

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Studijní program: doktorský

Studijní obor: farmakologie a toxikologie



**Frekvence výskytu vybraných bodových polymorfismů CYP2C8 a MDR1
v české populaci a jejich vliv na působení amiodaronu**

**Frequency of occurrence of selected single nucleotide polymorphisms of CYP2C8 and
MDR1 in the Czech population and their influence on the effect of amiodarone**

Disertační práce

Mgr. Kristina Pechandová

Školitel: Prof. MUDr. František Perlík, DrSc.

PRAHA, 2013

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

Velice ráda bych vyjádřila poděkování svému školiteli prof. MUDr. Františku Perlíkovi, DrSc. za všestrannou pomoc, motivaci, cenné rady a připomínky během celého mého postgraduálního studia.

Dále velice děkuji za zasvěcení do problematiky, za odbornou pomoc a cenné rady při aplikaci nových metodik doc. MUDr. Ondřeji Slanařovi PhD.

Na závěr bych chtěla poděkovat celému kolektivu pracovníků ze stejného ústavu za vytvoření výborných pracovních podmínek a všestrannou pomoc, zde bych chtěla jmenovat především laborantky paní Evu Vlachovou a Janu Buckovou.

Moje poděkování patří také mé rodině za trpělivost a podporu během mého studia.

Tato práce vznikla za finanční podpory GAUK19/C/2005, VZ MSM0021620849, VZ MSM0021620820.

V Praze,

Kristina Pechandová

Podpis.....

Identifikační záznam:

PECHANDOVÁ, Kristina. Frekvence výskytu vybraných bodových polymorfismů CYP2C8 a MDR1 v české populaci a jejich vliv na působení amiodaronu [Frequency of occurrence of selected single nucleotide polymorphisms of CYP2C8 and MDR1 in the Czech population and their influence on the effect of amiodarone]. Praha 2013. 99s., 3 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Farmakologický ústav. Vedoucí práce Perlík, František.

Souhrn

Úvod: Variabilita lékové odpovědi je někdy podmíněna genetickými rozdíly v metabolismu a transportu léčiv. Interindividuální rozdíly jsou často způsobeny polymorfismy, které ovlivňují biotransformační aktivitu enzymů a expresi transportérů.

V disertační práci jsme věnovali pozornost cytochromu P450 izoenzymu CYP2C8 a MDR1. Nejprve jsme popsali frekvenci výskytu vybraných variantních alel CYP2C8*2, CYP2C8*3 (2 substituce v exonu 3 a 8, CYP2C8*3G416A a CYP2C8*3A1196G), CYP2C8*4, CYP2C8 P404A u zdravé české populace a variantních alel MDR1 v exonech: 26 C3435T, 21 G2677A/T, 12 C1236T a 17 T-76A. Následně jsme sledovali vliv těchto polymorfismů na působení amiodaronu u vybraného souboru pacientů.

Metody: Genotyp MDR1 a CYP2C8 jsme stanovili pomocí PCR-RFLP za využití specifických restričních enzymů a primerů. Frekvence genotypů MDR1 jsme určili u 189 zdravých dobrovolníků a CYP2C8 u 161 zdravých osob. Do sledování jsme dále zařadili 63 pacientů užívajících amiodaron déle než dva měsíce. Jejich léčbu jsme posuzovali ze záznamů lékařské dokumentace, s využitím standardních biochemických a hematologických vyšetření a záznamů EKG. Koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu N-desethylamiodaronu byly hodnoceny HPLC analýzou.

Výsledky a závěry: Sníženou expresi genu MDR1, která je spojena s výskytem variantní alely 3435T v exonu 26 u homozygotů, jsme zjistili u 33,9% subjektů. Nejčastěji se vyskytující variantní alelu CYP2C8*3, spojenou s fenotypově nižší aktivitou enzymu, jsme našli u 10,9% české populace. Distribuce ostatních alel je shodná s jinými bělošskými populacemi. Přítomnost variantní alely MDR1 v exonu 26 3435T byla spojena se statisticky vyššími koncentracemi amiodaronu a jeho aktivního metabolitu. Statisticky významně vyšší koncentrace léčiva jsme prokázali i za současné přítomnosti variantní alely CYP2C8*3 a MDR1 3435T. Tyto nálezy jsme potvrdili haplotypovou analýzou, kdy ve shodě s literaturou, jedinci s haplotypem 12 měli statisticky významně vyšší koncentrace léčiva. U nemocných s amiodaronem jsme pozorovali vyšší hodnoty TSH za přítomnosti dvou variantních alel v exonu 26, 5,62 U/l oproti 2,31 U/l u homozygotů s wild-type alelou.

Naše výsledky frekvence častých polymorfismů MDR1 a CYP2C8 v české populaci umožňují interpretaci výsledků klinických studií získaných v odlišných populacích a vytvářejí základ pro optimalizaci terapie vybranými léčivy

Klíčová slova: amiodaron, cytochrom P450, CYP2C8, česká populace, farmakogenetika, jednonukleotidový bodový polymorfismus, MDR1, P-glykoprotein

Summary

Introduction: Variability in drug response is sometimes conditioned by genetic differences in the metabolism and the transport of drugs. Interindividual differences are often caused by polymorphisms affecting biotransformation activity of enzymes and expression of transporters.

In the thesis we paid attention to the cytochrome P450 CYP2C8 and MDR1. First, we described the frequency of occurrence of selected variant alleles CYP2C8 * 2, CYP2C8 * 3 (2 substitution in exon 3 and 8, CYP2C8 and CYP2C8 * 3G416A * 3A1196G), CYP2C8 * 4, CYP2C8 P404A in the healthy Czech population and MDR1 variant alleles in these exons: 26 C3435T, 21 G2677A/T, 12 C1236T a 17 T-76A. Subsequently, we studied the influence of these polymorphisms on effects of amiodarone in the selected group of patients.

Methods: We determined genotypes MDR1 a CYP2C8 by PCR-RFLP by using restriction enzymes and specific primers. We determined the frequency of MDR1 genotypes in 189 healthy volunteers and CYP2C8 in 161 healthy subjects. Further we included into the study 63 patients treated with amiodarone for longer than two months. Their treatment was assessed from medical records and by using standard biochemical and haematological examinations and ECG. Concentrations of amiodarone and its metabolite N-desethylamiodarone were evaluated by HPLC analysis.

Results and conclusions: Reduced expression of the MDR1 gene, which is associated with the occurrence of the variant 3435T allele in exon 26 in homozygotes, was found in 33.9% of subjects. The most frequent variant allele CYP2C8*3 associated with lower phenotype activity of the enzyme was found in 10.9% of the Czech population. Distribution of other alleles is identical to other Caucasian populations.

The presence of the variant allele of MDR1 in exon 26 3435T was associated with statistically higher concentrations of amiodarone and its active metabolite. Statistically significantly higher drug concentrations were demonstrated even in the current presence of variant allele CYP2C8 * 3 and MDR1 3435T. These findings were confirmed by haplotype analysis, when in accordance with the literature, individuals with haplotype 12 had statistically significantly higher concentrations of the drug. In patients with amiodarone, we observed higher TSH values in the presence of two variant alleles in exon 26, 5,62 U/l versus 2,31 U/l in homozygotes with wild-type allele.

Our results of frequency of common MDR1 and CYP2C8 polymorphisms in the Czech population allow interpretation of clinical trial studies obtained in different populations and form basis for optimizing treatment with selected drugs.

Key words: amiodarone, cytochrome P450, CYP2C8, Czech population, MDR1, P-glycoprotein, pharmacogenetics, single nucleotide polymorphism

Obsah

Souhrn.....	4
Seznam publikací	9
Citační ohlas.....	11
Seznam použitých zkratek	13
1 Literární úvod.....	15
1.1 Geneticky podmíněná variabilita lékové odpovědi	15
1.1.1 Historické aspekty farmakogenetiky.....	16
1.2 Geneticky podmíněná variabilita lékového metabolismu	18
1.2.1 Oxidační fáze metabolismu xenobiotik.....	19
1.2.2 Bodové mutace a výsledný fenotyp CYP450	21
1.2.2.1 Stanovení genotypu jednonukleotidových polymorfismů	23
1.2.3 Farmakogenetika oxidační fáze I.....	24
1.2.3.1 Genetický polymorfismus enzymu CYP2C8	26
1.3 Genetický polymorfismus na úrovni transportního systému.....	33
1.3.1 P-glykoprotein (Pgp/MDR1/ABCB1).....	33
1.3.1.1 Struktura a substrátová specifita Pgp.....	33
1.3.1.2 Fyziologická funkce Pgp.....	36
1.3.1.3 Polymorfismy MDR1	36
1.4 Amiodaron.....	39
1.4.1 Metabolismus amiodaronu	40
1.4.2 Nežádoucí účinky amiodaronu	42
1.4.3 Interakce amiodaronu.....	43
1.4.4 Polymorfismus amiodaronu.....	44
2 Cíle práce	46
3 Metody.....	47
3.1 Statistické vyhodnocení dat.....	49
4 Výsledky	50
4.1 Frekvence genotypů v české populaci	51
4.1.1 Frekvence polymorfismů CYP2C8 u zdravých dobrovolníků	51

4.1.2	Frekvence polymorfismů MDR1 u zdravých dobrovolníků	54
4.2	Vliv bodových polymorfismů v genech MDR1 a CYP2C8 u nemocných s amiodaronem	57
4.2.1	Distribuce koncentrací amiodaronu při terapeutickém monitorování.....	57
4.2.2	Alelické frekvence v souboru pacientů dlouhodobě užívajících amiodaron.....	59
4.2.3	Koncentrace amiodaronu a N-desethylamiodaronu v našem souboru ve srovnání s literaturou	61
4.2.4	Koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu N-desethylamiodaronu u genotypových skupin CYP2C8	62
4.2.5	Koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu N-desethylamiodaronu u genotypových skupin MDR1	64
4.2.6	Vliv haplotypových skupin na koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu N-desethylamiodaronu u polymorfismů MDR1 a CYP2C8.....	67
4.2.7	Vliv amiodaronu na EKG a biochemické parametry v jednotlivých genotypových skupinách	72
5	Diskuze	78
6	Závěry	88
7	Literatura.....	90
8	Seznam příloh	96
	Příloha 1	97
	Příloha 2	98
	Příloha 3	99

Seznam publikací

Výsledky vědecké činnosti byly dosud publikovány v šesti impaktovaných a čtyřech recenzovaných odborných časopisech. Separáty třech prací k tématu jsou *in extenso* součástí přílohy.

1. Pechandová K., Buzková H., Matoušková O., Perlík F., Slanař O.: Genetic polymorphism of CYP2C8 in the Czech Republic – Genet Test Mol Biomarkers. **2012** Jul;16(7):812-6. Epub 2012 Feb 7.. **IF** = 1.654 (2010)

2. Pechandová K., Buzková H., Slanař O., Perlík F.: Polymorphisms of the MDR1 Gene in the Czech Population. Folia Biologica (Praha) 52, 184-189, **2006**. **IF** = 0,387 (2006)

3. Pechandová K., Buzková H., Slanař O., Perlík F.: Efluxní transmembránový transportér – P-glykoprotein. Klin. Biochem. Metab., 14 (35), **2006**, No. 4, p. 196–201.

4. Buzková H., Pechandová K., Danzig V., Vařeka T., Perlík F., Žák A., Slanař O.: Lipid-lowering effect of fluvastatin in relation to cytochrome P450 2C9 variant alleles frequently distributed in the Czech population. Med Sci Monitor, Vol 18, No 7, **2012**. **IF** = 1,699 (2010)

5. Buzková H., Pechandová K, Slanař O., Perlík F.: Frequency of single nucleotide polymorphisms of CYP2D6 in the Czech population. Cell Biochem Funct **2008**; 26(1):76–81. **IF** = 1,333 (2008)

6. Buzková H., Pechandová K, Slanař O., Perlík F.: Genetický polymorfismus cytochromu CYP2C9 v české populaci. Klin. Biochem Metab. 15 (36), **2007**, No. 2; p. 102-105.

7. Buzková H., Pechandová K, Slanař O., Perlík F.: Genetic Polymorphism of Cytochrome P450 and Methods for its Determination. Prague Medical Report / Vol. 107, **2006** No. 4, p. 383–393.

