

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra farmakologie a toxikologie**

**Vliv genetických faktorů na farmakokinetiku léků**

The effect of genetic factors on the pharmacokinetics of drugs

**Bc. Petra Šlosárková**

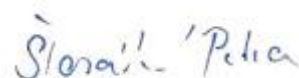
(diplomová práce)

**HRADEC KRÁLOVÉ 2009**

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové dne 20. dubna 2009



.....  
Bc. Petra Šlosárková

## **Poděkování**

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucímu diplomové práce panu doc. PharmDr. Františku Štaudovi, PhD. za jeho zájem, připomínky a čas, které mě a mé práci věnoval.

Realizace diplomové práce byla uskutečněna pod odborným vedením pana MUDr. Josefa Klímy, CSc. jednatele a odborného zástupce společnosti Pharmakl spol. s r.o. jako součást vědecko-výzkumného projektu společnosti, který řeší problematiku aplikace klinické farmakologie a farmakogenetiky pro potřeby lékařské praxe. Mé poděkování patří všem, kteří mi při vzniku této práce pomáhali, zejména panu MUDr. Josefu Klímovi, CSc. a mým spolupracovníkům panu RNDr. Janu Mackovi, CSc. a panu RNDr. Pavlu Ptáčkovi, CSc. Za odbornou konzultaci a připomínky děkuji také panu prof. MUDr. Karlovi Maškovi, DrSc.

Dále děkuji vedení společnosti Genomac International, s.r.o., paní RNDr. Lucii Benešové, PhD. a panu RNDr. Markovi Minárikovi, PhD., a jejich pracovníkům za získání praktických znalostí v oboru molekulární genetiky a laboratorní zajištění mého genetického testování.

Zvláštní poděkování patří panu MUDr. Josefu Klímovi, CSc., jedinečnému a vzácnému člověku, který mi poskytoval dokonalé zázemí a ekonomické zajištění nejen při tvorbě této diplomové práce, ale v průběhu celého mého studia na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Děkuji mu za námět na diplomovou práci, odborné konzultace i dlouholeté zkušenosti a rady, kterými mi vždy ochotně a trpělivě pomáhal.

Za trvalou a laskavou podporu bych ráda poděkovala také celé své rodině.

## **Abstract**

*The interindividual differences of activity of biotransformation enzymes play an important role in drug's pharmacokinetics; they are significantly influenced both by external factors (such as age, gender, weight, diet) and genetic disposition. The presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and mutations at a genes coding drug-metabolising enzymes can cause a major change of the metabolism and drug effects. In this study was evaluated an influence of enzyme CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetic parameters of Nurofen forte containing racemic mixture of ibuprofen in 20 healthy Czech volunteers (men, Caucasian population, age 21-40 years). The presence of the CYP2C9\*1/\*1 genotype was found in 17 individuals, the CYP2C9\*1/\*2 genotype in 2 individuals and the CYP2C9\*3/\*3 genotype in 1 individual. No statistically significant difference of pharmacokinetic parameters was observed between CYP2C9\*1/\*1 and CYP2C9\*1/\*2 genotypes.  $AUC_{(0-inf)}$  and  $t_{1/2}$  were higher by 113% and 90%, respectively and clearance was lower by 54% in subject with CYP2C9\*3/\*3 genotype compared to subjects CYP2C9\*1/\*1 and CYP2C9\*1/\*2. The individuals with CYP2C9\*3/\*3 genotype have increased risk of adverse drug reaction (ulceration, gastroduodenal bleeding) after long time nonsteroidal anti-inflammatory drugs use. The standard dosage of NSAID should be lowered to the half of recommended daily dose with CYP2C9\*3/\*3 genotype .*

## **Abstrakt**

*Interindividuální rozdíly v aktivitě biotransformačních enzymů hrají důležitou roli ve farmakokinetice léků. Kromě zevních faktorů (věk, pohlaví, hmotnost, výživa) se zde významně uplatňují genetické dispozice. Přítomnost jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) a mutací v genech kódujících biotransformační enzymy může vést k výrazné změně metabolismu i účinku léků. V této práci byl hodnocen vliv polymorfismu enzymu CYP2C9 na farmakokinetické parametry přípravku Nurofen forte obsahujícího racemickou směs ibuprofenu u 20 zdravých dobrovolníků (muži, česká národnost, kavkazská populace). Ve skupině bylo identifikováno celkem 17 nosičů genotypu CYP2C9\*1/\*1, 2 nosiči genotypu CYP2C9\*1/\*2 a 1 nosič genotypu CYP2C9\*3/\*3. Bylo zjištěno, že hodnoty farmakokinetických parametrů u nosičů genotypu CYP2C9\*1/\*2 nevykazují žádné statisticky významné odchylky oproti genotypu CYP2C9\*1/\*1. U nosičů genotypu CYP2C9\*3/\*3 byla hodnota  $AUC_{(0-\infty)}$  vyšší o 113%, hodnota  $t_{1/2}$  o 90% a hodnota clearance o 54% nižší oproti průměrným hodnotám nosičů genotypu CYP2C9\*1/\*1. V důsledku významných změn ve farmakokinetických parametrech mohou být nosiči genotypu CYP2C9\*3/\*3 vystaveni při dlouhodobém užívání nesteroidních protizánětlivých látek vyššímu riziku rozvoje nežádoucích účinků léčby (ulcerace a gastroduodenální krvácení). Standardní dávkování NSAID by u těchto osob mělo být sníženo až na polovinu doporučené denní dávky.*

## ZKRATKY

AUC <sub>(0-inf)</sub>	plocha pod křivkou od 0 do $\infty$
C <sub>max</sub>	maximální koncentrace
Cl	clearance
COX	cyklooxygenáza
CYP	cytochrom P450
ČR	Česká republika
DDD	doporučená denní dávka
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GF	růstový faktor
GIT	gastrointestinální trakt
GLP	správná laboratorní praxe
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IL-1	interleukin 1
IL-4	interleukin 4
NSAID, NSA	nesteroidní protizánětlivé látky
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCR	polymerázová řetězová reakce
PGD <sub>2</sub>	prostaglandin D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	prostaglandin I <sub>2</sub> (prostacyklin)
PGF <sub>2</sub>	prostaglandin F <sub>2</sub>
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
SNPs	jednonukleotidové polymorfismy
SOP	standardní operační postup
t <sub>1/2</sub>	poločas eliminace
t <sub>max</sub>	čas potřebný k dosažení maximální koncentrace
TBE	Tris borát EDTA
THC	9-tetrahydrocannabinol
TNF	tumor nekrotizující faktor
Tris-HCl	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
TXA <sub>2</sub>	tromboxan A <sub>2</sub>
USA	Spojené státy americké
wt	wilde type

## OBSAH

1. ÚVOD .....	9
2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	12
3. LITERÁRNÍ ČÁST .....	13
3.1 Ibuprofen .....	13
3.1.1 Chemická struktura a vlastnosti .....	14
3.1.2 Mechanismus účinku.....	15
3.1.3 Farmakokinetické vlastnosti .....	17
3.1.4 Metabolismus .....	17
3.1.5 Dávkování a nežádoucí účinky.....	18
3.2 Cytochromy P450.....	19
3.2.1 Názvosloví.....	19
3.2.2 Vznik a vývoj .....	20
3.2.3 Lokalizace .....	21
3.2.4 Substráty .....	22
3.2.5 Katalytické funkce .....	23
3.2.6 CYP2C9 .....	24
3.3 Metody genetické analýzy .....	27
3.3.1 Izolace DNA .....	27
3.3.2 Měření koncentrace a čistoty DNA.....	28
3.3.3 Polymerázová řetězová reakce .....	28
3.3.4 Analýza mutací a SNPs.....	30
3.3.5 Elektroforetické metody a detekce .....	31
3.3.6 Sekvenování .....	34
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
4.1 Charakteristika subjektů .....	36
4.2 Farmakokinetická studie.....	37
4.2.1 Klinická část .....	37
4.2.2 Laboratorní část .....	37
4.3 Genetická analýza.....	38

4.3.1	Biologický materiál .....	38
4.3.2	Chemikálie, kity a enzymy .....	38
4.3.3	Oligonukleotidy .....	38
4.3.4	Přístrojové vybavení .....	39
4.3.5	Počítačové programy .....	40
4.3.6	Laboratorní pomůcky .....	40
4.3.7	Spotřební materiál .....	40
4.3.8	Pracovní postup .....	40
4.3.9	Statistické hodnocení .....	44
4.4	Výsledky .....	47
4.4.1	Genetická analýza .....	47
4.4.2	Statistické testování .....	48
4.5	Diskuze .....	50
5.	ZÁVĚR .....	54
6.	LITERATURA .....	56



# 1. ÚVOD

Moderní medicína se v současné době stále častěji zabývá otázkou individualizace lékové terapie. Hlavními důvody jsou vedlejší účinky, toxicita, lékové interakce a nedostatečná nebo zcela chybějící účinnost indikovaných léků. Nežádoucí reakce se vyskytují u cca 1-30% léčených osob a u zhruba 3-7% z nich je zapotřebí hospitalizace.<sup>[1]</sup> Při standardní farmakologické léčbě hrozí některým pacientům vážné poškození zdraví, které může být až příčinou smrti. Na základě poznatků poslední doby byl zahájen nejen vývoj nových léků, které jsou charakterizovány vysoce selektivním účinkem na cílové struktury (target drugs), ale také výroba opticky čistých izomerů (enantiomerů) některých látek, která umožnila eliminovat z přípravku balastní nebo dokonce toxický izomer účinné látky. Realizace těchto projektů poskytuje v podmínkách klinické praxe možnost přesněji definovat vztah mezi aplikovanou dávkou a terapeutickým účinkem. Poznání individuálních genetických vlastností pacienta usnadňuje výběr vhodného léčiva a zejména umožňuje optimalizaci jeho dávkování. V současné době je za moderní a bezpečnou farmakoterapii považováno pouze podání takového léčiva, na které organismus definovaně farmakodynamicky odpovídá a jehož dávka je přiměřeně optimalizována dle individuálních potřeb pacienta.

Farmakogenetika je jedním z oborů, který v rámci klinické farmakologie pomáhá naplňovat kritéria individualizace lékové terapie. Tato poměrně mladá vědecká disciplína se zabývá studiem vlivu genetických faktorů na farmakodynamiku a farmakokinetiku podaných léčiv. Dnes nám umožňuje popsat a charakterizovat data, která byla dříve získávána převážně experimentální cestou:

- *typ účinné látky*
- *velikost dávky*
- *odpovídatost na léčbu*
- *vedlejší účinky*
- *lékové interakce.*<sup>[2,3]</sup>

Jeden z prvních poznatků v oboru farmakogenetiky učinil v podstatě už před 2 500 lety slavný řecký filozof a matematik Pythagoras, který si všiml, že někteří lidé

po podání favových bobů (*Vicia faba*) onemocní, zatímco jiní ne. Tento jev se podařilo vysvětlit poměrně nedávno, když byl popsán rozvoj hemolytické anémie u nosičů deficitu glukózo-6-fosfát-dehydrogenázy po podání určitých léků (např.: antimalarika primachinu, kyseliny acetylsalicylové, sulfonamidů, apod.) nebo po pozření syrových favových bobů.<sup>[3,4]</sup> V padesátých letech minulého století byly objasněny také další případy dnes už dobře známých farmakogenetických interakcí - periferní polyneuropatie při léčbě isoniazidem u pomalých acetylátorů (osob s deficitem N-acetyltransferázy), prodloužená apnoe až letální paralýza bránice v důsledku podání sukcinylcholinu nosičům deficitu pseudocholinesterázy a další.<sup>[3-5]</sup> V roce 1959 použil poprvé pojem farmakogenetika německý lékař a genetik Friedrich Vogel.<sup>[4,6,7]</sup> O několik let později v 90. letech minulého století nastal významný rozvoj oboru, který byl výsledkem pokroku v oboru molekulární biologie a úspěšného sekvenování lidského genomu (Human Genome Project).<sup>[3]</sup>

Podstatou deficitů enzymů a interindividuálních rozdílů v reakci na podané léčivo nebo jinou látku jsou tzv. genetické polymorfismy (SNPs, single nucleotide polymorphisms). Jedná se o občasné změny ve struktuře DNA s frekvencí výskytu v populaci nad 1% způsobené záměnou (substitucí), chyběním (deleci) nebo vsunutím (insercí) jednoho či více nukleotidů, které mají dědičný charakter. Desítky těchto změn se vyskytují přirozeně v genomu každého jedince. Umožňují fylogenetický vývoj, zajišťují různorodost ve výbavě jedinců stejného druhu, podporují schopnost adaptace a zvyšují tak pravděpodobnost zachování daného druhu na Zemi i přežití živých organismů vůbec. Výskyt SNPs není omezen pouze na enzymové systémy, jednou z příčin interindividuální variability účinku léků mohou být také změny v genech kódujících transportní systémy, receptory i cílové struktury, pro které byla účinná látka určena.<sup>[8]</sup>

Z hlediska farmakokinetiky léčiv hraje významnou roli především polymorfismus biotransformačních enzymů. Genetické varianty byly popsány téměř u každého důležitého enzymu podílejícího se na metabolismu xenobiotik. Funkční význam SNPs může být různý od mírného snížení enzymové aktivity až po její naprostý nedostatek nebo markantní zvýšení.<sup>[3]</sup> Enzymová aktivita zásadně rozhoduje o osudu léčiva v organismu. Osoby se sníženou nebo zcela chybějící aktivitou daného enzymu odbourávají léčivo pomalu. Při standardním denním dávkování, které je provázeno zpomaleným vylučováním, dochází v průběhu času

ke kumulaci léčiva v organismu. Pokud jeho koncentrace v biologických tekutinách dosáhne toxických hodnot, rozvíjí se klinická symptomatologie z předávkování (over-dosing), která může vyústit až v toxické poškození organismu s následkem úmrtí. U osob s vrozeným vysoce efektivním enzymatickým systémem jsou léčiva metabolizována velmi rychle, hladiny léků nedosáhnou požadovaných terapeutických koncentrací, pacient je poddávkován (under-dosing) a ohrožen neúčinností terapie. Tento stav může mít v řadě případů fatální důsledky. Terapeutická účinnost léčiv ze skupiny prodrug je úzce závislá na aktivitě biotransformačních reakcí, které přeměňují prekursorovou látku v aktivní léčivo. Pokud je vlivem genetických faktorů aktivita biotransformačních enzymů snížena, je při standardním dávkovacím režimu snížena také koncentrace aktivního léčiva v biologických tekutinách. V těchto případech může docházet k rozvoji klinické symptomatologie z poddávkování. Zvýšená aktivita biotransformačních enzymů vlivem genetických faktorů je naopak příčinou vyšší koncentrace aktivního léčiva v biologických tekutinách. Tento stav přechází při standardní denní aplikaci prodrug léčiva až k rozvoji klinické symptomatologie z předávkování.

## **2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Cílem diplomové práce bylo studium vlivu polymorfismů (SNPs) enzymu cytochromu P450 konkrétně CYP2C9 na farmakokinetiku přípravku Nurofen forte obsahujícího racemickou směs ibuprofenu.

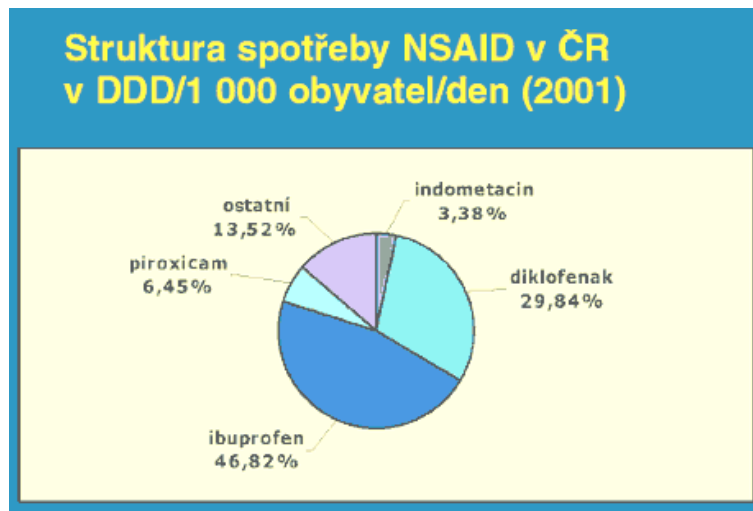
## 3. LITERÁRNÍ ČÁST

### 3.1 *Ibuprofen*

Ibuprofen patří k nejznámějším a nejrozšířenějším lékům na světě. Podle farmakologického účinku je řazen do skupiny tzv. nesteroidních antiflogistik (NSAID, NSA), která jsou charakterizována svými protizánětlivými, analgetickými a anti-pyretickými účinky. Jejich základní indikací je léčba muskuloskeletárních chorob, zejména zánětlivých revmatických onemocnění, degenerativních kloubních chorob, akutních i chronických vertebrogenních syndromů a traumat. Obecně mají NSAID velmi široké klinické použití, využívány jsou prakticky ve všech medicínských oborech. Oblíbená mezi lékaři jsou především pro své výhodné farmakologické vlastnosti. Protizánětlivé působení NSAID nevykazuje žádné vedlejší nežádoucí účinky hormonální povahy pozorované při antiflogistické léčbě kortikosteroidy, většina z nich má středně silný analgetický účinek, na rozdíl od analgetik opiátového typu nejsou návyková a neovlivňují dechové centrum.<sup>[9]</sup> Ibuprofen je běžně terapeuticky indikován k rychlé a efektivní symptomatické léčbě při horečnatých stavech, nemocech z nachlazení, při migréně vaskulární etiologie, bolestech po operacích nebo poraněních, bolestech zubů a bolestivé menstruaci.<sup>[10-12]</sup>

V šedesátých letech dvacátého století byl ibuprofen vyvinut jako antirevmatikum, které vykazovalo ve srovnání s ostatními látkami podstatně lepší snášenlivost.<sup>[9]</sup> Jeho výdej byl několik let vázán pouze na lékařský předpis. Později v osmdesátých letech se stal v mnoha zemích volně dostupným a jeho užívání se z větší části dostalo mimo odborný dohled.<sup>[13]</sup> Dnes patří užívání NSAID mezi nejčastější příčiny hospitalizace a úmrtí v důsledku nežádoucích účinků léků v západních zemích.<sup>[14]</sup> Spotřeba NSAID v České republice je poměrně vysoká, v evropském měřítku dokonce mírně nadprůměrná. Dle dostupných statistik Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL) se spotřeba NSAID v České republice od roku 2001 pravidelně pohybuje na 2. až 3. místě, přičemž celková spotřeba léčiv od roku 1990 neustále roste. V roce 2001 se prodalo celkem 18,75 miliónů balení NSAID, z účinných látek to byl především ibuprofen a diklofenak, které dohromady

tvořily až 75% spotřeby doporučené denní dávky na 1000 obyvatel a den (viz. Obrázek 1).

