετέχει στο μεταβολισμό τριών σημαντικών ανοσοκατασταλτικών και αντιλευχαιμικών φαρμάκων της κατηγορίας των θειοπουρινών και συγκεκριμένα της αζαθειοπρίνης, μερκαπτοπουρίνης και θειογουανίνης. Η αζαθειοπρίνη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα για την πρόληψη της οξείας απόρριψης ξένου μοσχεύματος και στη θεραπεία ορισμένων αυτοάνοσων ασθενειών, όπως η νόσος του Crohn. Ο δραστηκός μεταβολίτης της αζαθειοπρίνης, η 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP) δημιουργείται στο ήπαρ. Η 6-MP χρησιμοποιείται απευθείας για τη θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας σε παιδιά. Τα φάρμακα αυτά, όπως όλα τα κυτταροτοξικά φάρμακα έχουν ένα σχετικά μικρό θεραπευτικό εύρος και μπορεί να εμφανίσουν σοβαρή και δυνητικά μοιραία τοξικότητα, με κύρια την μυελοκαταστολή.

Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις μεταβολικές οδοί για την 6-MP (διαφάνεια 26). Ως προφάρμακο, η 6-MP απαιτείται να ενεργοποιηθεί από την φωσφοριβοσυλ-τρανσφεράση της υποξανθίνης-γουανίνης (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase, HGPRT) και στη συνέχεια να μεταβολιστεί περαιτέρω προς νουκλεοτίδια της θειογουανίνης (6-TGNs) προκειμένου να ασκήσει κυτταροτοξική δράση. Τα 6-TGNs ενσωματώνονται στο DNA και το RNA με αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης νουκλεοτιδίων και, κατ' επέκταση, πρωτεϊνών. Δύο ένζυμα ανταγωνίζονται την HGPRT στο μεταβολισμό της 6-MP, η οξειδάση της ξανθίνης και η TPMT. Η 6-MP αδρανοποιείται από την οξειδάση της ξανθίνης προς θειουρικό οξύ και από την TPMT προς 6-μεθυλ-πουρίνη (6-MMP). Η TPMT εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, αλλά και στα ερυθρά και στα λευκά αιμοσφαίρια. Η οξειδάση της ξανθίνης δεν εκφράζεται στον αιμοποιητικό ιστό, επομένως η μεθυλίωση από το ένζυμο TPMT αποτελεί το μοναδικό μονοπάτι αδρανοποίησης των θειοπουρινικών φαρμάκων (διαφάνεια 26).

Ορισμένοι ασθενείς, λόγω κληρονομικής ανεπάρκειας του ενζύμου TPMT δεν παρουσιάζουν την ίδια ανοχή στην καθιερωμένη δόση των θειοπουρινικών φαρμάκων, με

αποτέλεσμα να συσσωρεύουν υψηλά επίπεδα 6-TGNs στα ερυθροκύτταρα και να παρουσιάζουν μυελοτοξικότητα. Το 90%, περίπου, των ατόμων φέρει δύο λειτουργικά *TPMT* αλληλόμορφα και συνεπώς, τα άτομα αυτά εμφανίζουν κανονική δραστικότητα του *TPMT*. Ενδιάμεση δραστικότητα του ενζύμου παρατηρείται σε φορείς ενός μόνο μη λειτουργικού αλληλόμορφου, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν περίπου το 10% του πληθυσμού. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι το 0,3% του πληθυσμού έχει κληρονομήσει δύο μη λειτουργικά αλληλόμορφα και έχει χαμηλή ή και μη ανιχνεύσιμη δραστικότητα του *TPMT*. Το γονίδιο της *TPMT* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 και εμφανίζει γενετικό πολυμορφισμό. Μέχρι σήμερα περίπου 21 αλληλόμορφα του γονιδίου *TPMT* έχουν συνδεθεί με χαμηλά επίπεδα δραστικότητας του αντιστοίχου ενζύμου στον άνθρωπο. Το φυσιολογικό αλληλόμορφο, που κωδικοποιεί την ενεργή πρωτεΐνη ονομάζεται *TPMT*1* ενώ 18 αλληλόμορφα (*TPMT*2*, **3A*, **3B*, **3C*, **3D*, **5*–**14* και **16*–**19*) περιέχουν μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNP), που προκαλούν αντικατάσταση αμινοξέων. Το **14* SNP τροποποιεί το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, το **3D* δημιουργεί κωδικόνιο πρόωρου τερματισμού της μετάφρασης, ενώ τα **4* και **15* τροποποιούν θέσεις συναρμογής του mRNA. Τα παρακάτω τέσσερα αλληλόμορφα, *TPMT*2* (238G>C), *TPMT*3A* (460 G>A, 719A>G), *TPMT*3B* (460 G>A) και *TPMT*3C* (719A>G) ευθύνονται για το 80-95% των περιπτώσεων ανεπάρκειας της *TPMT* σε ολόκληρο τον κόσμο. Από τους παραπάνω πολυμορφισμούς, ο *TPMT*3A* είναι ο πιο κοινός στους Καυκάσιους (περίπου 5%), ενώ ο *TPMT*3C* συναντάται πιο συχνά σε Ασιάτες και Αφρικανούς (συχνότητα περίπου 2%). Οι πολυμορφισμοί αυτοί φαίνεται ότι αποσταθεροποιούν την κανονική δομή του ενζύμου *TPMT* με αποτέλεσμα το σχηματισμό ισομορφών με λανθασμένη αναδίπλωση, οι οποίες στη συνέχεια υφίστανται ταχεία ενδοκυτταρική αποικοδόμηση. Η ανεπάρκεια ενζυμικής δραστικότητας του *TPMT* σε άτομα ομόζυγα για τα αλληλόμορφα μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή ή και μοιραία αιματολογική τοξική αντίδραση όταν σε αυτά τα άτομα χορηγηθούν οι συνήθεις δόσεις θειοπουρινών, με αποτέλεσμα να φαίνεται ότι «υπερ-δοσολογούνται» με την φυσιολογική δόση. Η αποφυγή των επικίνδυνων παρενεργειών σε αυτούς τους ασθενείς επιτυγχάνεται με τη μείωση των δόσεων των θειοπουρινικών φαρμάκων στο 5-15% της συνήθους δόσης.