8. Slanař O, Bortlík M, Buzková H, Donoval R, Pechandová K, Sebesta I, Lukás M, Perlík F.: Polymorphisms of the TPMT gene in the Czech healthy population and patients with

inflammatory bowel disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. **2008** Jun;27(6):835-8. **IF** = 0,571 (2008)

9. Slanař O., Buzková H., Pechandová K., Marek J., Perlík F.: Frequency of TPMT functional polymorphisms in the Czech population. *Chem. Listy* 101, s 73-310, **2007**. **IF** = 0,683 (2007)

10. Slanař O., Dražd'áková M., Babiárová K., Pechandová K., Buzková H., Perlík F., Zima T.: Genotypizace cytochromu P450 2D6 a 2C19. *Čas. Lék. čes.*, **2007**, 146, pp. 708–711.

Abstrakta, postery, účast na odborných zahraničních konferencích a domácích sympoziích. Práce z Přílohy 2 získala 2. místo v soutěži „O nejlepší práci z oboru Klinická farmakologie uveřejněnou v roce 2006“.

Citační ohlas

Citační ohlas je zpracován na základě informací z Web of Science k datu 1.2.2013 s vyloučením autocitací. Naše publikace byly citovány celkem 34krát.

Pechandová K, Buzková H, Slanař O, Perlík F: **Polymorphisms of the MDR1 Gene in the Czech Population.** Folia Biologica (Praha) 52, 184-189 (2006)

Citováno: 18 (Web of Science)

- Al-Mohizea, Abdullah M.; Alkharfy, Khalid M.; Bagulb, Khawla M.; et al.2012
- Slanař O; Dupal P; Matouskova O; et al. 2012
- Yu Xiaobo; Xie Haiyang; Wei Bajin; et al. 2011
- Rideg O; Haber A; Botz L; et al. 2011
- Milojkovic M; Stojnev S; Jovanovic I; et al. 2011
- Neuvonen Anu M; Palo Jukka U; Sajantila A, 2011
- Mhaidat Nizar M; Alshogran Osama Y; Khabour Omar F; et al. 2011
- Sipeky C; Csongei V; Jaromi L; et al. 2011
- Turolo S; Tirelli A S; Ferraresso M; et al. 2010
- de Klerk OL, Willemsen ATM, Bosker FJ, et al. 2010
- Gumus-Akay G, Rustemoglu A, Karadag A, et al. 2010
- Scheiner MAM, Damasceno AM, Maia RC, 2010
- Gumus-Akay G, Rustemoglu A, Karadag A, et al. 2008
- Correia C, Santos P, Coutinho AM, et al. 2009
- Krivulcik T, Sedlak J, Bartosova Z: 2009
- Zhou SF, 2008
- Vicente J, Sinues B, Fanlo A, et al. 2008
- Jeannesson E, Albertini L, Siest G, et al. 2007

Buzková H, Pechandová K, Slanař O, Perlík F: **Frequency of single nucleotide polymorphisms of CYP2D6 in the Czech population.** Cell Biochem Funct **2008**;26(1):76-81.

Citováno: 11 (Web of Science)

- Pilgrim, Jennifer L.; Ruiz, Yarimar; Gesteira, Alejandro; et al. 2012
- Fernandez-Santander Ana; del Saz Sanchez Miguel et al. 2012
- Slanař O; Dupal P; Matouskova O; et al. 2012
- Rideg O; Haber A; Botz L; et al. 2011
- Matouskova O; Slanař O; Chytil L; et al. 2011
- Llovo R, Tudoli I, Carril JC, et al. 2009,
- Paulusova V, Rosch C, Drizhal I, et al. 2010
- Chytil L, Matouskova O, Cerna O, et al. 2010
- Chytil L, Sticha M, Matouskova O, et al. 1 2009
- Johansson I, Ingelman-Sundberg M, 2009
- Nam MH, Won HH, Lee KA, et al. 2007

Slanař O, Bortlík M, Buzková H, Donoval R, Pechandová K, Sebesta I, Lukás M, Perlík F: **Polymorphisms of the TPMT gene in the Czech healthy population and patients with inflammatory bowel disease.** Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. **2008** Jun;27(6):835-8.

Citováno: 4 (Web of Science)

- Cabaleiro T.; Roman M.; Gisbert, Javier P.; et al. 2012
- Umamaheswaran G; Kumar Dhakchinamoorthi K; Kayathiri D; et al. 2012
- Mladosievicova B; Dzurenkova A; Sufliarska S; et al. 2011
- Bahari A, Hashemi M, Bari Z, et al. 2010

Pechandová K., Buzková H., Matoušková O., Perlík F., Slanař O.: **Genetic polymorphism of CYP2C8 in the Czech Republic** – Genet Test Mol Biomarkers. **2012** Jul;16(7):812-6. Epub 2012 Feb 7.

Citováno: 1 (Web of Science)

- Xiujun W., Jiliang Z., et al. 2013

Seznam použitých zkratek

A	nukleová base, adenin
ABC	transportér vázající adenosintrifosfát (ATP-binding cassette transporter)
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
AMK	aminokyselina
Arg	nukleová base, arginin
ARF	absolutní refrakterní fáze
ARR	relativní refrakterní fáze
ATP	adenosintrifosfát
AST	aspartátaminotransferáza
AUC	plocha pod křivkou (area under the curve)
BCRP	breast cancer resistant protein
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
C	nukleová base, cytosin
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CYP450	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EKG	elektrokardiogram
EM	extenzivní metabolizátor (extensive metabolizer)
G	nukleová base, guanin
GGT	gama-glutamyltransferáza
GIT	gastrointestinální trakt
Gly	nukleová base, glycin
GST	glutathion-S-transferáza
IM	intermediární metabolizátor (intermedial metabolizer)
IL	interleukin
INR	výledek Quickova testu (international normalization ratio)
MDR1	gen kódující P-glykoprotein (multidrug resistance gene)
NAT	N-acetyltransferáza
NS	nesignifikantní
OAT a OCT	transportér organických aniontů a transportér organických kationtů (organic anion transporter and organic cation transporter)

PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
Pgp	P-glykoprotein
PM	pomalý metabolizátor (poor metabolizer)
RFLP	analýza délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
RNA	ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová RNA (messenger RNA)
tRNA	transferová RNA
miRNA	mikro RNA
SD	směrodatná odchylka
SNPs	jednonukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphisms)
T	nukleová báze, thymin
T3, T4	trijodthyronin, thyroxin
TBE	pufrovací roztok (tri-báze, kyselina boritá, EDTA)
TF	tepová frekvence
TPMT	thiopurin-S-metyltransferáza
TSH	thyreotropní hormon
UGT	UDP-glukuronyltransferáza
UM	velmi rychlý metabolizátor (ultrarapid metabolizer)
US	Spojené státy americké
v	variantní alela
v/v	homozygot pro variantní alely
v/wt	heterozygot
wt	alela bez přítomnosti polymorfismů, tzv. wild type
wt/wt	homozygot pro alely bez přítomnosti polymorfismů

1 Literární úvod

1.1 Geneticky podmíněná variabilita lékové odpovědi

Významný rozvoj analytických metod, metod molekulární a buněčné biologie v klinické medicíně umožnil celou řadu nových přístupů v terapii a péči o pacienta.

Již od počátku padesátých let minulého století je kladen důraz na individualizovanou farmakoterapii. Její hlavní úlohou je vytvořit medicínu bezpečnější a více efektivní pro každého jednotlivého pacienta. Nastává odklon od klasického přístupu „jedna dávka pro všechny“, naopak je snaha pacientovi přizpůsobit léčbu podle jeho jedinečných charakteristik. Hlavním cílem je zvýšit účinnost léčby a redukovat výskyt a závažnost nežádoucích účinků. Ze studií vyplývá, že nežádoucí účinky léčiv jsou příčinou asi 5% hospitalizací a zhruba 0,1% případů z interních oborů a 0,01% po chirurgických zákrocích končí úmrtím [1]. Možné nežádoucí účinky mohou mít kromě zdravotních i socioekonomické důsledky, proto individualizovaný přístup může pomoci redukovat i celkové ekonomické náklady léčby.

Interindividuální odpověď na léčbu je určena změnami ve farmakokinetice či farmakodynamice léčiva, které jsou podmíněné jedinečným genotypem člověka, ale i dalšími epigenetickými faktory.

Lidský genom je z 99% identický na úrovni DNA, ale právě na úrovni řetězce DNA se také často mohou vyskytovat různé genetické odchylky (např. substituce, inserce nebo delece nukleových bází a další). Záměna jednoho nukleotidu jiným v sekvenci DNA se vyskytuje v genomu přibližně na každých 500 bází. Je-li tato záměna na obou alelách nalezena u více než 1% populace je označována jako genetický polymorfismus. Tyto polymorfismy jediného nukleotidu (označované jako SNPs) mohou ovlivnit míru exprese proteinu, způsobit změny v jeho struktuře a funkci nebo mohou pozměnit výslednou mRNA, podle níž je protein syntetizován. SNPs se dále sdružují do bloků – tzv. haplotypů, které se zpravidla dědí společně.

1.1.1 Historické aspekty farmakogenetiky

Dávno se předpokládalo, že dědičné odchylky vedou k interindividuální variabilitě, ale přímé propojení fenotypu s genotypem začal systematicky studovat až obor farmakogenetika. Tento vědní obor se počal rozvíjet asi v polovině padesátých let minulého století. Už v dávném Řecku si Pythagoras všiml, že někteří lidé onemocní po požití favových bobů. Tento jev vysvětlil až v roce 1956 Carson, který ho definoval jako defekt glukózo-6-fosfát dehydrogenázy, známý jako favismus. Další důležitý objev byl učiněn v roce 1960, kdy Evans definoval klinicky velmi významný metabolický polymorfismus isoniazidu a poprvé rozdělil populaci dle její enzymatické výbavy na rychlé a pomalé acetylátory [2].

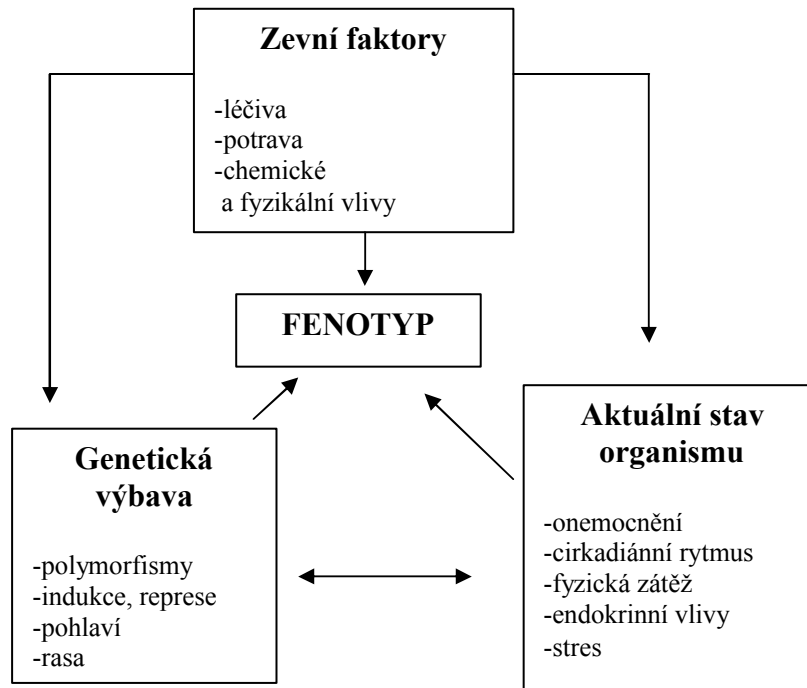
Farmakogenetika může být definována jako studium variability lékové odpovědi podmíněné dědičností. Její snahou je určit genotyp jedince a podle zastoupení jednotlivých alel ho přiřadit k danému fenotypu neboli projevu genetické výbavy jedince. Tato korelace začala být intenzivně využívána v 80. a ještě více v 90. letech 20. století, kdy se započalo významně používat genetické klonování. Fenotyp, neboli projev dané vlastnosti jedince, je vlastně výsledkem interakce genotypu s dalšími faktory. Projekt HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>), který mapuje haplotypy lidského genomu, a jemu další podobné projekty začaly studovat a identifikovat nové genetické faktory, které mohou předurčit vnímavost jedince k onemocnění, jeho odpověď na léčbu či možný vliv na průběh onemocnění, tzn. faktory, které mohou ovlivňovat jeho výsledný fenotyp.

