

REVIEWS

GENETIC POLYMORPHISM OF CYTOCHROME P450 2C19

Wichitra Tassaneeyakul¹, Arporn Tawalee¹, Wongwiwat Tassaneeyakul²

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, KhonKaen University, ²Department of Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, KhonKaen University, KhonKaen 40002, Thailand.

ABSTRACT

The measurement of S-mephenytoin hydroxylation was an original method for studying CYP2C19 polymorphism. This led to discover that CYP2C19 polymorphism in human is mediated through an autosomal recessive trait. The prevalence of this polymorphism exhibits a wide interethnic variation ranging from 1-6% of poor metabolizer (PM) in Caucasians to more than 40% in some Pacific islanders. At least 11 *CYP2C19* allelic variants have been described. Except for the wild-type alleles (*CYP2C19**1 or *CYP2C19*wt), all other mutant alleles led to either abolish or decrease CYP2C19 activity. The mutant alleles *CYP2C19**2 and *CYP2C19**3 were found to cover almost all of the PM in Asian populations, but to a lesser extent when applied to Caucasians. As CYP2C19 is responsible for metabolism of many currently used medications, individual CYP2C19 alteration would lead to increasing risk of either therapeutic failures or misadventures. The urinary mephenytoin S/R ratio has successfully been used for phenotyping CYP2C19 by several investigators, but concerns regarding adverse drug effect, analysis difficulty and long term sample unstability have limited its utility. The proguanil/cycloguanil ratio has been used for CYP2C19 expression, but overlapping result between the (PM) and (EM) also limits its utility. The plasma omeprazole/5-hydroxyomeprazole ratio correlates well with CYP2C19 genotype and has led to another substrate probe studied with advantages including less side effects and less difficulties in drug quantitation. Genotyping of CYP2C19 can be determined by the PCR-RFLP techniques. After digestion with appropriate restriction endonucleases, the pattern of CYP2C19 alleles can be simply revealed under the agarose electrophoresis. To date only a few studies have been reported on CYP2C19 polymorphism in Thai population. The discrepancy in finding of PM between 7% and 18% warrants further investigation before any unambiguous conclusion can be made.

Address correspondence and reprint requests to: Wichitra Tassaneeyakul, Ph.D., Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, KhonKaen University, KhonKaen 40002, Thailand.
Tel/Fax : 43-348397.

ความผิดปกติทางพันธุกรรมของเอนไซม์ cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) เดิมรู้จักกันในนาม mephenytoin hydroxylation polymorphism เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับการใช้ยากันชัก mephenytoin (3-methyl-5-phenyl-5-ethyl hydantoin, Mesantoin®) ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้รักษาการชักแบบ focal และ motor generalized ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1945 โดยยา mephenytoin ที่นำมาใช้ทางคลินิกมักอยู่ในรูป racemic ซึ่งประกอบด้วย R- และ S-enantiomers ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน การศึกษาในสัตว์ทดลอง เช่นสุนัข พบว่า S-enantiomer ของยาคือยาชนิดนี้จะถูกกำจัดออกจากพลาสมาได้เร็วกว่า R-enantiomer เนื่องจาก stereoselectivity ของปฏิกิริยา hydroxylation บน phenyl ring ของโมเลกุลยา^{1,2} สำหรับความผิดปกติทางพันธุกรรมของการเปลี่ยนแปลงยา mephenytoin ในมนุษย์ถูกพบครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1984 ขณะที่กำลังศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาในอาสาสมัคร โดยมีอาสาสมัครคนหนึ่งมีอาการง่วงนอนอย่างมากภายหลังได้รับยา เมื่อตรวจวัดระดับยาในปัสสาวะของเขา พบว่ามีปริมาณเมตาบอไลต์ของยา คือ 4-hydroxymephenytoin น้อยมาก เนื่องจากมีความบกพร่องของปฏิกิริยา hydroxylation ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยน mephenytoin ให้อยู่ในรูป hydroxy metabolite ได้³

การศึกษาต่อมา พบว่าความบกพร่องของปฏิกิริยา hydroxylation ชนิดนี้มีผลเฉพาะ mephenytoin ที่อยู่ในรูป S-enantiomer เท่านั้น ไม่มีผลต่อ R-

enantiomer^{4,5} นอกจากนี้ยังพบว่าความบกพร่องชนิดนี้ สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal recessive trait⁵ ผู้ที่มีความบกพร่องของปฏิกิริยา S-mephenytoin hydroxylation จึงเป็น poor metabolizer (PM) ของ mephenytoin hydroxylation ซึ่งพบว่าความชุกหรือความถี่ของจำนวนประชากร PM ในแต่ละเชื้อชาติมักแตกต่างกัน โดยในชาวผิวขาวพบ PM ประมาณ 1-6 % ในขณะที่พบในชาวเอเชียมากกว่า คือ ประมาณ 11-23% ดังแสดงในตารางที่ 1

ความผิดปกติของยีน CYP2C19

แม้ว่าความผิดปกติทางพันธุกรรมของเอนไซม์ S-mephenytoin hydroxylase ได้ถูกศึกษามาเป็นเวลานานหลายปีแล้ว แต่เพิ่งมีการค้นพบเมื่อไม่นานมานี้ว่าเอนไซม์นี้จัดอยู่ในกลุ่ม CYP2C subfamily ซึ่งปัจจุบันเรียกว่า CYP2C19^{1,2}. CYP2C เป็นกลุ่ม subfamily ที่ค่อนข้างใหญ่ ประกอบด้วยยีนชนิดต่างๆ ไม่น้อยกว่า 7 ชนิด โดยสำหรับยีน CYP2C19 มีโครงสร้างเป็น 9 exon ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ CYP2C19 ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 490 ตัว จากการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C19 ในอาสาสมัครที่เป็น PM พบว่าการผ่าเหล่าของ nucleic acid เกิดขึ้นบนบางตำแหน่งของยีน ทำให้ไม่มีการสร้างเอนไซม์ CYP2C19 หรือเอนไซม์ CYP2C19 ที่สร้างขึ้นมีความผิดปกติจนไม่สามารถทำงานได้ดีเท่าที่ควร

ตารางที่ 1 ความถี่ของ poor metabolizer (PM) ในประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ ⁶⁻⁸

Ethnic group	Frequencies of PM (%)
Asians of :	
China	11-17
India	11-20
Indonesia	15
Japan	14-23
Korea	13
Philipines	23
Vietnam	22
Mid-East Asians of :	
Isarael	3
Saudi Arabians	2
Caucasians of :	
Canada	4
Canada (Inuit)	2
Denmark	3
France	6
Greenland (west)	3
(east)	9
Netherland	2
Portugal	1
Russia	2
Spain	2
Sweden	3
Switzerland	5
Turkey	1-8
USA	3
Africans of :	
Black American	1-2
Ethiopia	5
Tanzania	8
Zimbabwe	4
Micellaneous :	
Vanuatu	41

ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *CYP2C19* ที่พบในประชากรเชื้อชาติต่างๆ ในปัจจุบัน มีความแตกต่างของคู่ยีน (alleles) ไม่น้อยกว่า 11 ชนิด ดังสรุปได้ดังนี้คือ (ดูรูปที่ 1 ประกอบ)

