

التحري عن التغير G>A1846 من المورثة CYP2D6 لدى عينة منتقاة عشوائياً من المجتمع السوري

مؤمنة محمود مطر^{1*}، غالية محي الدين أبو الشامات²

*1 طالبة ماجستير، كلية العلوم، جامعة دمشق، الوراثة الجزيئية. moamena21.matar@damascusuniversity.edu.sy

² أستاذ مساعد في قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، الوراثة الجزيئية.

prof.ghalia14@damascusuniversity.edu.sy

الملخص:

خلفية البحث وأهدافه: تختلف استجابة الأفراد للأدوية نتيجة عدد من العوامل أهمها اختلاف الذخيرة الوراثة بينهم، الأمر الذي يبرز أهمية الطب الشخصي بناءً على الاختلافات الجينية. تؤدي أنزيمات السيتوكروم دوراً جوهرياً في عملية استقلاب الأدوية، يؤدي أنزيم CYP2D6 دوراً مهماً في هذه العملية إذ يعد مسؤولاً عن استقلاب 20% من الأدوية شائعة الاستخدام، ومسؤولاً عن التنشيط الحيوي لعدد من الأدوية الأولية وتحويلها إلى الشكل الفعال مثل تحويل الكودئين إلى المورفين داخل الجسم والذي يعمل على تسكين الألم. وتؤدي بعض التغيرات الوراثة في مورثة CYP2D6 إلى تعديل نشاط الأنزيم زيادة أو نقصان مما يفضي إلى عدم تحقيق الهدف العلاجي وظهور الأعراض الجانبية والتعرض لخطر السمية. هدف بحثنا هذا إلى التقصي عن تواتر التغير G>A 1846 المحدد للنمط الفردي 4* CYP2D6 غير الوظيفي في المورثة CYP2D6 لدى عينة منتقاة عشوائياً من المجتمع السوري.

المواد والطرق: شارك في الدراسة 50 فرداً من السوريين وتم الكشف عن التغير G>A 1846 باستخدام تقانة-PCR RFIP.

النتائج: أظهرت النتائج وجود الأنماط الوراثة AA, GA, GG بنسبة 48%، 48%، 4% على الترتيب، وبلغت نسبة تواتر الأليل G 72% والأليل A 28% كما بينت الدراسة الإحصائية أن الأليل A يعزز من ظهور الأعراض الجانبية. **الاستنتاج:** يعد تحديد التركيب الوراثي للأفراد عملية مهمة جداً إذ أنها تساعد العاملين في مجال الرعاية الصحية على انتقاء البرتوكول العلاجي المناسب لكل فرد، وقد أظهرت دراستنا وجود تكرار ملحوظ للتغير G>A 1846 ضمن العينة المدروسة الأمر الذي يعزز من ضرورة التقصي عن مزيد من التغيرات الوراثة ضمن المورثة CYP2D6 ومورثات السيتوكروم الأخرى شديدة الصلة باستقلاب الأدوية.

الكلمات المفتاحية: استقلاب الدواء - التغيرات الوراثة - CYP2D6 - النمط الفردي.

Investigation of the 1846G>A variation of CYP2D6 gene in a Randomly Selected Sample of Syrian population

Moamena Mahmoud Matar ^{1*}, Ghalia mohy daine Abuo Al chamat ²

1 MSc student in Molecular Genetics, Department of Animal Biology, Faculty of Science, University 38 of Damascus . moamena21.matar@damascusuniversity.edu.sy

2PhD in Molecular Genetics, Assistant Professor in the Department of Animal Biology, Faculty of Science, Damascus University. prof.ghalia14@damascusuniversity.edu.sy

Abstract:

Background and aim: Individuals' response to drugs varies as a result of a number of factors, differences in genetic makeup is considered as the most important one. This highlights the importance of personalized medicine based on genetic variations. Cytochrome enzymes play an essential role in drug metabolism and the CYP2D6 enzyme is plays pivotal role in this process. It is responsible for metabolizing 20% of commonly used drugs, and is responsible for bioactive activation of a number of primary drugs and converting them to an effective form such as converting codeine to morphine inside the body that relieves pain. Some genetic variations in the CYP2D6 gene modify the enzyme's activity leading to not achieving the therapeutic target , appearance of side effects and toxicity . Our research aims to investigate the frequency of the 1846G > A variation specific to the non-functional CYP2D6 * 4 in a randomly selected sample of Syrian society

Materials and methods: 50 Syrians participants were recruited in the study and the 1846G > A variation was detected using PCR-RFIP method.