Ovšem korelace genotypu a fenotypu nemusí být vždy jednoznačně přímá, neboť při nedostatečnosti jedné metabolické cesty se může u jedince aktivovat alternativní cesta, která může plně nahradit původní defektní cestu. Stejně se na projevu fenotypu může podílet celá řada faktorů zevního prostředí. Také ne u všech jedinců se daný genotyp musí vždy projevit, tzv. neúplná penetrance, nebo se projeví genetická heterogenita v rámci populačního vzorku, nebo se naopak fenotyp objeví u jedinců, kteří daný genotyp vůbec nemají, tzv. fenokopie. Možné vlivy na projev fenotypu zobrazuje obr. 1.

Cílem farmakogenetiky je vytvořit doporučení pro optimalizaci dávkování léčiv pro jednotlivé fenotypové skupiny pacientů především u farmak s úzkým terapeutickým indexem, významným interakčním potenciálem, u závažně toxických farmak a léčiv s dlouhým poločasem účinku, jako jsou například warfarin, tamoxifen nebo často široce užívaný a diskutovaný amiodaron. Proto, aby farmakogenetika mohla efektivně využívat svých principů zvýšení bezpečnosti a efektivity farmakoterapie, je důležité stanovit a popsat frekvenci

výskytu variantních alel u konkrétní populace, neboť jejich výskyt se může populačně odlišovat.

Obr. 1: Faktory ovlivňující projev fenotypu



Farmakogenetika studuje vliv jednotlivých genetických variant na variabilitu účinnosti a bezpečnosti léčiv na různých úrovních - metabolických enzymů, transportních systémů a receptorů, zatímco farmakogenomika se zbývá studiem těchto vztahů na úrovni celého genomu a implementuje znalosti farmakogenetiky. Významným zdrojem, který shrnuje informace z oblasti genetického zkoumání, je databáze PharmGKB (pharmacogenetics and pharmacogenomics knowledge base, www.pharmgkb.org).

1.2 Geneticky podmíněná variabilita lékového metabolismu

Metabolismus můžeme definovat jako souhrn biochemických reakcí, kterými jsou endogenní (např. steroidy, žlučové kyseliny, mastné kyseliny, prostaglandiny, leukotrien, biogenní aminy atd.) i exogenní látky přeměňovány na metabolity.

Při odbourávání látek v organismu se postupně zvyšuje jejich hydrofilita a také se zvětšuje jejich objem a molekulární hmotnost, všechny tyto mechanismy snižují resorpci molekul již na úrovni střevní stěny a usnadňují následnou eliminaci látek z organismu pomocí transportních systémů do žluči nebo do moči. Celý tento proces se dělí do dvou fází a účastní se ho mnoho enzymatických systémů.

Ve fázi I, nazývané jako oxidační fáze metabolismu, dochází ke změně charakteru molekuly např. oxidací a hydroxylací. Ve fázi II, v tzv. konjugační fázi, jsou tyto metabolity konjugovány s hydrofilní podjednotkou – glukuronyl-, sulfo-, metyl- atd. Výsledkem metabolismu xenobiotik je buď jejich detoxikace na neaktivní komponenty, nebo jejich bioaktivace za vzniku jejich biologicky aktivních metabolitů, jako například u amiodaronu. Genetická výbava jedince ovlivňuje jak farmakokinetické procesy (absorpce, distribuce, eliminace), tak i farmakodynamické účinky léku. V metabolismu léčiv byla stanovena celá řada klinicky významných polymorfismů, které se mohou podílet na variabilitě odpovědi na podanou léčbu (viz tab. 1, 2).

Tab. 1: Přehled nejznámějších polymorfních enzymatických systémů v metabolismu léčiv

Oxidační fáze metabolismu (fáze I)	Konjugační fáze metabolismu (fáze II)
cytochrom P450	UDP-glukuronyltransferáza (UGT)
alkoholdehydrogenáza	sulfonyltransferáza
aldehyddehydrogenáza	N-acetyltransferáza (NAT)
paraaxonáza	18lutation-S-transferáza (GST)
cholinesteráza	metyltransferáza
dihydropyrimidindehydrogenáza	thiopurin-S-metyltransferáza (TPMT)
epoxid hydroláza	
flavin monooxygenáza	

Tab. 2: Změny v genech enzymů II. Fáze lékového metabolismu (upraveno podle [3])

Izoforma	Substrát	Povaha polymorfismu	Efekt SNPs na aktivitu	Frekvence výskytu variantních alel
UGT1A1	bilirubin irinotekan	upstream TA inzerce nesynonymní SNP v exonu 1	snížená aktivita	poměrně nízká
UGT2B7	morfin	nesynonymní upstream SNPs	pravděpodobně snížená aktivita	poměrně nízká
NAT2	isoniazid	nesynonymní SNPs	chybění aktivity	poměrně vysoká u bělošské populace
TPMT	merkaptopurin azathioprin	nesynonymní SNPs	chybění aktivity	poměrně nízká
GSTP3	cisplatina	delece genu	chybění aktivity	vysoká

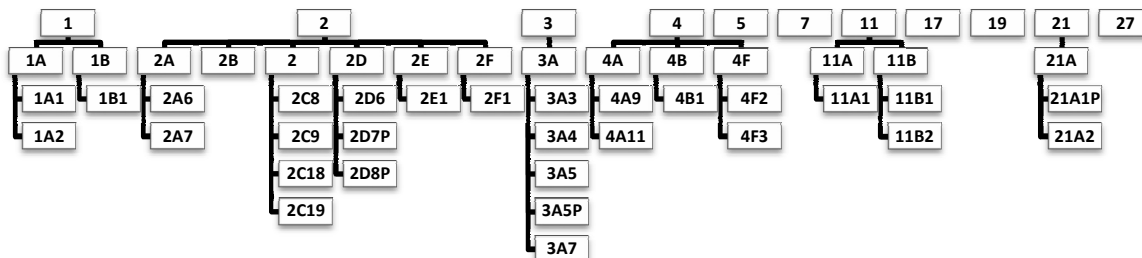
1.2.1 Oxidační fáze metabolismu xenobiotik

Téměř 56% léčiv, u kterých byly vyjádřeny nežádoucí účinky, je metabolizováno některým polymorfním enzymem fáze I. Zhruba v 86% případů je to cytochromem P450 (CYP450), který je v této oblasti nejlépe prostudovaným enzymovým systémem [4]. Cytochrom P450 byl poprvé popsán v roce 1962. Jedná se o skupinu enzymů lokalizovaných v membránách endoplazmatického retikula, které mají ve své struktuře molekulu hemu a jejich UV absorpční maximum nastává při 450 nm, jsou-li v komplexu s oxidem uhelnatým. Tento velmi starý systém se vyskytuje u všech žijících organismů a zprostředkovává asi 70 až 80% všech reakcí fáze I. Počet enzymů cytochromu P450 se u jednotlivých organismů liší, odráží to jejich potřebu pro jednotlivé specifické funkce. Největší počet enzymů byl nalezen u rostlin, které pro záchranu a udržení svého života využívají toxinů a nejrůznějších chemických látek, neboť v nebezpečí nemohou utéct nebo se bránit jako živočišné druhy [5].

Monooxygenázy tohoto prastarého systému jsou dále děleny podle stupně sekvenční podobnosti jejich aminokyselin do rodin (alespoň 40% shoda) a podrodin (55% shoda). Pro humánní CYP450 tak bylo popsáno 51 rodin. Obecně mají rodiny 4 - 51 vysokou afinitu k endogenním substrátům, druhou skupinu tvoří rodiny 1 - 3, které participují na metabolismu xenobiotik a jsou zodpovědné za odbourávání 70 až 80% všech látek ve fázi I.

Jednotlivé enzymy jsou označeny zkratkou CYP, číslem značíme rodinu enzymu, písmenem tzv. podrodinu a dalším číslem individuální enzym. Číslo rodiny může naznačovat funkci enzymů (např. CYP21 je steroidní 21 - hydroxyláza), ale ne vždy je toto pravidlem. Může se také stát, že enzymy různých druhů mohou nést stejné označení, např. lidský CYP1A2 a potkaní CYP1A2. Nebo byla čísla v nomenklatuře jednotlivým enzymům přidělována v chronologickém pořadí podle toho, jak byly objevovány. Proto se můžeme setkat s tím, že například CYP3A3, 3A4, 3A5 a 3A7 jsou označení pro lidské CYP450 izoenzymy a CYP3A6 je označení králičího izoenzymu. Hierarchii izoenzymů znázorňuje obrázek 2.

Obr. 2: Příklad hierarchie izoenzymů lidského CYP450 (upraveno podle [6])



Pro každý izoenzym CYP450 je charakteristická poměrně široká skupina substrátů a účinky enzymů se na cílový substrát mohou překrývat. Distribuce některých těchto enzymů v těle je téměř ubikvitní. Na metabolismu xenobiotik se podílejí především formy zastoupené v játrech, gastrointestinálním traktu (GIT), plicích, ledvinách, mozku, a to především enzymové rodiny 1 až 3 – nejvýznamněji se v metabolismu léčiv uplatňují izoenzymy CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP3A4, v biotransformaci ostatních chemických látek a především metabolické aktivaci pre-karcinogenů se uplatňují CYP1A2, CYP2A6, CYP1B1 a CYP2E1 [7, 8]. Ostatní rodiny jsou důležité pro syntézu a metabolismus endogenních substancí, viz tabulka 3 [9].

Tab. 3: Savčí cytochrom P450 – příklady rodin a podrodin

CYP450 rodiny	Hlavní funkce
CYP1	metabolismus xenobiotik, léků
CYP2	metabolismus xenobiotik, léků, steroidů
CYP3	metabolismus xenobiotik, léků
CYP4	metabolismus mastných kyselin, prostaglandiny, leukotrieny syntéza tromboxanu A
CYP5	7- α -hydroxyláza cholesterolu
CYP7	metabolismus cholesterolu, steroidů
CYP11	17- α -hydroxyláza steroidů
CYP17	aromatáza steroidů
CYP19	21 hydroxyláza steroidů
CYP21	cholesterol 25, 26, 27 hydroxyláza, metabolismus žlučových kyselin

Na metabolismu léčiva se obvykle různou měrou podílí více než jeden izoenzym a u léků, jejichž hlavní cesta metabolismu je katalyzována stejným izoenzymem, můžeme očekávat vysoký interakční potenciál. Aktivita většiny enzymů může být indukovaná nebo inhibovaná celou řadou faktorů i současně podávanou farmakoterapií. Znalost pravděpodobných interakcí umožňuje předpovídat farmakokinetiku látek metabolizovaných touto cestou.

Indukce cytochromu P450 je založena na zvýšení exprese genu pro daný enzym. Inhibice nastává, když se současně podané léčivo (tzv. inhibitor) naváže na metabolizující enzym, a to buď na stejné vazebné místo (kompetitivní inhibice), nebo na místo jiné, čímž způsobí konformační změnu tohoto enzymu. Taková změna znemožní vazbu substrátu (nekompetitivní inhibice). Významná interakce může vzniknout, když daný enzym je jedinečný v biotransformaci substrátu.

1.2.2 Bodové mutace a výsledný fenotyp CYP450

Odlišnosti v sekvenci DNA genů (řídících tyto pochody) mohou způsobit variabilitu odpovědi u pacientů na běžně podávaný lék v obvyklých dávkách. U některých pacientů může být podaný lék málo účinný až neúčinný, nebo naopak běžné dávky mohou vyvolat nežádoucí

účinky až projevy akutního předávkování, především u látek s úzkým terapeutickým rozmezím.

Genetická variabilita CYP450 je způsobena především jedno či více nukleotidovými polymorfismy. Pokud se bodové mutace vyskytnou v exonech genu a nevyvolávají žádné změny v sekvenci vznikajících aminokyselin, označují se jako nonsense nebo také jako synonymní mutace. Když tyto odchylky v sekvenci DNA vedou ke změně výsledného aminokyselinového řetězce a mohou tak zapříčinit zásadní změny ve struktuře a funkci proteinu, označujeme je jako nekonzervativní neboli missense mutation. Dobře prostudovaným příkladem změny v kódující sekvenci a následně i změny ve stavbě a v katalytické funkci proteinu a tím i variantní odpovědi na léčbu je model warfarinu [10].