1. *CYP2C19*1A* และ *CYP2C19*1B* เป็นคู่ยีน *CYP2C19* แบบที่พบในประชากรส่วนใหญ่ (wild-type) ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ได้ตามปกติโดยคู่ยีน *CYP2C19*1B* ต่างจาก *CYP2C19*1A* ตรงที่มีการผ่าเหล่า (mutation) ของ nucleic acid ใน exon 1 บนตำแหน่งที่ 99 จาก C เป็น T แต่การผ่าเหล่านี้นี้เป็นแบบ silent mutation จึงไม่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์

2. *CYP2C19*2 (m1)* เป็นคู่ยีนชนิดที่เกิดจากการผ่าเหล่าบน exon 5 ตำแหน่งที่ 681 จาก G เป็น A ทำให้เกิดการเชื่อมต่อ exon แบบผิดปกติ และเกิดการหยุดสร้าง (stop codon) เอนไซม์ก่อนกำหนดปกติ ทำให้เอนไซม์ *CYP2C19* ที่ถูกสร้างขึ้นมีกรดอะมิโนเพียง 234 ตัว และขาดส่วนที่จำเป็น ต่อการจับกับ heme จึงไม่สามารถทำงานได้⁹

3. *CYP2C19*3 (m2)* เป็นคู่ยีนที่มีการผ่าเหล่าบน exon 4 ตำแหน่งที่ 636 จาก G เป็น A ทำให้เกิดการหยุดสร้างก่อนกำหนดปกติ¹⁰

4. *CYP2C19*4 (m3)* เป็นคู่ยีนที่มีการผ่าเหล่าของรหัสเริ่มสร้าง (initiation codon) จาก ATG เป็น GTG ทำให้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ได้¹¹

5. *CYP2C19*5 (m4)* เป็นคู่ยีนที่มีการ

C เป็น T ทำให้มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 433 ซึ่งเป็นส่วนที่จำเป็นต่อการจับกับ heme จาก Arg เป็น Trp ทำให้ได้เอนไซม์ที่ใช้งานไม่ได้¹²

6. *CYP2C19*6 (m5)* เป็นคู่ยีนที่ค้นพบใน PM ชาวสวิส โดยมีการผ่าเหล่าใน exon 3 ตำแหน่งที่ 395 จาก G เป็น A ทำให้ amino acid ที่ตำแหน่ง 132 เปลี่ยนจาก Arg เป็น Gln ส่งผลให้เอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นทำงานไม่ได้เช่นกัน¹³

7. *CYP2C19*7 (m6)* เป็นคู่ยีนที่ค้นพบใน PM ชาวเดนมาร์ก โดยมีการผ่าเหล่าจาก T เป็น A ที่ตำแหน่งเชื่อมต่อด้าน 5' ของ intron 5 ทำให้การเชื่อมต่อยีนผิดปกติ ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ได้¹⁴

8. *CYP2C19*8* เป็นคู่ยีนชนิดที่ถูกค้นพบเมื่อไม่นานมานี้ใน PM ชาวฝรั่งเศส โดยพบการผ่าเหล่าของ exon 3 ตำแหน่งที่ 358 จาก T เป็น C จึงเกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโน ตำแหน่งที่ 120 จาก Trp เป็น Arg¹⁴

สำหรับประชากรกลุ่ม PM ในชาวเอเชีย พบว่า 75-80% เกิดจากความผิดปกติของยีนแบบ *CYP2C19*2 (m1)* ที่เหลืออีก 20-25% เป็นแบบ *CYP2C19*3 (m2)* ในขณะที่คู่ยีนทั้งสองแบบนี้พบในชาวผิวขาวที่เป็น PM เพียง 86-87% เท่านั้น^{10,15-17} การวิจัยเมื่อเร็วๆ นี้ยังพบว่า PM ชาวยุโรปเป็นแบบ *CYP2C19*4 (m3)* และ *CYP2C19*5B* ประมาณ 3% และ 1-5% ของตามลำดับ^{11,12} สำหรับ *CYP2C19*5A* ซึ่งคล้ายคลึงกับ *CYP2C19*5* พบเฉพาะในชนกลุ่มน้อยเชื้อชาติ Bai ของผ่าเหล่าของ exon 9 ตำแหน่งที่ 1,297 จาก

ประเทศจีน แต่ไม่พบในชนชาติอื่นซึ่งเป็นประชากรส่วนใหญ่ของประเทศจีน¹⁸ นอกจากนี้ยังอาจตรวจพบ CYP2C19*4 (m3) ในชาวจีนที่อาศัยอยู่ในฮ่องกง อย่างไรก็ตาม ความชุกของคูยีน ทั้งแบบ CYP2C19*5A และ CYP2C19*4 ในประชากรจีนทั้งสองกลุ่มนี้จะต่ำมาก

ส่วนยีน CYP2C19 ชนิดอื่นๆ มักพบน้อยมาก จึงเห็นได้ว่าความผิดปกติของยีน CYP2C19 เท่าที่มีรายงานถึงปัจจุบันสามารถทำนายลักษณะการแสดงออก (phenotype) ของเอนไซม์ CYP2C19 ในประชากรเอเชียได้ค่อนข้างดี แต่สามารถครอบคลุมชาวผิวขาวเพียง 93% เท่านั้น¹⁴ จึงมีความเป็นไปได้ว่าอาจยังมีความผิดปกติที่ตำแหน่งอื่นๆ ของยีน CYP2C19 ที่ส่งผลต่อความบกพร่องในการทำงานของเอนไซม์ CYP2C19 ซึ่งยังไม่ถูกค้นพบ และจะต้องศึกษาค้นคว้าต่อไปอีกในอนาคต

ความสำคัญทางคลินิกของความผิดปกติทางพันธุกรรมของ CYP2C19

แม้ยา mephenytoin จะไม่เป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบันเนื่องจากให้ผลการรักษาไม่ดี รวมทั้งมีอาการข้างเคียงสูง แต่ยังมีผู้สนใจศึกษาการทำงานของเอนไซม์ S-mephenytoin hydroxylase หรือ CYP2C19 อย่างกว้างขวาง เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์นี้ในแต่ละบุคคลมีโอกาสแตกต่างกันได้มาก รวมทั้งยังเป็นเอนไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงยาที่ใช้ในปัจจุบันหลายชนิด ได้แก่ citalopram, carisoprodol,