Results: the presence of AA, GA, GG genotypes were 4%, 48% and 48%, respectively, and the frequency of allele G was 72% and allele A was 28%. The statistical study showed that allele A enhances the appearance of side effects among participants.

Conclusion: Determining the genetic composition of individuals is a very important process as it helps health care workers select the appropriate therapeutic protocol for each individual. Our study has shown a marked frequency of the 1846G > A variation in the sample studied. This reinforces the need to investigate further genetic changes within the CYP2D6 and other cytochrome genes that are highly relevant to drug metabolism.

Keywords: Drug Metabolism - Genetic Variations – CYP2D6 – Haplotype.



المقدمة (Introduction):

ينتج التباين الملحوظ بين المرضى في الاستجابة للأدوية إلى حد كبير، عن الاختلافات المحددة وراثياً في استقلاب الدواء drug metabolism، ونقله في الجسم drug transport، وشكل مستقبله drug receptor. فقد تؤثر الاختلافات الوراثية في أنزيمات استقلاب الأدوية والبروتينات الناقلة لها على التخلص من العقاقير في الجسم أو في زيادة سميتها. [1]

تقوم أنزيمات السيتوكروم باستقلاب ثلاثة أرباع الأدوية التي يتناولها البشر [2]. ومن أبرزها أنزيم CYP2D6 الذي يتوضع على الشبكة السيتوبلاسمية الداخلية للمساء، والغشاء الداخلي للميتوكوندريا، يستقلب الأنزيم قرابة 20% من الأدوية المستخدمة في علاج الحالات النفسية من مثل مضادات الاكتئاب (الباراكستين- مضادات الاكتئاب ثلاثية الحلقات) - تدبير الألم والمسكنات (الكودئين - الترامدول) - الأورام (كالتاموكسفين) - وكذلك في أمراض القلب. [3, 4]

تتوضع المورثة CYP2D6 على الذراع الطويلة للصبغي 22 (22q13.2)، وتتألف من تسعة إكسونات. أظهرت الدراسات بأن للمورثة تعددات شكلية وحيدة النكليوتيد كثيرة single nucleotide polymorphisms (SNPs)، وتغيرات هيكلية أكبر تتضمن التضاعف، الحذف، الترتيب الترادفي، وغيرها من التغيرات الوراثية الأمر الذي يؤدي دوراً مهماً في التنوع الوظيفي الملاحظ لدى الأفراد. [5]

إذ تبين بأن تلك التغيرات الوراثية تعد عوامل مهمة لأنها تبين المجال الواسع للنشاط الأنزيمي فيما يتعلق بالأنزيمات المستقبلة للدواء والذي من الممكن أن يختلف بين الأعراق وضمن المجتمع السكاني نفسه. [6]

وفقاً لدرجة نشاط الأنزيم يتم تعيين النمط الظاهري للفرد، فيكون من النمط المستقلب الفقير (PM) poor metabolizer عندما يحمل نسختين غير وظيفيتين من الأنزيم وبالتالي يكون نشاط الانزيم يساوي 0 ، ويكون الفرد من النمط المستقلب المتوسط

(IM) intermediate metabolizer عندما يحمل نسختين إحداهما وظيفية والأخرى غير وظيفية وتكون درجة نشاط الأنزيم ضمن المجال 1- 0.25 ، أما المستقلب السوي normal metabolizer (NM) فيكون الفرد فيها حاملاً نسختين وظيفيتين أو نسخة وظيفية واحدة و الأخرى منقوصة الوظيفة وفي هذه الحالة تكون درجة نشاط الأنزيم ضمن المجال 1.25-2.25، وفي المستقلب الفائق (UM) ultra-rapid metabolizer يمتلك الفرد تكراراً من إحدى النسخ الوظيفية على الأقل ، وتكون درجة نشاط الأنزيم أكثر من 2.25. [7-9]