Ο καθορισμός του γενετικού προφίλ του *TPMT* κάθε ασθενούς γίνεται με δύο τρόπους, είτε μέσω φαινοτυπικής, είτε μέσω γονοτυπικής ανάλυσης. Η φαινοτυπική ανάλυση περιλαμβάνει αρχικά τον υπολογισμό της δραστικότητας του ενζύμου *TPMT* στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Αναλυτικά τα ερυθρά αιμοσφαίρια επωάζονται με 6-MP και εκτιμάται η ποσότητα του μεταβολίτη 6-MPP με διάφορες μεθόδους (π.χ. με χρήση ραδιοσημασμένων ισotόπων ή με HPLC) (διαφάνεια 27). Ο λόγος του μεταβολίτη προς το φάρμακο προσδιορίζει τη δραστικότητα του ενζύμου και οι ασθενείς μπορούν να διακριθούν σε ασθενείς, ενδιάμεσους και υψηλούς μεταβολιστές. Επίσης, κατά τη φαινοτυπική ανάλυση γίνεται εκτίμηση του επιπέδου των 6-TGNs στα ερυθρά αιμοσφαίρια (η συγκέντρωση των 6-TGNs είναι αντιστρόφως ανάλογη με το επίπεδο δραστικότητας του ενζύμου). Η γονοτυπική ανάλυση του ανθρωπίνου *TPTM* βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και επιτρέπει την ανίχνευση των τριών κυριότερων SNP (238G>C, 460 G>A και 719A>G), που συνδέονται με μειωμένη δραστικότητα του ενζύμου *TPTM*.

Η γενετική ανάλυση του γονιδίου *TPMT* αποτελεί μία από τις πρώτες φαρμακογονιδιωματικές δοκιμασίες με εφαρμογή στην κλινική πράξη. Σε πολλές χώρες της Ευρώπης πραγματοποιείται φαρμακογονιδιωματικός έλεγχος των ασθενών πριν την χορήγηση θειοπουρινικών φαρμάκων με σκοπό τον προσδιορισμό της κατάλληλης δόσης του φαρμάκου και την αποφυγή ανεπιθύμητων παρενεργειών λόγω ανεπαρκούς δράσης του ενζύμου *TPMT*.