diazepam, hexobarbital, mephobarbital, imipramine, propranolol, proguanil, pantoprazole, omeprazole, และ lansoprazole^{19,20} ซึ่งความผิดปกติทางพันธุกรรมของเอนไซม์ย่อมส่งผลต่อการตอบสนองในการรักษา รวมทั้งมีโอกาสเกิดอาการข้างเคียงหรืออาการพิษจากยาด้วย ตัวอย่างเช่น ผู้ป่วยที่เป็น PM มีโอกาสเกิดอาการข้างเคียงจากยา mephenytoin, mephobarbital และ hexobarbital มากกว่าผู้ที่เป็น extensive metabolizer (EM)³ และการค้นพบเมื่อเร็วๆ นี้ พบว่า omeprazole สามารถลดกรดในกระเพาะอาหาร รวมทั้งเพิ่มปริมาณ gastrin ในพลาสมาของอาสาสมัครที่เป็น PM ได้ดีกว่าผู้ที่เป็น EM²¹ การพบว่าอัตราการกำจัด *H. pylori* โดยการใช้ omeprazole ร่วมกับ amoxicillin จะสูงในผู้ป่วยกลุ่มที่เป็น PM เมื่อเทียบกับผู้ป่วยกลุ่ม EM²² นอกจากนี้ยังเชื่อว่ายาป้องกันมาลาเรีย proguanil อาจใช้ไม่ได้ผลในผู้ป่วยมาลาเรียที่เป็น PM เนื่องจากบุคคลเหล่านี้ไม่สามารถเปลี่ยน proguanil ให้อยู่ในรูปสารออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ป้องกันมาลาเรียได้ และการใช้ยานี้ในผู้ป่วย PM อาจเป็นเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อ *Plasmodium falciparum* เกิดการดื้อยาเพิ่มขึ้น²³

จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงเห็นได้ว่าการทราบข้อมูลความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ CYP2C19 ของผู้ป่วยแต่ละรายก่อนใช้ยา อาจมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา รวมทั้งหลีกเลี่ยง หรือลดความเสี่ยงในการเกิดอาการข้างเคียงหรือพิษของยาได้ ปัจจุบันเราสามารถตรวจวัด

(ภาพที่ 1 เปรียบเทียบรายละเอียดของคู่จีน *CYP2C19* แบบต่างๆ เท่าที่มีรายงานจนถึงปัจจุบัน)

Allele	Trivial Name	Effect of Nucleotide	Enzyme Activity	0 200 400 600 800 1000 1200 1400 1600 bp
CYP2C19*1A	CYP2C19 _{wt1}		Active	1 2 3 4 5 6 7 8 9
CYP2C19*1B	CYP2C19 _{wt2}	Ile ₃₁₁ Val	Active	1 2 3 4 5 6 7 8 9 C ₉₉ T A ₉₉₁ G
CYP2C19*2A	CYP2C19 _{m1A}	Splicing Defect	Inactive	1 2 3 4 5 6 7 8 9 C ₉₉ T G ₆₆₁ A C ₉₉₀ T A ₉₉₁ G
CYP2C19*2B	CYP2C19 _{m1B}	Glu ₉₂ Asp Splicing Defect	Inactive	1 2 3 4 5 6 7 8 9 C ₉₉ T G ₂₇₆ C G ₆₆₁ A C ₉₉₀ T A ₉₉₁ G
CYP2C19*3	CYP2C19 _{m2}	Stop Codon	Inactive	1 2 3 4 5 6 7 8 9 G ₅₃₆ A A ₉₉₁ G A ₁₂₅₁ C
CYP2C19*4	CYP2C19 _{m3}	GTG Initiation Codon	Inactive	1 2 3 4 5 6 7 8 9 A ₁ G C ₉₉ T A ₉₉₁ G
CYP2C19*5A	CYP2C19 _{m4} CYP2C19 _{TRP433}	Arg ₄₃₃ Trp	Inactive	1 2 3 4 5 6 7 8 9 C ₁₂₅₇ T
CYP2C19*5B		Ile ₃₃₁ Val; Arg ₄₃₃ Trp	Inactive	1 2 3 4 5 6 7 8 9 C ₉₉ T A ₉₉₁ G C ₁₂₅₇ T
CYP2C19*6	CYP2C19 _{m5}	Arg ₁₃₂ Gln; Ile ₃₃₁ Val	Inactive	1 2 3 4 5 6 7 8 9 C ₉₉ T G ₃₃₅ A A ₉₉₁ G
CYP2C19*7	CYP2C19 _{m6}	T to A base transversion at donor site of intron 5 (Exon Skipping)	Inactive	
CYP2C19*8		Trp ₁₂₀ Arg	Decrease	1 2 3 4 5 6 7 8 9 T ₃₅₉ C

ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ โดยตรวจวัดการทำงานหรือการแสดงออก (phenotyping) ของเอนไซม์ และการตรวจวัดลักษณะทางพันธุกรรมของวัดลักษณะทางพันธุกรรมของยีน (genotyping)

การตรวจวัดการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2C19

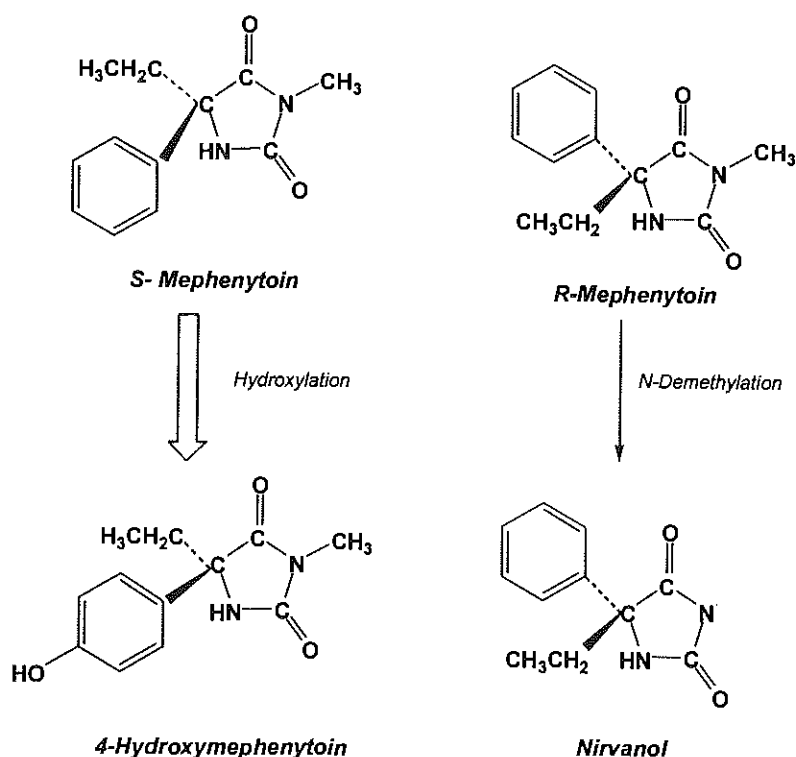
เราสามารถศึกษาลักษณะการแสดงออกของเอนไซม์ CYP isoform ต่างๆ ในแต่ละบุคคลได้โดยการให้อาสาสมัครรับประทานยาหรือสารเคมีที่เป็นสารถูกย่อย (substrate) ที่จำเพาะต่อ CYP isoform ที่ต้องการศึกษา ซึ่งยาที่อาจนำมาใช้เป็นตัววัดที่ดีควรมีความปลอดภัยสูง ทำให้เกิดอาการข้างเคียงต่ำ วิเคราะห์หาปริมาณยาและ metabolites ได้ง่าย สามารถแปลผลได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ สำหรับยาที่นิยมใช้เป็นตัววัดความสามารถในการทำงาน CYP2C19 ปัจจุบัน มีหลายชนิด แต่ที่จะกล่าวถึงในที่นี้ได้แก่