على سبيل المثال يستقلب أنزيم CYP2D6 الكودئين داخل الجسم إلى الشكل الأكثر فعالية المورفين ويتميز المورفين بألفة تجاه مستقبلات Mu-opioid أعلى 200 مرة من الكودئين. [10] في حالة استقلاب CYP2D6 المنخفض أو المتوسط إن المرضى لا يحولون بشكل كاف الكودئين إلى الشكل الفعال بسبب التغيرات الوراثية مما يزيد من خطر عدم تسكين الألم لدى هؤلاء المرضى عند تلقيهم المسكنات الأفيونية [11]. في المقابل، يؤدي تكرار الجينات لدى (UMs) إلى ارتفاع تركيزات المورفين في البلازما. [12] مما قد يؤدي إلى الإفراط في التخدير والاكتئاب التنفسي وحتى الوفاة بين الأطفال، هذا هو السبب في أن إدارة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA) منعت استخدام الكودئين لعلاج الألم والسعال لدى المرضى الذين تقل أعمارهم عن 12 عاماً. [13]

وبشكل عام بينت الدراسات أن التعرض لخطر الآثار الضارة كان الأعلى لدى المستقلب الفقير. [14] تصنف التغيرات الوراثية التي تؤثر على فاعلية الأنزيم CYP2D6 إلى أليلات ذات نمط فرداني (haplotype) إذ يرمز للأليل 1* بالنمط السوي وتكون الأليلات 2*، 27*، 33* ذات فاعلية أنزيمية سوية أيضاً، بينما تكون الأليلات 10*، 17*، 41*، 49* ذات انخفاض بالفاعلية الأنزيمية، أما الأليلات 3*، 4*، 5*، 6*، 36* فهي غير وظيفية. [15]

(Malaysia ;vivantis) بعد ذلك قيست تراكيز العينات باستخدام جهاز المطيافية الضوئية النانوي Nano Photometer من طراز P- Class® (USP P – 360 – Germany).

ثالثاً: تصميم البادئات:

تم تحديد الشدفة المراد تضخيمها المحيطة بالتغير 1846G>A بواسطة قاعدة البيانات NCBI ومن ثم تم تصميم زوج من البادئات بواسطة Primer Blast مع مراعاة القواعد الأساسية في تصميم البادئات، واستخدمت قواعد البيانات UCSC والأوتوات التالية Amplifx – Eurofins لضمان جودة التضخيم.

رابعاً: الكشف عن التغير 1846G>A باستخدام تقنية PCR-RFLP

تم إجراء تفاعل PCR باستخدام البادئات المصممة وفق ما ذكر أعلاه وكان تسلسلها كالآتي:

Forward 'TGAGCTAGGTCCAGCAGCCTGA 3
Reverse 5'CAACCACTCCGGTGGGTGAT3'

والتي تضخم شدة بطول 223bp تحوي التغير 1846G>A ، كان حجم التفاعل النهائي 25µl متضمناً المواد التالية:

2µl من البادئات بتركيز (10 µM) لكل بادئة و 80 ng من DNA الجينومي، 10µl ماء مقطر، 12.5µl من PCR mix (Gene Direx).

أجري تفاعل تضخيم PCR باستخدام جهاز المداور الحراري Thermal Cycler (Eppendorf Mastercycler) من طراز (Eppendorf AG – 22331Hamburg – Germany)

وباتباع برنامج التضخيم الآتي: مرحلة فك التشافع البدئي بدرجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة خمس دقائق تليها 30 دورة تتضمن (95 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، 62.5 درجة مئوية لمدة 45 ثانية، 72 درجة مئوية لمدة 30 ثانية) ثم مرحلة استظالة نهائية بدرجة حرارة 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، متبوعة بفترة حفظ عند درجة حرارة 4 درجة مئوية. تمت عملية تمييط العينات المدروسة باستخدام الأنزيم BstNI،

وفقاً لاتحاد تنفيذ علم الدوائي الوراثي السريري Clinical pharmacogenetics implementation consortium, CPIC فإن الأليل 4*CYP2D6 ينتج عن عدد من التغيرات الجينية على طول المورثة نذكر منها rs1065852, rs28371703, rs28371704, rs3892097, rs16947, rs1058172, rs1135833, rs1135835, rs28371735, rs766507177, rs74478221, rs75467367, rs1135840 تعمل كل من هذه التغيرات الجينية على تبديل أحد الحموض الامينية في الأنزيم الناتج أو إزاحة موقع التضفير مؤدية بذلك إلى إنتاج بروتين غير وظيفي. [16]