II. Ένζυμο N-ακετυλοτρανσφεράση-2 (NAT-2)

Το ηπατικό ένζυμο N-ακετυλοτρανσφεράση ακετυλιώνει την ισονιαζίδη, η οποία είναι το πρώτο αποτελεσματικό φάρμακο στη θεραπεία της φυματίωσης. Παρατηρήθηκε ότι μετά τη χρήση της ισονιαζίδης υπήρχαν μεγάλες διαφορές στην ποσότητα ισονιαζίδης που απεκκρίνονταν στα ούρα από τους ασθενείς. Στη συνέχεια, ανακαλύφθηκε ότι αυτές οι διαφορές οφείλονταν στη διαφορετική ικανότητα των ατόμων να μετατρέπουν την ισονιαζίδη σε ακετυλο-ισονιαζίδη. Οι αργοί ακετυλιωτές υπέφεραν από τα τοξικά αποτελέσματα της ισονιαζίδης και συχνά εμφάνιζαν περιφερειακή νευροπάθεια. Στη διαφάνεια 28 δίνεται η κατανομή του ρυθμού ακετυλίωσης σε ένα γενικό πληθυσμό. Χορηγήθηκε ισονιαζίδη per os και λίγες ώρες μετά μετρήθηκε η συγκέντρωσή της στο αίμα. Τα άτομα, ανάλογα με το ρυθμό με τον οποίο ακετυλιώνουν την ισονιαζίδη διακρίνονται σε γρήγορους ακετυλιωτές (χαμηλή συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα) και αργούς ακετυλιωτές (υψηλή συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα).

Σήμερα είναι γνωστό ότι η ταχεία ακετυλίωση κληρονομείται ως αυτοσωμικός επικρατής χαρακτήρας ενώ η βραδεία ακετυλίωση ως υπολειπόμενος. Συνολικά, έχουν ταυτοποιηθεί 36 αλληλόμορφα NAT-2. Τα *NAT2*5* και *NAT2*6* είναι υπεύθυνα για το 90% των αργών ακετυλιωτών. Η αναλογία ταχέων και βραδέων ακετυλιωτών έχει φυλετικό υπόστρωμα και είναι 40:60 για την Ευρώπη, 85:15 για την Ιαπωνία και 95:5 για τους Εσκιμώους της Βόρειας Αμερικής. Σε κλινικό επίπεδο, οι βραδείς ακετυλιωτές απαιτούν μικρότερες δόσεις ισονιαζίδης συγκριτικά με τους ταχείς καθώς μπορεί να εμφανίσουν ενισχυμένη αντίδραση στην αγωγή και αυξημένο κίνδυνο τοξικότητας.

III. Ένζυμο UGT

Παρόμοια προβλήματα ποικιλομορφίας στην απόκριση ασθενών σε θεραπείες έχουν παρατηρηθεί στην περίπτωση καταπολέμησης του καρκίνου. Τα φάρμακα, που κυρίως χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση του καρκίνου είναι προφάρμακα, δηλαδή χορηγούνται σε ανενεργή μορφή και μετά από τον μεταβολισμό τους στον οργανισμό παράγουν ενεργούς μεταβολίτες. Η δομική ποικιλομορφία των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα για τον μεταβολισμό των προφαρμάκων (ένζυμα που ενεργοποιούν τα προφάρμακα και που μεταβολίζουν και αδρανοποιούν τους ενεργούς μεταβολίτες αυτών), όμως προκαλεί μία ποικιλία αποκρίσεων μεταξύ των ασθενών κατά χορήγηση των συγκεκριμένων φαρμάκων.

Στη διαφάνεια 29 δίνεται το παράδειγμα της ιρινοτεκάνης, που χορηγείται σε ασθενείς με καρκίνο του ορθού. Η ιρινοτεκάνη είναι ένα προφάρμακο, που μετατρέπεται από καρβοξυεστεράσες στο ενεργό συστατικό SN-38, το οποίο αναστέλλει την τοποϊσομεράση I