1. Mephenytoin

Mephenytoin เป็นยาตัวแรกที่ใช้ในการวัดฟีโนไทป์ของ CYP2C19 และปัจจุบันยังเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยทั่วไปนิยมให้อาสาสมัครรับประทาน mephenytoin ในรูป racemic (Mesantoin[®], Sandoz) ในขนาด 100 mg (หรือ 50 mg ในอาสาสมัครที่มีน้ำหนักตัวน้อยกว่า 50 กิโลกรัม) หลังจากนั้นเก็บปัสสาวะในช่วง 8 ถึง 24 ชั่วโมงหลังจากรับประทานยา เพื่อวัดหาปริมาณ 4-hydroxymephenytoin หรือ

enantiomeric ratio ระหว่าง S- และ R-mephenytoin ซึ่งโดยทั่วไป จะถือว่าบุคคลคนนั้นเป็น PM ต่อเมื่อมีปริมาณของ 4-hydroxymephenytoin น้อยกว่า 2% ของขนาดยาที่ให้ หรือมีค่า S/R ratio มากกว่าหรือเท่ากับ 0.8²⁴ วิธีการเปลี่ยนแปลง mephenytoin ในร่างกายมนุษย์แสดงไว้ในรูปที่ 2

อย่างไรก็ตามการศึกษาการแสดงออกของ CYP2C19 โดยใช้ mephenytoin มีข้อจำกัดอยู่หลายประการด้วยกัน ตัวอย่างเช่นยานี้มีผลข้างเคียงต่อระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้เกิดอาการง่วงนอนและเวียนศีรษะได้ง่าย²⁵ วิธีการวิเคราะห์ปริมาณยาหรือ metabolite ของยานี้ค่อนข้างยุ่งยาก เพราะต้องทำการวิเคราะห์แยก S- และ R-enantiomers ของ mephenytoin นอกจากนี้ยังมีปัญหาความไม่คงตัวของยา เช่น metabolite ของ S-mephenytoin ที่ไม่ใช่ (S)-4-hydroxymephenytoin บางชนิด สามารถเปลี่ยนรูปกลับมาเป็น S-mephenytoin ได้ด้วย โดยเฉพาะถ้าตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บไว้เป็นเวลานานเกินกว่า 6 เดือน เป็นผลให้สัดส่วนของ S/R mephenytoin ที่คำนวณได้คลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริงทำให้แปลผลฟีโนไทป์ผิดพลาดได้²⁶ ดังนั้นผู้วิจัยจะต้องทำการตรวจวัด S/R ratio ของ mephenytoin อีกครั้งภายหลังจากการเติมกรดเกลือ (HCl) ลงไปในตัวอย่างปัสสาวะ โดยที่ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ที่เป็น PM จะต้องมีค่า S/R ratio ของ mephenytoin ก่อนและหลังการเติมกรดเกลือเดียวกัน (ไม่เกิน 1.2) แต่ถ้าพบว่าตัวอย่างปัสสาวะนั้น S/R



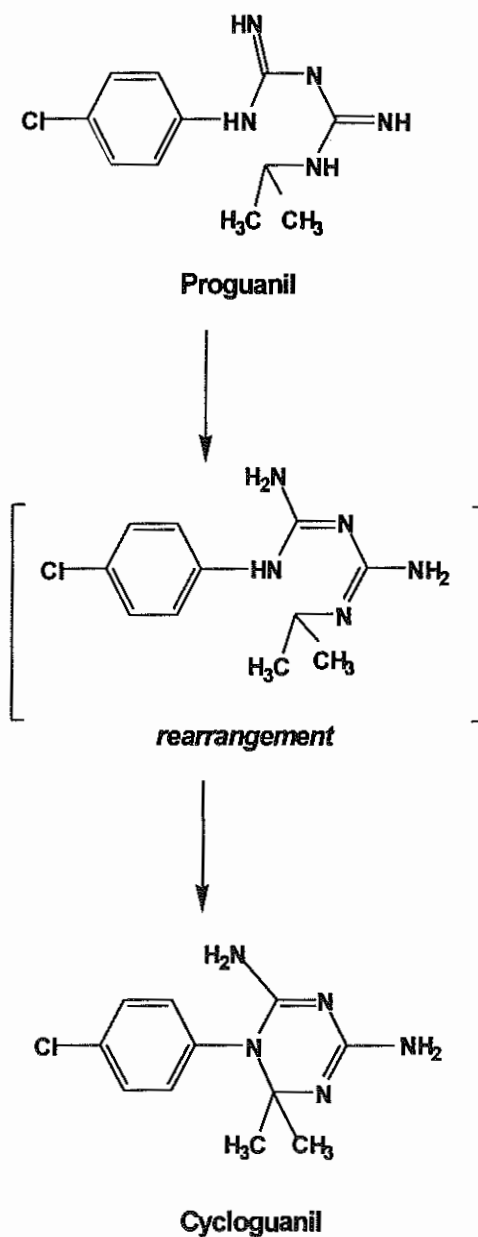
รูปที่ 2 วิธีการเปลี่ยนแปลง mephénytoin ในมนุษย์

ratio มีค่าเพิ่มขึ้นหลังจากการเดิมกรด แสดงว่าบุคคลนั้นเป็น EM

2. Proguanil

Proguanil เป็นอนุพันธ์ของ biguanil ที่มีฤทธิ์ป้องกัน (prophylactic) โรคมาเลเรียจากเชื้อ *P. falciparum* โดยเฉพาะเชื้อที่ดื้อต่อ chloroquine ยานี้มีความปลอดภัยค่อนข้างสูง สามารถใช้ได้กับเด็ก และหญิงมีครรภ์ Proguanil โดยตัวเองไม่มีฤทธิ์แต่เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็น metabolite หลัก คือ cycloguanil ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ dihydrofolate reductase ของเชื้อ plasmodium ได้²⁷ (รูปที่3)

ในปี ค.ศ.1987 Watkins และคณะพบว่ามีความแตกต่างของระดับยา cycloguanil ในพลาสมาของอาสาสมัครชาวเคนยา หลังจากได้รับยา proguanil ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของความล้มเหลวในการใช้ proguanil ในการป้องกันมาเลเรีย²³ จากการศึกษาต่อมา พบว่าความถี่ในการกระจายของอัตราส่วนความเข้มข้นของ proguanil และ cycloguanil ในตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บหลังจากให้ยา proguanil ในขนาด 200 mg ไปแล้ว 0-6 ชั่วโมง ในชาวอังกฤษและชาวเคนยามีลักษณะเป็นแบบ bimodal²⁸ นอกจากนี้ยังพบว่าปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลง proguanil ให้เป็น cycloguanil มักบกพร่อง