لتحديد الأليل 4*CYP2D6 يتم اعتماد التغير 1846G>A المعروف في قواعد البيانات بالرقم المرجعي rs3892097 فقط بين التغيرات الفرعية 28 الأخرى التي تم التعريف عنها حتى الآن. [17] هدفت هذه الدراسة إلى الكشف عن نسبة تكرار التغير 1846G>A لدى عينة منتقاة عشوائياً من المجتمع السوري وبالتالي تحديد تكرار الأليل غير الوظيفي 4*CYP2D6.

المواد والطرق (Materials and Methods):

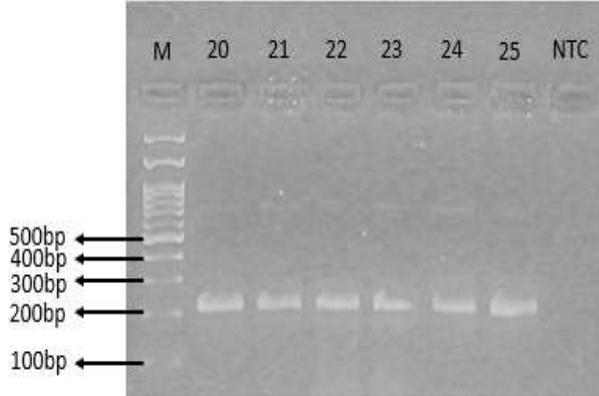
أولاً: مجموعة الدراسة:

جمعت 50 عينة دم من أفراد من المجتمع السوري في الفترة الممتدة من تشرين الأول لعام 2021 حتى أيار عام 2022 وذلك بعد الحصول على موافقتهم، وحفظت العينات مباشرة في درجة حرارة - 20 لحين الاستخدام. ملئت استمارة خاصة بكل فرد تضمنت معلومات عامة: العمر والجنس ومعلومات عن نوع المسكن والجرعة ومعدل الاستخدام والأعراض الجانبية الناجمة عن استخدامه. أجريت الدراسة في مخبر البحوث والدراسات العليا (2)، قسم البيولوجيا، كلية العلوم، جامعة دمشق.

ثانياً: استخلاص الحمض النووي:

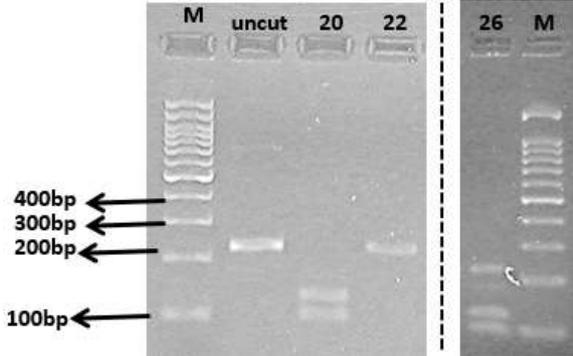
عُزل الـ DNA الجينومي (gDNA) لجميع العينات المأخوذة من الأفراد وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة باستخدام طاقم جاهز (GF-1 Blood DNA extraction kit) من شركة

حصلنا على الطول المتوقع 223bp لجميع العينات المدروسة
الشكل (1)



الشكل رقم (1): نتيجة الرحلان الكهربائي لنواتج PCR على هلامه
أغاروز 2% وظهور الطول المتوقع 223bp.

يتعرف الأنزيم BstNI الأليل الطبيعي (WT) Wild-type
ويقطع الشدفة 223 إلى (100\123) ولا يقطع في حال وجود
SNP. بينت نتائج التتميط الجيني وجود الأنماط الجينية GG,
GA, AA وبلغت نسبة تواتر هذه الأنماط (4%) و(48%)
و(72%) على التوالي، وكانت نسبة تواتر الأليل G (28%)
ونسبة تواتر الأليل A (28%).



الشكل رقم (2): نتيجة الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل RFLP بعد
عملية الهضم الأنزيمي باستخدام أنزيم BstNI الذي يحدد ويقطع النمط
(WT\WT) العينة 20 ولا يقطع في النمط (SNP \ SNP) العينة
(22) ويكون الفرد متخالف الألائل كما في العينة (26) (WT\SNP).