SNPs byly nalezeny i v oblasti intronů, kde mohou ovlivnit stabilitu mRNA a tím míru exprese proteinu.

Synonymní mutace nebo mutace v nekódujících oblastech jsou méně srozumitelné a hůře prokazatelné. Příkladem je polymorfismu 3435 C>T *ABCB1* genu, který mění jeho expresi, ale nevede ke změně v sekvenci aminokyselin výsledného proteinu. Byly popsány dva mechanismy, kterými tento druh mutací může přímo ovlivňovat translaci genu. Prvním je předurčenost kodonů. Každá aminokyselina (AMK) je určena až šesti typy kodonů. Výběr mezi těmito kodony určuje míru exprese. Avšak tento výběr není náhodný, ale je vždy předurčena nejčastější varianta kodonu pro danou AMK, která využívá stejnou tRNA. Mutace tohoto preferovaného kodonu může vést k výběru jiné tRNA a tím k redukci dostupnosti nebo ke snížené expresi z důvodu nedostatečného využití [11]. Druhým mechanismem je destabilizace mRNA. Změny v mRNA vedou ke snížení dostupnosti receptoru na mRNA a tím ke snížení míry exprese. Příkladem je výskyt variantní alely v genu dopaminového receptoru D2 [12].

Nově poznaným mechanismem, který může ovlivnit lékovou odpověď, je tzv. miRNA regulace translace. miRNA je krátká sekvence dlouhá asi 22 nukleotidů, která se komplementárně váže na 3' regulační konec exprimovaného genu a označuje ho tak k degradaci nebo tím inhibuje jeho translaci. Lidský genom kóduje asi 1000 miRNA, které ovlivňují 50 - 60% známých genů [13]. Byly popsány SNPs i v těchto miRNA oblastech, které mohou vést ke změně exprese proteinu. Známý je příklad rozvoje vzniku rezistence k methotrexátu (nadměrná exprese enzymu za nepřítomnosti miRNA-24 regulace) [14].

Další možnou změnou v sekvenci DNA, která tvoří asi 12% interindividuální genetické variability genomu, je několikanásobné zkopírování nebo naopak vymazání (delece) sekvencí genu o velikosti 1kb nebo větších. Asi nejvýznamnější a nejdůkladněji prostudovaný je

příklad izoenzymu CYP2D6. Na základě počtu kopií jsou jedinci rozděleni do fenotypů pomalých, extenzivních a ultra-rychlých metabolizátorů. Dnes je v literatuře také používán termín metabolické indexy, který rozlišuje metabolickou kapacitu na rezervní metabolický index pro zvýšenou aktivitu enzymu, a nebo na alterovaný metabolický index pro negativně ovlivněnou aktivitu enzymu.

Fenotyp jedinců, u kterých se daný gen mnohonásobně opakuje, je označován jako velmi rychlý metabolizátor – UM (ultrarapid metabolizer) a projevuje se velice rychlým metabolismem léčiv.

Naopak enzymový defekt se dědí autozomálně recesivně, proto největší projevy tohoto defektu jsou u homozygotů s funkčně defektní alelou nebo u jedinců bez daného genu, ti jsou klasifikováni jako pomalí metabolizátoři – PM (poor metabolizers) a mají tedy metabolismus velmi nízký nebo vůbec žádný. Jedinci s jednou normální neboli wild-type alelou (tj. nejčastěji se vyskytující alelou v populaci, také označovanou jako wild-type alela) a jednou variantní alelou, tzv. heterozygoté, jsou označováni jako intermediární metabolizátoři – IM, mohou mít metabolismus také snížen, ale v menší míře než homozygotní jedinci s oběma defektními alelami. Homozygoti s oběma wild-type alelami mají metabolismus nezměněn, řadíme sem většinu populace a jsou nazýváni rychlími nebo také extenzivními metabolizátory – EM (extensive metabolizers).

1.2.2.1 Stanovení genotypu jednonukleotidových polymorfismů

Stanovení genotypu jedince má celou řadu výhod před přímým určením fenotypu. Odpadá nutnost podání modelové látky a s tím spojený výskyt možných nežádoucích účinků, eliminuje se vliv vnějších faktorů (např. patologický stav organismu, lékové interakce, přítomnost nečistot ve standardu), výsledek je platný po celý život jedince. Nevýhody genotypování představují: časová a finanční náročnost, nutnost definice variantní alely ovlivňující aktivitu enzymu, predikce je jen na základě genotypu. Proto je fenotypování stále užitečným výzkumným nástrojem, např. pro definování vztahu mezi genotypem a fenotypem *in vivo*, znalost fenotypu nám umožňuje odhalit polymorfismy, které ještě nebyly popsány.

Ideálně by genotypovací metoda měla splňovat následující parametry:

- a) Snadná a rychlá optimalizace testu na základě sekvenční informace.
- b) Nízká cena vývoje testu jak z hlediska použitých reagensů, tak i času stráveného vyškoleným personálem na optimalizaci.
- c) Robustní reakce, aby i vzorek DNA horší kvality poskytl spolehlivé výsledky.

- d) Snadno automatizovatelný test s minimálním zásahem obsluhy.
- e) Jednoduchá analýza dat s automatizací výsledné genotypizace.
- f) Flexibilní uspořádání experimentu, které bude vhodné pro provedení stovek až milionů testů za den.

Nejčastěji se ke stanovení SNPs používá metoda polymerázové řetězové reakce neboli PCR amplifikace s následnou analýzou délky restričních fragmentů (RFLP) nebo REAL – time PCR, metody sekvenování nebo FRET analýzy. S rozvojem moderních technologií se dnes s výhodou k rychlé detekci mnoha genů najednou využívá biočipových technologií, kde jeden mikroset na svém povrchu může nést desítky až desetitisíce vybraných známých sekvencí DNA. Také je možnost využít komerčně již předpřipravené kity pro jednotlivé testy, např. stanovení genotypu pro thiopuriny – kit obsahuje proužky s již navázanými alel-specifickými sondami pro detekci SNPs, výsledkem jsou různě barevné substráty pro jednotlivé genotypy.

1.2.3 Farmakogenetika oxidační fáze I

Genetický polymorfismus je jeden z nejvýznamnějších faktorů ovlivňující interindividuální variabilitu aktivity enzymů CYP450 a také mající vliv na variabilitu lékové odpovědi.

Lidský CYP450 je kódován 59 rozdílnými geny a 48 pseudogeny, v tabulce 4 (upraveno podle Nelson 1993, 2004) je uvedena lokalizace nejznámějších izoform CYP450 na chromozomech [15, 16].

Tab. 4: Lokalizace enzymů CYP450 na chromozomech

CYP450	Poloha na chromozomu	Zastoupení z celkového CYP450 (%)	Polymorfismus	Testovací látka
1A1	15q22		(+)	-
1A2	15q22	12	(+)	kofein
2C8	10q24.1-24.3	7	(+)	paklitaxel
2C9	10q24.1-24.3	20	+	tolbutamid
2C19	10q24.1-24.3	8	+	omeprazol
2D6	22q13.1	4	+	dextrometorfan (spartein)

2E1	10	6	(+)	chlorzoxazon
3A4	7q22.1	28		midazolam, kortisol
3A5	7q22.1		+	-

Povahu polymorfismů v genech CYP450 a jejich možný vliv na metabolismus léčiv shrnuje tabulka 5. Nejnovější informace z nomenklatury jednotlivých lidských alel CYP450 jsou přístupné na internetové adrese <http://www.cypalleles.ki.se/>. V celkovém zastoupení jednotlivých frakcí enzymů CYP450 není významnější mezirasový rozdíl. Když však budeme sledovat frekvenci výskytu jednotlivých polymorfismů v rámci různých zemí, zjistíme, že mezi jednotlivými rasami lidské populace existuje významná proměnlivost v přítomnosti některých SNPs. Tento fakt by mohl vysvětlovat, proč určité léky účinkují u některých národností odlišně než u jiných a také velikou rozmanitost ve výskytu nežádoucích účinků.

Tab. 5: Změny v genech CYP450 a polymorfismy v metabolismu léčiv

Izoforma	Substrát	Povaha polymorfismu	Efekt SNPs na aktivitu	Frekvence výskytu variantních alel
CYP1A2	klozapin theofylin kofein	v nekódující oblasti	-chybění aktivity nehlášeno -určitý vliv na expresi nebo indukci	vysoká
CYP2A6	nikotin	nesynonymní, velké delece, upstream SNPs	-chybění aktivity v nízké frekvenci -ultrarychlý metabolizátoři	nízká u bělošské populace, vysoká u Asiatů
CYP2B6	cyklofosfamid	nesynonymní, upstream SNPs	-chybění aktivity nehlášeno -změny v aktivitě jsou běžné	poměrně nízká
CYP2C8	paklitaxel rosiglitazon	nesynonymní, upstream SNPs	-chybění aktivity nehlášeno -změny v aktivitě jsou běžné	vysoká
CYP2C9	warfarin ibuprofen theofylin	nesynonymní – často, upstream SNPs	-velmi nízká aktivita u některých jedinců – významný funkční vliv	relativně nízká
CYP2C19	Omeprazol klopidogrel diazepam	nesynonymní, v místě stříhu, úvodní kodon, upstream SNPs	-chybění aktivity -časté -někteří jedinci ultrarychlý metabolismus -významný funkční vliv	vysoká

CYP2D6	kodein tamoxifen metoprolol dextrometorfan haloperidol perfenzin antiarytmika fluoxetin paroxetin	nesynonymní, v místě střihu, malé a velké delece, duplikace, a jiné amplifikace	-chybění aktivity - časté -někteří jedinci ultrarychlý metabolismus	relativně nízká
CYP2E1	etanol isoniazid	vzácně nesynonymní, upstream SNPs - časté	-chybění aktivity nehlášeno -určité změny aktivity, neprokázané	vysoká
CYP3A4	cyklosporin takrolimus simvastatin	vzácně nesynonymní, upstream SNPs - časté	-chybění aktivity nehlášeno -určité změny aktivity, nevýznamné	nízká
CYP3A5	podobné 3A4	vzácně nesynon., v místě střihu- časté	-časté chybění aktivity -určité změny aktivity	vysoká

Upraveno podle [3] a [7]

1.2.3.1 Genetický polymorfismus enzymu CYP2C8

CYP2C8 je řazen do velké podrodiny enzymů CYP2C, která je hlavní podrodinou enzymové rodiny CYP450. Proteiny jsou z více než 80% identické a tvoří asi 18,2% celkového jaterního CYP450. U lidí jsou zastoupeny izoformy CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19. Geny CYP2C jsou lokalizované na chromozomu 10q24 v následujícím pořadí – gen – 2C18-2C19-2C9-2C8-Tel, žádný z nich nebyl nalezen ve fetálních játrech [17]. Všechny enzymy CYP2C jsou geneticky polymorfni a sdílejí významnou sekvenční homologii, např. gen CYP2C8 sdílí 74% sekvenční homologii s CYP2C9. Metabolizují asi 20% všech předepisovaných léčiv, kdy se nejvíce uplatňují enzymy CYP2C9 a CYP2C19. Tabulka 6 shrnuje nejzávažnější klinické důsledky polymorfismů těchto enzymů.

Tab. 6: Klinické důsledky polymorfismů vybraných forem CYP2C u pomalých metabolizátorů

Enzym	Léčivo	Nežádoucí účinek
CYP2C9	S-warfarin fenytoin losartan tolbutamid nesteroidní antirevmatika	krvácení ataxie hypotenze hypoglykémie krvácení do GIT
CYP2C19	omeprazol diazepam klopidogrel	nevolnost, bolest hlavy zvýšená sedace snížený antiagregační efekt
CYP2C8	paklitaxel amiodaron	zvýšená toxicita ?

CYP2C8 představuje asi 7% celkového jaterního cytochromového systému P450 a metabolizuje přibližně 5% všech léčiv ve fázi I. Pozornost k tomuto izoenzymu byla obrácena poměrně nedávno, když se zjistilo, že hraje významnou roli jak v metabolismu endogenních (arachidonová, retinová kyselina), tak i exogenních látek [18]. CYP2C8 byl charakterizován jako nejvíce inducibilní protein z rodiny CYP2C.