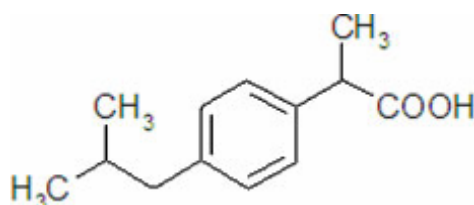


Obrázek 1 - Spotřeba NSAID v ČR za rok 2001<sup>[16]</sup>

V roce 2007 činil prodej už celých 23,2 miliónů balení NSAID, z toho 10,5 miliónů balení představoval ibuprofen.<sup>[15]</sup> V této souvislosti je zajímavý také výrazný a stále stoupající počet osob léčených nebo ošetřených na odborných pracovištích gastroenterologie v České republice. V období od roku 2000 do roku 2007 činil nárůst pacientů celých 54%. Mezi nejčastější diagnózy patřila s nárůstem o 84% ulcerózní kolitida, jeden z nežádoucích účinků léčby NSAID.<sup>[17]</sup>

### 3.1.1 Chemická struktura a vlastnosti

Chemický název ibuprofenu je (±)-(R,S)-2-(4-isobutylfenyl)propionová kyselina, jedná se o derivát chirální 2-arylpropionové kyseliny (2-APA). Struktura ibuprofenu je znázorněna na Obrázku 2.

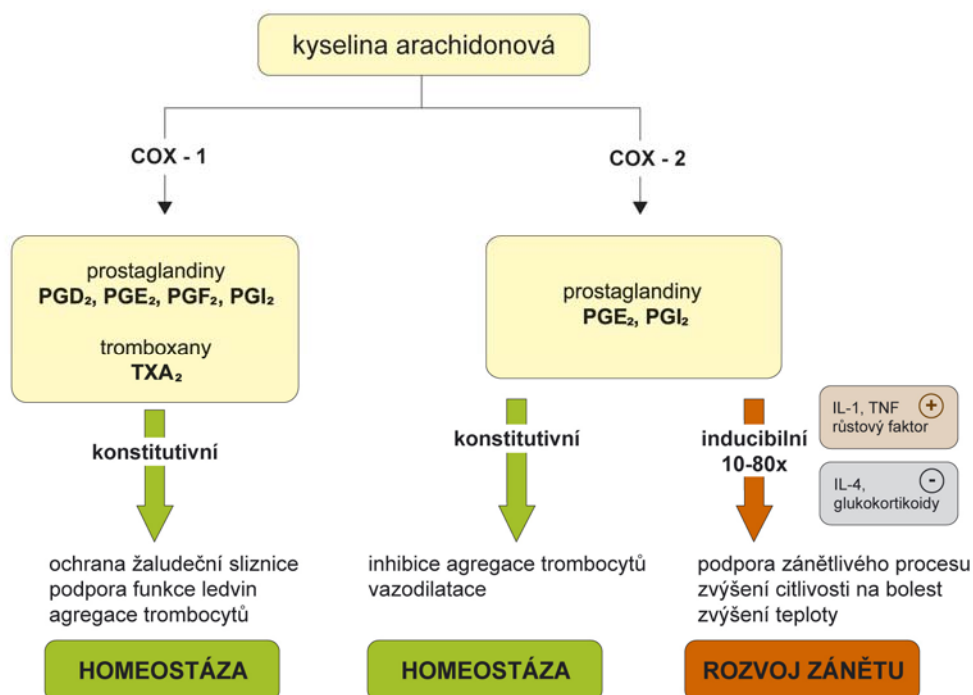


Obrázek 2 - Struktura ibuprofenu

Ibuprofen je ve většině lékových přípravků obsažen ve formě racemické směsi. V některých zemích jsou dostupné přípravky obsahující pouze čistý (+)-S-enantiomer. Farmakodynamické vlastnosti obou enantiomerů se liší. Hlavní farmakodynamicky účinnou látkou je (+)-S-ibuprofen, (-)-R-ibuprofen je některými autory považován za neúčinný nebo dokonce škodlivý. Jiní autoři prokázali, že tento enantiomer se podílí na účinnosti přípravku, z větší části totiž podléhá biotransformaci na farmakodynamicky účinný (+)-S-enantiomer.<sup>[12,13]</sup>

### 3.1.2 Mechanismus účinku

Mechanismus působení NSAID (konkrétně aspirinu) byl objeven počátkem sedmdesátých let dvacátého století anglickým farmakologem Johnem Robertem Vanem, který za tento objev získal spolu se svými dvěma dalšími kolegy v roce 1982 Nobelovu cenu za medicínu a byl britskou královnou povýšen do šlechtického stavu.<sup>[9]</sup>



Obrázek 3 - Schéma působení izoenzymů cyklooxygenázy (COX)<sup>[5,9,18,21]</sup>

Základním principem účinku NSAID je inhibice enzymu cyklooxygenázy (COX), který katalyzuje přeměnu kyseliny arachidonové (esenciální mastné

kyseliny) na prostaglandiny jako mediátory zánětu zodpovědné za lokální projevy zánětu - hyperémie, otoku, bolestivosti, zvýšené teploty, atd. Cyklooxygenáza je však zodpovědná také za syntézu fyziologických prostaglandinů, které v organismu plní řadu důležitých funkcí a právě úbytek těchto prostaglandinů vede často k rozvoji nežádoucích účinků doprovázejících léčbu NSAID<sup>[9]</sup> (viz. Obrázek 3).

Významnou událostí v historii NSAID se v osmdesátých letech stal objev dvou izoform enzymu: cyklooxygenázy 1 (COX-1) a cyklooxygenázy 2 (COX-2).<sup>[9]</sup> Studie potvrdily, že izoforma COX-1 je exprimována konstitutivně ve většině tkání a podporuje tvorbu fyziologických eikosanoidů (prostaglandinů a tromboxanů), které chrání žaludeční sliznici před poškozením, zajišťují mikrocirkulaci v ledvinách, podporují agregaci trombocytů, atd. Předpokládá se, že inhibice této izoformy je zodpovědná za nežádoucí účinky (eroze žaludeční sliznice, gastroduodenální ulcerace a krvácení) charakteristické pro léčbu tzv. neselektivními NSAID, látkami blokující obě izoformy enzymu. Neselektivní NSAID mohou inhibovat oba izoenzymy v různém poměru, na základě této skutečnosti se odvíjí jejich antiflogistický, resp. analgetický účinek a rozvoj účinků nežádoucích. Naproti tomu izoforma COX-2 je inducibilní (10-80x), její zvýšenou syntézu vyvolávají působky uvolňující se při poškození tkáně (IL-1, GF, TNF). Enzym COX-2 katalyzuje přeměnu kyseliny arachidonové na tzv. mediátory zánětu, látky působící dilataci cév a inhibici agregace krevních destiček (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>). Konstitutivní fyziologická exprese COX-2 nebyla ve většině tkání prokázána, zjištěna byla pouze v některých orgánech (ledviny, CNS, děloha, cévní endotel). Na základě těchto poznatků byla vytvořena koncepce nové formy NSAID, tzv. selektivních NSAID, látek inhibujících pouze COX-2 izoformu. Tyto inhibitory neovlivňují COX-1, proto postrádají přímý antiagregační účinek často využívaný k léčbě v klinické praxi kardiologie a angiologie. V současné době je intenzivně studován jejich vliv na rozvoj nežádoucích kardiovaskulárních účinků.<sup>[1,5, 9,15,19-21]</sup>

Ibuprofen se řadí do skupiny neselektivních inhibitorů cyklooxygenázy, inhibuje obě izoformy enzymu. V nižších dávkách působí ibuprofen analgeticky, ve vyšších protizánětlivě. Doba nástupu účinku se liší dle typu přípravku. Analgetický účinek nastupuje přibližně za 0,5 hodin po podání 400 mg racemické směsi ibuprofenu a trvá 4-6 hodin, antipyretický účinek se dostavuje později za 2-4 hodiny a trvá 4-8 i více hodin.<sup>[10]</sup>



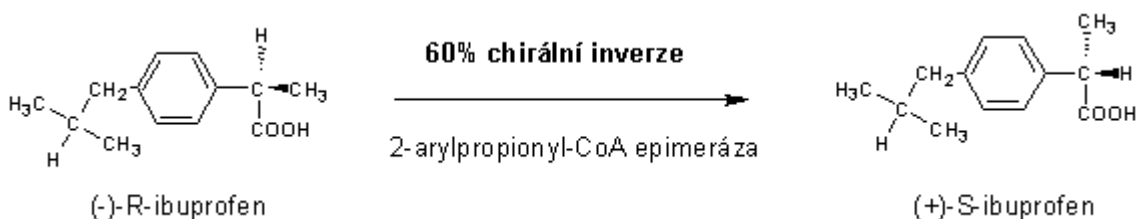
### 3.1.3 Farmakokinetické vlastnosti

Ibuprofen je běžně podáván perorálně ve formě tablet a suspenzí. Využívány jsou také lékové formy umožňující lokální, parenterální, intramuskulární nebo per rectum podání, které obchází žaludeční sliznici a zlepšují tak snášenlivost léčiva. Jednotlivé přípravky se mohou lišit formou, složením i obsahem účinné látky. Typ přípravku má vliv na čas potřebný k dosažení maximální koncentrace ( $t_{max}$ ), velikost maximální koncentrace ( $c_{max}$ ) i biologickou dostupnost látky (AUC).

Ibuprofen ve formě soli lysinu vykazuje vyšší hodnoty  $c_{max}$  než ve formě kyseliny nebo soli L-argininu.<sup>[13]</sup> Přípravky obsahující účinnou látku ve formě soli ibuprofen-lysinát jsou charakterizovány rychlým a snadným vstřebáváním, účinek nastupuje už do 7 minut od podání 400 mg racemické směsi ibuprofen-lysinátu. Maximální plazmatické koncentrace je dosahováno do 30 minut po podání nalačno, při podání s jídlem je absorpce zpomalena.<sup>[22]</sup> U přípravků obsahujících účinnou látku ve formě ibuprofenu je dosahováno maximální plazmatické koncentrace za 1-2 hodiny po podání a jejich biologický poločas je cca 2 hodiny.<sup>[10]</sup>

### 3.1.4 Metabolismus

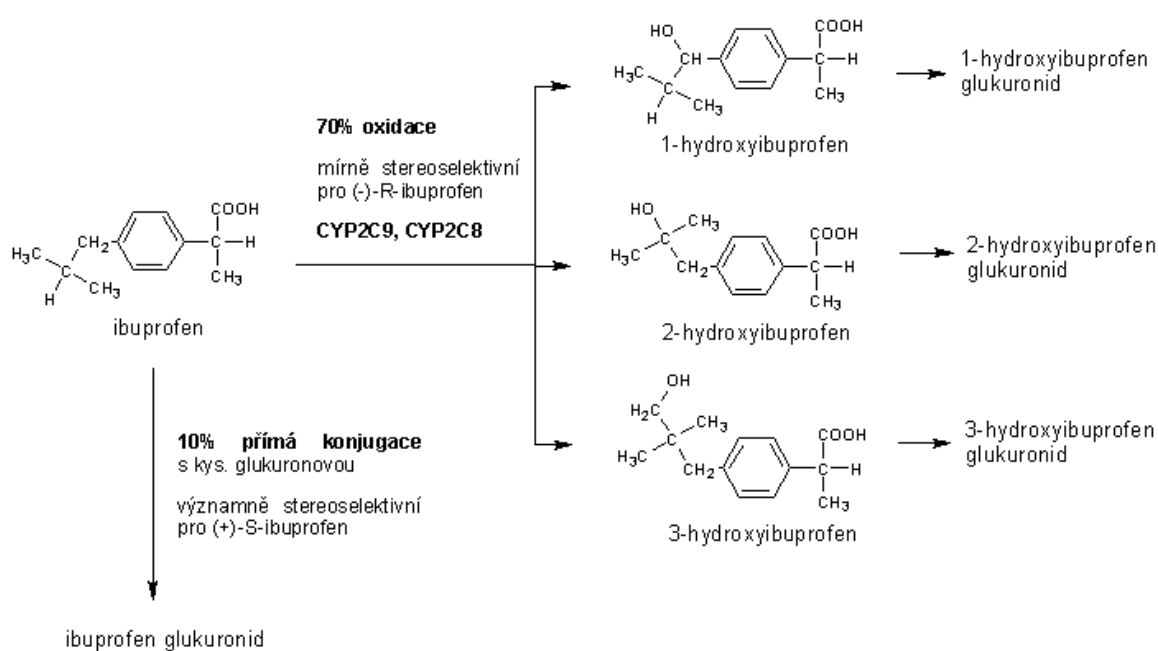
Po podání racemické směsi se přibližně 60% (-)-R-ibuprofenu mění v lidském těle na (+)-S-enantiomer.<sup>[23,24]</sup> Mechanismus chirální inverze byl popsán a schématicky je znázorněn na Obrázku 4.



Obrázek 4 - Chirální inverze (-)-R-ibuprofenu<sup>[25]</sup>

Až 70% obou enantiomerů prochází oxidativní biotransformací katalyzovanou cytochromy P450 a následnou glukuronidací, 10% převážně (+)-S-enantiomeru podléhá přímé konjugaci s kyselinou glukuronovou a méně než 1% je v nezměněné formě vyloučeno močí.<sup>[24]</sup> Farmakologická účinnost nebyla zjištěna u žádného

z metabolitů. Studie prokázaly, že hlavním enzymem katalyzujícím oxidaci ibuprofenu na 1-, 2- a 3-hydroxyibuprofen je enzym ze skupiny cytochromu P450, CYP2C9.<sup>[13]</sup> Později bylo popsáno, že CYP2C9 se podílí převážně na biotransformaci (+)-S-ibuprofenu, zatímco oxidace (-)-R-ibuprofenu je z větší části katalyzována enzymem CYP2C8.<sup>[24]</sup> Recentní studie realizována in vitro prokázala minoritní roli enzymu CYP2C8 v metabolismu ibuprofenu.<sup>[26]</sup> Přehled biotransformačních reakcí ibuprofenu v organismu schématicky znázorňuje Obrázek 5.



**Obrázek 5 - Metabolismus ibuprofenu<sup>[13,23,27]</sup>**

Nezměněný ibuprofen a jeho volné nebo konjugované metabolity jsou v různém poměru vylučovány z cca 70-90% celkové dávky močí a z cca 10% stolicí.<sup>[12,24]</sup>

### 3.1.5 Dávkování a nežádoucí účinky

Doporučená denní dávka ibuprofenu pro dospělé osobu je 200 až 400 mg každých 6 hodin. Maximální doporučená dávka pro pacienty s revmatoidní artritidou činí 3200 mg za den. Terapeutický rozsah ibuprofenu se pohybuje v rozmezí 10-50 mg/l, přičemž za toxické jsou považovány hodnoty vyšší než 100 mg/l.<sup>[13]</sup>

Studie akutní toxicity u zvířat prokázaly eroze žaludku a albuminurii. Ulcerogenní účinky byly výsledkem systémového i lokálního působení ibuprofenu.

Chronická intoxikace způsobovala anémii a nalezeny byly také intestinální ulcerace. Při pitvě byly eroze, ulcerace žaludku a záněty střev diagnostikovány i při netoxických dávkách.<sup>[11]</sup>

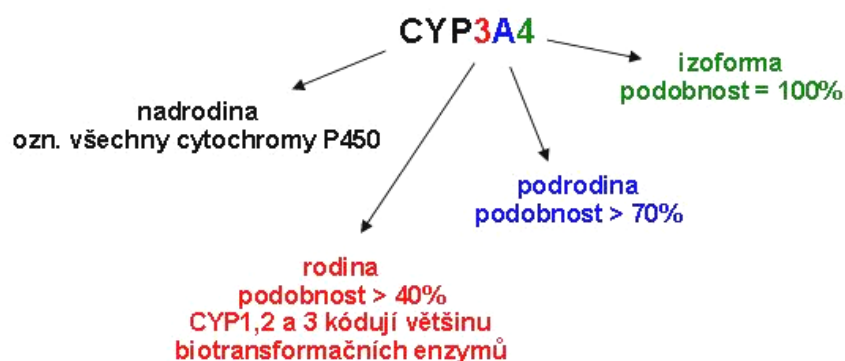
O nežádoucích účincích NSAID byla publikována řada studií. V důsledku dlouhodobého užívání byla u lidí popsána zvýšená incidence rozvoje gastroduodenálního krvácení, ulcerace žaludeční sliznice,<sup>[28]</sup> poškození střev,<sup>[28,29]</sup> renálního selhání<sup>[30]</sup> nebo akutní pankreatitidy.<sup>[31]</sup> Některé z těchto studií byly zaměřeny přímo na ibuprofen.<sup>[28,30,32,33]</sup>

Riziko rozvoje nežádoucích účinků NSAID obecně závisí na dávce, délce užívání a typu přípravku. Za relativně bezpečné lze považovat pouze krátkodobé správně dávkované užívání NSAID nepřekračující 1200 mg za den. V ostatních případech nebezpečí nežádoucích účinků výrazně stoupá.<sup>[29,34-37]</sup>

## 3.2 Cytochromy P450

### 3.2.1 Názvosloví

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1) patří mezi klíčové enzymy metabolismu cizorodých látek (xenobiotik). V roce 1958 je objevil a popsal německý chemik Martin Klingenberg jako hemové proteiny absorbující v redukované formě s oxidem uhelnatým záření při vlnové délce 450 nm.<sup>[38,39]</sup> Odtud pochází také jejich označení P450 (P = pigment, 450 = vlnová délka).