και προκαλεί κυτταρικό θάνατο. Το SN-38 αδρανοποιείται με μια αντίδραση γλυκουρονιδίωσης (προσθήκη γλυκουρονιδίου) μέσω των ενζύμων UGT (UDP glucuronosyltransferase) και κυρίως του UGT1A1. Η μετατροπή της ιριδοτεκάνης στην κυτταροταξική SN-38 γίνεται σε όλα τα κύτταρα, που φαίνονται στη διαφάνεια 29, όπως του αίματος, του ήπατος και του εντέρου. Η αδρανοποίηση, ωστόσο, της SN-38 δεν μπορεί να γίνει στο αίμα, με αποτέλεσμα η συσσώρευσή της να προκαλεί ουδετεροπενία. Στο ήπαρ και το έντερο η αδρανοποίηση της SN-38 συνδέεται με τον πολυμορφισμό του γονιδίου *UGT1A1*. Ασθενείς με χαμηλό ρυθμό γλυκουρονιδίωσης συσσωρεύουν το SN-38 και αναπτύσσουν τοξικές αντιδράσεις, που εκδηλώνονται με σοβαρή διάρροια και ουδετεροπενία. Η ελαττωμένη ικανότητα για γλυκουρονιδίωση σχετίζεται με τις επαναλήψεις (A[TA]_nTAA) στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *UGT1A1* και συγκεκριμένα η δραστηριότητα της μεταγραφής ελαττώνεται όσο αυξάνεται το n. Η παρουσία 6 επαναλήψεων (TA6) αποτελεί τον κανονικό γενότυπο, που δεν σχετίζεται με τοξικότητα λόγω επαρκούς παραγωγής ενζύμου. Η παρουσία, όμως, 7 επαναλήψεων (TA7) που παρατηρείται στο αλληλόμορφο *UGT1A1**28 σχετίζεται με μειωμένη γονιδιακή έκφραση και άρα μειωμένη γλυκουρονιδίωση σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα. Η μειωμένη ενζυμική ενεργότητα οδηγεί σε συσσώρευση του ενεργού προϊόντος SN-38, με επακόλουθες τοξικές αντιδράσεις (π.χ. διάρροια και ουδετεροπενία). Στην περίπτωση αυτή είναι σημαντικό να μελετηθεί ο γενότυπος του κάθε ασθενούς προτού λάβει την θεραπεία με ιριδοτεκάνη. Σε περίπτωση άτομου ομόζυγου για τις 6 επαναλήψεις (TA6/TA6) χορηγείται η συνήθης δόση του φαρμάκου. Ένα άτομο ομόζυγο για τις 7 επαναλήψεις (TA7/TA7) ή ετερόζυγο για τις 6 και 7 επαναλήψεις (TA6/TA7) θεωρείται υψηλού κινδύνου ή μετρίου κινδύνου, αντίστοιχα για εκδήλωση τοξικότητας, οπότε η δόση του φαρμάκου πρέπει να μειωθεί ή ο ασθενής να ακολουθήσει μια άλλη φαρμακευτική αγωγή (διαφάνεια 30).

B. Πολυμορφισμοί σε στόχους φαρμάκων

Στην προηγούμενη ενότητα αναλύθηκαν περιπτώσεις, στις οποίες η διαφορετική απόκριση των ατόμων στα φάρμακα οφείλεται σε πολυμορφισμούς σε γονίδια μεταβολικών ενζύμων, που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των φαρμάκων στον οργανισμό και, συνεπώς, τη φαρμακοκινητική του. Μπορεί, όμως, η διαφορετική απόκριση ενός ατόμου να οφείλεται σε πολυμορφισμούς γονιδίων που κωδικοποιούν το στόχο, στον οποίο το φάρμακο πρέπει να συνδεθεί για να ασκήσει το βιολογικό του αποτέλεσμα. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι πολυμορφισμοί σε υποδοχείς, κανάλια ιόντων, μεταφορείς και ένζυμα. Μια περίπτωση πολυμορφισμού σε γονίδιο, που σχετίζεται με τη φαρμακοδυναμική φαίνεται στη διαφάνεια 31 και είναι η περίπτωση πολυμορφισμού των β1-αδρενεργικών υποδοχέων. Οι υποδοχείς αυτοί βρίσκονται στην καρδιά και τα χορηγούμενα φάρμακα (β1-αδρενεργικοί ανταγωνιστές) στοχεύουν στη μείωση της αρτηριακής πίεσης. Ο υποδοχέας φυσιολογικά έχει στη θέση 389 το αμινοξύ αργινίνη αλλά λόγω πολυμορφισμού μπορεί να έχει το αμινοξύ γλυκίνη. Ο πολυμορφισμός του υποδοχέα δεν επηρεάζει την φαρμακοκινητική, δηλαδή τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα αλλά επηρεάζει το βιολογικό αποτέλεσμα, τη μείωση της πίεσης. Ο υποδοχέας με την αργινίνη στη θέση 389 μετά από σύνδεση στο

φάρμακο ενεργοποιεί μονοπάτια μετάδοσης σήματος, που προκαλούν την επιθυμητή υπόταση ενώ ο υποδοχέας με τη γλυκίνη στη θέση 389 προκαλεί μικρότερη μείωση της πίεσης.

Άλλες περιπτώσεις πολυμορφισμών σε στόχους φαρμάκων, που επηρεάζουν την απόκριση των ασθενών αναφέρονται στη συνέχεια. Οι πολυμορφισμοί σε υποδοχείς νευροδιαβιβαστών και συγκεκριμένα σε ντοπαμινεργικούς υποδοχείς έχουν συσχετιστεί με την απόκριση σε νευροληπτικά φάρμακα (κλοζαπίνη). Οι πολυμορφισμοί σε μεταφορείς νευροδιαβιβαστών και συγκεκριμένα στο μεταφορέα σεροτονίνης έχουν συσχετιστεί με την απόκριση σε αντικαταθλιπτικά φάρμακα. Οι πολυμορφισμοί σε κανάλια ιόντων (καλίου και νατρίου) στην καρδιά έχουν συσχετιστεί με την απόκριση ατόμων σε αντιαρρυθμικά φάρμακα.