Oproti ostatním členům 2C8 rodiny má necharakteristicky velké aktivní místo, které rozeznává rozmanité typy substrátů. Vedle jaterní tkáně se CYP2C8 vyskytuje v řadě extrahepatálních tkáních - v ledvinách, mozku, nadledvinách, prsní žláze, vaječnících a duodenu [19]. Jak se ukázalo, CYP2C8 hraje významnou roli v metabolismu mnoha dobře známých a často předepisovaných léčiv (ibuprofen, fluvastatin, rosiglitazon atd.). Jeho hlavní substráty a inhibitory jsou shrnuty v tabulce 7. CYP2C8 sdílí mnoho substrátů s CYP3A4, ale jejich oxidační produkty jsou rozdílné, neboť objem vazebné kapsy je u obou enzymů podobný, ale liší se svým tvarem, proto metabolizují substráty v odlišné poloze [20].

Tab. 7: Substráty a inhibitory CYP2C8:

CYP2C8 hlavní metabolizující enzym		
Specifická látka	Farmakoterapeutická skupina	Ostatní účastníci se enzymy CYP450
<i>trans</i> -kyselina retinová	deriváty vitamínu A	CYP2C9
amiodaron	antiarytmika III. třída	CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6
cerivastatin	inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázy	CYP3A4
chlorochin	antimalarika, antirevmatika	CYP3A4, CYP2D6
paklitaxel	cytostatikum -taxoly	CYP3A4, CYP3A5
repaglinid	antidiabetika	CYP3A4
rosiglitazon, pioglitazon	antidiabetika-thiazolidindiony	CYP2C9, CYP3A4, CYP1A1
kyselina tazarotenová	deriváty retinoidů	
troglitazon	antidiabetika-thiazolidindiony	CYP3A4
CYP2C8 střední nebo méně významný metabolizující enzym		
karbamazepin	antiepileptika	CYP3A4 (hlavní)
cyklofosfamid	cytostatika	CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A
dapson	antibakteriální sulfony	CYP2C9 (hlavní)
diklofenac	nesteroidní antirevmatika	CYP2C9 (hlavní), CYP3A4, and CYP2C19
diltiazem	blokátory kalciového kanálu	CYP3A4, CYP2C9
fluvastatin	inhibitory HMG-CoA reduktázy	CYP2C9 (hlavní), CYP3A4
ibuprofen	nesteroidní antirevmatika	CYP2C9
ifosfamid	cytostatika	CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A
loperamid	agonisté μ -opioidních receptorů - antidiarogikum	CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4
metadon	agonisté μ -opioidních receptorů	CYP3A4, CYP2D6, CYP2B6
morphin	agonisté μ -opioidních receptorů	CYP3A4
simvastatin	inhibitory HMG-CoA reduktázy	CYP3A4 (hlavní)
tenoxicam	nesteroidní antirevmatika	CYP2C9 (hlavní)
torasemid	kličková diuretika	CYP2C9 (hlavní)
verapamil	blokátory kalciového kanálu	CYP3A4 (hlavní), CYP3A5
zopiclon	hypnotika	CYP3A4 (hlavní)

Inhibitory CYP2C8		
amitriptylin	tricyklická antidepresiva	CYP3A4
gemfibrozil	fibráty	
ketokonazol	antimykotika	CYP3A4
montelukast	antagonisté leukotrienových receptorů	
quercetin	rostlinný derivát flavonoidů	CYP1A2
terfenadin	antihistaminika	CYP3A4
triazolam	benzodiazepiny	CYP3A4
trimethoprim	inhibitory dihydrofolát reduktázy	-

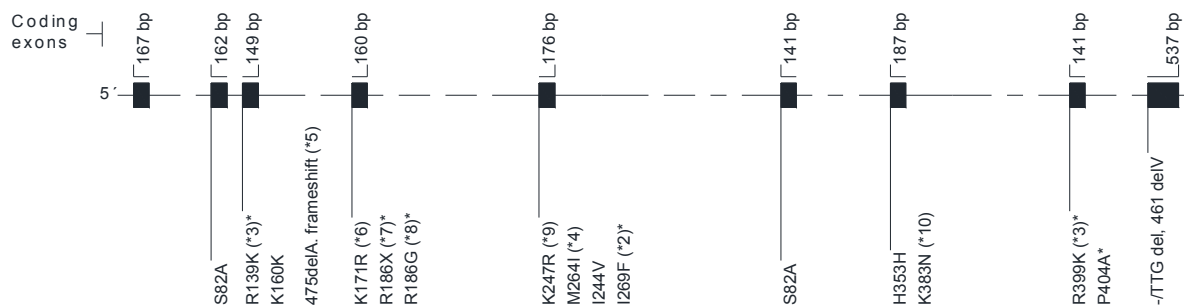
Tabulka převzata a upravena podle [21] a [22].

Gen CYP2C8 je tvořen 9 exony s 31 kilobasemi. Bodový polymorfismus v genu kódující tento enzym byl poprvé popsán až v roce 2001 [23, 24]. Od té doby bylo zaznamenáno více než 20 bodových záměn hlavně v exonech 3, 5 a 8, nejčastější SNPs jsou uvedeny v tabulce 8 [23]. Přírozená alela se označuje jako CYP2C8*1 nebo také jako CYP2C8*1A. Nejvíce studované variantní alely, které se označují zkratkou enzymu CYP2C8, dále hvězdičkou a arabskou číslicí, jsou CYP2C8*2, CYP2C8*3 (R139K, K399R) a CYP2C8*4. Přepis těchto variantních alel do výsledného enzymu může vést k jeho nižší katalytické aktivitě. Alela CYP2C8*3 se vyskytuje v částečné vazbě s funkčně defektní alelou CYP2C9*2. Substráty CYP2C9 je celá řada významných a často používaných léčiv. U alely CYP2C8*5 dochází k delecí adeninu v pozici 471, tak vzniká významný posun čtecího rámce označovaný jako „frame-shift“ mutace. Tento posun způsobuje významnou alteraci v aminokyselinovém řetězci enzymu. Předpokládá se, že nově vzniklý enzym téměř ztratí svou katalytickou aktivitu, neboť dochází až k 64% ztrátě jeho struktury a to včetně hemového vazebního místa. Možný vliv tohoto polymorfismu v klinické praxi je nutné potvrdit nebo vyvrátit *in vitro* a případně *in vivo* studii. Tato alela byla detekována u japonského pacienta, u kterého se objevila závažná rhabdomyolýza v korelaci s vysokými koncentracemi cerivastatinu [25]. Obrázek 3 znázorňuje strukturu polymorfního genu CYP2C8.

Tab. 8: Vybrané známé jednobodové záměny nukleotidů u CYP2C8

Alela	Označení	Nesynonymní změny	Poloha	Funkční změny (<i>in vitro</i>)
CYP2C8*1A	CYP2C8.1	-	-	normální
CYP2C8*1B	CYP2C8.1	C-271A	promotor	normální
CYP2C8*1C	CYP2C8.1	T-370G	promotor	normální
CYP2C8*5	CYP2C8.5	A475del	exon 3	asi inaktivní
CYP2C8*3	CYP2C8.3	G416A, A1196G	exon 3, 8	snížení metab.-paklitaxel
CYP2C8*2	CYP2C8.2	A805T	exon 5	zvýšení Km-6 α -hydroxylace paklitaxelu
CYP2C8*4	CYP2C8.4	C792G	exon 5	neznámý
Neklasifikovaná	P404A	C1210G	exon 8	snížení metab. amiodaronu
CYP2C8*14	CYP2C8.14	G712C		snížení metab.paklitaxelu/ amiodaronu

Obr. 3: Polymorfni struktura genu CYP2C8, převzato podle [21]



Klinicky signifikantní vliv polymorfismů byl popsán v metabolismu paklitaxelu. Ve studiích se prokázalo, že přítomnost alely CYP2C8*3 redukuje hydroxylační aktivitu enzymu až o 50% [26]. Přítomnost alely CYP2C8*2 také snižuje metabolismus paklitaxelu o 15%. Obě alely tedy zvyšují možnou toxicitu po podání tohoto cytostatika a mohou mít závažné důsledky pro homozygoty s funkčně defektní alelou. Alela CYP2C8*4 také vykazovala nižší aktivitu oproti wild-type alele, ale tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní. Další alela, u které se prokázalo, že může ovlivnit metabolismus léčiv, je vzácně se vyskytující alela CYP2C8 P404A, která byla doposud popsána jen u japonské populace. Přítomnost alely CYP2C8 P404A vedla k signifikantnímu snížení biodegradace amiodaronu v buněčné linii lidského hepatocelulárního karcinomu (HEP G2) [27]. Také u nedávno popsané nové variantní alely CYP2C8*14, která byla nalezena u japonské populace, byla v *in vitro* studiích prokázána snížená afinita enzymu k paklitaxelu a dále snížený metabolismus amiodaronu [28, 29]. Všechny tyto nálezy je nutné podpořit daty z *in vivo* studií.

Izoenzym CYP2C8 dále ovlivňuje řadu fyziologických a patologických procesů u člověka. Přeměňuje kyselinu arachidonovou na biologicky aktivní epoxyeikosatrienovou kyselinu, která moduluje jaterní glykogenolýzu, ovlivňuje sekreci hormonů v pankreatu, agregaci destiček a další [30]. Zjistilo se, že variantní alela CYP2C8*3 je výrazně spojená s defektním metabolismem kyseliny arachidonové.

Frekvence výskytu variantních alel CYP2C8 je významně mezirasově odlišná. V bělošské populaci se nejčastěji vyskytuje variantní alela CYP2C8*3, asi ve 13%, zatímco u Afroameričanů je vyjádřena jen ve 2% a nebyla popsána u Asiatů. Také se prokázalo, že tato alela se vyskytuje ve vazbě s variantní alelou CYP2C9*2.

Variantní alela CYP2C8*4 byla detekována asi u 7,5% bělošské populace [23, 26]. Variantní alela CYP2C8*2 se v bělošské populaci téměř nevyskytuje, změřená frekvence byla 0 - 2%, vyskytuje se téměř výlučně u afroamerické populace, stejně jako alela CYP2C8*5 u japonské populace [31]. Alela P404A byla prozatím stanovena jen v japonské populaci, kde variantní alela byla nalezena ve velmi nízké frekvenci 0,007% [27].

Výrazná mezirasová rozdílnost v zastoupení variantních alel se projevuje i v haplotypové struktuře polymorfismů CYP2C8. Tabulka 9 shrnuje výskyt nejčastěji zastoupených haplotypů v bělošské populaci, tabulka využívá data z mezinárodního projektu HapMap [32].

Tab. 9: Nejčastější haplotypy s frekvencí větší než 2% pro studované SNPs s domnělým funkčním významem.

SNPs	HapA	HapB	HapC1	HapC2	HapC3	HadD	HapE
CYP2C8*1B -271C>A, promotor	C	A	C	C	C	C	C
CYP2C8*1C -370T>G, promotor	T	T	G	G	T	T	T
CYP2C8*3 Arg139Lys, exon 3	G	G	G	G	G	A	G
CYP2C8*4 Ile264Met, exon 5	C	C	C	G	C	C	C
CYP2C8*3 Lys399Arg, exon 8	A	A	A	A	A	G	A
Frekvence (%)	30,5	19,6	7,4	6,5	5,4	15,3	6,9

1.3 Genetický polymorfismus na úrovni transportního systému

Většinu transportérů léčiv dělíme do dvou super-rodin: rodiny transportních proteinů vázajících adenosintrifosfát (ABC) nebo rodiny rozpustných nosičů (solute carriers family). ABC transportéry jsou dále děleny do sedmi rodin označovaných písmeny A až G. Lidský genom obsahuje 49 genů kódujících ABC proteiny. Pro 16 z nich je známa jejich funkce a 14 genů je spojeno s výskytem onemocnění u lidí. Vedle jejich efluxní funkce mají nepostradatelnou roli v eliminaci širokého spektra endogenních substrátů, xenobiotik, léčiv, kovů a chemických toxinů [33].