Obrázek 6 - Názvosloví cytochromů P450<sup>[41]</sup>

Dnes už není používání pojmu „cytochromy“ zcela správné a přesné. Toto označení vzniklo historicky a původně představovalo různorodou skupinu redoxních proteinů a enzymů nesoucích ve své struktuře hemovou skupinu. Nově byl tento výraz vyhrazen pro sloučeniny obsahující alespoň jeden zbytek histidinu vázající hemové železo. Pro označení enzymů P450 je v současné době doporučován termín „hem-thiolové enzymy“ nebo „hem-thiolové proteiny“. Používání těchto pojmů se však do dnešního dne v běžné praxi příliš nerozšířilo.<sup>[38]</sup>

Systematické názvosloví z roku 1989, které se ustálilo pro klasifikaci cytochromů P450 vychází z podobnosti aminokyselinové sekvence enzymu. Příslušnost k nadrodině cytochromů P450 je označována zkratkou CYP nebo P450, rodina je značena arabským číslem, podrodina velkým písmenem a arabská číslice na konci zápisu identifikuje konkrétní izoformu enzymu (viz. Obrázek 6). V případě, že mluvíme o genech kódujících enzymy cytochromu P450 je označení zapsáno kurzívou, např.: *CYP3A4*.<sup>[38,40]</sup>

### 3.2.2 Vznik a vývoj

Cytochromy P450 jsou evolučně velmi staré enzymy. Předpokládá se, že různé izoformy se vyvinuly postupně z jediného genu starého 1,5 miliardy let kódujícího hemoprotein u archebakterií. Jejich výskyt byl prokázán ve všech prokaryotních a eukaryotních organismech. Do dnešního dne bylo popsáno několik tisíc izoform, které se liší svou strukturou, substrátovou selektivitou i zastoupením v jednotlivých organismech.

V rámci lidské populace byly studovány a popsány polymorfismy genů, které odhalily příslušnost jednotlivých fenotypových projevů k určitým etnogeografickým skupinám. Vznik těchto odchylek byl s největší pravděpodobností výsledkem dlouhodobého působení rozdílů ve složení a zdroji přijímané potravy. Tato teorie umožnila logické a jednoduché vysvětlení různého zastoupení jednotlivých rodin a podrodin cytochromů P450 mezi živočišnými druhy. Přehled označení jednotlivých rodin cytochromů byl zpracován do Tabulky 1.<sup>[38]</sup>

U člověka bylo dosud identifikováno 57 genů a 35 izoform, z toho celkem 18 z nich se podílí na metabolismu xenobiotik (pouze z rodin 1, 2, 3). Mezi nejvíce zastoupené biotransformační enzymy patří CYP3A4 (50%), 2D6 (30%), 2C9/10 (10%),

1A2 (4%), 2E1 (2%), 2C19 (2%) a 2A6 (2%). Enzymy cytochromu P450 ovšem nekatalyzují pouze reakce spojené s biotransformací xenobiotik, ale i reakce endogenních látek (např. rodiny 4, 5, 7, 8, 11, 17, atd.). K jejich eobiotickým substrátům patří například vitamíny rozpustné v tucích, prostaglandiny, prostacykliny, tromboxany, cholesterol a steroidní hormony nebo mastné a žlučové kyseliny.<sup>[40,42,43]</sup>

<b>CYP</b>	<b>funkce nebo druh</b>
1	metabolismus cizorodých látek
2	metabolismus cizorodých látek
3	metabolismus cizorodých látek
4	metabolismus vyšších mastných kyselin
5	syntéza tromboxanů
6	hmyz
7	metabolismus steroidů
8	syntéza prostacyklinů
9	hmyz
10	měkkýši
11	syntéza steroidů
17	syntéza steroidů
19	syntéza steroidů
21	syntéza steroidů
24	metabolismus vitamin D <sub>3</sub>
26	metabolismus retinoidů
27	syntéza žlučových kyselin
51-70	houby
71-100	rostliny
101-140	bakterie

**Tabulka 1 - Přehled označení jednotlivých rodin cytochromů P450<sup>[38]</sup>**

### **3.2.3 Lokalizace**

V buňkách jsou enzymy P450 vázány především v membránách hladkého endoplazmatického retikula a v mitochondriích. Výskyt některých izoform v lidském těle je téměř ubikvitární, jiné jsou orgánově více či méně specifické. Izoformy podílející se na metabolismu xenobiotik se nejčastěji nachází v játrech, ledvinách, plicích a GIT, ale i v mozku, kůži, svalech, cévách, krevních destičkách, nadledvinách, placentě, varletech, vaječnicích a mléčných žlázách. Enzymová aktivita většiny z nich závisí nejen na vrozených dispozicích (genetický polymorfismus enzymů, pohlaví, věk), ale i na vnějších vlivech (životní prostředí, výživa, návyky,

léky, atd.). Tyto faktory mohou působit různě významně jako induktory nebo inhibitory enzymů (viz. Tabulka 2).<sup>[40,41,43-45]</sup>

CYP	lokalizace	inhibitor	induktor	poznámky
3A4	játra, střevo	diltiazem, kortikosteroidy, grapefruitový džus	steroidy, barbituráty, karbamazepin, třezalka	nízká substrátová selektivita
2D6	játra, GIT	-	-	není indukovatelný
2C9/19	játra	orální antikoncepce	barbituráty, rifampicin	
1A2	játra	naftoflavon, grapefruitový džus	barbituráty, PAH, kofein, grilované maso, brukvovité rostliny	aktivátor toxických látek
2E1	játra, plíce, ledviny	brukvovité rostliny, diallylsulfidy (česnek)	hladovění, ethanol, aceton, benzen	tvorba radikálů
2A6	játra	-	barbituráty	metabolismus nikotinu

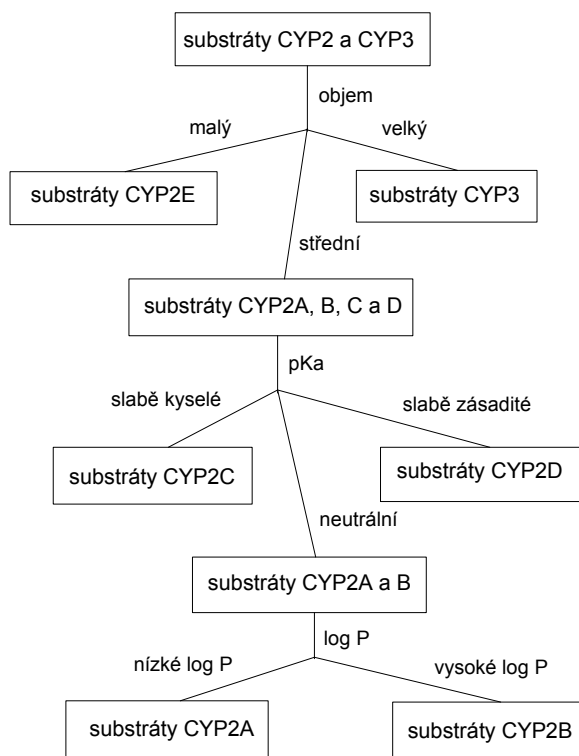
**Tabulka 2 - Zjednodušený přehled cytochromů P450** <sup>[40,43-45,47]</sup>

### 3.2.4 Substráty

Jednou z charakteristických vlastností enzymů P450 je nízká substrátová selektivita. Cytochromy katalyzují celou řadu rozmanitých reakcí strukturně velmi odlišných látek. Naopak je tomu u mitochondriálních cytochromů P450, které podobně jako většina bakteriálních enzymů mají stupeň substrátové selektivity poměrně vysoký. U savců a jiných živočišných druhů jsou rodiny enzymů 1, 2 a 3 zaměřeny zejména na 1. fázi biotransformace xenobiotik, tomu odpovídá také spektrum jejich substrátů. Částečně se ale tyto enzymy účastní i metabolismu endogenních látek, např. estrogenů, testosteronů, katecholaminů, atd. Znalost fyzikálně-chemických vlastností substrátu umožňuje předvídat účast konkrétních enzymů v biotransformačních reakcích (viz. Obrázek 7).

Některé látky mohou být vhodným substrátem pro více enzymů současně, potom se průběh a výsledek jednotlivých biotransformačních reakcí obvykle liší. Příkladem může být biotransformace omeprazolu, který v přítomnosti CYP2C19 podléhá 5-methyl hydroxylaci, zatímco enzym CYP3A4 katalyzuje S-oxidaci tohoto

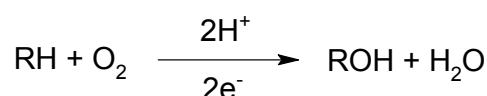
substrátu. O tom, která z reakcí a v jaké míře bude ve skutečnosti probíhat se rozhoduje na základě velikosti afinity enzymu k danému substrátu, jeho množství a lokalizaci.<sup>[38]</sup>

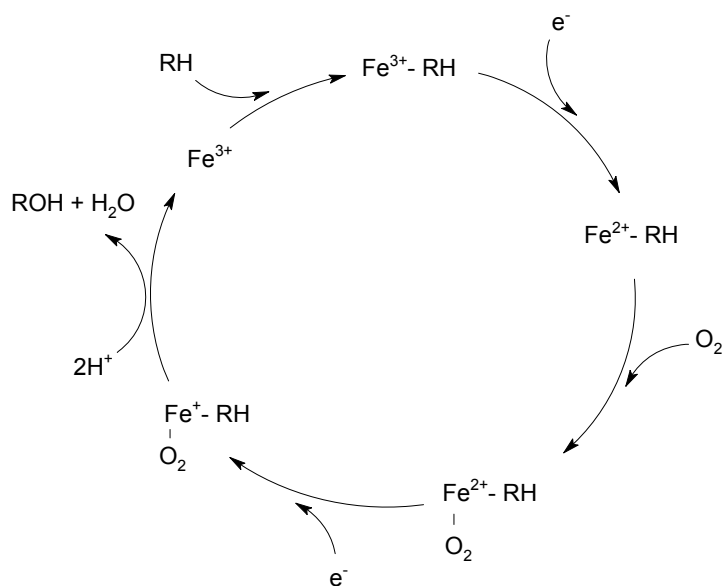


**Obrázek 7 - Schéma rozdělení substrátů na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností a struktury<sup>[38]</sup>**

### 3.2.5 Katalytické funkce

Hlavním úkolem cytochromů P450 jako enzymů I. fáze biotransformace je modifikace struktury substrátu, která umožní průběh II. fáze biotransformace, tzn. konjugaci s aminy, kyselinami nebo alkoholy vedoucí k zvýšení rozpustnosti daného substrátu ve vodném prostředí a jeho následné eliminaci z organismu.<sup>[42]</sup> Enzymy obecně katalyzují reakce spojené se zabudováním molekuly kyslíku do organické struktury dle následující rovnice a schématu znázorněného na Obrázku 8:





Obrázek 8 - Reakční cyklus katalyzovaný cytochromy P450<sup>[38]</sup>

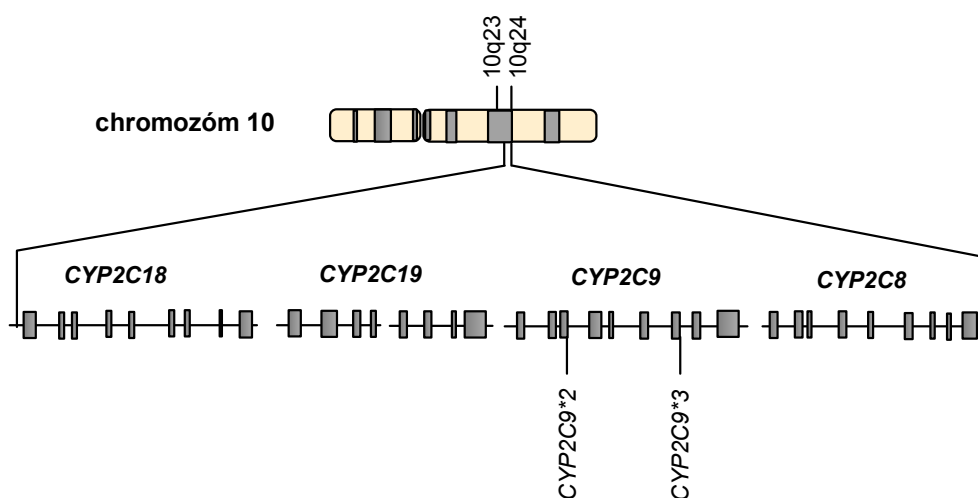
### 3.2.6 CYP2C9

V podrodině CYP2C byly dosud popsány celkem 4 enzymy - CYP2C9, CYP2C8, CYP2C18 a CYP2C19.<sup>[46]</sup> I přes vysokou podobnost v aminokyselinové sekvenci (až 85%) se substrátová specifita jednotlivých izoforem liší. Na metabolismu xenobiotik se podílí zejména CYP2C9 a CYP2C19, přičemž nejvyšší aktivitu vykazuje CYP2C9 (dříve ozn. MP-1 nebo MP-2<sup>[38]</sup>). V lidském organismu je CYP2C9 primárně syntetizován v játrech, kde představuje až 20% produkce všech jaterních cytochromů.<sup>[47]</sup>

Typickým substrátem pro CYP2C9 jsou látky lipofilní, neutrální nebo slabě kyselé povahy, z léků jsou to některá NSAID, orální antidiabetika, hypnotika, antiepileptika, orální antikoagulans, psychotropní látky, atd., konkrétně například fenytoin, tolbutamid, naproxen, ibuprofen, diclofenak, THC a warfarin.<sup>[44,47-49]</sup> Enzym katalyzuje také reakce spojené s oxidací karcinogenů a prokarcinogenů benz- $\alpha$ -antracenového typu obsažených v tabáku.<sup>[50]</sup> Jeho endogenními substráty jsou kyselina arachidonová a linoleová. Silným selektivním inhibitorem CYP2C9 je sulfafenazol, amiodaron a některé další látky. Jako induktor působí například rifampicin.<sup>[48,51]</sup>



Expresce CYP2C9 ve fetálním období života zcela chybí, zjištěna byla až u novorozenců a v následujícím období. Interpretace aktivity enzymu u starších osob je obtížná. Důvodem jsou především změny v hladinách plazmatických proteinů, respektive funkce jater, ledvin a činnosti dalších orgánů. Některé studie dokládají, že s rostoucím věkem se aktivita CYP2C9 nemění,<sup>[52-54]</sup> jiné popisují statisticky významné odchylky,<sup>[55-57]</sup> například až 28% pokles v eliminaci volné frakce podaného xenobiotika.<sup>[57]</sup> Přesto se obecně předpokládá, že vliv věku na aktivitu enzymu je minimální.<sup>[13,52]</sup>

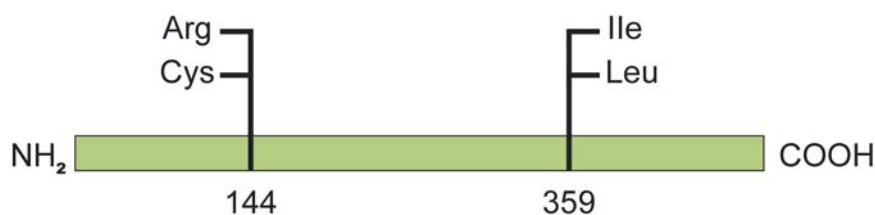


**Obrázek 9 - Schématické zobrazení genů lokalizovaných na chromosomu 10<sup>[51]</sup>**

Geny podrodiny CYP2C jsou lokalizovány na dlouhém raménku 10. chromosomu mezi lokusem q23 a q24 v následujícím pořadí ve směru od centromery k telomeře: CYP2C18, CYP2C19, CYP2C9 a CYP2C8 (viz. Obrázek 9). Tvoří je DNA o velikosti cca 500 kbp a některé z nich vykazují významný genetický polymorfismus (SNPs).<sup>[51,58]</sup> CYP2C9 se nachází v lokusu 10q24.1, přibližně 55 kbp obsahujících 9 exonů (GenBank accession numbers: L16877 - L16883) kóduje protein tvořený 490 aminokyselinami. CYP2C9 je z 92% podobný CYP2C19, liší se pouze v 43 ze 490 aminokyselin.<sup>[59]</sup> Až 75% nukleotidů v 5' promotorové oblasti CYP2C9 se shoduje s CYP2C8.<sup>[58]</sup>

V kódující i nekódující oblasti CYP2C9 bylo dosud popsáno více než 30 různých SNPs. Dva z nich se v populaci vyskytují s vyšší frekvencí a jsou asociovány s detekovatelným snížením aktivity enzymu.<sup>[46]</sup> Polymorfismus označovaný jako CYP2C9\*2 (rs1799853) popisuje záměnu jednoho nukleotidu

cytosinu za thymin (**CGC**→**TGC**) v tripletu DNA kódující CYP2C9, která vede ke změně aminokyseliny argininu za cystein v poloze 144 polypeptidového řetězce (Arg144Cys). Další polymorfismus *CYP2C9*\*3 (rs1799853) kóduje jednonukleotidovou záměnu adeninu za cytosin v tripletu DNA (**ATT**→**CTT**), která způsobuje změnu aminokyseliny isoleucinu za leucin v poloze 359 polypeptidového řetězce (Ile359Leu).<sup>[47,60,61]</sup> Záměny aminokyselin v polypeptidovém řetězci enzymu CYP2C9 jsou schématicky znázorněny na Obrázku 10.



Obrázek 10 - Záměny v polypeptidovém řetězci enzymu CYP2C9<sup>[52]</sup>

Frekvence výskytu těchto polymorfismů závisí na typu populace (viz. Tabulka 3). V kavkazské populaci se *CYP2C9*\*2 objevuje u cca 11-12% a *CYP2C9*\*3 u cca 7-8% osob. U ostatních populací je frekvence výskytu výrazně nižší, některé SNPs se téměř nevyskytují, například v asijské populaci *CYP2C9*\*2.<sup>[46,51,52,58]</sup> Přehledné tabulky studií zabývajících se frekvencí výskytu SNPs v jednotlivých populacích byly publikovány v některých rešerších.<sup>[46,59]</sup> Jako *CYP2C9*\*1 neboli „wilde type (wt)“ je označována varianta, která se v populaci vyskytuje s nejvyšší frekvencí a kóduje tzv. normální funkci enzymu.