รูปที่ 3 วิธีการเปลี่ยนแปลง proguanil ในมนุษย์

ในผู้ที่เป็น PM ของ S-mephenytoin hydroxylase²⁹ ผลจากการศึกษาในหลอดทดลองต่อมายังพบว่า mephenytoin ยับยั้งการเปลี่ยนแปลง proguanil ไปเป็น cycloguanil แบบ competitive^{30,31} แสดงว่าเอนไซม์ CYP2C19 เป็นเอนไซม์สำคัญที่

ทำหน้าที่เปลี่ยน proguanil ให้กลายเป็น cycloguanil

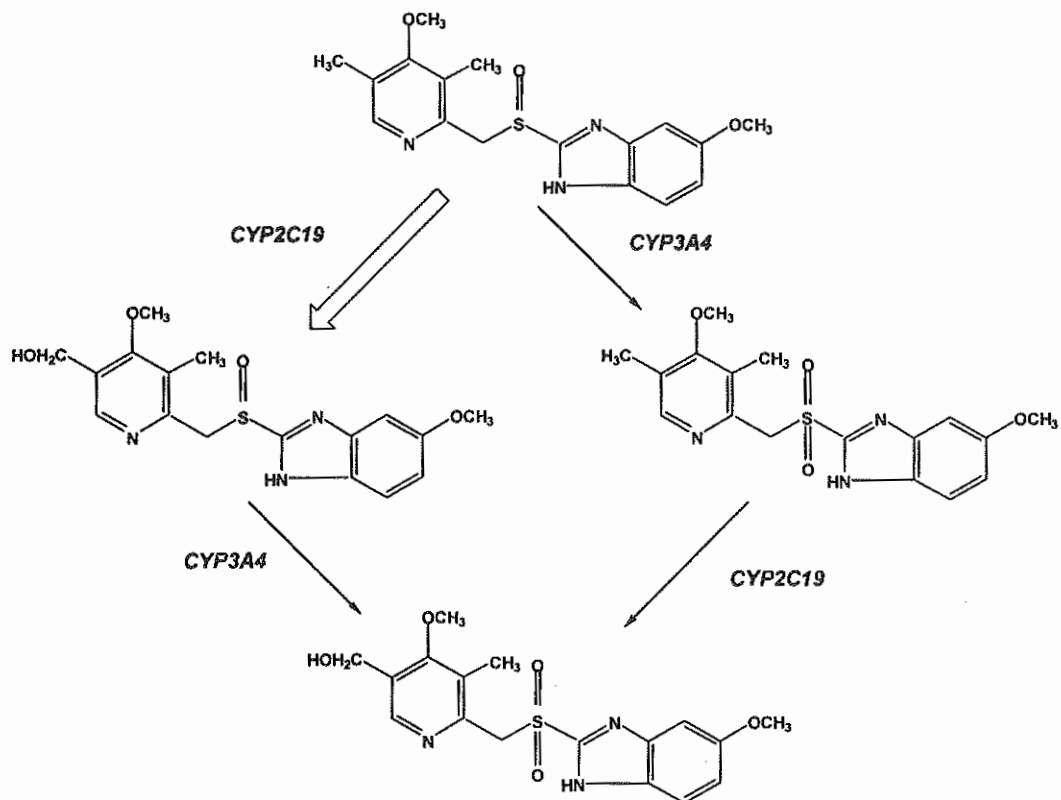
ปัจจุบัน proguanil เป็นยาชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาการแสดงออกของ CYP2C19 โดยนิยมให้รับประทาน proguanil ในขนาด 200 มิลลิกรัม หลังจากนั้น

เก็บตัวอย่างปัสสาวะที่เวลา 0-6 ชั่วโมงหลังรับประทานยา หรือเจาะเลือดที่เวลา 3 ชั่วโมง หลังรับประทานยา เพื่อวัดปริมาณ proguanil และ cycloguanil โดยแปลผลจากค่าสัดส่วน proguanil/cycloguanil ถ้าสัดส่วนมากกว่า 10 แสดงว่าเป็น PM^{28,32} จากรายงานการวิจัยเมื่อเร็วๆนี้ พบว่าค่าสัดส่วน proguanil/cycloguanil ในเลือดที่เก็บหลังจากรับประทาน proguanil ไปแล้ว 3 ชั่วโมงมีการคาบเกี่ยวกันค่อนข้างสูงระหว่างกลุ่มประชากรที่เป็น heterozygous EM และ homozygous PM³ ดังนั้นความเหมาะสมในการใช้สัดส่วน proguanil/cycloguanil เป็นดัชนีวัดการแสดงออกของ CYP2C19 จึงควรต้องมีการตรวจสอบอีกในอนาคต

3. Omeprazole

Omeprazole เป็นยารักษาแผลเปปติกในกลุ่ม benzimidazole ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งกรดจาก acidic canaliculi ของ parietal cell ในกระเพาะอาหาร โดยจับกับ $H^+-K^+ATPase$ หลังจากเข้าสู่ร่างกาย omeprazole จะถูกเปลี่ยนเป็น metabolite หลายชนิด ชนิดที่ตรวจพบในพลาสมาได้แก่ 5-hydroxyomeprazole และ omeprazole sulfone ส่วนชนิดที่ตรวจพบในปัสสาวะได้แก่ 5-hydroxyomeprazole และ carboxylic acid metabolite ของ hydroxyomeprazole^{33,34}

การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ omeprazole ในอาสาสมัครที่เป็น PM และ



รูปที่ 4 วิธีการเปลี่ยนแปลงของ omeprazole ในร่างกายมนุษย์

EM ของ S-mephenytoin hydroxylation มักเป็น PM ของ omeprazole 5-hydroxylation ด้วยเภสัชจลนศาสตร์ของยาเมื่อวัดจากพื้นที่ใต้กราฟระหว่างความเข้มข้นและเวลา (AUC) รวมทั้งค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ของ omeprazole ในกลุ่ม PM มีค่ามากกว่ากลุ่ม EM ประมาณ 5 เท่าและ 3 เท่าตามลำดับ³⁴ ข้อมูลจากการศึกษาในมนุษย์ (*in vivo*) เหล่านี้สอดคล้องเป็นอย่างดีกับผลการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) ใช้ human liver microsomes ซึ่งพบว่า CYP2C19 หรือ S-mephenytoin hydroxylase เป็นเอนไซม์หลักที่รับผิดชอบในการเปลี่ยน omeprazole ให้เป็น 5-hydroxyomeprazole ส่วน CYP3A4 ทำหน้าที่เปลี่ยน omeprazole ให้เป็น omeprazole sulfone³⁵ ทั้ง 5-hydroxyomeprazole และ omeprazole sulfone จะถูกเปลี่ยนแปลงทางเคมีต่อไปเป็น 5-hydroxyomeprazole ที่ 3 sulfone โดย CYP3A4 และ CYP2C19 ตามลำดับ³⁶ ดังแสดงในรูปที่ 4