1.3.1 *P-glykoprotein (Pgp/MDR1/ABCB1)*

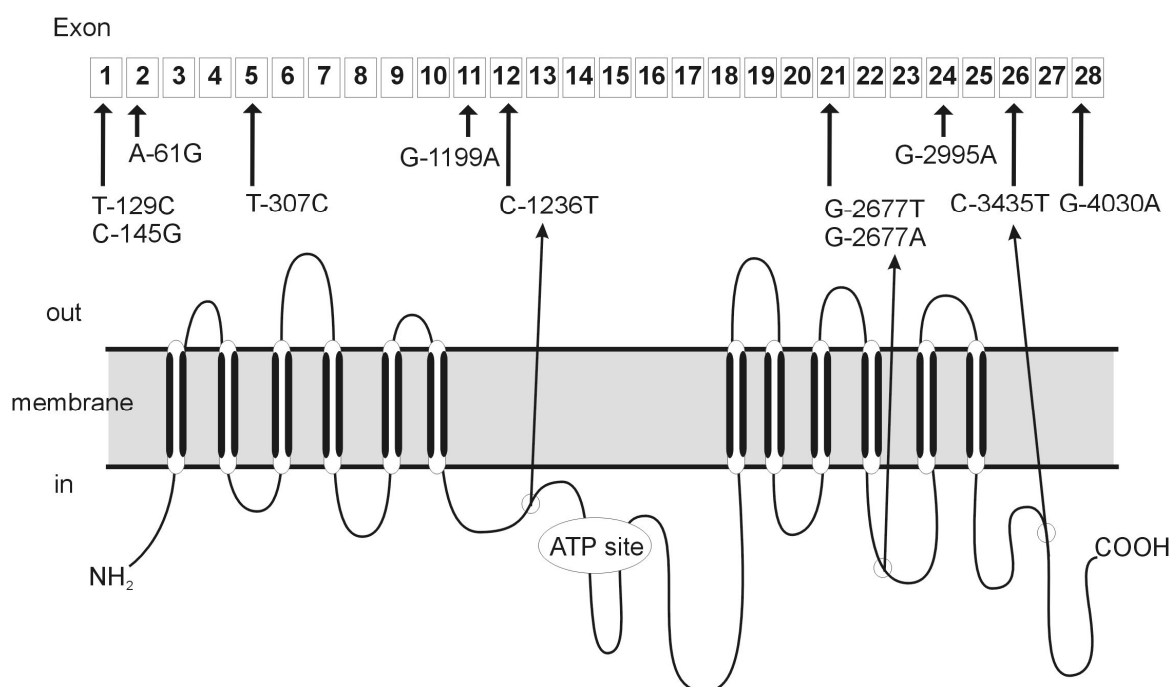
Významným členem ABC rodiny je P-glykoprotein, také označovaný jako ABCB1. P-glykoprotein je efluxní transmembránová pumpa, která má významnou roli v absorpci, distribuci a eliminaci řady léčiv a je důležitým obranným mechanismem před vstupem xenobiotik do organismu. Nadměrná exprese genu, který tento protein kóduje (MDR1), často vede k rezistenci na podávanou terapii. Juliano a Ling jako první zaznamenali v roce 1976 souvislost mezi sníženou propustností membrány ovariálních nádorových buněk čínského křečka pro kolchicin a vzestupem exprese vysokomolekulárního glykoproteinu (170 000–180 000 Da), který byl nazván P-glykoprotein (Pgp) [34].

1.3.1.1 Struktura a substrátová specifita Pgp

Gen MDR1 je lokalizován na dlouhém raménku chromozómu 7q21-21.1 a tvoří ho 28 exonů. Pgp vytváří velký vodní kanál, který je uzavřený směrem k cytoplazmě a otevřený do extracelulárního prostoru [35]. Kanál je lemován hydrofobními a aromatickými AMK v extracelulární části, kdežto cytosolická část kanálu obsahuje polární a nabitě zbytky. Strukturní analýzy odhalily v proteinu přítomnost dvou otvorů v lipidové dvojvrstvě, které umožňují extrakci substrátů přímo z membrány pasivní difúzí [36]. Molekulární podklad struktury Pgp vytváří monomerní transmembránová bílkovina složená z 1280 aminokyselin, která je tvořena dvěma analogickými částmi se 43% sekvenční homologií. Obě poloviny (N- a C-konec) obsahují dvanáct transmembránových α -helix šroubovic, které jsou odděleny šesti extracelulárními, hydrofilními smyčkami a obsahují četné N-glykosylace na asparaginu 91, 94, 99. V cytosolu jsou dvě nukleotidy vázající domény, na kterých dochází k hydrolýze ATP za uvolnění energie využívané k transportu substrátů. Toto ATPázové místo (představuje

přibližně 200 aminokyselin) je charakteristické pro tzv. ATP Binding Cassette proteiny (ABC), kam je kromě Pgp řazena řada dalších membránových bílkovin (multidrug resistance-associated protein, breast cancer resistant protein – BCRP/MXR/ABCP a další) [37]. Obě homologní poloviny jsou vzájemně propojeny peptidovým segmentem, který je složen ze 75 aminokyselin. Strukturu schematicky znázorňuje obrázek 4.

Obr. 4: Grafické znázornění struktury P-glykoproteinu, šipky naznačují polohy nejznámějších SNPs



Pro Pgp je typické, v porovnání s ostatními transportéry, že s ním interaguje velké množství látek, často chemicky i funkčně značně odlišných. Patří sem kromě mnoha xenobiotik léčiva z různých farmakoterapeutických skupin, ale i endogenní hormony a jiné látky (tab. 10). Pro většinu substrátů je typické, že jsou hydrofóbní nebo amfifilní (tedy obsahují hydrofilní i hydrofóbní části) povahy a jsou planárně uspořádané. Mají molekulovou hmotnost přes 400D a při pH 7,4 jsou kladně nabitě. Ale tyto charakteristiky nejsou vždy podmínkou pro substráty Pgp, neboť Pgp méně často přenáší i některé neutrální (např. digoxin) nebo i negativně nabitě molekuly (např. atorvastatin), dokonce i molekuly hydrofilní povahy, jako je methotrexát nebo substráty s molekulovou hmotností nižší než 400D [38]. Protein vykazuje vysokou konformační flexibilitu, která mu umožňuje přeskládání při vázání a vypuzování substrátů. Zároveň se ukázalo, že Pgp rozlišuje stereoizomery a dokáže

najednou vázat i více substrátů v překrývajících se vazebných místech [36]. Z toho lze usuzovat na možný vznik interakcí u současného podávání substrátů. Pgp a CYP3A4 metabolizující enzym se vyznačují společnou tkáňovou distribucí a také se překrývají specifitou pro substráty, inhibitory a induktory.

Tab. 10: Hlavní substráty P-glykoproteinu

Substráty P-glykoproteinu		
antineoplastika	imunosupresiva	blokátory kalciového kanálu a metabolismy
aktinomycin	cyclosporin A	diltiazem
etoposid	takrolimus	mibefradil
docetaxel	rapamycin	nikardipin
doxorubicin	steroidy	verapamil
daunorubicin	aldosteron	N-dealkylverapamil
epirubicin	dexamethason	N-dealkynorverapamil
irinotekan	estradiol	
mitomycin C	hydrokortison	
mitoxantron	antiemetika	H1- antihistaminika
paklitaxel (taxol)	domperidon	fexofenadin
tamoxifen	ondansetron	terfenadin
teniposid	hypolipidemika	H2-antihistaminika
topotekan	atorvastatin	cimetidin
vinblastin	lovastatin	ranitidin
vinkristin	antibiotika	opiáty
vindesin	erytromycin	morfium
kardiotonika	levofloxacin	loperamid
antiarytmika	sparfloxacin	ostatní
digoxin	inhibitory HIV	debrisochin
digitoxin	proteáz	fenytoin
chinidin	amprenavir	rifampin
amiodaron	indinavir	amitriptylin
β blokátory	nelfinavir	losartan
celoprolool	sequinavir	emetin
talinolol	ritonavir	kolchicin

1.3.1.2 Fyziologická funkce Pgp

Pgp hraje významnou roli v ochraně organismu před vstupem xenobiotik do organismu a zároveň napomáhá jejich eliminaci. Gen MDR1 je příznačně nazýván proteinem způsobujícím mnohočetnou rezistenci k farmakům, tzv. multidrug resistance protein. Jeho nadměrná exprese může vést až k selhání farmakoterapie. Míra exprese Pgp se například 30 - 40% podílí na selhání antiepileptické terapie nebo koreluje s odpovědí na terapii akutní myeloidní leukémie a další [39].

Přenašeč je strategicky situován v epiteliálních buňkách orgánů podílejících se na absorpci a distribuci látek, jako jsou enterocyty, buňky hematoencefalické a testikulární bariéry, a také v lokalizacích s čistě exkreční funkcí - v kanalikulární membráně hepatocytů, na apikální straně epitelových buněk žlučových kanálků a renálního proximálního tubulu [38]. Pgp je mimoto také součástí procesu distribuce a transportu některých endogenních látek v organismu, např. cholesterolu, kortisolu, glutathion-S-konjugátů, a dále se podílí např. v syntéze steroidních hormonů. Pgp se pravděpodobně účastní také na transportu některých cytokinů – např. IL-2, IL-4, interferonu–gama z periferních T-lymfocytů. V některých případech Pgp může zabránit spojení obalených virových partikulí s plazmatickou membránou buněk, a tak sehrát významnou roli v rozvoji rezistence k virové infekci [40, 41]. Dále se podílí na mobilizaci dendritických buněk z periferie do lymfatických uzlin, tím iniciuje T-lymfocyty zprostředkovanou imunitu [42].

1.3.1.3 Polymorfismy MDR1

V genu MDR1 je popisován vysoký výskyt bodových polymorfismů. První zpráva o funkčním polymorfismu genu MDR1 je z roku 1989 [43]. Z lidských nadledvin, kde je Pgp hojně zastoupen, byla izolována v celé délce genu cDNA a bylo odvozeno pořadí aminokyselin. Ve srovnání s Pgp získaným z buněk rezistentních na kolchicin byla v aminokyselinové sekvenci nalezena substituce Gly→Val v kodonu 185. Buňky, do kterých byla vnesena cDNA, nesoucí informaci pro Val 185, získaly větší rezistenci ke kolchicinu [44]. Další polymorfismy na úrovni DNA byly popsány v roce 1998 v pozicích G2677T a G2995A exonu 21 a 24.

První systematický screening polymorfismů MDR1 uskutečnili Hoffmeyer a spol. v roce 2000 [45], kteří našli 15 různých polymorfismů, z nichž 12 nemění sekvenci aminokyselin proteinu a 7 je lokalizovaných v intronech. Tři polymorfismy v exonu 2 (Asn21Asp), 5

(Phe103Leu) a 11 (Ser400Asn) vedou k záměně aminokyseliny a mohou tak měnit funkčnost proteinu změnou náboje, velikostí molekuly proteinu atd.

Polymorfismus exonu 26 v pozici 3435 (C3435T), který nezpůsobuje změny v sekvenci aminokyselin, mění intenzitu exprese proteinu v duodenu a tím ovlivňuje farmakokinetiku, zejména absorpci typického substrátu Pgp – digoxinu. U jedinců homozygotních pro alelu T byla ve srovnání s jedinci homozygotními pro alelu C zaznamenána více než dvakrát nižší exprese intestinálního Pgp s následně zvýšenými plazmatickými koncentracemi digoxinu díky jeho rychlejší a úplnější absorpci. Terminální eliminace byla srovnatelná s jedinci s alelou C/C [46]. Další publikované studie u zdravých dobrovolníků prokázaly, zejména u homozygotů TT varianty C3435T, změněnou farmakokinetiku u fexofenadinu, fenytoinu, efinaviru a nelfinaviru, které jsou také substráty závislémi na funkci P-glykoproteinu [46-48].