SNP	změna v nukleotidové sekvenci	lokalizace	změna v aminokyselinové sekvenci	aktivita enzymu ve srovnání s CYP2C9*1/*1	frekvence výskytu v populaci		
					africká	asijská	kavkazská
CYP2C9*2	430C→T	exon 3	Arg144Cys	snížená	4%	0%	11%
CYP2C9*3	1075A→C	exon 7	Ile359Leu	snížená	2%	3%	7%
CYP2C9*4	1076T→C	exon 7	Ile359Thr	-	0%	-	0%
CYP2C9*5	1080C→G	exon 7	Asp360Glu	snížená	1,8%	-	0%
CYP2C9*6	818delA	exon 5	-	žádná	0,6%	-	0%
CYP2C9*7	55C→A	exon 1	Leu19Ile	-	-	-	-
CYP2C9*8	449G→A	exon 3	Arg150His	zvýšená	6,7%	-	-
CYP2C9*9	752A→G	exon 5	His251Arg	snížená	-	-	-
CYP2C9*10	815A→G	exon 5	Glu272Gly	-	-	-	-
CYP2C9*11	1003C→D	exon 7	Arg335Trp	snížená	2,7%	-	0,4%
CYP2C9*12	1465C→D	exon 9	Pro489Ser	snížená	-	2%	-

Tabulka 3 - Přehled polymorfismů enzymu CYP2C9<sup>[51]</sup>

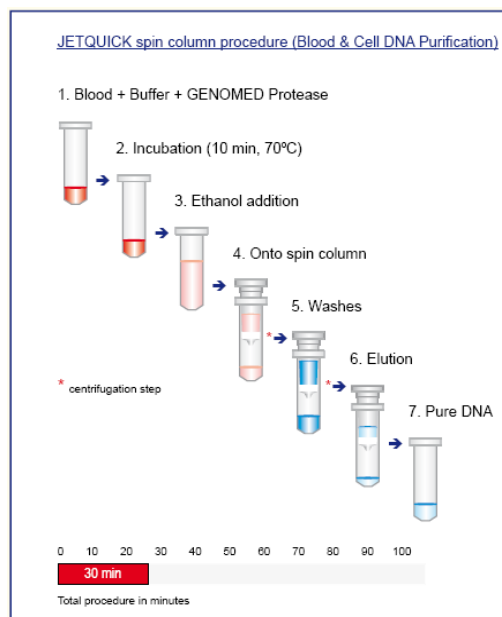
### **3.3 Metody genetické analýzy**

V sedmdesátých letech dvacátého století představovala DNA pro biochemiky jednu z nejhůře analyzovatelných molekul. Dnes je situace zcela odlišná. Klíčovou roli ve vývoji všech molekulárně genetických metod sehrál objev polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR), která umožnila namnožit DNA nebo její fragmenty do množství potřebného pro diagnostické účely. V současné době jsou principy molekulárně genetických metod využívány nejen v diagnostice závažných dědičných onemocnění, ale i při průkazu přítomnosti infekčních agens, k prognóze průběhu onemocnění, detekci polymorfismů a mutací genů, testování paternity, průkazu identity, apod. Genetická analýza se stala nejen neodmyslitelnou součástí výzkumných a vývojových pracovišť, ale i běžných klinických laboratoří a dalších ústavů.<sup>[62,63]</sup>

#### **3.3.1 Izolace DNA**

Principy izolace DNA jsou založeny na chemických a fyzikálních vlastnostech deoxyribonukleonové kyseliny. Z analytických postupů zahrnují tyto procesy zejména centrifugační, extrakční a purifikační metody. Diferenciální a zonální centrifugace lyzátů buněk umožňuje izolaci DNA na základě rychlosti sedimentace, velikosti, tvaru a hustotě částic. V rutinní praxi jsou ovšem nejčastěji využívány extrakční a purifikační metody, konkrétně metoda fenolové extrakce a zejména metoda adsorpce DNA na silikátový povrch kolony. Pro tyto účely je v současné době dostupné velké množství komerčně vyráběných setů a souprav, které umožňují snadnou a rychlou izolaci DNA i z velkého množství vzorků.<sup>[64,65]</sup>

Při izolaci DNA ze vzorku periferní krve metodou adsorpce DNA na silikátový povrch kolony jsou enzymaticky rozrušeny buňky bílé krevní řady a DNA uvolněna do roztoku vzorku. Přídavkem ethanolu dochází k precipitaci DNA. Takto upravený vzorek je nanesen na kolonku, vysrážená DNA se zachytí na silikátovém povrchu kolony a balastní složky jsou odstraněny pomocí promývacích pufrů. DNA je eluována vodou nebo 10 mmol/l Tris-HCl. Izolace trvá dle počtu vzorků cca 30 minut až 1 hodinu. Schématicky je metoda adsorpce DNA na silikátový povrch kolony znázorněna na Obrázku 11.



Obrázek 11 - Izolace DNA na silikátový povrch kolony<sup>[66]</sup>

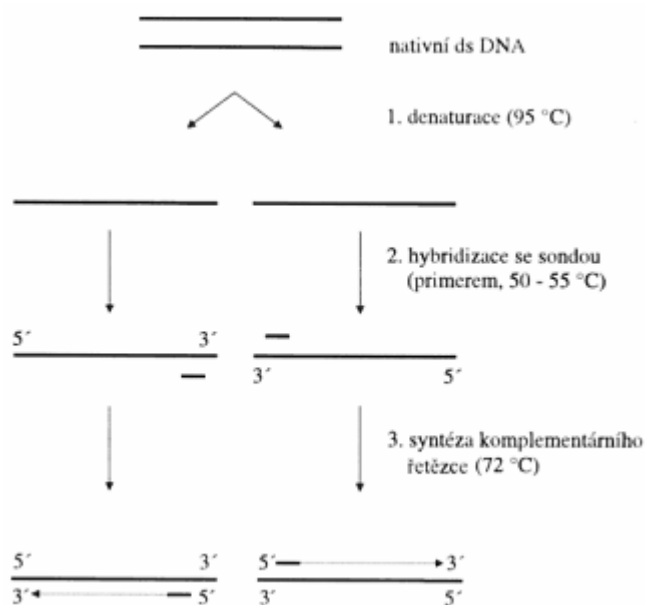
### 3.3.2 Měření koncentrace a čistoty DNA

K zjištění koncentrace a čistoty DNA se běžně využívají dvě metody. Spektrofotometrické měření lze použít pro vzorky o koncentraci vyšší než 25 mg/l, které neobsahují významné množství nečistot. Stanovení je prováděno pomocí kalibrační řady standardů. Čistotu vzorku hodnotíme z poměru absorbance při vlnových délkách 260 a 280 nm. Jeho hodnota by neměla klesnout pod 1,8. Při fluorescenčním měření srovnáváme intenzitu záření emitovanou ethidium bromidem s vzestupnou řadou standardních vzorků DNA. Metoda je citlivější, lze zjistit velmi malé množství vzorku DNA (až 1 ng), a to i v případě, že je vzorek kontaminován významným množstvím nečistot (bílkoviny, apod.). Součástí kontroly koncentrace a čistoty vzorku je také posouzení integrity získané DNA metodou gelové elektroforézy a fotografií gelu na UV transluminátoru.<sup>[64,65]</sup> Provedení gelové elektroforézy vzorku je v běžné praxi dostačující i pro orientační stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA.

### 3.3.3 Polymerázová řetězová reakce

Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) byla vyvinuta v 80. letech dvacátého století ve společnosti Cetus Corporation v Kalifornii. Za její objev získal v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii Kary B. Mullis. Princip této jednoduché

metody spočívá v opakované enzymatické amplifikaci vybraného specifického úseku DNA in vitro v průběhu tří teplotních fází: denaturace, annealingu a elongace. Nukleotidová sekvence amplifikované DNA nemusí být přesně známa, nutná je znalost krátkých úseků na obou koncích cílového segmentu DNA. K těmto úsekům jsou navrženy a poté nasyntetizovány komplementární jednořetězcové oligonukleotidové sondy, tzv. primery (cca 18-25 bází). Ty v průběhu reakce vymezují úsek DNA, který bude amplifikován.



Obrázek 12 - Schéma PCR reakce<sup>[64]</sup>

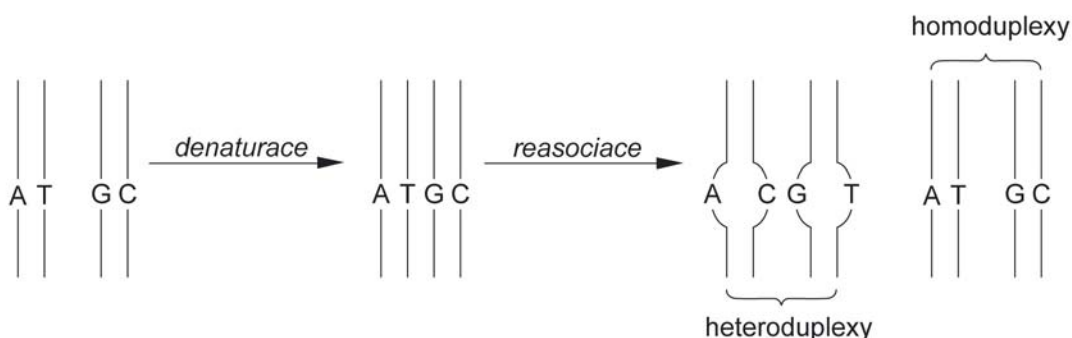
Dvouvláknová DNA je nejprve krátkodobým zvýšením teploty na cca 95°C denaturována na dvě jednovláknové, tzv. templátové neboli matricové molekuly DNA. Poté je teplota snížena na cca 50-55°C, v této fázi označované jako annealing nasedají primery na templátovou DNA. Následuje fáze elongace, při které o teplotě cca 72°C probíhá syntéza komplementárního řetězce. Tento proces probíhá vždy ve směru od 5' konce k 3' konci a je katalyzován termostabilní DNA polymerázou, např. Taq polymerázou z bakterie *Thermus aquaticus*. Schéma reakce je znázorněno na Obrázku 12. Během prvního cyklu vznikají řetězce nespécifické délky, syntéza pokračuje dále až za sledovanou sekvenci DNA. V dalších cyklech slouží i nově nasyntetizované molekuly DNA jako templáty a během několika málo cyklů začnou v roztoku převládat amplifikované molekuly ohraničené z obou stran primery. Množství amplifikovaných molekul v reakci roste geometrickou řadou.<sup>[62,66]</sup>

### 3.3.4 Analýza mutací a SNPs

K detekci mutací a SNPs je dnes nejčastěji využívána analýza heteroduplexů (Heteroduplex Analysis, HA) a analýza jednovláknového konformačního polymorfismu (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP). Obě metody umožňují rychlou, spolehlivou a levnou identifikaci známých i neznámých genetických variant.

#### **Analýza heteroduplexů**

Princip metody spočívá v tvorbě homo- a heteroduplexů a jejich následné separaci v gelu na základě rozdílné teploty tání, tzn. teploty, při které dochází k přechodu dvouřetězcových molekul DNA na jednořetězcové molekuly. Heterozygotní jedinci jsou nosiči dvou různých typů alel v jediném genu, jeden typ alely zdědili po matce (např. AT) a druhý odlišný po otci (např. GC). Homozygotní jedinci jsou v obou alelách totožní, tzn. po matce i otci zdědili stejný typ alely (např. AT nebo CG). V případě, že vzorky heterozygotních jedinců podrobíme denaturaci s následnou reasociací, dojde k tvorbě 4 různých produktů, vzniknou 2 různé homoduplexní řetězce (AT, CG) a 2 různé heteroduplexní řetězce (AC, GT) (viz. Obrázek 13). U homozygotních vzorků heteroduplexy nevznikají, výsledkem analýzy je pouze jeden typ homoduplexu, a to stejný jako byl na počátku reakce (např. AT nebo CG).

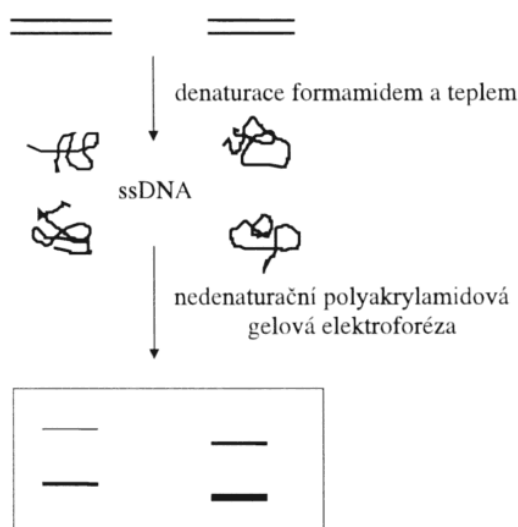


**Obrázek 13 - Tvorba heteroduplexů**

Vzorky homo- a heterozygotních jedinců lze rozlišit pomocí gradientové teplotní elektroforézy. Vzhledem k tomu, že heteroduplexní řetězce nejsou plně kompatibilní, mají nižší teplotu tání než homoduplexní řetězce.

### **Analýza jednovláknového konformačního polymorfismu**

Analýza jednovláknového konformačního polymorfismu je založena na principu různé migrace jednovláknových molekul DNA, které se liší svou sekundární strukturou v nativním (nedenaturačním) polyakrylamidovém gelu. Unikátní konformace jednovláknového fragmentu DNA je dána intramolekulárními interakcemi uvnitř DNA sekvence.



**Obrázek 14 - Princip analýzy jednovláknového konformačního polymorfismu<sup>[64]</sup>**

I malý rozdíl způsobený záměnou jedné báze vede ke změně konformace a pohyblivosti při elektroforéze za nedenaturačních podmínek. Princip metody znázorňuje Obrázek 14. Tato vysoce citlivá technika zachycuje 100% mutací v DNA fragmentech menších než 200 bází a 80% mutací v DNA fragmentech menších než 400 bází. Optimální velikost PCR produktu je 150 bází pro detekci mutací, větší PCR produkty jsou vhodné k sledování polymorfismů.<sup>[64]</sup>

### **3.3.5 Elektroforetické metody a detekce**

Termín „elektroforéza“ pochází z řečtiny a obecně znamená transport pomocí elektřiny. Vysokomolekulární látky (např. fragmenty DNA nebo produkty PCR) se dělí elektroforetickými metodami na základě své molekulové hmotnosti a velikosti náboje. Přestože základní princip elektroforézy je znám již od konce 19. století, za otce této metody je považován švédský elektrochemik Arne Thiselius, který roku

1937 vyvinul tzv. metodu pohyblivého rozhraní. Šlo o elektroforézu v kapalném médiu, kde k detekci jednotlivých proteinů byla využívána různá absorpce světla.<sup>[67]</sup>

### ***Agarózová gelová elektroforéza***

Pravděpodobně nejužívanější molekulárně-genetickou metodou je horizontální agarózová gelová elektroforéza, která slouží k rutinnímu stanovení koncentrace, čistoty a integrity izolované DNA, produktů PCR, atd. Koncentrace agarózy se volí podle velikosti fragmentů, které mají být separovány. Gel je obvykle ponořen do 10-20x ředěného komerčně dodávaného TBE pufru. Vzorky jsou před aplikací na start smíchány se směsí obsahující fluorescenční barvivo (např. ethidium bromid), barvivo viditelného spektra (např. bromfenolová modř) a látky zajišťující klesání vzorku do jamky v gelu (např. sacharóza, glycerol). Rozdělené frakce je možné přenést na speciální membrány tzv. blotováním a podrobit hybridizaci nebo vizualizovat na transiluminátoru v UV světle s následnou fotodokumentací. Žebříček po 50 nebo 100 bp (ladder) nebo jiné PCR markery jsou používány jako kalibrační stupnice molekulové hmotnosti (velikosti fragmentů). Orientačně lze odhadnout také koncentraci vzorku porovnáním intenzity záření se standardním vzorkem DNA.<sup>[64,65]</sup>

### ***Polyakrylamidová gelová elektroforéza***

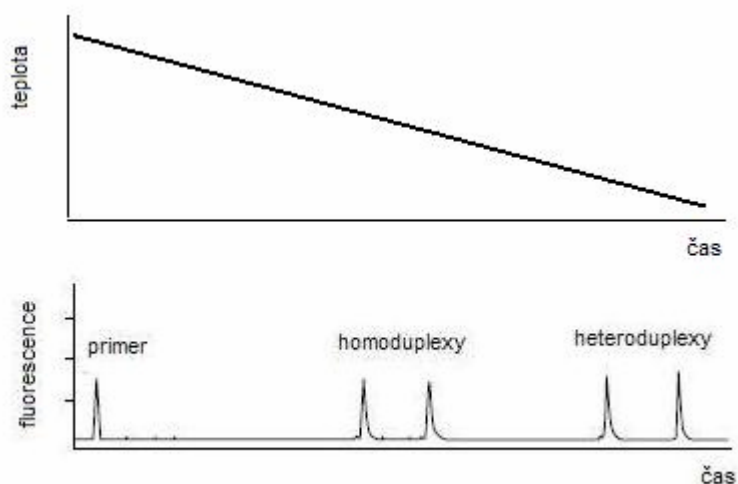
Nativní nebo denaturační provedení polyakrylamidové gelové elektroforézy patří rovněž mezi často využívané metody v genetické analýze. Jedná se obvykle o vertikální elektroforézu, kde jako matrice slouží směs připravená katalytickou polymerizací dvou monomerů, akrylamidu a N,N'-methylenbisakrylamidu. Velikost pórů polyakrylamidového gelu závisí nepřímo úměrně na koncentraci akrylamidu. Čím vyšší je koncentrace akrylamidu, tím menší jsou póry gelu. Tato metoda a její aplikace našly široké uplatnění nejen v molekulární biologii, ale také biochemii, imunologii, mikrobiologii, proteomice a dalších oborech.<sup>[64,67]</sup>

### ***Kapilární elektromigrační metody***

Kapilární elektromigrační metody jsou moderní separační techniky založené na elektroforetické migraci iontů v elektrickém poli. Obecně vynikají především malou spotřebou vzorku a činidel, velkou účinností separace, rychlostí analýzy a krátkou dobou potřebnou k optimalizaci separačních podmínek. Tyto metody



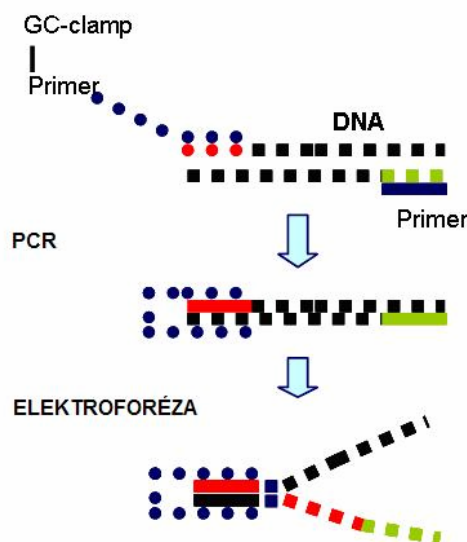
umožňují plnou automatizaci analýzy. Vlastní separace probíhá v kapilárách o vnitřním průměru několika desítek mikrometrů, zhotovených zpravidla z taveného křemene nebo z jiného materiálu. Základní kapilární techniky se liší médiem přítomným v separační koloně a vlastním mechanismem separace.