Γ. Πολυμορφισμοί γονιδίων που επηρεάζουν τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική

Η βαρφαρίνη είναι ένα αντιπηκτικό φάρμακο, που συνταγογραφείται ευρέως στην Αμερική και την Ευρώπη. Επειδή, όμως, δεν υπάρχει ένα εργαστηριακό τεστ που να χρησιμοποιείται διεθνώς για να μπορέσει να εκτιμηθεί η επίδραση της βαρφαρίνης στην πηκτικότητα, παρατηρούνται στους ασθενείς σοβαρές παρενέργειες όπως αιμοραγγίες και ανεπιθύμητη θρόμβωση. Συγκεκριμένα, η ορθή χρήση της βαρφαρίνης εμποδίζεται από την περίπου δεκαπλάσια ποικιλότητα στις αποκρίσεις μεταξύ των ασθενών σε δόσεις που απαιτούνται για θεραπευτική απόκριση.

Η βαρφαρίνη μεταβολίζεται και απενεργοποιείται από το κυτόχρωμα CYP2C9. Έχουν ταυτοποιηθεί πολυμορφισμοί του *CYP2C9*, που σχετίζονται με μειωμένη απομάκρυνση της βαρφαρίνης και επεισόδια αιμορραγιών. Το αγρίου τύπου αλληλομόρφο είναι το *CYP2C9*1*, ενώ οι παραλλαγές *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*, *CYP2C9*4* και *CYP2C9*5* αφορούν σε αλληλόμορφα με μειωμένη ενζυμική ενεργότητα. Τα άτομα με το αλληλόμορφο *CYP2C9*1* μεταβολίζουν κανονικά τη βαρφαρίνη, ενώ τα άτομα με τα αλληλόμορφα *CYP2C9*2* και *CYP2C9*3* έχουν μειωμένο μεταβολισμό βαρφαρίνης κατά 30% και 90%, αντίστοιχα. Επομένως, άτομα ετερόζυγα γι' αυτά τα 2 αλληλόμορφα απαιτούν 60% με 75% χαμηλότερη δόση βαρφαρίνης σε σχέση με ομόζυγους αγρίου τύπου ασθενείς. Επίσης, έχει δειχθεί ότι οι συχνότητες των αλληλομόρφων του *CYP2C9* εξαρτώνται από την εθνικότητα. Πιο συγκεκριμένα, το 10% και 6% των Καυκασίων έχουν τα αλληλόμορφα *CYP2C9*2* και *CYP2C9*3*, αντίστοιχα ενώ και τα δύο αλληλόμορφα εμφανίζονται σπάνια (συχνότητα < 2%) σε άτομα Αφρικανικής ή Ασιατικής καταγωγής.

Έχει, επίσης, δειχθεί ότι εκτός από τους πολυμορφισμούς στο *CYP2C9*, πολυμορφισμοί στο στόχο της βαρφαρίνης (*VKORC1*, vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1) σχετίζονται με διαφορετικές αποκρίσεις των ασθενών στο φάρμακο. Η βαρφαρίνη αναστέλλει το ένζυμο *VKORC1*, το οποίο μειώνει τα επίπεδα της ενεργής βιταμίνης K, που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση αρκετών παραγόντων πήξης του αίματος, όπως η προθρομβίνη και ο παράγοντας πήξης VII. Στη θέση 1639 του γονιδίου *VKORC1* μπορεί να υπάρχει το G αλληλόμορφο ή το A αλληλόμορφο. Επειδή τα άτομα με το A αλληλόμορφο παράγουν λιγότερο ένζυμο *VKORC1* σε σχέση με άτομα με το G αλληλόμορφο, χρειάζονται μικρότερες δόσεις βαρφαρίνης για να αναστείλουν το ένζυμο *VKORC1* και να εμφανίσουν

αντιπηκτικό αποτέλεσμα. Η συχνότητα των αλληλόμορφων επηρεάζεται από την εθνικότητα, όπως φαίνεται από το γεγονός ότι το 37% των Καυκάσιων και το 14% των Αφρικανών έχουν το A αλληλόμορφο. Με βάση τα παραπάνω έχει προταθεί ένας αλγόριθμος δοσολογίας βαρφαρίνης (διαφάνεια 33), σύμφωνα με τον οποίο προτείνεται η δοσολογία της βαρφαρίνης να λαμβάνει υπόψη τους πολυμορφισμούς του *CYP2C9*, του *VKORC1*, την ηλικία και το ύψος των ασθενών.