أبدى تواتر الأنماط الجينية توافقاً مع معادلة هاردي-وينبرغ
Hardy-weinberg Equilibrium (HWE) إذ بلغت قيمة =

إذ أشار موقع شركة Biolabs باستخدام NEBcutterTM v3.0

إلى وجود موقع تعرف طبيعي للأنزيم BstNI
(Thermo scientific, 2000u, ER0551) الذي يتعرف
الموقع $5' \dots \text{CC}\nabla\text{WGG} \dots 3'$ حيث يرمز W لأحد الأليلين A\T.
ومن خلال حضن ناتج التضخيم مع أنزيم BstNI يمكن تحديد
النمط الوراثي لكل فرد من أفراد عينة الدراسة.

تم اجراء تفاعل القطع الأنزيمي وكان الحجم النهائي 21µl
متضمناً المواد الآتية:

10µl من منتج PCR، 2µl من (BstNI) enzyme buffer،
1µl من (BstNI) enzyme، 18µl ماء مقطر. تم حضن
التفاعل على درجة حرارة 37° مئوية لمدة ساعة، أخيراً تم
إيقاف التفاعل الأنزيمي بإضافة 1.3µl من محلول EDTA ذي
التركيز 0.5 M، pH= 8.

خامساً: الدراسة الإحصائية:

استخدم اختبار Chi-square (X2) لتحديد الانحراف في تواتر
الأنماط الجينية عن معادلة هاردي-وينبرغ في العينة، وبرنامج
MedCalc لحساب نسبة الأرجحية Odds ratio, OR والقيمة
الاحتمالية p value.

النتائج:

بلغت نسبة الذكور المشاركين في الدراسة 32% والإناث
68%، تراوحت أعمارهم بين (21-61)، وكان متوسط أعمارهم
29 عاماً والانحراف المعياري 7.47.

أظهرت نتائج المعلومات المأخوذة عن الاستمارة أن 36% من
الأفراد يعتمدون على الكودئين كمسكن وكانت دواعي الاستخدام
هي الصداع بالمرتبة الأولى ومن ثم آلام المفاصل والعظام
بالمرتبة الثانية تلاها آلام الدورة الشهرية في المرتبة الثالثة.

بينت النتائج أن (61%) يستخدمون الكودئين بمعدل مرة في الشهر
و(22%) يستخدمونه من 2-3 مرة في الأسبوع و(11%) يومياً.
بينت نتائج تضخيم الشدفة الحاوية على التغير G>A1846

فعلى سبيل المثال في دراسة أجريت في تركيا أفادت أن تواتر الأليل CYP2D6*4 كان منخفض نسبياً 0.21% لدى عينة من الأتراك الاصحاء، وفي دراسة أخرى أجريت على مرضى السرطان بلغت نسبة الأليل 13.9%. [22, 23]

في دراسة أجريت على عينة من الأصحاء في الأردن بلغت نسبة الأليل CYP2D6*4 12.8%، وكانت الأفراد متخالفة الألائل GA بنسبة 20.3% بينما الأفراد متماثلة الألائل AA 2.6% وهي نسبة تقارب النتائج في دراستنا. [24] بينما بلغت نسبة الأليل CYP2D6*4 لدى مرضى متلازمة الشريان التاجي العراقيين 6.8% نسبة الأفراد متماثلة الأليل AA 2.8% وهي أيضاً تتفق مع دراستنا حيث كانت نسبة الأفراد متماثلة الألائل AA 4%. [25]

من جانب آخر، بينت الدراسات أن هناك عدد من الأعراض الجانبية المرافقة لاستخدام الكودئين لاسيما الأعراض الهضمية [26]. وهذا ما يتفق مع دراستنا إذ أوضحت الدراسة الإحصائية إلى أن وجود الأليل A في حالة تخالف الألائل (GA) كان قد زاد من احتمال التعرض لأعراض جانبية بنسبة ثلاث أضعاف وبنسبة أحد عشر ضعفاً في حال وجود الأليل A في حالة تماثل الألائل AA.