**Obrázek 15 - Teplotní gradientová kapilární elektroforéza heteroduplexů**

Jednou z moderních kapilárních elektromigračních metod je i teplotní denaturační kapilární elektroforéza. Narozdíl od běžné gelové elektroforézy, kde jsou fragmenty DNA děleny v matrici gelu podle své molekulové hmotnosti a náboje, kapilární gelová elektroforéza separuje analyty na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí. Gel v separační křemenné kapiláře brání vzniku elektroosmotického toku a zvyšuje rozdíly elektroforetických rychlostí. Vzorek je na kolonu zaváděn pomocí elektroendosmózy, množství naneseného vzorku je přímo úměrné intenzitě vloženého napětí. Při heteroduplexní analýze postupují fragmenty DNA (primery, homo- a heteroduplexy) gelem v postupně klesajícím teplotním gradientu. Při poklesu teploty pod hodnotu teploty tání se částečně denaturované (rozevřené) dvouřetězcové struktury renaturují, čímž dojde k změně jejich rychlosti při průchodu gelem. Fluorescenční detektor zaznamenává intenzitu fluorescence v závislosti na čase. Výsledkem analýzy je elektroforegram obsahující soubor píků. V přední části elektroforegramu jsou lokalizovány jednořetězcové primery, za nimi následují homoduplexní řetězce s nejvyšší teplotou tání a na závěr jsou eluovány heteroduplexní řetězce (viz. Obrázek 15). Výsledkem analýzy je jeden pík u homozygotního vzorku a čtyři píky u heterozygotního vzorku. Typ homozygota,

tzn. zda se jedná o alelu TA nebo CG, odhalíme smícháním analyzovaného vzorku se vzorkem známého homozygota a heterozygota.



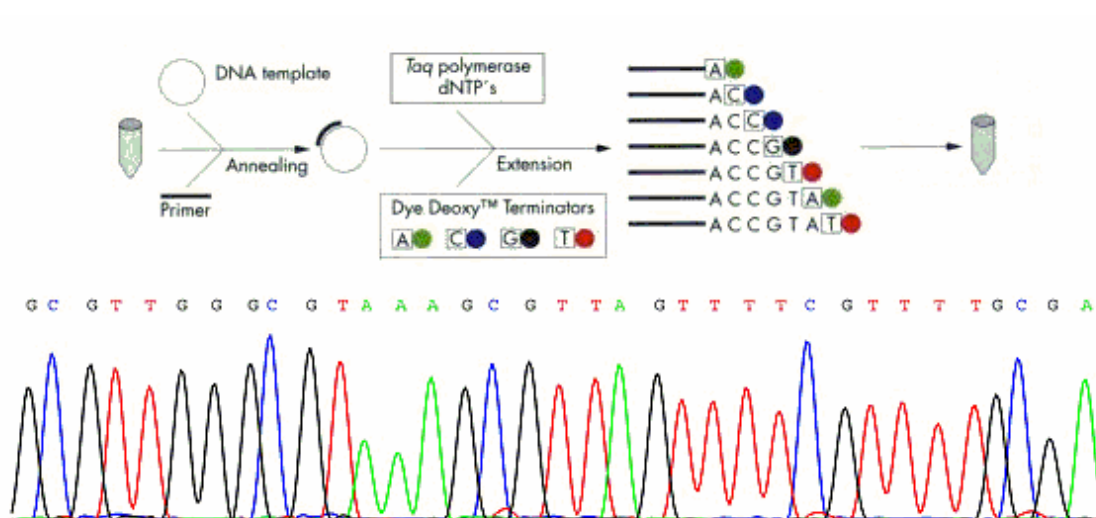
Obrázek 16 - Princip GC svorky<sup>[70]</sup>

Pro tento typ analýzy jsou navrhovány primery s fluorescenčním značením a tzv. GC svorkou (GC clamp), která po dobu analýzy zajišťuje pouze částečnou denaturaci dvouřetězcových úseků analyzované DNA. GC svorka je navržena jako krátký úsek nukleotidů (cca 50 bp) bohatý na guanin (G) a cytosin (C) s vysokou teplotou tání. Na svém 3'konci nese svorka sekvenci (cca 15 bp) kompatibilní s 5'koncem jednoho z primerů a na 5'konci sekvenci (cca 15 bp) kompatibilní s 3'koncem komplementárního řetězce. Po nasyntetizování komplementárního řetězce DNA v průběhu PCR reakce se naváže spojka na 3'konec komplementárního řetězce a spojí tak na jednom konci oba řetězce dohromady.<sup>[64,68,69,71]</sup> Princip GC svorky znázorňuje Obrázek 16.

### 3.3.6 Sekvenování

K přesnému určení primární struktury (pořadí jednotlivých nukleotidů) analyzovaného úseku DNA jsou využívány chemické a enzymatické metody sekvenování. V praxi je to nejčastěji automatické enzymové sekvenování DNA založené na principu konvenční Sangerovy metody. Jedná se v podstatě o provedení klasické PCR reakce za použití fluorescenčně značených dideoxyribonukleosidtrifosfátů (ddNTP), tzn. derivátů deoxyribonukleosidtrifosfátů

postrádající 3'-hydroxylovou skupinu. V případě, že je tento analog v průběhu PCR reakce začleněn do rostoucího řetězce DNA, chybějící 3'-hydroxylová skupina zabrání přidání dalšího nukleotidu a syntéza řetězce je ukončena. Produktem sekvenační reakce je potom směs různě dlouhých fragmentů DNA ukončených v různých místech fluorescenčně značeným analogem (ddNTP). Určení primární struktury DNA zajistí laserová detekce emise čtyř různých fluorescenčních barev (viz. Obrázek 17).<sup>[62,64]</sup>



Obrázek 17 - Enzymatické sekvenování DNA<sup>[64]</sup>

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Úkolem experimentální části diplomové práce bylo provedení genetické analýzy enzymu CYP2C9 u osob zařazených do farmakokinetické studie přípravku obsahujícího racemickou směs ibuprofenu, korelace získaných genetických dat s farmakokinetickými parametry, zpracování a statistické vyhodnocení výsledků.

### 4.1 Charakteristika subjektů

K hodnocení bylo vybráno celkem 20 zdravých dobrovolníků, mužů české národnosti (kavkazská populace), ve věku od 21 do 40 let, kteří absolvovali farmakokinetickou studii ibuprofenu realizovanou společností Pharmakl spol. s r.o. Tyto osoby souhlasily s provedením genetické analýzy, podepsaly informovaný souhlas a podstoupily základní lékařské a laboratorní vyšetření, které bylo součástí podmínek pro zařazení do farmakokinetické studie.

#### Podmínky pro zařazení do studie:

- muž
- věk 18 až 55 let
- hodnota BMI = 18-29
- lékařské vyšetření - interní fyziologický nálezn, orientován v čase a prostoru, bez výskytu neurologických a psychických poruch
- laboratorní vyšetření - bez klinicky významných odchylek a nálezu návykových látek
- osobní anamnéza - bez výskytu závažných onemocnění kardiovaskulárního systému, zažívacího traktu, metabolických poruch a poruch funkce jater a ledvin
- minimálně 14 dní před zahájením studie bez aplikace jakýchkoliv léků

#### **Tabulka 4 - Přehled základních podmínek pro zařazení do studie**

Věkový průměr dobrovolníků byl 27,8 let a průměrná hodnota BMI 23,1.

## 4.2 Farmakokinetická studie

*Farmakokinetická studie byla realizována společností Pharmakl spol. s r.o. Vedení společnosti souhlasilo s poskytnutím potřebných údajů a farmakokinetických dat pro účely této diplomové práce.*

### 4.2.1 Klinická část

Každému dobrovolníkovi byl za standardních podmínek podán nalačno přípravek obsahující 400 mg racemické směsi ibuprofenu. Krev byla odebírána z loketní žíly do plastových zkumavek obsahujících lithium-heparin v časových intervalech 0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 2,0; 2,5; 3; 4; 6; 9 a 12 hodin po podání léku. Celkem bylo odebráno 14 vzorků venózní krve o objemu cca 8 ml. Každý vzorek venózní krve byl nejpozději do 20 minut zcentrifugován. Získaný vzorek plazmy byl do doby analýzy uchováván v mrazícím boxu při teplotě cca -18°C.

### 4.2.2 Laboratorní část

Koncentrace ibuprofenu v plazmě byla zjišťována validovanou metodou HPLC dle předpisů správné laboratorní praxe (GLP) a standardních operačních postupů (SOP) společnosti Pharmakl spol. s r. o. Vzorky plazmy byly deproteinizovány methanolem, separovány na koloně s obrácenými fázemi a měřeny spektrofotometrickým detektorem při vlnové délce 220 nm. Metoda umožňovala stanovení koncentrace ibuprofenu v rozmezí 1-80 µg/ml.

V rámci diplomové práce byl sledován vliv genetických faktorů na farmakokinetické parametry  $AUC_{(0-\infty)}$ ,  $t_{1/2}$ ,  $C_{max}$  a  $t_{max}$ , které byly získány vyhodnocením koncentračních dat ibuprofenu u celkem 20 dobrovolníků po jednorázovém podání přípravku Nurofen Forte (Boots Healthcare International, Velká Británie). Hodnoty clearance (Cl) byly vypočteny z výše uvedených dat za použití vzorce<sup>[72]</sup>:

$$clearance = \frac{dávka}{AUC_{(0-\infty)}}$$

## 4.3 Genetická analýza

### 4.3.1 Biologický materiál

K získání DNA bylo odebráno cca 6 ml periferní krve do plastových zkumavek obsahujících antikoagulační činidlo EDTA. Vzorky krve byly do doby následného zpracování uchovávány v mrazícím boxu při teplotě cca -20°C. Genetická analýza byla provedena po ukončení farmakokinetické studie.

### 4.3.2 Chemikálie, kity a enzymy

**Izolace DNA:** JETQUICK Blood & Cell Culture DNA spin kit (Genomed, Německo); ethylalkohol čistý (Sigma Aldrich, USA); sterilní deionizovaná voda (Ultrapur 10 Super, Watrex, ČR).

**Gelová elektroforéza:** pufr TBE (Fluka, ČR); 10 mg/ml PCR ethidium bromid<sup>TB</sup> (Top-Bio, ČR); PCR agaróza<sup>TB</sup> (Top-Bio, ČR); PCR vkládací pufr<sup>TB</sup> (Top-Bio, ČR); 1kbp DNA ladder GeneRuler<sup>TM</sup> ready-to-use (Fermentas, Kanada); deionizovaná voda (Ultrapur 10 Super, Watrex, ČR).

**PCR a sekvenace:** PPP Master Mix s MgCl<sub>2</sub> (Top-Bio, s.r.o., ČR); PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, s.r.o., ČR); sekvenační premix (Amersham, USA); Exonuclease I – Exol (Genomac, ČR); Shrimp Alkaline Phosphatase – Sap (Genomac, ČR); Sephadex G50; sterilní deionizovaná voda (Ultrapur 10 Super, Watrex, ČR).

**Kapilární elektroforéza:** Denaturing matrix for sequencing and genotyping (Genomac, ČR); CE buffer (Genomac, ČR); GMC GeneTrace 500 fluorescent DNA (Genomac, ČR); deionizovaná voda (Ultrapur 10 Super, Watrex, ČR).

### 4.3.3 Oligonukleotidy

**Primery pro CYP2C9\*2 (VBC, Rakousko)**

CYP2C9\*2\_left

5'-CAG CAA TGG AAA GAA ATG GAA-3'

CYP2C9\*2\_right\_GC\_fl

5'-CGG GCG GGG GCG GCG GGA CGG GCG CGG GGC GCG GCG GGC GCC  
ACC CTT GGT TTT TCT CAA-3'

CYP2C9\*2\_right

5'-CCG CTT CAC ATG AGC TAA CA -3'

***Primery pro CYP2C9\*3 (VBC, Rakousko)***

CYP2C9\*3\_left\_GC\_fl

5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GAT  
GCA AGA CAG GAG CCA CAT-3'

CYP2C9\*3\_right

5'-CCT TGG GAA TGA GAT AGT TTC TG -3'

CYP2C9\*3\_left

5'-TCC AGG AAG AGA TTG AAC GTG-3'

#### **4.3.4 Přístrojové vybavení**

Biohazardní box s UV světlem (PBI International, Itálie); vertikální laminární PCR box s UV světlem (ESCO, USA); centrifuga MIKRO 20 (Hettich, Německo); centrifuga Universal 32 (Hettich, Německo); centrifuga MiniSpin (Eppendorf AG, Německo); inkubátor Delta Chrom<sup>TM</sup> Temperature Control Unit (Watrex, ČR); inkubátor Dry Bath genius (Major Science, USA); aparatura pro gelovou horizontální elektroforézu Mini Gel Unit (Scie-Plas, Velká Británie); transiluminátor UVT-14M, 312 nm (Herolab, Německo); nastavitelný zdroj stejnosměrného elektrického napětí ELITE 300 PLUS (Wealtec, USA); genetický analyzátor MegaBACE<sup>TM</sup> 1000 (GE Healthcare Bio-Sciences, USA); třepačka Vortex VELPR (Scientifica, Velká Británie); gradientový termocykler MJ Research (GMI, USA); digitální fotoaparát (Kodak, USA).

### **4.3.5 Počítačové programy**

MegaBACE configuration selector - MBCSTM (Genomac, ČR); Genetic Profiler (GE Biosciences, USA); Sequence Analyzer (GE Biosciences, USA); Sequencher (Gene Codes Corporation, USA).

### **4.3.6 Laboratorní pomůcky**

Jednokanálové pipety Research 2,5 µl, 10 µl, 100 µl a 1000 µl (Eppendorf AG, Německo); osmikanálová pipeta 10 µl (Eppendorf AG, Německo); elektronická osmikanálová pipeta Finnpipette Biocontrol 300 µl (Labsystems, Velká Británie); stojánek na mikrozkuhavky; chladicí stojánek.

### **4.3.7 Spotřební materiál**

Mikrozkuhavky (Axygene, USA); PCR destičky 96-well plate (Axygene, USA); Sample desalting 96-well filter plates (Genomac, ČR); špičky s filtrem 0,1-10 µl, 0,2-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Axygene, USA); špičky bez filtru 0,1-10 µl, 100-1000 µl (Axygene, USA); sterilní dělená buničina; sterilní pinzeta, lepící páska šířka 2,5 a 7,5 cm.

### **4.3.8 Pracovní postup**

#### ***Izolace DNA***

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) byla izolována z periferních buněk bílé krevní složky metodou extrakce na pevné fázi. K 100 µl vzorku nesrážlivé krve bylo přidáno 200 µl pufru JETQUICK T2 a 25 µl JETQUICK proteinkinázy K. Směs byla důkladně promíchána a inkubována po dobu 10 minut při teplotě 70°C. Poté byla mikrozkuhavka se vzorkem vložena do předem vychlazeného stojánku a vzorek vysrážen přidáním 150 µl 96% ledového ethanolu. Po promíchání byl obsah mikrozkuhavky přenesen na kolonku s odpadní mikrozkuhavkou umístěnou pod kolonkou a kolonka byla centrifugována po dobu 1 minuty při zrychlení 8000 g. Po centrifugaci byla odpadní mikrozkuhavka vyprázdněna. Na kolonku bylo nanášeno 500 µl promývacího pufru JETQUICK TX a kolonka byla opět centrifugována po dobu 1 minuty při zrychlení 8000 g. Po centrifugaci byla odpadní



mikrozkumavka vyprázdněna. Na kolonku bylo naneseo 500  $\mu$ l promývacího pufru JETQUICK T3 a kolonka byla centrifugována po dobu 1 minuty při zrychlení 8000 g. Odpadní mikrozkumavka byla vyprázdněna a kolonka byla centrifugována 2 minuty při zrychlení 10000 g. Poté byla celá odpadní mikrozkumavka odstraněna a pod kolonku byla vložena čistá mikrozkumavka pro jímání eluentu. Na střed kolonky bylo naneseo 100  $\mu$ l sterilní deionizované vody o teplotě cca 70°C, po dobu 1 minuty byla kolonka inkubována při laboratorní teplotě a poté centrifugována 2 minuty při zrychlení 8000 g. Kvalita a kvantita izolované DNA byla ověřena pomocí gelové elektroforézy.

### ***Gelová elektroforéza***

Pro účely gelové elektroforézy byl připraven 1,5% agarózový gel s přidavkem 5  $\mu$ l ethidium bromidu (10 mg/ml), který byl ponořen do 20 x ředěného TBE pufru (89 mmol/l tris-borát, 2 mmol/l EDTA, pH 8,3) cca 5 mm pod horní okraj vany. 3  $\mu$ l vzorku DNA byly smíchány se 2  $\mu$ l vkladacího pufru (bromfenolová modř). Takto připravená směs byla naneseo do jamky v agarózovém gelu. Na začátek a konec každé řady byl nanesen 1  $\mu$ l standardu 1kbp DNA ladder GeneRuler™. Elektroforéza probíhala po dobu cca 45 - 60 min při vloženém napětí 45 V. Po ukončení elektroforézy byla zhodnocena kvalita a kvantita izolované DNA srovnáním se standardním vzorkem. Pomocí digitálního fotoaparátu byl pořízen snímek gelu a spolu s příslušnými údaji uložen do počítačového systému laboratoře.