เนื่องจาก omeprazole เป็นยาที่มีความปลอดภัยในการใช้สูงและก่อให้เกิดอาการข้างเคียงน้อย โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับ mephenytoin จึงมีผู้เสนอให้ใช้สัดส่วนความเข้มข้นระหว่าง omeprazole และ 5-hydroxyomeprazole ในพลาสมาหลังจากการรับประทาน omeprazole ขนาด 20 mg ไปแล้ว 2 หรือ 3 ชั่วโมง เป็นดัชนีในการวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ CYP2C19 แทนการใช้ S-mephenytoin hydroxylation^{37,38} การใช้ omeprazole เป็นตัววัดความสามารถในการทำงานของ CYP2C19 นี้ นอกจากจะมีความถูกต้อง

และแม่นยำสูงแล้ว ยานี้ยังมีฤทธิ์ข้างเคียงน้อยและสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาและ metabolite ได้ง่ายและสะดวกกว่า mephenytoin การศึกษาในประเทศไทย อีสานโดยคณะผู้วิจัยของเรา พบว่าสัดส่วนความเข้มข้นที่เวลา 3 ชั่วโมงหลังจากรับประทานยาเป็นดัชนีที่เหมาะสมสำหรับประชากรไทย เนื่องจากในอาสาสมัครบางรายอาจตรวจไม่พบ omeprazole หรือ 5-hydroxyomeprazole ที่เวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งอาจเกิดจากการแปรปรวนในการดูดซึม และกระจายตัวของยาในระยะต้นๆ

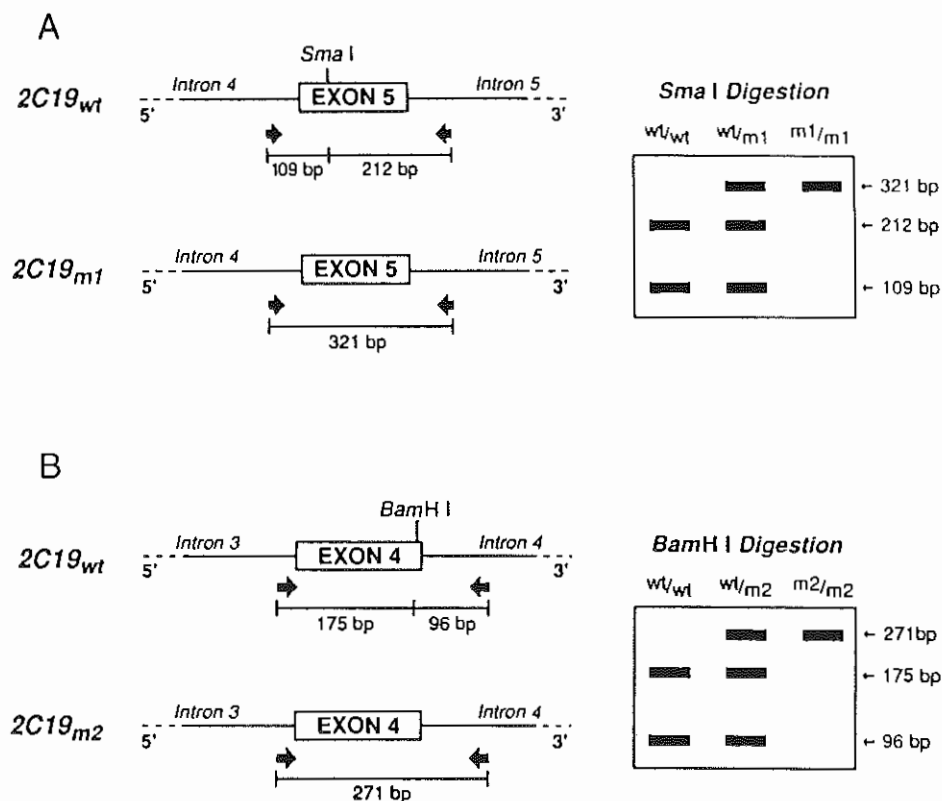
การศึกษาพันธุกรรมของ CYP2C19 (CYP2C19 genotyping)

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีตรวจวัดความสามารถของเอนไซม์ CYP2C19 โดยอาศัยการตรวจลักษณะทางพันธุกรรมของยีน CYP2C19 หรือที่เรียกว่า genotyping ซึ่งวิธีการนี้ทำได้ไม่ยุ่งยาก และไม่จำเป็นต้องให้อาสาสมัครรับประทานยา เพียงแต่เก็บเลือดจากปลายนิ้วของอาสาสมัคร(ประมาณ 100-200 μ l) ก็เพียงพอสำหรับการเตรียม genomic DNA (gDNA) เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมต่อไป

การตรวจความผิดปกติของยีน CYP2C19 ในชาวเอเชีย ชนิด CYP2C19*2 และ CYP2C19*3 อาจเพียงพอที่จะระบุว่าบุคคลนั้นเป็น PM ของ CYP2C19 หรือไม่ เพราะมากกว่า 99% ของชาวเอเชียที่เป็น PM เป็นผลจากการผ่าเหล่า ทั้งสองแบบนี้ การตรวจทำได้โดยใช้เทคนิค poly-

merase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) เช่นอาศัยวิธีของ Goldstein และ Blaisdell³⁹ โดยถ้าต้องการตรวจยีน CYP2C19*2 ก็ใช้ คู่ primers ที่จำเพาะกับ exon 5 และหากต้องการตรวจ CYP2C19*3 ก็ใช้คู่ primers ที่จำเพาะกับ exon 4 แทน เป็นต้น

สำหรับการวิเคราะห์ผล CYP2C19*2 ให้นำ PCR product ที่ได้ไปย่อยด้วยเอนไซม์ SmaI ส่วนการวิเคราะห์ CYP2C19*3 ให้ย่อยด้วยเอนไซม์ BamHI หลังจากนั้นนำ DNA ที่ย่อยแล้วไปวิเคราะห์แยกขนาดด้วยไฟฟ้า (electrophoresis) โดยใช้ 3% agarose gel จะพบลักษณะของ DNA fragments เป็นแถบเรืองแสงบน agarose gel ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 5



รูปที่ 5 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของคู่ยีนแบบ CYP2C19*2 (m1) และ CYP2C19*3 (m2) โดยใช้ PCR– base restriction analysis

ในผู้ที่ไม่มีพันธุกรรมแบบ homozygous wild type (wt/wt) จะพบว่า DNA ที่ได้จาก PCR reaction ของ exon 5 ขนาด 321 bp จะถูก *SmaI* ตัดได้อย่างสมบูรณ์ ให้มีขนาดเล็กลง คือ 212 และ 109 bp ในขณะที่ผู้ที่ เป็น homozygous m1 allele (m1/m1) หรือ (*CYP2C19*2/CYP2C19*2*) ซึ่งมี mutation ใน exon 5 จาก G กลายเป็น A ที่ตำแหน่ง 681 เป็นเหตุให้สูญเสีย recognition site ของ *SmaI* ทำให้ *SmaI* ไม่สามารถย่อย DNA ได้ ดังนั้น DNA ที่พบ จึงมีขนาดเท่าเดิมคือ 321 bp ส่วนผู้ที่ เป็น heterozygous m1 allele (wt/m1) หรือ (*CYP2C19*1/CYP2C19*2*) จะพบแถบของ DNA เป็น 3 แถบ ที่ขนาด 321, 212 และ 109 bp