ختاماً، تعد هذه الدراسة من الدراسات القليلة في سورية التي ساهمت في وضع بيانات حول مورثة CYP2D6 والتي تلعب دوراً هاماً في عملية استقلاب الأدوية.

الاستنتاجات:

إن تحديد التركيب الوراثي للأفراد هو أمر مهم ويساعد العاملين في مجال الرعاية الصحية على انتقاء البروتوكول العلاجي المناسب لكل فرد، ويجب إجراء المزيد من الدراسات للتقصي عن المزيد من التغيرات في مورثة CYP2D6 وغيرها من المورثات ذات الصلة باستقلاب الأدوية.

P 0.178 ، (إذا تعد القيم أقل من 0.05 غير متوافقة مع معادلة هاردي- وينبرغ) و أظهرت دراسة العلاقة بين النمط الجيني للأفراد المتلقين للكودئين والبالغ عددهم 18 (32%) وظهرت أعراض جانبية أن وجود الأليل A في حالة (GA) تزيد من احتمال ظهور أعراض جانبية بنسبة تزيد عن ثلاث أضعاف $OR=3.35$. أما وجود الأليل A في حالة (AA) تزيد من احتمال ظهور أعراض جانبية بنسبة أحد عشر ضعف تقريباً $OR=11.66$.

المناقشة:

أظهرت الدراسات أن الأشخاص الذين يعانون من بطء استقلاب الكودئين قد لا يتم لديهم تسكين الألم بشكل كافي أو مطلقاً. [18] و أن المرضى الذين لديهم الأنزيم CYP2D6 بالشكل غير الفعال (المستقلب الفقير PM) سيعانون من ظهور الأعراض الجانبية لأن الدواء لا يُستقلب أو لا يتم استقلابه بطريقة كاملة، و سيفشل العلاج لدى هؤلاء المرضى الذين يعانون من النمط الظاهري (PM) إذا كان الدواء يعتمد على CYP2D6 للتنشيط الحيوي. [19]

وفقاً لـ Pharmavar فإن الأليل CYP2D6*4 يحوي عدداً من الأليلات الفرعية نذكر منها (P34S- L91M- H94R) التي تعمل على استبدال حمض أميني بآخر والتغير G>A 1846 الذي يعمل على إزاحة موقع التضفير [15, 20].

في دراسة أجراها سنجر وزملاؤه بهدف التحري عن تأثير التغيرات الوراثية في الأليل CYP2D6*4 بينت أن التغير G>A 1846 يعمل على إزاحة موقع التضفير بمقدار 36 نكليوتيد مؤدياً بذلك إلى فقدان 12 حمضاً أمينياً في بداية الإكزون الرابع. [21]

أظهرت الدراسات أن تواتر CYP2D6*4 يختلف باختلاف الأعراق ضمن المجتمع الواحد أو التباين في اختيار العينة

معلومات التمويل: هذا البحث ممول من قبل جامعة دمشق وفق رقم الممول 501100020595.

References:

1. Pratt VM, Everts RE, Aggarwal P, Beyer BN, Broeckel U, Epstein-Baak R, Hujsak P, Kornreich R, Liao J, Lorier R, Scott SA. Characterization of 137 genomic DNA reference materials for 28 pharmacogenetic genes: a GeT-RM collaborative project. *The Journal of molecular diagnostics*. 2016 Jan 1;18(1):109-23.
2. Waring RH. Cytochrome P450: genotype to phenotype. *Xenobiotica*. 2020 Jan 2;50(1):9-18.
3. Cook Sangar M, Anandatheerthavarada HK, Tang W, Prabu SK, Martin MV, Dostalek M, Guengerich FP, Avadhani NG. Human liver mitochondrial cytochrome P450 2D6—individual variations and implications in drug metabolism. *The FEBS journal*. 2009 Jul;276(13):3440-53.
4. Taylor C, Crosby I, Yip V, Maguire P, Pirmohamed M, Turner RM. A Review of the Important Role of CYP2D6 in Pharmacogenomics. *Genes*. 2020 Oct 30;11(11):1295.
5. Maulana Y, Toro Jimenez R, Twesigomwe D, Sani L, Irwanto A, Bertin N, Gonzalez-Porta M. The variation landscape of CYP2D6 in a multi-ethnic Asian population. *Scientific Reports*. 2024 Jul 20;14(1):16725
6. LLerena A, Naranjo ME, Rodrigues-Soares F, Penas-LLedó EM, Fariñas H, Tarazona-Santos E. Interethnic variability of CYP2D6 alleles and of predicted and measured metabolic phenotypes across world populations. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2014 Nov 1;10(11):1569-83
7. Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Leeder JS. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genetics in Medicine*. 2017 Jan;19(1):69-76.
8. Nahid NA, Johnson JA. CYP2D6 pharmacogenetics and phenoconversion in personalized medicine. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2022 Nov 2;18(11):769-85.
9. Dean L, Kane M. Codeine therapy and CYP2D6 genotype.
10. Thorn CF, Klein TE, Altman RB. Codeine and morphine pathway. *Pharmacogenetics and genomics*. 2009 Jul 1;19(7):556-8.
11. Reizine N, Danahey K, Schierer E, Liu P, Middlestadt M, Ludwig J, Truong TM, Wijk XM, Yeo KT, Malec M, Ratain MJ. Impact of CYP2D6 pharmacogenomic status on pain control among opioid-treated oncology patients. *The oncologist*. 2021 Nov 1;26(11):e2042-52.
12. He YJ, Brockmöller J, Schmidt H, Roots I, Kirchheiner J. CYP2D6 ultrarapid metabolism and morphine/codeine ratios in blood: was it codeine or heroin?. *Journal of analytical toxicology*. 2008 Mar 1;32(2):178-82.
13. Kuehn BM. FDA: No codeine after tonsillectomy for children. *Jama*. 2013 Mar 20;309(11):1100-.
14. Rau T, Wohlleben G, Wuttke H, Thuerauf N, Lunkenheimer J, Lanczik M, Eschenhagen T. CYP2D6 genotype: impact on adverse effects and nonresponse during treatment with antidepressants—a pilot study. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2004 May;75(5):386-93.
15. (PharmVar, <https://www.pharmvar.org/gene/cyp2d6>).
16. <https://cpicpgx.org/guidelines/>
17. Nofziger C, Turner AJ, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Agúndez JA, Black JL, Dunnenberger HM, Ruano G, Kennedy MA, Phillips MS, Hachad H. PharmVar genefocus: CYP2D6. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2020 Jan;107(1):154-70. *therapeutics*, 107(1), 154–170.
18. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *The pharmacogenomics journal*. 2005 Feb;5(1):6-13.
19. Weinshilboum R. (2003). Inheritance and drug response. *The New England journal of medicine*, 348(6), 529–537.
20. Gough AC, Miles JS, Spurr NK, Moss JE, Gaedigk A, Eichelbaum M, Wolf CR. Identification of the primary gene defect at the cytochrome P 450 CYP2D locus. *Nature*. 1990 Oct 25;347(6295):773-6.

- 21.Sangar MC, Anandatheerthavarada HK, Martin MV, Guengerich FP, Avadhani NG. Identification of genetic variants of human cytochrome P450 2D6 with impaired mitochondrial targeting. *Molecular genetics and metabolism*. 2010 Jan 1;99(1):90-7.
- 22.Köseler A, İlçöl YÖ, Ulus İ. Frequency of mutated allele CYP2D6* 4 in the Turkish population.
- 23.Aydin M, Hatirnaz O, Erensoy N, Ozbek U. CYP2D6 and CYP1A1 mutations in the Turkish population. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*. 2005 Mar;23(2):133-5.
- 24.Zihlif M, Imraish A, Irshaid YM. Frequency of certain single-nucleotide polymorphisms and duplication of CYP2D6 in the Jordanian population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2012 Oct 1;16(10):1201-5.
- 25.Swadi AA, Mohammad BI, Hadi NR, Al-Aubaidy HA. Correlation of CYP2D6 allelic polymorphism to outcome of acute coronary syndrome in mid-Euphrates Iraqi patients on metoprolol therapy. *Gene*. 2019 Jun 30;703:112-9.
- 26.Edinoff AN, Kaplan LA, Khan S, Petersen M, Sauce E, Causey CD, Cornett EM, Imani F, Moghadam OM, Kaye AM, Kaye AD. Full opioid agonists and tramadol: pharmacological and clinical considerations. *Anesthesiology and Pain Medicine*. 2021 Aug;11(4).