### ***Polymerázová řetězová reakce (PCR)***

Úseky DNA obsahující vyšetřované jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) byly amplifikovány metodou PCR. Do PCR směsi (PCR premixu) o výsledném objemu 10  $\mu$ l bylo odměřeno 5  $\mu$ l směsi PPP Master Mix s  $MgCl_2$ , 1  $\mu$ l levého primeru (5  $\mu$ mol/l), 1  $\mu$ l pravého primeru (5  $\mu$ mol/l) a 3  $\mu$ l DNA (cca 100 ng). Vzorky byly opatrně promíchány, krátce zcentrifugovány a vloženy do termocykleru s nastaveným programem HET60 pro vzorky CYP2C9\*2 a programem HET64 pro vzorky CYP2C9\*3 (viz. Tabulka 5). Pro každou PCR reakci a marker byly připraveny 3 negativní kontroly (ozn. NK1, NK2, NK3), do kterých byly do PCR směsi namísto 3  $\mu$ l DNA přidány 3  $\mu$ l sterilní deionizované vody.

CYP2C9*2			CYP2C9*3		
teplota	čas	počet cyklů	teplota	čas	počet cyklů
95°C	4 min	1x	95°C	4 min	1x
94°C	30 s	34x	94°C	30 s	34x
60°C	30 s		64°C	30 s	
72°C	1 min		72°C	1 min	
72°C	10 min	1x	72°C	10 min	1x
15°C	1 h	1x	15°C	1 h	1x

**Tabulka 5 - Programy HET60 a HET64**

Kvalita provedení a průběh PCR reakce byl opět ověřen metodou gelové elektroforézy. Hodnoceno bylo množství a koncentrace PCR produktů ve vzorku, nepřítomnost PCR produktů v negativních kontrolách a nežádoucích vedlejších produktů PCR reakce. Fotografie gelu s příslušným popisem byla uložena do počítačového systému laboratoře.

#### ***Tvorba heteroduplexů***

Produkty PCR reakce byly v termocykleru podrobeny heteroduplexnímu programu HT8MIN (viz. Tabulka 6), který znamenal denuraci a následnou reasociaci amplifikovaných úseků DNA (produktů PCR reakce).

teplota	čas	počet cyklů
95°C	8 min	1x
65°C	30 min	1x
15°C	1 min	1x

**Tabulka 6 - Heteroduplexní program HT8MIN**

#### ***Kapilární elektroforéza***

Přítomnost jednonukleotidových polymorfismů *CYP2C9\*2* (rs1799853; CGC→TGC; Arg144Cys) a *CYP2C9\*3* (rs1799853; ATT→CTT; Ile359Leu)

ve vzorku byla detekována na genetickém analyzátoru MegaBACE™ 1000 metodou teplotní denaturační kapilární elektroforézy. Vzorky připravené ke genetické analýze (po heteroduplexním programu) byly rozpipetovány a 100x naředěny do 96-jamkové destičky, a to 1 µl vzorku do 99 µl deionizované vody. Podobně byla připravena 96-jamková destička se známým heterozygotním vzorkem a destička se známým homozygotním vzorkem. Na genetickém analyzátoru byly nastaveny parametry pro analýzu (viz. Tabulka 7).

Výsledky analýzy byly vyhodnoceny pomocí programu Genetic Profiler. Pro ověření správnosti výsledků analýzy bylo provedeno kontrolní měření. Směsi vybraných homozygotních a heterozygotních vzorků byly podrobeny heteroduplexnímu programu (viz. Tvorba heteroduplexů), po jeho ukončení byly směsi analyzovány na genetickém analyzátoru spolu s destičkou se známým heterozygotem. Porovnáván byl počet píků, profil píků a jejich vzdálenost se standardním vzorkem heterozygota. U vzorků s nejasným výsledkem a zástupců homozygotních a heterozygotních vzorků bylo provedeno přímé sekvenování.

PARAMETR	HODNOTA
Elektrické napětí pro dávkování vzorku	3 kV
Doba dávkování vzorku	120 s
Teplota (Run Temperature)	56°C
Elektrické napětí (Internal Voltage)	8 kV
Celkový čas analýzy (Run Time)	75 min

**Tabulka 7 - Nastavení parametrů analýzy**

### **Sekvenace**

U PCR produktů vybraných vzorků byly pomocí směsi Exol/Sap enzymaticky odstraněny primery. Připravena byla sekvenační směs ve složení: 4 µl sekvenačního premixu, 1 µl levého primeru a 1 µl pravého primeru na 4 µl analyzovaného vzorku. Směs, analyzované vzorky a standardní vzorek byly rozpipetovány do mikrozkušavek umístěných v chladícím stojánku. Takto připravené vzorky byly zamíchány, krátce zcentrifugovány a vloženy do termocykleru s příslušným programem pro sekvenační reakci. Po ukončení programu byly ze vzorků

odstraněny ionty pomocí gelové filtrace na gelu Sephadex. V dávkovači bylo dle instrukcí výrobce odměřeno potřebné množství gelu, které bylo přeneseno do připravené 96-jamkové destičky. Do jamek v destičce bylo napipetováno 300  $\mu$ l deionizované vody, destička byla přelepena izolační páskou a inkubována při laboratorní teplotě cca 2 hodiny. Poté byla pod destičku umístěna odpadní destička a celá souprava centrifugována po dobu 5 minut při zrychlení 910 g k odstranění přebytečné množství vody z jamek. Na destičku bylo nanášeno 100  $\mu$ l deionizované vody a opět provedena centrifugace po dobu 5 minut při zrychlení 910 g. Pod destičku byla vložena sterilní PCR destička a na střed sephadexového sloupce byla do jamek nanášena směs 10  $\mu$ l vzorku a 10  $\mu$ l deionizované vody. Destička byla centrifugována po dobu 5 minut při zrychlení 910 g. Eluent byl rozpipetován po 10  $\mu$ l do 96-jamkové destičky a na genetickém analyzátoru byl zahájen program pro sekvenaci. V programu Sequencher bylo ověřeno, zda byla metoda analýzy heteroduplexů vyvinuta správně a v sekvenované oblasti DNA se nenachází jiný typ polymorfismu nebo neznámá mutace.

#### **4.3.9 Statistické hodnocení**

K statistickému zpracování výsledků měření bylo použito Studentova a Grubbsova testu. Data získaná od celkem 20 dobrovolníků byla na základě genotypu rozdělena do 3 skupin: CYP2C9\*1/\*1, CYP2C9\*1/\*2 a CYP2C9\*3/\*3. Farmakokinetická data dobrovolníků s genotypem CYP2C9\*1/\*2 a CYP2C9\*3/\*3 nesoucí polymorfismus snižující aktivitu enzymu byla statisticky porovnávána s daty dobrovolníků s genotypem CYP2C9\*1/\*1, označovaný také jako wilde type (wt), kódujícího normální aktivitu enzymu. Pro statistické hodnocení dat CYP2C9\*1/\*1 a CYP2C9\*1/\*2 bylo použito Studentova testu. Protože skupina nesoucí genotyp CYP2C9\*3/\*3 byla zastoupena pouze jediným dobrovolníkem, data CYP2C9\*1/\*1 a CYP2C9\*3/\*3 byla porovnávána pomocí Grubbsova testu na testování odlehlosti výsledků.

### Grubbsův test:

- výpočet hodnoty Grubbsova kritéria<sup>[73]</sup>

$$T_i = \left| \frac{x_i - \bar{x}}{S_i} \right| \quad S_i = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_1^n (x_i - \bar{x})^2}$$

- určení kritické hodnoty Grubbsova testu  $T_\alpha$

n	kritické hodnoty $T_\alpha$			
	$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,025$	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,10$
10	2,540	2,414	2,294	2,146
11	2,606	2,470	2,343	2,190
12	2,663	2,519	2,387	2,229
13	2,714	2,562	2,426	2,264
14	2,759	2,602	2,461	2,297
15	2,800	2,638	2,493	2,326
16	2,837	2,670	2,523	2,354
17	2,871	2,701	2,551	2,380
18	2,903	2,728	2,557	2,404
19	2,932	2,754	2,600	2,426
20	2,959	2,778	2,623	2,447

Tabulka 8 - Kritické hodnoty  $T_\alpha$  pro vylučování odlehlých výsledků<sup>[73]</sup>

- hodnocení výsledků testování

Grubbsův test - rozhodování	
$\alpha < 0,01$	statisticky vysoce významně odlehlý
$0,01 \leq \alpha < 0,05$	statisticky významně odlehlý
$0,05 \leq \alpha < 0,10$	statisticky málo významně odlehlý
$0,10 \leq \alpha$	není odlehlý

Tabulka 9 - Hodnocení statistické významnosti pro Grubbsův test<sup>[73]</sup>

### Studentův test:

- výpočet hodnoty Studentova kritéria pro  $n_A \neq n_B$ <sup>[73]</sup>

$$t = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{\sqrt{\frac{s_A^2}{n_A - 1} + \frac{s_B^2}{n_B - 1}}}$$

- určení kritické hodnoty  $t_\alpha$ , je-li poměr  $s_A^2$  a  $s_B^2$  statisticky nevýznamný

$$v = n_A + n_B - 2$$

v	kritické hodnoty $t_\alpha$		
	$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,1$
16	2,921	2,120	1,746
17	2,898	2,110	1,740
18	2,878	2,101	1,734
19	2,861	2,093	1,729
20	2,845	2,086	1,725

Tabulka 10 - Kritické hodnoty Studentova rozdělení  $t_\alpha$ <sup>[73]</sup>

- hodnocení výsledků testování

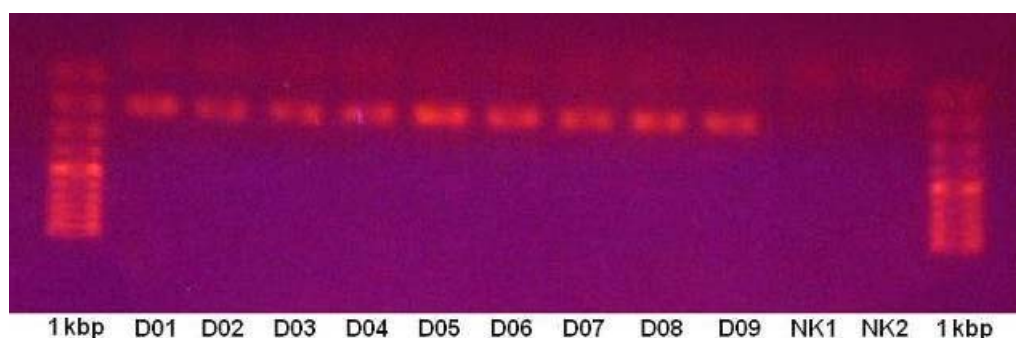
Studentův test - rozhodování	
$\alpha < 0,01$	statisticky vysoce významný
$0,01 \leq \alpha < 0,05$	statisticky významný
$0,05 \leq \alpha < 0,1$	statisticky málo významný
$0,1 \leq \alpha$	statisticky nevýznamný

Tabulka 11 - Hodnocení statistické významnosti pro Studentův test<sup>[73]</sup>

## 4.4 Výsledky

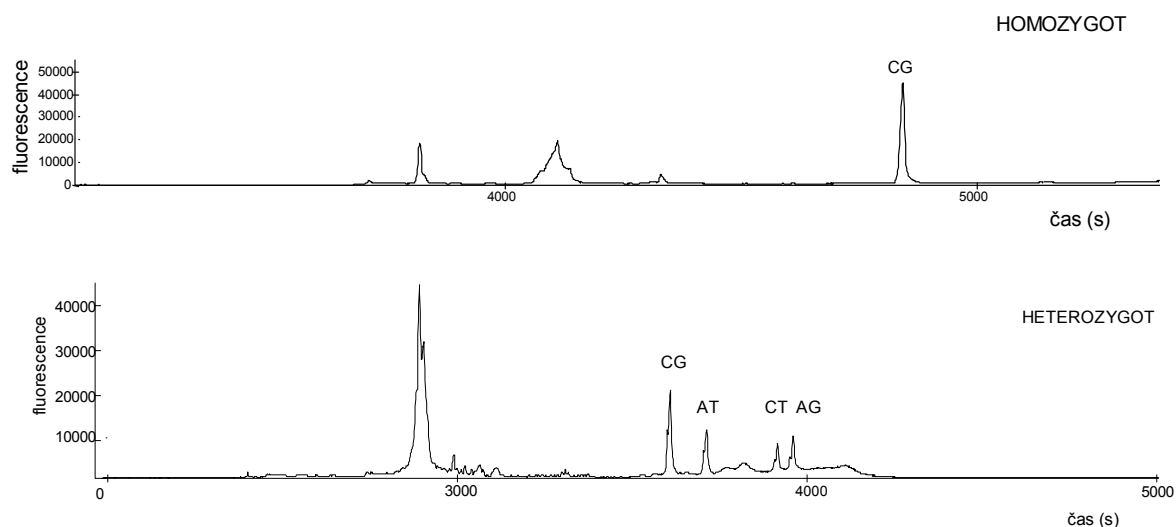
### 4.4.1 Genetická analýza

Ze vzorků periferní krve všech 20 dobrovolníků byla izolována DNA metodou adsorpce na silikátový povrch kolony. Výše uvedenou metodou PCR byla provedena amplifikace dvou úseků genu kódujícího enzym CYP2C9, tzn. *CYP2C9\*2* a *CYP2C9\*3*. Pomocí klasické agarózové gelové elektroforézy byl zhodnocen výsledek izolace DNA a amplifikace cílových úseků genu (viz. Obrázek 18).



Obrázek 18 – Ukázka záznamu elektroforézy produktů PCR

Produkty PCR reakce byly podrobeny heteroduplexnímu programu a následně analyzovány metodou teplotní denaturační kapilární elektroforézy na genetickém analyzátoru MegaBACE™ 1000 (viz. Obrázek 19).



Obrázek 19 - Elektroforegram homozygotního a heterozygotního vzorku v genu *CYP2C9\*3*  
(C = cytosin, G = guanin, A = adenin, T = thymin)

Ze získaných elektroforegramů byl u každého vzorku dobrovolníka odečten genotyp *CYP2C9*\*2 a *CYP2C9*\*3. U vzorků s nejasným elektroforetickým záznamem a pro potvrzení správnosti měření u vybraných homo- a heterozygotních vzorků bylo provedeno enzymatické sekvenování.

Výsledky genetické analýzy byly zpracovány do níže uvedené tabulky a následně byl vyhodnocen výsledný genotyp enzymu *CYP2C9* dobrovolníka (viz. Tabulka 12).

dobrovolník	<i>CYP2C9</i> *2	<i>CYP2C9</i> *3	genotyp
D01	CC	AA	*1/*1
D02	CC	AA	*1/*1
D03	CC	AA	*1/*1
D04	CC	CC	*3/*3
D05	CC	AA	*1/*1
D06	CC	AA	*1/*1
D07	CT	AA	*1/*2
D08	CC	AA	*1/*1
D09	CC	AA	*1/*1
D10	CC	AA	*1/*1
D11	CC	AA	*1/*1
D12	CC	AA	*1/*1
D13	CC	AA	*1/*1
D14	CC	AA	*1/*1
D15	CC	AA	*1/*1
D16	CT	AA	*1/*2
D17	CC	AA	*1/*1
D18	CC	AA	*1/*1
D19	CC	AA	*1/*1
D20	CC	AA	*1/*1

**Tabulka 12 - Vyhodnocení genetické analýzy *CYP2C9***

#### 4.4.2 Statistické testování

Při porovnávání hodnot jednotlivých farmakokinetických parametrů mezi genotypy *CYP2C9*\*1/\*1 a *CYP2C9*\*1/\*2 pomocí Studentova testu nebyl nezjištěn žádný statisticky vysoce významný rozdíl ( $\alpha = 0,01$ ). Mezi hodnotami farmakokinetického parametru  $t_{\max}$  genotypu *CYP2C9*\*1/\*1 a *CYP2C9*\*1/\*2 byl nalezen pouze statisticky významný rozdíl ( $\alpha = 0,05$ ).

K statistickému testování hodnot farmakokinetických parametrů mezi genotypy *CYP2C9*\*1/\*1 a *CYP2C9*\*3/\*3 nebylo možné použít standardní způsob testování pomocí Studentova testu. Hodnoty *CYP2C9*\*3/\*3 byly proto testovány



formou Grubbsova testu na odlehlost výsledků. V tomto případě byly odhaleny statisticky vysoce významné rozdíly ( $\alpha = 0,01$ ) mezi genotypy CYP2C9\*1/\*1 a CYP2C9\*3/\*3, a to u parametrů  $AUC_{(0-\text{inf})}$ ,  $t_{1/2}$  a clearance (viz. Tabulka 13).