Γενετικό προφίλ και φάρμακα σε καρκίνο

I. Εμφάνιση καρκίνου λόγω υπερέκφρασης του HER2

Το γονίδιο *ERBB2* συχνά καλείται *HER2* (human epidermal growth factor receptor 2) ή *HER2/neu* (από το πρωτο-ογκογονίδιο *neu*). Ο HER2 είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGFR/ERBB) με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Ο υποδοχέας παίζει σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης της φυσιολογικής κυτταρικής ανάπτυξης. Εντούτοις, η υπερέκφραση του υποδοχέα έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη και την εξέλιξη μερικών επιθετικών μορφών καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα, ο υποδοχέας ενεργοποιείται από τη σύνδεση του αυξητικού παράγοντα στο εξωκυτταρικό τμήμα του και ακολουθεί ένα μονοπάτι μετάδοσης σήματος, που καταλήγει στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (διαφάνεια 34). Τα τελευταία χρόνια ο HER2 έχει αποτελέσει θεραπευτικό στόχο σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το trastuzumab (που στο εμπόριο κυκλοφορεί ως herceptin), συνδέεται στο εξωκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα και δεν επιτρέπει την σύνδεση του αυξητικού παράγοντα. Το φάρμακο αυτό είναι αποτελεσματικό μόνο σε ασθενείς με καρκίνο, στους οποίους υπερεκφράζεται ο HER2. Δεδομένου ότι η υπερέκφραση του HER2 παρατηρείται σε 15-30% των καρκίνων του μαστού, πραγματοποιείται έλεγχος για τα επίπεδα του HER2 σε βιοψίες ασθενών με καρκίνο του μαστού για να καθοριστεί αν πρέπει να λάβουν θεραπεία με trastuzumab. Είναι σημαντικό η θεραπεία με trastuzumab να πραγματοποιηθεί μόνο στα άτομα, στα οποία υπερεκφράζεται ο HER2 γιατί μόνο σε αυτά τα άτομα τα οφέλη υπερτερούν των κινδύνων (κόστος φαρμάκου και πρόκληση καρδιοτοξικότητας).

II. Εμφάνιση καρκίνου λόγω υπερέκφρασης του HER1

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR, Epidermal growth Factor Receptor), επίσης γνωστός ως HER1, ή ErbB1 αρχικά αλληλουχήθηκε ως μέλος μιας οικογένειας υποδοχέων γνωστών ως υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Ο υποδοχέας αυτός παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης της φυσιολογικής κυτταρικής ανάπτυξης και έχει ευρεία έκφραση σε επιθηλιακούς, μεσεγγυματικούς και νευρικούς ιστούς. Οι μεταλλάξεις που προκαλούν υπερέκφραση του EGFR έχουν παρατηρηθεί σε καρκινώματα μαστού, εγκεφάλου, τραχήλου, πνευμόνων, ουροδόχου κύστης και φαίνεται ότι η ενεργοποίηση της ενεργότητας κινάσης του EGFR οδηγεί σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και συμβάλλει στην ανάπτυξη και τη μετάσταση όγκων. Ο υποδοχέας αποτελεί στόχο για σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων, που καλούνται αναστολείς του EGFR ("EGFR inhibitors"), με χαρακτηριστικό

παράδειγμα το gefitinib. Το gefitinib αναστέλλει την ενεργότητα κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα EGFR διότι συνδέεται στην περιοχή σύνδεσης του ATP του ενζύμου. Η περιοχή σύνδεσης του ATP είναι σημαντική για τη δράση των υποδοχέων κινάσης-τυροσίνης, αφού η φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας από το ATP. Το gefitinib είχε χρησιμοποιηθεί τόσο σε ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα όσο και σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Παρατηρήθηκε ότι θετική απόκριση εμφανίστηκε μόνο σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών και με μελέτη του γενοτύπου βρέθηκε ότι οι αποκρινόμενοι ασθενείς είναι όσοι έχουν μια μετάλλαξη στον υποδοχέα και ειδικά στη θέση σύνδεσης του ATP. Επίσης, βρέθηκε ότι ασιατικοί πληθυσμοί και κυρίως Γιαπωνέζοι είχαν αυτή τη μετάλλαξη και η καταπολέμηση του καρκίνου έγινε με μεγαλύτερη επιτυχία σε αυτούς σε σχέση με τους Καυκάσιους. Συμπερασματικά, η διαλογή των ασθενών με βάση τις μεταλλάξεις του EGFR θα επιτρέψει να αναγνωριστούν πριν την έναρξη της θεραπευτικής αγωγής τα άτομα που θα απαντήσουν θετικά στην θεραπεία με το gefitinib.