Všeobecně se může jeden polymorfismus vyskytovat zároveň s polymorfismem v jiné pozici – tzv. haplotyp. Analýzy MDR1 genu se zaměřily na nejčastěji se vyskytující spojení sekvenčních variant v exonu 26 s variantami v exonu 21, 12 a v intronu 6. John et al. pro haplotyp s T alelou v pozici 3435 a G v 2677 naměřili vyšší plazmatické koncentrace digoxinu. Naopak u jedinců s alelami s haplotypem T v pozici 3435 a T alelou v pozici 2677 a u jedinců s wild type alelami byly naměřené hodnoty nižší. Analýzy haplotypů pomáhají sladit rozporné výsledky ze studií, které se zaměřily jen na jednotlivé SNPs (např. ve studii Kim et al. naměřili nižší plazmatické koncentrace fexofenadinu u homozygotů T/T 3435. Rozšířili proto svou studii na analýzu haplotypů, která byla ve shodě s výsledky jiných laboratoří) [46]. Nejlepší predikci aktivity P-glykoproteinu nám tedy poskytuje stanovování haplotypů polymorfismů, které se vyskytují v genu MDR1. Další, v bělošských populacích časté polymorfismy, jsou v intronech 6 (pozice Ex 6+139) a 16 (pozice Ex 17-76), přičemž mutace v intronu 6 je v nekompletní vazbě s mutací C1236T exonu 12. Zbylé polymorfismy jsou méně časté, nicméně např. v exonech 2 a 11 na pozicích 61 a 1199 vedou k záměně aminokyselinové struktury, byť u těchto posledních dvou polymorfismů nebyl popsán vliv na farmakokinetiku substrátů P-glykoproteinu [45]. Aktivita P-glykoproteinu je nejen geneticky polymorfně kódována, ale může být také významně ovlivněna interakcemi s inhibitory přenašeče, mezi které patří např. amiodaron i grapefruitová šťáva [38, 49]. V souvislosti s výskytem SNPs v genu MDR1 a jejich možným funkčním vlivem je studována celá řada dalších léčiv. Bylo prokázáno, že amiodaron a jeho aktivní metabolit N-desethylamiodaron mají významný inhibiční vliv na Pgp [50], z toho lze usuzovat na možný vliv polymorfismů MDR1 na koncentrace parentní látky a jejího metabolitu a významný interakční potenciál se

substráty Pgp. Polymorfismy MDR1 jsou dále velice často studované ve spojitosti s výskytem řady onemocnění.

Podobně jako v případě polymorfismů jiných genů existují výrazné mezirasové rozdíly ve frekvenci výskytu bodových polymorfismů MDR1. Například pro C3435T je frekvence genotypů C/C a T/T v bělošské populaci srovnatelná, je to přibližně 25%, zatímco v africké populaci je frekvence T/T genotypu pouze 6% [46, 51]. Variantní alela A2677 se nejčastěji vyskytuje u Asiatů, u Afroameričanů a v bělošské populaci není téměř detekovatelná. Rozložení alelických variant MDR1 u bělošské, afroamerické a asijské populace shrnuje tabulka 11.

Tab. 11: Alelické frekvence v genu MDR1 mezi populacemi (upraveno podle [52])

		Alelická frekvence (%)		
MDR1	Variantní alela	Kavkazané (n=200)	Afroameričané (n=200)	Asiaté (n=60)
exon 26	3435T	56,1	20,2	40,0
exon 21	2677T	46,4	10,0	45,0
exon 21	2677A	3,6	0,5	6,7
exon 12	1236T	45,9	20,9	68,5

Ostatní ABC transportéry jako *ABCC2*, *ABCB4*, *ABCB11* jsou také intenzivně studovány. Funkční význam polymorfismů *ABCC2* není jasný. Vzácně se vyskytující varianty *ABCB4* a *ABCB11* se pravděpodobně podílejí na vzniku dědičné formy cholestázy.

ABCG2/BCRP – breast cancer resistant protein, který byl identifikován v buňkách rakoviny prsu, je významnou ochrannou efluxní pumpou v organismu. Jeho nadměrná exprese byla zaznamenána u řady hematologických nádorů a solidních tumorů. Předpokládá se, že to může být jeden z mechanismů vzniku rezistence k řadě protinádorových léků jako antracykliny, mitoxantron a další [53].

1.4 Amiodaron

Amiodaron je strukturální diiodovaný derivát benzofuranu, jenž se svými účinky při léčbě poruch srdečního rytmu řadí do III. třídy antiarytmik dle klasifikace Vaughan-Williamse. Původně byl používán jako antianginózní lék, který byl zaregistrován jako antiarytmikum až v 80. letech. Je označován jako širokospektré antiarytmikum s přijatelnou úrovní proarytmogenního rizika, proto se stal široce užívaným lékem mezi odbornou veřejností především v terapii a prevenci komorových i supraventrikulárních tachyarytmií [54].

Elektrofyzilogické účinky amiodaronu spočívají v blokádě draslíkových, sodíkových a vápníkových kanálů, potlačení aktivity sinusového uzlu, zpomalení vedení vzruchu v atrioventrikulárním uzlu, prodloužení trvání refrakterní fáze, tedy i délky akčního potenciálu, který má nepřímo úměrnou závislost na srdeční frekvenci [55]. Zároveň má také alfa – sympatolytický a beta – sympatolytický účinek, který je středně silný, účinky shrnuje tabulka 12 [56]. Amiodaron ovlivňuje nejen srdeční elektrofyziologii, ale i neurochemické parametry, dále zlepšuje koronární průtok a hemodynamiku a má lokální antithyreoidální účinek.

Tab. 12: Elektrofyzilogický efekt amiodaronu na srdce

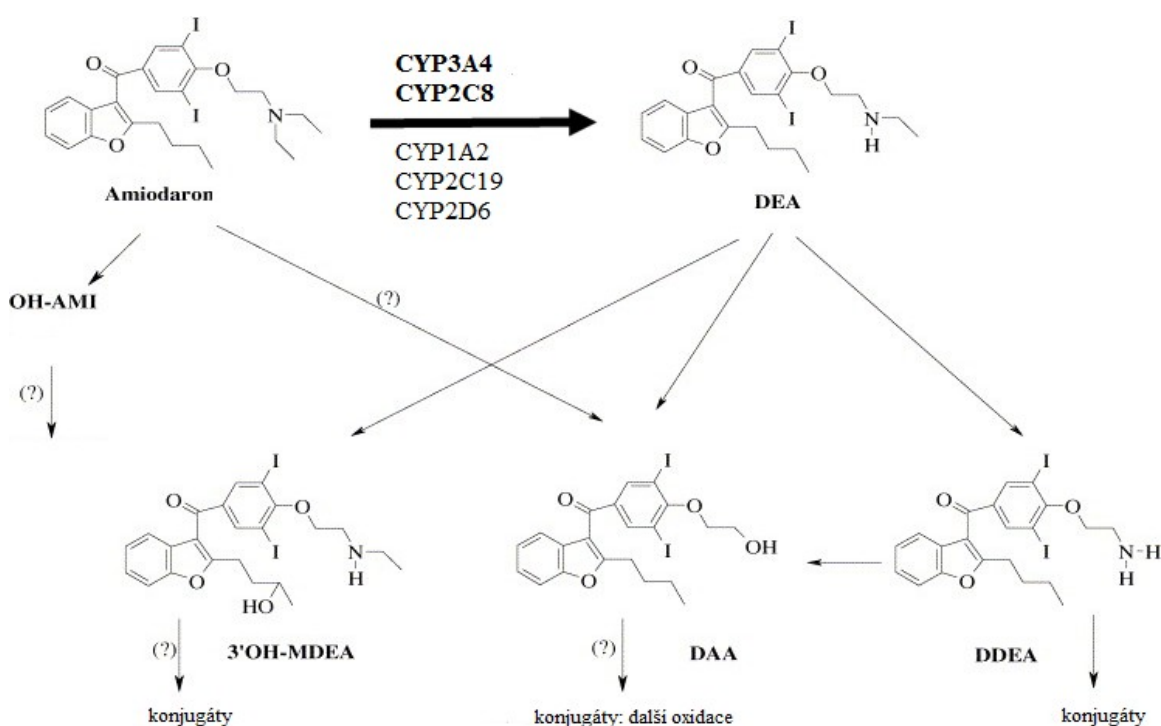
Elektrofyzilogický efekt	
Parametr	Pozorování
TF [♥]	Zpomalení
RR	Prodloužení
QT	Prodloužení
QRS	Nezměněno/prodloužení
A uzel	↓ aktivity
Atriální ARF*	Prodloužení
AV uzel ARF	Prodloužení
AV uzel RRF*	Prodloužení
Komorová ARF	Prodloužení

[♥]TF – tepová frekvence, *ARF – absolutní refrakterní fáze, *RRF – relativní refrakterní fáze

1.4.1 Metabolismus amiodaronu

Amiodaron je silně lipofilní lék, který je metabolizován jaterními enzymy na jeho hlavní metabolit N-desethylamiodaron (DEA). Formování metabolitu je velice rychlé, dosahuje tak koncentrací podobných jako parentní látka, nebo koncentrace DEA mohou být v lidských tkáních dokonce i vyšší [57]. Vzniklý metabolit má podobné farmakologické, ale i toxikologické účinky jako parentní látka. N-deetylace amiodaronu je katalyzována enzymy cytochromu P450, a to především izoformou CYP3A4 [58, 59] a CYP2C8 [27, 60] (cestu metabolismu znázorňuje obrázek 5). Vedle hlavního metabolitu DEA byly detekovány další produkty přeměny amiodaronu. 3-hydroxy-mono-N-desethylamiodaron (3'OH-MDEA) může být považován za druhý významný produkt měřitelný v krvi pacientů a je hlavním a primárním metabolitem DEA. Koncentrace dalších dvou metabolitů di-desethylamiodaronu (DDEA) a velmi nestabilního deaminovaného amiodaronu (DAA) jsou třicetkrát nižší než parentní látky. Metabolit DAA může být i přímým produktem metabolismu amiodaronu. Třetím přímým metabolitem amiodaronu je hydroxyamiodaron, jehož plazmatické koncentrace zatím není možné stanovit z důvodu vysoké nestability referenční molekuly. Lze tedy shrnout, že molekula amiodaronu je metabolizována hlavní cestou dealkylací, dále deaminací a hydroxylací [61]. Aktivitu jednotlivých metabolitů je nutné ještě vyzkoumat, stejně tak i detailně popsat účast metabolických enzymů ve všech biotransformačních cestách.

Obr. 5: Metabolické přeměny amiodaronu (upraveno podle [61])



Amiodaron je metabolizován již během absorpce v enterocytech, což snižuje jeho biologickou dostupnost po perorálním podání na 25 – 65%. Procesy absorpce i eliminace léčiva jsou navíc komplikovány tím, že amiodaron je kombinovaným substrátem/inhibitorem enzymů cytochromu P450 a P-glykoproteinu. Pokud jsou léčiva tohoto typu podána perorálně, dochází po jejich průniku do enterocytů k aktivnímu vypuzování zpět do střevního lumen prostřednictvím P-glykoproteinu a jen část látky, která tímto efluxním systémem není zachycena nebo převyšuje jeho transportní kapacitu, se stává potenciálním substrátem enterocytálního cytochromu P450 [62]. Léčivo, které cytochromem P450 není degradováno posléze proniká z enterocytů do krevního oběhu a následně i do jater, kde prochází metabolickým řetězcem vedoucím k eliminaci. Funkce P-glykoproteinu i cytochromu P450 jsou tedy synergistické a omezují biologickou dostupnost léčiva na úrovni střevní stěny i hepatocytů, a následně synergisticky ovlivňují i metabolismus a eliminaci v játrech [50]. Na druhou stranu hlavní metabolit desethylamiodaron je významným inhibitorem CYP3A4 i efluxního proteinu Pgp, proto se předpokládá, že biologická dostupnost amiodaronu u dlouhodobé terapie se s časem zvyšuje a naopak clearance látky se snižuje [63].

Biologická dostupnost amiodaronu je dále silně ovlivněna potravou, která zvyšuje rychlost i rozsah jeho absorpce [64]. Koncentrace dosahuje maxima zhruba za 3 – 7 hodin od podání. Eliminace léku se děje především jaterní, kožní a lakrimální exkrecí. Z 99% se amiodaron váže na plazmatické proteiny, především albumin, a protože je silně lipofilní, má tendenci vytvářet v organismu, především tukové tkáni, depa. Právě to přispívá k jeho neobyčejně dlouhému poločas eliminace. Zdánlivý distribuční objem amiodaronu je 66 l/kg. Jeho poločas eliminace má multifázický průběh. V akutní fázi je biologický poločas 3 – 20 hodin, v chronické fázi je to 20 – 100 dní. Řada studií opakovaně prokázala, že délka biologického poločasu je nejčastěji okolo 50 dní [65, 66].