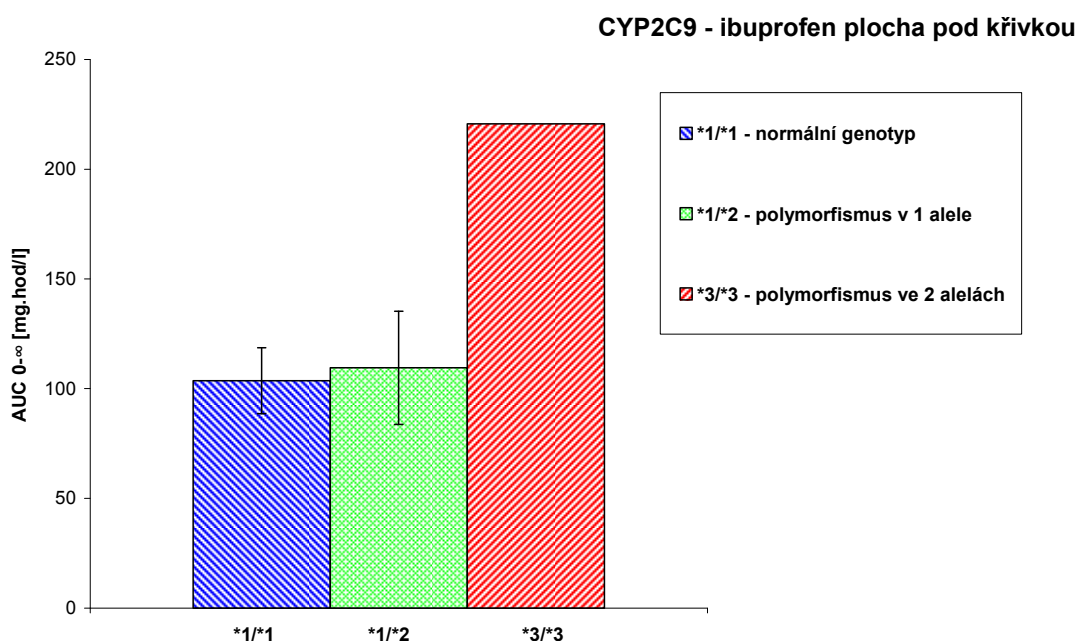
dobrovolník	CYP2C9	$AUC_{(0-\text{inf})}$ [mg.h/l]	$t_{1/2}$ [h]	clearance [l/h]	$C_{\text{max}}$ [μg/ml]	$t_{\text{max}}$ [h]
D01	*1/*1	103,6	2,22	3,86	22,6	0,75
D02	*1/*1	99,4	1,58	4,03	29,8	0,75
D03	*1/*1	97,3	1,44	4,11	38,9	0,75
D05	*1/*1	99,9	1,95	4,00	31,3	1,00
D06	*1/*1	96,0	1,77	4,17	33,6	0,50
D08	*1/*1	93,8	1,88	4,26	26,9	0,75
D09	*1/*1	108,8	1,84	3,68	36,3	1,00
D10	*1/*1	128,9	2,04	3,10	45,4	1,00
D11	*1/*1	100,8	2,11	3,97	30,4	1,00
D12	*1/*1	147,1	2,18	2,72	36,6	1,25
D13	*1/*1	81,16	1,76	4,93	29,4	1,00
D14	*1/*1	94,48	2,00	4,23	22,5	2,50
D15	*1/*1	116,0	1,91	3,45	26,6	0,75
D17	*1/*1	93,5	1,93	4,28	29,1	1,00
D18	*1/*1	110,4	1,88	3,62	30,0	1,00
D19	*1/*1	94,5	1,86	4,23	24,3	1,50
D20	*1/*1	95,0	1,88	4,21	34,5	1,00
D07	*1/*2	83,7	1,94	4,78	26,1	1,50
D16	*1/*2	135,3	1,76	2,96	34,4	2,00
D04	*3/*3	220,7	3,61	1,81	34,8	1,50
<b>Studentův test (t)</b>	*1/*1 *1/*2	0,161	0,424	0,069	0,185	2,637 <sup>†</sup>
<b>statistická významnost (<math>\alpha = 0,01</math>)</b>		ne	ne	ne	ne	ne
<b>Grubbsův test</b>	*1/*1 *3/*3	6,48	7,86	3,69	0,60	1,03
<b>statistická významnost (<math>\alpha = 0,01</math>)</b>		ano	ano	ano	ne	ne

pozn.: <sup>†</sup> odlehlost je statisticky významná ( $0,01 < \alpha \leq 0,05$ )

**Tabulka 13 - Statistické testování hodnot farmakokinetických parametrů CYP2C9\*1/\*2 a CYP2C9\*3/\*3 proti CYP2C9\*1/\*1**

## 4.5 Diskuze

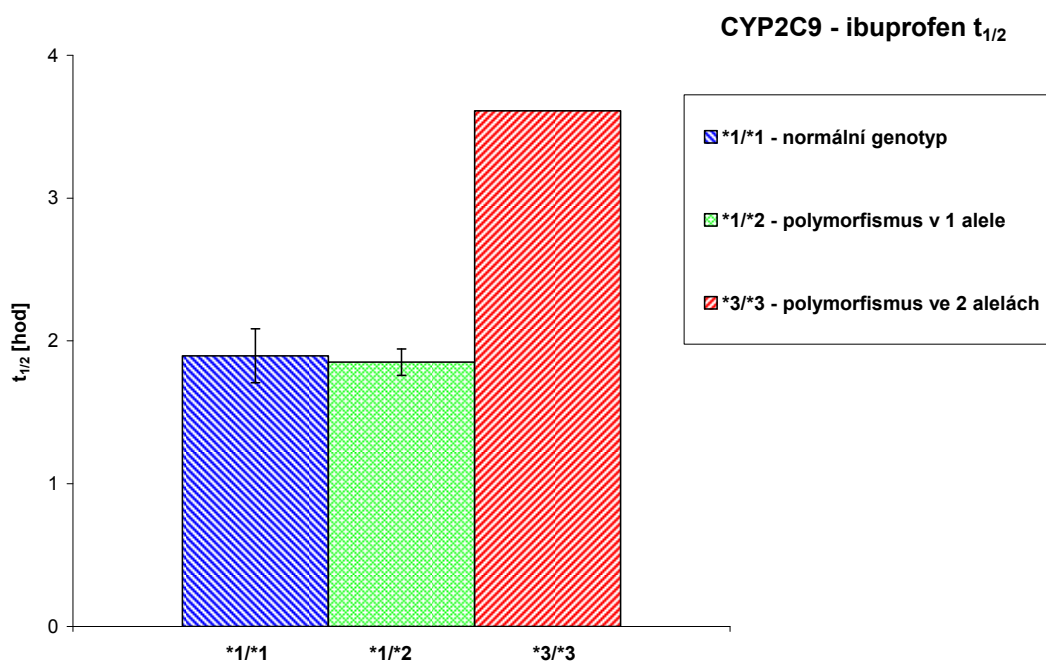
Z dvaceti testovaných dobrovolníků české národnosti bylo identifikováno celkem 17 nosičů genotypu CYP2C9\*1/\*1, 2 nosiči genotypu CYP2C9\*1/\*2 a 1 nosič genotypu CYP2C9\*3/\*3. Frekvence výskytu alel odpovídala rozložení v kavkazské populaci.<sup>[51]</sup> Mezi dvaceti testovanými osobami byl přítomen jeden nosič genotypu CYP2C9\*3/\*3, který se v dané populaci vyskytuje vzácně s frekvencí kolem 0,4%.<sup>[3]</sup>



**Obrázek 20 - Histogram plochy pod křivkou ( $AUC_{0-\infty}$ ) v závislosti na genotypu enzymu CYP2C9**

Údaje získané z farmakokinetické studie korelovaly s genotypem dobrovolníků. Bylo zjištěno, že nosiči genotypu CYP2C9\*1/\*2 nevykazují žádné statisticky významné odchylky v hodnotách farmakokinetických parametrů  $AUC_{(0-\infty)}$ ,  $t_{1/2}$  a clearance oproti genotypu CYP2C9\*1/\*1, tzn. oproti nosičům genu kódujícího normální funkci enzymu. Statisticky vysoce významné odchylky byly zjištěny v parametrech  $AUC_{(0-\infty)}$  a  $t_{1/2}$  u nosičů genotypu CYP2C9\*3/\*3, kde hodnota  $AUC_{(0-\infty)}$  byla vyšší o 113% a hodnota  $t_{1/2}$  o 90% oproti průměrným hodnotám u nosičů genotypu CYP2C9\*1/\*1. Histogram hodnot  $AUC_{(0-\infty)}$  a  $t_{1/2}$  dle genotypu dobrovolníka znázorňuje Obrázek 20 a 21. Statisticky významně odlehlá byla u genotypu CYP2C9\*3/\*3 také hodnota clearance, která byla o 54% nižší než

průměrná hodnota nosičů genotypu CYP2C9\*1/\*1. Histogram hodnot clearance dle genotypu dobrovolníka znázorňuje Obrázek 22. Hodnoty farmakokinetického parametru  $t_{max}$  genotypu CYP2C9\*1/\*1 vykazovaly ve srovnání s genotypem CYP2C9\*1/\*2 statisticky významnou odchylku, statisticky nevýznamný rozdíl byl zjištěn při porovnání hodnot tohoto parametru s genotypem CYP2C9\*3/\*3. Jako statisticky nevýznamné byly rovněž vyhodnoceny rozdíly mezi soubory  $c_{max}$ , a to jak u genotypu CYP2C9\*1/\*2 tak CYP2C9\*3/\*3. Závislost průměrné hodnoty  $c_{max}$  na čase podle genotypu dobrovolníka graficky znázorňuje Obrázek 23.

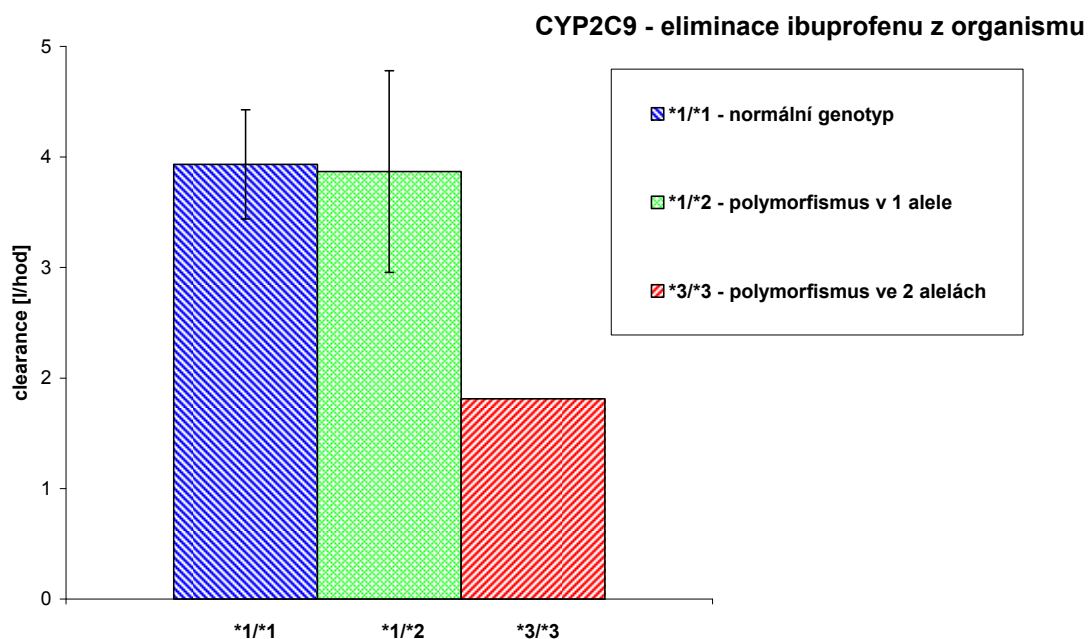


**Obrázek 21 - Histogram  $t_{1/2}$  v závislosti na genotypu enzymu CYP2C9**

Hodnota  $t_{max}$  se neliší dle genotypu dobrovolníka nejen z důvodů nízkého počtu osob v zastoupených jednotlivých genotypových skupinách, ale pravděpodobně také protože není významně závislá pouze na aktivitách biotransformačních enzymů. Farmakokinetický parametr  $t_{max}$  charakterizuje především rychlost resorpce látky ze žaludku a střeva do krve a jeho hodnota je proto výrazně ovlivněna i dalšími vlastnostmi organismu jako například pH žaludku a střev, mechanismus prosté difúze, exprese transportérů, apod.

Otázka farmakokinetického parametru  $c_{max}$  zůstává otevřená. I přestože ve studiích, které již byly publikovány, prokázaly statisticky významné rozdíly mezi genotypy CYP2C9\*1/\*1 a CYP2C9\*3/\*3, zde se tuto skutečnost prokázat

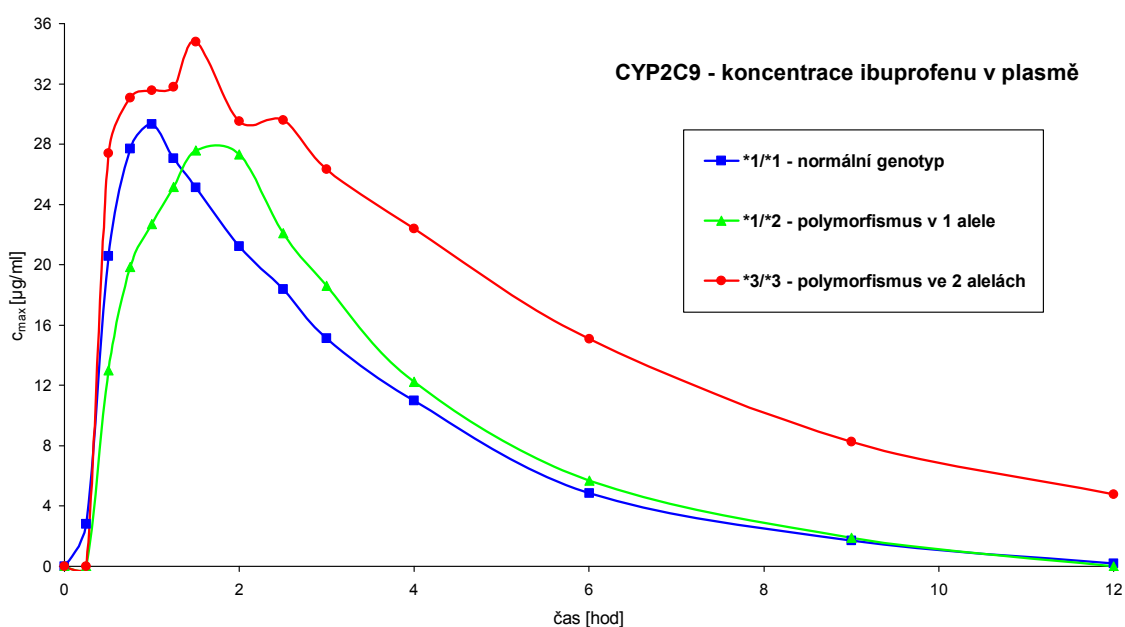
nepodařilo.<sup>[24,75]</sup> Jedním z možných vysvětlení může být fakt, že podobně jako  $t_{max}$  také hodnota farmakokinetického parametru  $c_{max}$  není závislá pouze na aktivitě biotransformačních enzymů, ale i na dalších faktorech, které ji významně ovlivňují. Na základě výsledků některých studií lze rovněž uvažovat, že o tom, jakou roli hrají genotypy dalších enzymů, které se za normálních okolností na metabolismu léku podílí pouze částečně nebo méně významně, v tomto případě např. enzymu CYP2C8.<sup>[74-76]</sup> Ve studii provedené na 130 španělských dobrovolnících bylo například zjištěno, že nosiči genotypu CYP2C9\*3/\*3 mohou dosahovat přibližně stejných hodnot  $c_{max}$  jako nosiči genotypu CYP2C9\*1/\*1, a to v případě je-li současně exprimován genotyp CYP2C8\*1/\*3. Na druhé straně statisticky významné odchylky ve svých farmakokinetických parametrech od CYP2C9\*1/\*1 vykazovali v kombinaci s CYP2C8\*1/\*3 nosiči genotypu CYP2C9\*1/\*2.<sup>[75]</sup> Zajímavá na této práci je také vysoká variabilita v hodnotách jednotlivých farmakokinetických parametrů u osob nesoucí genotyp nebo kombinace genotypů výrazně snižující aktivitu hlavních biotransformačních enzymů.



**Obrázek 22 - Histogram clearance v závislosti na genotypu enzymu CYP2C9**

Vliv genotypu enzymu CYP2C9 na metabolismus léků byl rovněž studován ve vztahu k rozvoji nežádoucích účinků spojených s léčbou NSAID. Klinické studie provedené na pacientech s výskytem gastroduodenálního krvácení nebo ulcerace v anamnéze po dlouhodobém užívání NSAID ukazují, že nosičství genotypu

CYP2C9\*1/\*2, CYP2C9\*1/\*3 a CYP2C9\*2/\*3 není asociováno se zvýšeným rizikem rozvoje gastroduodenálního krvácení,<sup>[14,77-79]</sup> naopak je tomu u osob nesoucích určitou kombinaci genotypů CYP2C8\*3 a CYP2C9\*2.<sup>[80]</sup> Studie zaměřené na rozvoj nežádoucích účinků u nosičů genotypu CYP2C9\*3/\*3 se statisticky relevantním rozsahem dat nebyly dosud publikovány. Na základě výše uvedených studií a získaných farmakokinetických dat lze ovšem předpokládat, že nosiči genotypu CYP2C9\*3/\*3 budou při dlouhodobé nebo nevhodně indikované léčbě NSAID ohroženi vyššími hladinami účinné látky v krvi, sníženou schopností její eliminace z organismu a tak i vyšším rizikem rozvoje závažných nežádoucích účinků.



**Obrázek 23 - Závislost koncentrace ibuprofenu v plazmě na čase**

## 5. ZÁVĚR

V diplomové práci byl sledován vliv genotypu enzymu CYP2C9 na farmakokinetické parametry ( $AUC_{(0-inf)}$ ,  $t_{1/2}$ , clearance,  $c_{max}$  a  $t_{max}$ ) přípravku obsahujícího 400 mg racemické směsi ibuprofenu. Pro účely hodnocení byla použita data 20 zdravých dobrovolníků (muži, věk 21 - 40 let, kavkazská populace), kteří se zúčastnili farmakokinetické studie po jednorázovém podání přípravku Nurofen forte. U těchto osob byla provedena genetická analýza enzymu CYP2C9. Hodnoty farmakokinetických parametrů a výsledky genetické analýzy byly zpracovány do tabulek a grafů. Přehledný souhrn uvádí Tabulka 14. K statistickému hodnocení bylo použito Studentova a Grubbsova testu.