III. Εμφάνιση καρκίνου λόγω της έκφρασης της κινάσης *bcr-abl*

Στη χρόνια μυελοειδή λευχαιμία σχηματίζεται το χρωμόσωμα Philadelphia λόγω μετατοπίσεων μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22. Το χρωμόσωμα αυτό οδηγεί στο σχηματισμό μιας πρωτεΐνης σύντηξης, που καλείται *bcr-abl* (σύντηξη των γονιδίων *abl* και *bcr*). Η πρωτεΐνη αυτή είναι μια συνεχώς ενεργή κινάση τυροσίνης. Το φάρμακο imatinib, που διατίθεται από την εταιρεία Novartis ως Gleevec (ΗΠΑ, Καναδάς) ή Glivec (Ευρώπη, Αυστραλία, Λατινική Αμερική) σχεδιάστηκε ειδικά ώστε να αναστέλλει την ενεργότητα της BCR-Abl. Το ενεργό κέντρο των κινάσεων τυροσίνης έχει μια θέση σύνδεσης για το ATP. Η ενζυμική ενεργότητα μιας κινάσης τυροσίνης αφορά στη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών-υποστρώματων, δηλαδή τη μεταφορά φωσφορικής ομάδας από το ATP σε κατάλοιπα τυροσίνης άλλων πρωτεϊνών. Το imatinib συνδέεται κοντά στην περιοχή σύνδεσης του ATP της κινάσης BCR-Abl και, καθώς την κρατά σε κλειστή διαμόρφωση, αναστέλλει την ενζυμική ενεργότητα. Έτσι, δεν μπορούν να φωσφορυλιωθούν άλλες πρωτεΐνες-υποστρώματα με συμμετοχή σε μονοπάτια μετάδοσης σήματος απαραίτητων για την επιβίωση και ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό, το imatinib αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Το imatinib είναι ειδικό μόνο για την κινάση BCR-Abl. Η κινάση BCR-Abl υπάρχει μόνο στα καρκινικά και όχι στα υγιή κύτταρα, με αποτέλεσμα το imatinib να αποτελεί ένα είδος στοχευμένης θεραπείας. Για το λόγο αυτό το imatinib ονομάστηκε “μαγική σφαίρα” (magic bullet) για τον καρκίνο και αναφέρεται συχνά ως ένα παράδειγμα έρευνας στη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου.

Εργαλεία έρευνας για τη μελέτη του γονιδιώματος

Τα εργαλεία, που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη μελέτη του γονιδιώματος περιλαμβάνουν από την αλληλούχιση γονιδίων και άλλες τεχνικές μοριακής βιολογίας, όπως η PCR σε συνδυασμό με την RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), την SSCP (Single-Stranded Conformation Polymorphism) και τις TGGE και DGGE (Temperature και Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, αντίστοιχα). Αναλυτικά, η PCR επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό (μέχρι εκατομμύρια αντίγραφα) μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η

RFLP είναι μια τεχνική, που μελετά παραλλαγές σε ομόλογες αλληλουχίες DNA και αυτό επιτυγχάνεται με την πέψη του DNA σε κομμάτια (με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων) και την ανάλυσή τους ως προς το μέγεθός τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η SSCP επιτρέπει το διαχωρισμό αλληλουχιών και την ταυτοποίηση πολυμορφισμών σε κομμάτια μονόκλωνου DNA, τα οποία διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, ανάλογα με την διαμόρφωσή τους. Οι TGGE και DGGE είναι μορφές ηλεκτροφόρησης, στις οποίες η διαβάθμιση της θερμοκρασίας ή ενός αποδιακακτικού χημικού παράγοντα αποδιατάσσει το δείγμα καθώς κινείται σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Οι TGGE και DGGE μπορούν να εφαρμοστούν σε νουκλεϊκά οξέα, όπως DNA και RNA. Ο διαχωρισμός των νουκλεϊκών οξέων (και η ταυτοποίηση πολυμορφισμών) βασίζονται σε αλλαγές στη διαμόρφωσή τους καθώς εκτίθενται σε διαφορετικές θερμοκρασίες ή συγκεντρώσεις αποδιακακτικού παράγοντα.