สำหรับผู้ที่ เป็น homozygous wild type (wt/wt) DNA ของ exon 4 ที่ได้ จาก PCR reaction ซึ่งมีขนาด 271 bp จะถูก *BamHI* ย่อย ทำให้มีขนาดเล็กลงเป็น 175 และ 96 bp ส่วนผู้ที่ มีคูยีนแบบ homo-zygous m2 (m2/m2) หรือ (*CYP2C-19*3/CYP2C19*3*) มี mutation ใน exon ที่ 4 ของ *CYP2C19* gene จาก G เป็น A ที่ตำแหน่ง 636 ทำให้ *BamHI* ไม่สามารถย่อย DNA ได้ ขนาดของ DNA ที่ปรากฏบน agarose gel จึงเท่าเดิมคือ 271 bp ส่วนผู้ที่ มีคูยีนแบบ heterozygous m2 (wt/m2) หรือ (*CYP2C19*1/CYP2C19*3*) จะปรากฏแถบของ DNA 3 แถบคือ 271, 175 และ 96 bp

ความผิดปกติของเอนไซม์ CYP2C19 ในประชากรไทย

สำหรับความผิดปกติทางพันธุกรรมของ *CYP2C19* ในประชากรไทยยังมีข้อมูลค่อนข้างน้อย Edstein และคณะ⁴⁰ ได้ทำการศึกษาลักษณะการแสดงออกของเอนไซม์ *CYP2C19* โดยใช้อาสาสมัครที่เป็นทหารเรือที่อาศัยในภาคกลาง โดยใช้สัดส่วน proguanil/cycloguanil เป็นดัชนีในการวัดพบว่าสัดส่วนของประชากรที่เป็น PM มีประมาณ 18% อย่างไรก็ตามมีข้อสังเกตว่า ผลการศึกษาของ Edstein และคณะนั้น ความถี่ของค่าสัดส่วน proguanil/cycloguanil ในพลาสมาของประชากรมีการกระจายตัวแบบ unimodal ไม่ใช่ bimodal อย่างไรก็ตาม Edstein และคณะ ได้ทำการคำนวณสัดส่วนของประชากรที่เป็น PM โดยอาศัยค่า cut point ที่มากกว่า 10 ตามที่เคยมาผู้เสนอไว้

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการแสดงออก รวมทั้งลักษณะทางพันธุกรรมของ *CYP2C19* ในชาวไทยอีสานจำนวน 55 คน โดยใช้ omeprazole และเทคนิค PCR-RFLP พบว่าการแจกแจงความถี่ของค่า omeprazole metabolic ratio (MR) มีลักษณะเป็น bimodal โดยอาสาสมัครที่เป็น PM พบประมาณ 7.27 % จากการคำนวณพบว่าค่าความถี่ของคูยีน *CYP2C19*1* และ *CYP2C19*2* มีค่าประมาณ 0.73 และ 0.23 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับที่มีผู้รายงานไว้ในชาวญี่ปุ่น แต่มีค่าสูงกว่าที่พบใน

ชาวยุโรปและอเมริกัน ส่วนความถี่ของคูยีน CYP2C19*3 มีค่าประมาณ 0.03 ซึ่งต่ำกว่าที่เคยมีรายงานไว้ในประชากรเอเชียอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าอาจมีความผิดปกติของยีน CYP2C19 ชนิดอื่น ซึ่งอาจเป็นชนิดใหม่ที่เป็นสาเหตุให้การทำงานของเอนไซม์บกพร่องในคนไทยได้ อย่างไรก็ตามผู้เขียนกำลังดำเนินการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อให้ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นตัวแทนประชากรไทยอีสานได้อย่างแท้จริง รวมทั้งศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ CYP2C19 ในประชากรภาคต่างๆ ของประเทศไทยด้วย จากข้อมูลความแตกต่างที่กล่าวมาแล้วระหว่างของ Edstein และคณะ และข้อมูลของผู้วิจัยเอง ในขั้นนี้จึงอาจสันนิษฐานได้ว่าสัดส่วนของ PM ชาวไทยในแต่ละภูมิภาคมีโอกาสที่จะแตกต่างกัน หรือเกิดจากการใช้

ดัชนีที่ต่างกัน เช่น จากสัดส่วน proguanil/cycloguanil กับสัดส่วน omeprazole MR การวิจัยเมื่อเร็วๆ นี้ยังพบว่าการใช้ค่าสัดส่วน proguanil/cycloguanil เป็นดัชนีในการวัดการแสดงออกของ CYP2C19 อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกระหว่าง heterozygous EM และ PM ได้ เนื่องจากมีการคาบเกี่ยวกันของค่าสัดส่วน proguanil/cycloguanil⁴¹ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าในบางบุคคลแม้ตรวจจะพบค่าสัดส่วน proguanil/cycloguanil ได้มากกว่า 10 บุคคลนั้นก็อาจจะไม่ได้เป็น PM ได้ ดังนั้นจึงทำให้สัดส่วนของ PM ในประชากรไทยที่คำนวณจากงานวิจัยของ Edstein และคณะ สูงกว่าที่ควรจะเป็น

เอกสารอ้างอิง

1. Wrighton SA, Stevens JC, Becker GW, VandenBranden M. Isolation and characterization of human liver cytochrome P450 2C19: correlation between 2C19 and S-mephenytoin 4'-hydroxylation. *Arch Biochem Biophys* 1993;306:240-5.
2. Goldstein JA, Faletto MB, Romkes Kitareewan S, Raucy JL, M, Sullivan T, et al. Evidence that CYP2C19 is the major (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase in humans. *Biochemistry* 1994; 33:1743-52.
3. Kupfer A, Preisig R. Pharmacogenetics of mephenytoin: a new drug hydroxylation polymorphism in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1984a; 26:753-9.
4. Jurima M, Inaba T, Kadar D, Kalow W. Genetic polymorphism of mephenytoin p (4')-hydroxylation: difference between Orientals and Caucasians. *Br J Clin Pharmacol* 1985; 19:483-7.
5. Ward SA, Goto F, Nakamura K, Jacqz E, Wilkinson GR, Branch RA. S-mephenytoin 4-hydroxylase is inherited as an autosomal-recessive trait in Japanese families. *Clin Pharmacol Ther* 1987; 42:96-9.
6. Sohn DR, Shin SG, Ishizaki T. S-mephenytoin pharmacogenetics and its clinical implications in Asian ethnic populations. *Asia Pacific J Pharmacol* 1994; 9:287-301.
7. Xie HG, Stein CM, Kim RB, Wilkinson GR, Flockhart DA, Wood AJ. Allelic , genotype and phenotypic distributions of S-mephenytoin 4'-hydroxylase (CYP2C19) in healthy Caucasian populations of European descent throughout the world. *Pharmacogenetics* 1999; 9:539-549.
8. Kaneko A, Bergqvist Y, Taleo G, Kobayakawa T, Ishizaki T, Bjorkman A. Proguanil disposition and toxicity in malaria patients from Vanuatu with high frequencies of CYP2C19 mutations. *Pharmacogenetics* 1999; 9:317-326.
9. de Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA.