	CYP2C9		
	*1/*1	*1/*2	*3/*3
počet subjektů	17	2	1
frekvence výskytu	85%	10%	5%
$AUC_{0-inf}$ [mg.hod/l]	103,6 (81,2 - 147,1)	109,5 (83,7 - 135,3)	220,7
$t_{1/2}$ [hod]	1,90 (1,44 - 2,22)	1,85 (1,76 - 1,94)	3,61
clearance [l/hod]	3,93 (2,72 - 4,93)	3,87 (2,96 - 4,78)	1,81
$c_{max}$ [ng/ml]	31,1 (22,5 - 45,4)	30,3 (26,1 - 34,4)	34,8
$t_{max}$ [hod]	1,03 (0,50 - 2,50)	1,75 (1,50 - 2,00)	1,50

**Tabulka 14 - Vliv genotypu CYP2C9 na farmakokinetické parametry přípravku obsahujícího racemickou směs ibuprofenu**

Bylo zjištěno, že hodnoty farmakokinetických parametrů nosičů genotypu CYP2C9\*1/\*2 se významně neliší od genotypu CYP2C9\*1/\*1 kódujícího normální aktivitu enzymu. Významné rozdíly ve farmakokinetických parametrech byly objeveny u genotypu CYP2C9\*3/\*3. Osoba s genotypem CYP2C9\*3/\*3 měla o 113% vyšší biologickou dostupnost, o 90% vyšší poločas eliminace a o 54% nižší hodnotu clearance. Vzhledem k rozvoji závažných nežádoucích účinků spojených s léčbou NSAID, který je prokazatelně asociován s rostoucí biologickou dostupností léku a jeho sníženou eliminací z organismu, je vhodné co nejlépe optimalizovat dávku dle individuálních potřeb pacienta. Z výsledků práce vyplývá, že standardní doporučené denní dávkování léku uváděné na příbalových letáčích výrobce je

vhodné pouze osoby s genotypem CYP2C9\*1/\*1 a CYP2C9\*1/\*2. Dávkování léku pro nosiče genotypu CYP2C9\*3/\*3 by mělo být sníženo až na polovinu doporučené denní dávky.

Farmakogenetická analýza byla v této práci provedena na limitovaném souboru osob, který vyhovoval účelům realizované farmakokinetické studie zaměřené na posouzení farmakokinetických vlastností dvou odlišných lékových formulací. Statisticky vysoce významnou odchylku od genotypu CYP2C9\*1/\*1, kódujícího normální funkci enzymu, prokázal v farmakokinetických parametrech  $AUC_{(0-\infty)}$ ,  $t_{1/2}$  a clearance genotyp CYP2C9\*3/\*3, který byl zastoupen jediným dobrovolníkem. Výsledky této analýzy je proto nutné chápat jako orientační výsledky pilotní studie. Provedení stejné farmakogenetické studie na větším souboru osob a tedy s vyšším zastoupením v genotypové skupině CYP2C9\*3/\*3 by umožnilo získat statisticky validní údaje o farmakokinetice ibuprofenu v závislosti na genetické výbavě jedince, která by umožnila vypracování validních směrnic pro individualizaci dávkování v klinické praxi .

## 6. LITERATURA

1. Hynie S.: Farmakologie v kostce, Triton, Praha 2001.
2. Phillips K.A., Veenstra D.L., Oren E., Lee J.K., Sadee W.: Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *JAMA* 2001; 286(18): 2270-9.
3. Roots I., Laschinski G., Arjomand-Nahad F., Kirchheiner J., Schwarz D., Brockmöller J., Cascorbi I. and Gerloff T.: Genotype and Phenotype Relationship in Drug Metabolism. Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings 2007; 59: 81-100.
4. Šeda O., Liška F., Šedová L.: Aktuální genetika. Multimediální učebnice lékařské biologie, genetiky a genomiky, Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. lékařská fakulta Univerzita Karlova a Vinohradská fakultní nemocnice, Praha 2005-2006, <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/farmakogenetika.htm> - 12.10. 2008.
5. Lüllmann H., Mohr K., Hein L.: Barevný atlas farmakologie, Grada, Praha 2007.
6. Motulsky A.G., Qi M.: Pharmacogenetics, pharmacogenomics and ecogenetics. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006; 7(2): 169-70.
7. Propping P., Bartram C.R.: Friedrich Vogel 1925 - 2006. *Hum Genet.* 2007; 120: 751-3.
8. Cascorbi I.: Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther.* 2006; 112 (2): 457-73.
9. PACE 2010: Nesteroidní antirevmatika. Apotex (ČR) spol. s r.o., [http://www.pace.cz/go/archiv\\_p\\_0202\\_1](http://www.pace.cz/go/archiv_p_0202_1) - 2.10. 2008.
10. Státní ústav pro kontrolu léčiv: Souhrn údajů o přípravku Nurofen forte. [http://old.sukl.cz/\\_download/spc/SPC64753.doc](http://old.sukl.cz/_download/spc/SPC64753.doc) - 16.2.2009.
11. Státní ústav pro kontrolu léčiv: Souhrn údajů o přípravku Ibalgin 400. <http://www.sukl.cz/download/spc/SPC88877.doc> - 16.2.2009.
12. Potthast H., Dressman J.B., Junginger H.E., Midha K.K., Oeser H., Shah V.P., Vogelpoel H., Barends D.M.: Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ibuprofen. *J Pharm Sci.* 2005; 94 (10): 2121-31.
13. Davies N.M.: Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. *Clin Pharmacokinet.* 1998; 34 (2): 101-54.
14. Pilotto A., Seripa D., Franceschi M., Scarcelli C., Colaizzo D., Grandone E., Niro V., Andriulli A., Leandro G., Di Mario F., Dallapiccola B.: Genetic susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drug-related gastroduodenal bleeding: role of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Gastroenterology.* 2007; 133 (2): 465-71.
15. Státní ústav pro kontrolu léčiv: Spotřeba léčiv v České republice v letech 2001 - 2007. <http://www.sukl.cz> - 2.10. 2008.
16. PACE 2010: Nesteroidní protizánětlivé léky. Apotex (ČR) spol. s r.o., [http://www.pace.cz/go/archiv\\_p\\_0202\\_2](http://www.pace.cz/go/archiv_p_0202_2) - 2.10. 2008.
17. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR: Aktuální informace 2000 - 2007. <http://www.uzis.cz> - 2.10.2008.



18. Štaud F.: NSAID, Antirevmatika - přednáška z předmětu Toxikologie a farmakologie, Hradec Králové 2007, Farmaceutická fakulta Univerzita Karlova.
19. Wolfe M.M.: Future trends in the development of safer nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med.* 1998; 105 (5A): 44S-52S.
20. Rodrigues A.D.: Impact of CYP2C9 genotype on pharmacokinetics: are all cyclooxygenase inhibitors the same? *Drug Metab Dispos.* 2005; 33 (11): 1567-75.
21. Brune K.: Persistence of NSAIDs at effect sites and rapid disappearance from side-effect compartments contributes to tolerability. *Curr Med Res Opin.* 2007; 23 (12): 2985-95.
22. Zentiva, a.s.: Souhrn údajů o přípravku Ibalgin® fast.  
<http://www.ibalgin.cz/default.aspx/cz/chc/xyxycccv/default/menu/proodborniky/ibalginfast> - 20.2. 2009.
23. Hamman M.A., Thompson G.A., Hall S.D.: Regioselective and stereoselective metabolism of ibuprofen by human cytochrome P450 2C. *Biochem Pharmacol.* 1997; 54 (1): 33-41.
24. Kirchheiner J., Meineke I., Freytag G., Meisel C., Roots I., Brockmöller J.: Enantiospecific effects of cytochrome P450 2C9 amino acid variants on ibuprofen pharmacokinetics and on the inhibition of cyclooxygenases 1 and 2. *Clin Pharmacol Ther.* 2002; 72 (1): 62-75.
25. Reichel C., Brugger R., Bang H., Geisslinger G., Brune K.: Molecular cloning and expression of a 2-arylpropionyl-coenzyme A epimerase: a key enzyme in the inversion metabolism of ibuprofen. *Mol Pharmacol.* 1997; 51 (4): 576-82.
26. Chang S.Y., Li W., Traeger S.C., Wang B., Cui D., Zhang H., Wen B., Rodrigues A.D.: Confirmation that cytochrome P450 2C8 (CYP2C8) plays a minor role in (S)-(+)- and (R)-(-)-ibuprofen hydroxylation in vitro. *Drug Metab Dispos.* 2008; 36 (12): 2513-22.
27. Tan S.C., Patel B.K., Jackson S.H., Swift C.G., Hutt A.J.: Stereoselectivity of ibuprofen metabolism and pharmacokinetics following the administration of the racemate to healthy volunteers. *Xenobiotica.* 2002; 32 (8): 683-97.
28. Bjarnason I., Hayllar J., MacPherson A.J., Russell A.S.: Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology.* 1993; 104 (6): 1832-47.
29. Lewis J.D., Kimmel S.E., Localio A.R., Metz D.C., Farrar J.T., Nessel L., Brensinger C., McGibney K., Strom B.L.: Risk of serious upper gastrointestinal toxicity with over-the-counter nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterology.* 2005;129 (6): 1865-74.
30. Moore N.: Ibuprofen: a journey from prescription to over-the-counter use. *J R Soc Med.* 2007; 100 (Suppl 48): 2-6.
31. Magill P., Ridgway P.F., Conlon K.C., Neary P.: A case of probable ibuprofen-induced acute pancreatitis. *JOP.* 2006; 7 (3): 311-4.
32. Purcell H.: Ibuprofen and cardiovascular safety: where do we stand? *J R Soc Med.* 2007; 100 (Suppl 48): 7-10.

33. Bjarnason I.: Ibuprofen and gastrointestinal safety: a dose-duration-dependent phenomenon. *J R Soc Med.* 2007; 100 (Suppl 48): 11-4.
34. Lewis S.C., Langman M.J., Laporte J.R., Matthews J.N., Rawlins M.D., Wiholm B.E.: Dose-response relationships between individual nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NNSAIDs) and serious upper gastrointestinal bleeding: a meta-analysis based on individual patient data. *Br J Clin Pharmacol.* 2002; 54 (3): 320-6.
35. Henry D., Lim L.L., Garcia Rodriguez L.A., Perez Gutthann S., Carson J.L., Griffin M., Savage R., Logan R., Moride Y., Hawkey C., Hill S., Fries J.T.: Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. *BMJ.* 1996; 312 (7046): 1563-6.
36. Fries J.F., Murtagh K.N., Bennett M., Zatarain E., Lingala B., Bruce B.: The rise and decline of nonsteroidal antiinflammatory drug-associated gastropathy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50 (8): 2433-40.
37. Mellekjaer L., Blot W.J., Sørensen H.T., Thomassen L., McLaughlin J.K., Nielsen G.L., Olsen J.H.: Upper gastrointestinal bleeding among users of NSAIDs: a population-based cohort study in Denmark. *Br J Clin Pharmacol.* 2002; 53 (2): 173-81.
38. Lewis D.F.V.: *Guide to Cytochromes P450: Structure and function*, CRC Press LLC, USA 2001.
39. Ioannides C.: *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*, CRC Press LLC, USA 1996.
40. Skálová L., Szotaková B.: *Cytochromy P450; Indukce, inhibice biotransformačních enzymů; Genetický polymorfismus. - přednáška z předmětu Xenobiochemie*, Farmaceutická fakulta Univerzita Karlova, Hradec Králové 2008.
41. Hynie S.: *Xenobiochemie. 1. lékařská fakulta Univerzita Karlova, Praha 2005*, <http://che1.lf1.cuni.cz/html/Xenobiochemie.pdf> - 17.2.2009.
42. Knejzlík Z., Káš J., Ruml T.: Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické listy* 2000; 94: 913-18.
43. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy* 1999; 93: 229-37.
44. Anzenbacher P., Anzenbacherová E.: Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58 (5-6): 737-47.
45. Kousalová L., Baranová J., Anzenbacher P.: Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – Část I. Interakce na úrovni enzymu CYP3A4. *Klin Farmakol Farm.* 2003; 17: 151-7.
46. Rosemary J., Adithan C.: The pharmacogenetics of CYP2C9 and CYP2C19: ethnic variation and clinical significance. *Curr Clin Pharmacol.* 2007; 2 (1): 93-109.
47. Ingelman-Sundberg M., Sim S.C., Gomez A., Rodriguez-Antona C.: Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther.* 2007; 116 (3): 496-526.

48. Smith D.A., Abel S.M., Hyland R., Jones B.C.: Human cytochrome P450s: selectivity and measurement in vivo. *Xenobiotica*. 1998; 28 (12): 1095-128.
49. Kirchheiner J., Seeringer A.: Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1770 (3): 489-94.
50. Lee J.S., Obach R.S., Fisher M.B.: *Drug Metabolizing Enzymes: Cytochrome P450 and other enzymes in drug discovery and development*, FontisMedia S.A. and Marcel Dekker Inc., Netherlands 2003.
51. Kirchheiner J., Tsahuridu M., Jabrane W., Roots I., Brockmöller J.: The CYP2C9 polymorphism: from enzyme kinetics to clinical dose recommendations. *Personalized Medicine* 2004; 1 (1): 63-84.
52. Miners J.O., Birkett D.J.: Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol*. 1998; 45 (6): 525-38.
53. Loi C.M., Vestal R.E.: Drug metabolism in the elderly. *Pharmacol Ther*. 1988; 36 (1): 131-49.
54. Horn J.R., Wittkowsky A.K., Linenberger M., Greenberg D., Meade D.M., Lam A.: Effect of age on disposition of warfarin enantiomers. *Clin Pharmacol Ther*. 1997; 61: 175.
55. Sotaniemi E.A., Arranto A.J., Pelkonen O., Pasanen M.: Age and cytochrome P450-linked drug metabolism in humans: an analysis of 226 subjects with equal histopathologic conditions. *Clin Pharmacol Ther*. 1997; 61 (3): 331-9.
56. Fialová D.: *Specifické rysy geriatrické farmakoterapie I. Změna terapeutické hodnoty léků ve stáří*, Karolinum, Praha 2007.
57. Tan S.C., Patel B.K., Jackson S.H., Swift C.G., Hutt A.J.: Influence of age on the enantiomeric disposition of ibuprofen in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 2003; 55 (6): 579-87.
58. Smith G., Stubbins M.J., Harries L.W., Wolf C.R.: Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica* 1998; 28 (12): 1129-65.
59. Xie H.G., Prasad H.C., Kim R.B., Stein C.M.: CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002; 54 (10): 1257-70.
60. Shi M.M., Bleavins M.R., de la Iglesia F.A.: Pharmacogenetic application in drug development and clinical trials. *Drug Metab Dispos*. 2001; 29 (4,Part 2): 591-5.
61. Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. <http://www.imm.ki.se/CYPalleles> - 10.9. 2008.
62. Alberts B. et al.: *Základy molekulární biologie*, Espero Publishing, Ústí nad Labem 1998.
63. Řehout V., Bláhová B., Čítek J., Krabačová I.: *Základy genetiky a poradenství. Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice 2003*, [www.zsf.jcu.cz/struktura/katedry/kko/ucebni\\_texty/zaklady-genetiky-a-poradenstvi/04.pdf](http://www.zsf.jcu.cz/struktura/katedry/kko/ucebni_texty/zaklady-genetiky-a-poradenstvi/04.pdf) - 7.3. 2009.

64. Průša R., Lány J., Vejvalka J., Karger V., Kotaška K.: Multimediální učebnice DNA diagnostiky. 2. lékařská fakulta Univerzita Karlova, Praha 1998, [www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna](http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna) - 8.3. 2009.
65. Šimůnek T., Gavelová M.: Izolace NK, PCR a gelová elektroforéza. - přednáška z předmětu Molekulární biologie, Hradec Králové 2006, Farmaceutická fakulta Univerzita Karlova.
66. Genomed GmbH: Online Catalogue Genomed 2008/2009. Germany 2008 [www.genomed-dna.com](http://www.genomed-dna.com) - 8.3. 2009.
67. Munclinger P.: Elektroforéza proteinů. [www.natur.cuni.cz/~muncling/elfo.doc](http://www.natur.cuni.cz/~muncling/elfo.doc) - 10.3.2009.
68. Štulík K. a kol.: Analytické separační metody, Karolinum, Praha 2005.
69. Minarik M., Minarikova L., Bjørheim J., Ekstrøm P.O.: Cycling gradient capillary electrophoresis: A low-cost tool for high-throughput analysis of genetic variations. *Electrophoresis* 2003; 24 (11): 1716–1722.
70. Sujaya: Teknik Biologi Molekuler Menginspirasi Revolusi Dalam Diskriminasi Komposisi Komunitas Mikrobial. Udayana School of Public Health, <http://usph.files.wordpress.com/2008/06/denaturing-gradient.png> - 10.3. 2009.
71. Top B.: A simple method to attach a universal 50-bp GC-clamp to PCR fragments used for mutation analysis by DGGE. *PCR Methods Appl.* 1992; 2(1): 83-5.
72. Lincová D., Farghali H.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, Praha 2007.
73. Eckschlager K., Horsák I., Kodejš Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod, SNTL, Praha 1980.
74. Yasar U., Lundgren S., Eliasson E., Bennet A., Wiman B., de Faire U., Rane A.: Linkage between the CYP2C8 and CYP2C9 genetic polymorphisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 299 (1): 25-8.
75. García-Martín E., Martínez C., Tabarés B., Frías J., Agúndez J.A.: Interindividual variability in ibuprofen pharmacokinetics is related to interaction of cytochrome P450 2C8 and 2C9 amino acid polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 76 (2): 119-27.
76. Martínez C., García-Martín E., Blanco G., Gamito F.J., Ladero J.M., Agúndez J.A.: The effect of the cytochrome P450 CYP2C8 polymorphism on the disposition of (R)-ibuprofen enantiomer in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2005; 59 (1): 62-9.
77. Martin J.H., Begg E.J., Kennedy M.A., Roberts R., Barclay M.L.: Is cytochrome P450 2C9 genotype associated with NSAID gastric ulceration? *Br J Clin Pharmacol.* 2001; 51 (6): 627-30.
78. Vonkeman H.E., van de Laar M.A., van der Palen J., Brouwers J.R., Vermes I.: Allele variants of the cytochrome P450 2C9 genotype in white subjects from The Netherlands with serious gastroduodenal ulcers attributable to the use of NSAIDs. *Clin Ther.* 2006; 28 (10): 1670-6.

79. Ma J., Yang X.Y., Qiao L., Liang L.Q., Chen M.H.: CYP2C9 polymorphism in non-steroidal anti-inflammatory drugs-induced gastropathy. *J Dig Dis.* 2008; 9 (2): 79-83.
80. Blanco G., Martínez C., Ladero J.M., Garcia-Martin E., Taxonera C., Gamito F.G., Diaz-Rubio M., Agundez J.A.: Interaction of CYP2C8 and CYP2C9 genotypes modifies the risk for nonsteroidal anti-inflammatory drugs-related acute gastrointestinal bleeding. *Pharmacogenet Genomics.* 2008; 18 (1): 37-43.