Οι μικροσυστοιχίες (DNA chips, DNA microarrays, gene chips) βασίζονται στην υβριδοποίηση κατά Northern και Southern και είναι τμήματα διαφορετικών ολιγονουκλεοτιδίων στερεωμένα πάνω σε ένα γυάλινο υπόστρωμα, με τα οποία υβριδίζονται σημασμένα φθορίζοντα τμήματα του mRNA ή του cDNA από το προς ανάλυση δείγμα. Ανάλογα με το είδος της μικροσυστοιχίας μπορεί να μελετηθεί η έκφραση σε ευρεία κλίμακα γονιδίων (gene expression arrays) ή να προσδιοριστούν μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί σε συγκεκριμένα γονίδια του υπό εξέταση δείγματος. Ειδικά για τη μελέτη πολυμορφισμών χρησιμοποιούνται οι μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων SNP (SNP arrays). Ένα παράδειγμα μιας τέτοιας μικροσυστοιχίας φαίνεται στη διαφάνεια 38. Μια μικροσυστοιχία, που χρησιμοποιείται για τη μελέτη πολυμορφισμών/μεταλλάξεων περιέχει, συνήθως, ένα ή δύο γονίδια, ανάλογα με το μέγεθός τους. Προσφάτως έχουν δημιουργηθεί και διατίθενται στο εμπόριο μικροσυστοιχίες που περιλαμβάνουν ένα μεγάλο αριθμό (906.600) SNP διαφορετικών γονιδίων (Genome-Wide Human SNP Array 6.0). Οι μικροσυστοιχίες του ενός ή δύο γονιδίων περιέχουν περίπου 350.000 ολιγονουκλεοτίδια, που αναπαριστούν μέχρι 40.000 bp γονιδιακής αλληλουχίας και περιλαμβάνουν και τις δυο αλυσίδες του DNA με κάθε δυνατό πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου. Για το κάθε ολιγονουκλεοτίδιο (25-μερές ή 17-μερές) χρησιμοποιείται και ένα σετ από άλλα τρία ομόλογα ολιγονουκλεοτίδια, στα οποία διαφέρει η κεντρική βάση (αν η κεντρική βάση του 1^{ου} είναι η T, του 2^{ου} είναι η A, του 3^{ου} η G, και του 4^{ου} η C). Υβριδίζοντας με το cRNA του γονιδίου-στόχου ενός ασθενούς και συγκρίνοντας με την ένταση του υβριδισμού ενός φυσιολογικού ατόμου μπορούν να διακριθούν ακόμα και σημειακές μεταλλάξεις. Με αυτά τα εξειδικευμένα chips έχουν αναλυθεί το γονίδιο της κυστικής ίνωσης και τα γονίδια του κυτοχρώματος P450 που εμπλέκονται στο μεταβολισμό φαρμάκων.

Συμπεράσματα

Οι πρόσφατες ανακαλύψεις στον τομέα της γονιδιωματικής και οι συναφείς τεχνολογικές καινοτομίες έδωσαν μια ώθηση στον τομέα της φαρμακογονιδιωματικής. Αυτό φαίνεται και από τον αριθμό των δημοσιεύσεων, που περιέχουν τις λέξεις φαρμακογενετική και φαρμακογονιδιωματική (διαφάνεια 38). Σήμερα, είναι γνωστοί αρκετοί πολυμορφισμοί, οι οποίοι επηρεάζουν την απόκριση των ασθενών σε συγκεκριμένα φάρμακα μεταβάλλοντας

είτε τη φαρμακοκινητική είτε τη φαρμακοδυναμική τους. Ο βασικός σκοπός της φαρμακογονιδιωματικής είναι ο περιορισμός της ποικιλομορφίας στην απόκριση των ασθενών στις θεραπείες λόγω του δομικού πολυμορφισμού των γονιδίων και η παραγωγή ασφαλών και αποτελεσματικών φαρμάκων, προσαρμοσμένων σε γενετικά προσδιορισμένους υποπληθυσμούς με σαφείς ενδείξεις και αντενδείξεις.

Η «εξατομικευμένη ιατρική» είναι ένας από τους στόχους της μοντέρνας φαρμακοθεραπείας. Για το σκοπό αυτό τα στάδια έρευνας της φαρμακογονιδιωματικής περιλαμβάνουν:

- 1) την αναγνώριση του μηχανισμού δράσης του φαρμάκου
- 2) την αναγνώριση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον μηχανισμό δράσης του φαρμάκου
- 3) την αναγνώριση των υποψήφιων γονιδίων, που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες στόχους του φαρμάκου
- 4) την αναγνώριση των αλληλόμορφων γονιδίων
- 5) την κλινική μελέτη της σχέσης μεταξύ των γονιδιακών αλληλόμορφων και της απόκρισης στο φάρμακο
- 6) τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της κλινικής μελέτης
- 7) την κλινική εφαρμογή του φαρμάκου σε ομάδες ατόμων με συγκεκριμένο γενετικό προφίλ. Η φαρμακογονιδιωματική είναι ένα νέο επαναστατικό κεφάλαιο στην ιστορία της φαρμακολογίας.