- The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem* 1994; 269:15419-22.
10. 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. *Mol Pharmacol* 1994; 46:594-8.
 11. Ferguson RJ, De Morais SM, Benhamou S, Bouchardy C, et al. A new genetic defect in human CYP2C19: mutation of the initiation codon is responsible for poor metabolism of S-mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284:356-61.
 12. Ibeanu GC, Blaisdell J, Ghanayem BII, Beyeler C, et al. An additional defective allele, CYP2C19*5, contributes to the S-mephenytoin poor metabolizer phenotype in Caucasians. *Pharmacogenetics* 1998a; 8:129135.
 13. Ibeanu GC, Goldstein JA, Meyer U, Benhamou S, et al. Identification of new human CYP2C19 alleles (CYP2C19*6 and CYP2C19*2B) in a Caucasian poor metabolizer of mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 1998b; 286:1490-5.
 14. Ibeanu GC, Blaisdell J, Ferguson RJ, Ghanayem BI, et al. A novel transversion in the intron 5 donor splice junction of CYP2C19 and a sequence polymorphism in exon 3 contribute to the poor metabolizer phenotype for the anticonvulsant drug S-mephenytoin. *Pharmacol Exp Ther* 1999; 290:635-40.
 15. de Morais SM, Goldstein JA, Xie HG, Huang SL, et al. Genetic analysis of the S-mephenytoin polymorphism in a Chinese population. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 58:404-11.
 16. Brosen K, de Morais SM, Meyer UA, Goldstein JA. A multifamily study on the relationship between CYP2C19 genotype and S-mephenytoin oxidation phenotype. *Pharmacogenetics* 1995; 5:312-7.
 17. Goldstein JA, Ishizaki T, Chiba K, de Morais SM, et al. 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; 7:59-64.
 18. Xiao ZS, Goldstein JA, Xie HG, Blaisdell J, 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. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281:604.
 19. Meyer U, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:269-96.
 20. Andersson T. Pharmacokinetics, metabolism and interactions of acid pump inhibitors. Focus on omeprazole, lansoprazole and pantoprazole. *Clin Pharmacokinet* 1996; 31:9-28.
 21. Furata T, Kyoichi O, Kazuhiro K, Zhao XJ, et al. CYP2C19 genotype status effect of omeprazole on intragastric pH in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65:552-561.
 22. Furata T, Baba S, Takashima M, Futami H, et al. Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric juice pH. *Scand J Gastroentero* 1998; 33:357-363.
 23. Watkins WM, Chulay JD, Sixsmith DG, Spencer HC, Howells RE. A preliminary pharmacokinetic study of antimalarial drugs proguanil and chloroguanil. *J Pharm Pharmacol* 1987; 39:261-265.
 24. Wedlund PJ, Aslanian WS, McAllister CB, Wilkinson GR, Branch, RA. Mephenytoin hydroxylation deficiency in Caucasians: frequency of a new oxidative drug metabolising polymorphism. *Clin pharmacol Ther* 1984; 36:773-776.
 25. Setiabudy R, Chiba K, Kusuka M, Ishizaki T. Caution in the use of 100 mg of racemic mephenytoin for phenotyping Southeastern Oriental subjects. *Br J Clin Pharmacol* 1992; 33:665-6.
 26. Zhang Y, Blouin R, McNamara PJ, Steinmetz J, Wedlund PJ. Limitation to the use of the urinary S/R-mephenytoin ratio in pharmacogenetic studies. *Br J Clin Pharmacol* 1991; 31 : 353-355.
 27. Carrington HC, Crowther AF, Davey DG, Levi AA, Rose FL. A metabolite of 'Paludrine' with high antimalarial activity. *Nature* 1951; 168:1080.
 28. Ward SA, Watkins WM, Mberu E, Saunders JE, Koech DK, Gilles HM. Inter-subject variability in the metabolism of proguanil to the active metabolite cycloguanil in man. *Clin Pharmacol* 1989; 27:781-87.
 29. Ward SA, Helsby NA, Skjelbo E, Brosen K, Grain LF, Breckenridge AM. The activation of the biguanide antimalarial proguanil cosegregates with the mephenytoin oxidation polymorphism-

- panel study. *Br J Clin Pharmacol* 1991; 31:689-92.
30. Helsby NA, Ward SA, Howells RE, Breckenridge AM. *In vitro* metabolism of the biguanide antimalarials in human liver microsomes: evidence for a role of the mephenytoin hydroxylase (P450 MP) enzyme. *Br J Clin Pharmacol* 1990; 30:287-91.
31. Birkett DJ, Rees D, Andersson T, Gonzalez FJ, Miners JO, Veronese ME. *In vitro* proguanil activation to cycloguanil by human liver microsomes is mediated by CYP3A isoforms as well as by S-mephenytoin hydroxylase. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 37:413-420.
32. Watkins WM, Mberu EK, Nevill CG, Ward SA, Breckenridge AM, Koech DK. Variability in the metabolism of proguanil to the active metabolite cycloguanil in healthy Kenya adults. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1990; 84:492-3.
33. Andersson T, Regardh CG, Dahl Puustinen ML, Bertilsson L. Slow omeprazole metabolizers are also poor S-mephenytoin hydroxylators. *Ther Drug Monit* 1990; 12:415-6.
34. Sohn DR, Kobayashi K, Chiba K, Lee KH, Shin SG, Ishizaki T. Disposition kinetic and metabolism of omeprazole in extensive and poor metabolizers of S-Mephenytoin hydroxylation recruited from an Oriental population. *Pharmacol Exp Ther* 1992; 262:1195-1202.
35. Andersson T, Miners JO, Veronese ME, Tassaneeyakul W, et al. Meyer UA, Birkett DJ. Identification of human liver cytochrome P450 isoform mediating omeprazole metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 1993; 36:521-530.
36. Andersson T, Miners JO, Veronese ME, Birkett DJ. Identification of human liver cytochrome P450 isoforms mediating secondary omeprazole metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 37:597-604.
37. Balian JD, Sukhova N, Harris JW, Hewett J, et al. The hydroxylation of omeprazole correlates with S-mephenytoin metabolism: a population study. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 57:662-9.
38. Chang M, Dahl ML, Tybring G, Gotharson E, Bertilsson L. Use of omeprazole as a probe drug for CYP2C19 phenotype in Swedish Caucasians: comparison with S-mephenytoin hydroxylation phenotype and CYP2C19 genotype. *Pharmacogenetics* 1995; 5:358-63.
39. Golestein JA, Blaisdell J. Genetic tests which identify the principal defects in CYP2C19 responsible for the polymorphism in mephenytoin metabolism. *Methods Enzymol* 1996; 272:210-8.
40. Edstein MD, Shanks GD, Teja-Isavadharm P, Rieckmann KH, Wedster HK. Oxidative activation of proguanil and dapsone acetylation in Thai soldiers. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 37:67-70.
41. Kaneko A, Kaneko O, Taleo G, Bjorkman A, Dobayakawa T. High frequencies of CYP2C19 mutations and poor metabolism of proguanil in Vanuatu (letter). *Lancet* 1997; 349:921-2.