Vzhledem ke svým jedinečným farmakokinetickým charakteristikám je užívání amiodaronu spojeno s poměrně vysokou prevalencí nežádoucích účinků, celosvětově okolo 25 – 75%, v České republice se prevalence výskytu pohybuje okolo 25%. Vznik nežádoucích účinků je velice často spojený s vysokými koncentracemi léčiva a jeho aktivního metabolitu. Proto se při užívání amiodaronu doporučuje monitorování koncentrací parentní látky a jejího metabolitu. Doporučení optimální ještě účinné spodní hranice pro koncentraci amiodaronu se může místně lišit, nejčastěji doporučované rozmezí optimální koncentrace je 1 – 2,5 mg/l, další často doporučovaná rozmezí jsou 0,5 – 2,5 mg/l nebo 0,7 – 2,5 mg/l [67].

Nedostatečná koncentrace léku nevede k optimálnímu antiarytmickému účinku a naopak supraoptimální koncentrace zvyšuje výskyt závažných nežádoucích účinků a vede paradoxně ke zhoršení prognózy nemocných [68].

1.4.2 Nežádoucí účinky amiodaronu

Pro molekulu amiodaronu je známá celá řada nežádoucích účinků, které jsou velice často asociované s vysokými koncentracemi léčiva. Relativně často se vyskytují thyreopatie - až u 3 - 25% pacientů po 2 – 6 měsících léčby a častěji u mužů. Méně čtené jsou pneumopatie – jejichž četnost je 0.5 – 1%. Vzácně se vyskytují u dávek pod 400 mg/den a při trvání léčby méně než dva měsíce. Mezi nimi je třeba odlišit hypersenzitivní plicní toxicitu po amiodaronu, která nemá vztah k dávce léku a má vysokou mortalitu, až 30%. Další časté komplikace jsou kožní fotosenzitivita, modrošedé zbarvení kůže a korneální depozita [69, 70]. Hlavním předpokládaným mechanismem vzniku thyreoidální toxicity je přímá podobnost amiodaronu s molekulou T3 (trijodthyronin) a T4 (tyroxin), především v oblasti diiodofenylového kruhu, který je zřejmě vazebnou doménou T3 na jeho receptorech. Potom je to přítomnost dvou atomů jódu, tzn. že z 200mg tablety se do organismu dostane asi 50 krát vyšší dávka, než je na území České republiky doporučovaný denní limit přijatého jódu. Dále spolupůsobí přímý cytotoxický vliv amiodaronu na thyreoidální buňky [71]. U metabolitu se zjistilo, že je dokonce více toxický na thyreoidální a plicní tkáň. Přehled nežádoucích účinků spojených s užíváním amiodaronu shrnuje tabulka 13. K prevenci výskytu těchto nežádoucích účinků přispívá i terapeutické monitorování koncentrací amiodaronu [72-74].

Tab.13: Nežádoucí účinky amiodaronu

Nežádoucí účinky amiodaronu		
Nežádoucí účinky	Frekvence výskytu (%)	Terapie
závažné		
plicní toxicita (plicní fibróza)	0,5-10 (1-2)	vysadit amiodaron, zahájit terapii kortikosteroidy
thyreotoxikóza (AIT I.,II.)	5-9 (v jodoprivních oblastech)	thyreostatika, kortikosteroidy, zvážit vysazení amiodaronu suplementace levotyroxinem
hypotyreóza	3-25	při překročení jaterních enzymů nad
hepatopatie	6-22 až 30	3 násobek → amiodaron ↓ či vysadit vysadit amiodaron
bradykardie	2-4	
méně závažné		žádná
korneální depozita	> 90	redukce dávky
nauzea, anorexie	30	redukce dávky
neurologické komplikace	8-10	žádné
modrošedé zbarvení kůže	2-57	opalovací krémy s TiO ₂
fotosenzitivita	4-9	

1.4.3 Interakce amiodaronu

Z již popsanych vlastností a mechanismu účinku amiodaronu vyplývá, že je pro toto léčivo charakteristický velký interakční potenciál. Amiodaron významně zpomaluje jaterní i renální metabolismus celé řady léků cestou inhibice cytochromu P450 a P-glykoproteinu. Klinicky potenciálně závažnou je často se vyskytující interakce s digoxinem a warfarinem. Při kombinaci s warfarinem, vzhledem k inhibičnímu potenciálu amiodaronu a jeho metabolitu, může dojít k výraznému snížení clearance warfarinu a tím i náhlému prodloužení protrombinového času a INR se zvýšeným rizikem krvácení. Další častá interakce

amiodaronu je se simvastatinem a s léčivy ze skupiny betablokátorů. Kombinace s betablokátorů může být u řady případů přímo indikovaná, ale je nutné předpokládat, že může způsobovat excesivní blokádu beta receptorů a vést až k život ohrožující bradykardii. Významné lékové interakce a jejich možná řešení shrnuje tabulka 14.

Tab. 14: Významné lékové interakce s amiodaronem

Látka	Důsledek	Opatření
digoxin	↑ plazmatické koncentrace digoxinu	↓ dávku digoxinu o 1/3 –1/2, monitorovat cp digoxinu
warfarin	↑ antikoagulač. účinku	monitorovat INR, ↓ dávku warfarinu o 25%
simvastatin	↑ incidence myopatií při dávkách > 20 mg/d	↓ dávku simvastatinu
sildenafil	↑ koncentrací sildenafilu	
cyklosporin	↑ koncentrací cyklosporinu	monitorovat koncentrace cyklosporinu, příp. ↓ dávku
chinolony	aditivní působení na prodloužení QT → arytmie	
antidepresiva	↑ koncentrací látek metabolizovaných játry	
betablokátory	významná blokáda β receptorů → arytmie	vysadit amiodaron nebo snížit dávku nebo vyměnit betablokátor
verapamil/diltiazem	potenciace negativního chronotropního a iontrop. působení → bradykardie	vysadit blokátor kalciového kanálu, vyměnit za jiný

1.4.4 Polymorfismus amiodaronu

Všechny tři hlavní proteiny (P-glykoprotein, CYP2C8 a CYP3A4), které se na metabolismu a transportu amiodaronu přes biologické membrány podílejí, vykazují výrazně variabilní interindividuální aktivitu v populaci. Zatímco genetické predispozice této variability nejsou v případě CYP3A4 dosud přesvědčivě identifikovány, jsou u P-glykoproteinu a CYP2C8 popsány mutace a polymorfismy způsobující změny aktivity genových produktů ve srovnání s běžně se vyskytujícími proteiny [75, 76]. Izoforma CYP2C8 je považována za jeden z hlavních enzymů účastnících se přeměny amiodaronu a tedy i může

mít rozhodující vliv na jeho koncentrace. V souvislosti se změněným metabolismem substrátů CYP2C8 byly studovány čtyři nejčastější alely CYP2C8*2, CYP2C8*3, (2 substituce v exonu 3 a 8, CYP2C8*3G416A a CYP2C8*3A1196G vyskytující se především v bělošské populaci), CYP2C8*4 a CYP2C8 P404A (substituce v exonu 8). Především přítomnost alely CYP2C8*3 je spojována se sníženou katalytickou aktivitou enzymu CYP2C8 v metabolismu jeho substrátů [23]. Tato alela se vyskytuje v částečné vazbě s alelou CYP2C9*2, která je často spojována se zhoršeným odbouráváním substrátů CYP2C9, v české populaci se vyskytuje ve frekvenci u 12,2% [77]. U vzácně se vyskytující alely CYP2C8P404A, která byla doposud popsána jen u japonské populace, bylo prokázáno statisticky významné snížení biodegradace amiodaronu v buněčné linii lidského hepatocelulárního karcinomu (HEP G2) [27]. Klinický význam těchto změn není znám a je nutné ho podložit *in vivo* studii.

Polymorfismy v genech, které vedou ke změně aktivity proteinů zapojených do řetězce metabolismu a transportu amiodaronu v entero- a hepatocytech, mohou být příčinou výrazné interindividuální variability biologické dostupnosti a metabolismu amiodaronu u pacientů vedoucí k variabilitě koncentrací léčiva během terapie. Mohou být ale také příčinou významných lékových interakcí potencovaných amiodaronem a jeho metabolitem a přítomností funkčně významného SNPs.

2 Cíle práce

Během mého postgraduálního studia jsem se věnovala následujícím okruhům:

1. V prvním okruhu jsme popsali genotyp u české populace. Cílem bylo popsat frekvenci výskytu vybraných variantních alel u zdravých dobrovolníků v genu kódující enzym CYP2C8
 - a. CYP2C8*2
 - b. CYP2C8*3 (2 substituce v exonu 3 a 8, CYP2C8*3G416A a CYP2C8*3A1196G)
 - c. CYP2C8*4
 - d. CYP2C8 P404Aa v genu MDR1
 - e. Exon 26 C3435T
 - f. Exon 21 G2677A/T
 - g. Exon 12 C1236T
 - h. Exon 17 T-76A
2. V druhém okruhu jsme sledovali vliv bodových polymorfismů v genech MDR1 a CYP2C8 u souboru pacientů užívajících amiodaron.
 - a. sledovali jsme distribuci koncentrace amiodaronu u široké skupiny pacientů užívajících dlouhodobě amiodaron
 - b. stanovili jsme alelické frekvence v souboru pacientů užívajících amiodaron
 - c. hodnotili jsme vliv SNPs na koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu N-desethylamiodaronu
 - d. sledovali jsme bezpečnost léčby amiodaronem pomocí parametrů EKG a biochemických parametrů u jednotlivých genotypových skupin pacientů

3 Metody

V prvním okruhu mé disertační práce jsme analyzovali genotyp u zdravých dobrovolníků v české populaci. Pro stanovení genotypu jsme odebrali krevní vzorky do jednorázových vakuovaných odběrových zkumavek s přídavkem K_2EDTA , ze kterých jsme izolovali leukocytární DNA. DNA jsme izolovali buď vysolovací metodou, nebo za použití kitu na izolaci DNA – QIAamp DNA Blood Mini Kit.

Vysolovací metoda – asi 5ml plné krve jsme přenesli do 20ml RBC pufru (10mM Na_3PO_4 , 150mM NaCl, 1mM $MgCl_2$, pH 7,4), který je lyzační směsí erytrocytů. Směs jsme promíchali a nechali 30 minut stát ve vodní lázni s ledem. Poté jsme směs 10 minut při 3000 ot./min centrifugovali. Supernatant jsme slili a ke zbylé směsi jsme opět přidali RBC pufr, opět jsme vše promíchali a nechali 30 minut stát ve vodní lázni s ledem. Směs jsme opět centrifugovali 10 minut při 3000 ot./min. Lýzu erytrocytů a centrifugaci jsme opakovali až do úplného vyčištění směsi, to znamená dokud nevznikla po slití pufru bílá sedlina tzv. peleta. Ke vzniklé sedlině jsme přilili 3ml roztoku Bristol, promíchali a dále přidali 300 μ l proteinázy K a 300 μ l 10% roztoku SDS (dodecyl sulfátu sodného). Směs jsme nechali inkubovat buď 4 hodiny při 55°C, nebo při 37°C přes noc. Po inkubaci jsme přidali 900 μ l NaCl a asi 2 minuty jsme směs míchali, poté jsme opět centrifugovali při 5000 ot./min 30 min. Vzniklý supernatant jsme smíchali s 8ml vychlazeného 96% etanolu. Došlo k vysrážení vyizolované DNA, která vyplavala na hladinu. Vlákno DNA jsme namotali na sterilní skleněnou tyčinku a nechali oschnout při pokojové teplotě. Poté jsme ji spláchli 150 μ l TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) do eppendorfky a skladovali v lednici při 4°C.

Izolace DNA – QIAamp DNA Blood Mini Kit – při této izolační metodě jsme používali 20 μ l QIAGEN proteázy, která se smíchala s 200 μ l krve a 200 μ l pufru AL (součást izolačního kitu) do předem popsaných eppendorfek. Směs jsme nechali inkubovat 10 minut při 56°C, po vyndání z vodní lázně jsme přidali 200 μ l 96% vychlazeného etanolu a 15 sekund jsme míchali. Celý obsah eppendorfky jsme nalili na kolonku s filtrem (QIAamp Mini Column) a nechali centrifugovat 1 minutu při 8000x g. Poté jsme na filtr nanесли postupně 500 μ l pufru AW1, centrifugovali 1 minutu při 8000x g a proces jsem opakovali s pufrem AW2 6 minut při 14100x g, celé se provádí vždy v nové sběrné zkumavce Collection Tube a filtráty se vyhodí. Závěrem jsme do sterilních a popsaných eppendorfek přenesli filtr, nanесли na něj 200 μ l pufr AE a po krátké inkubaci při pokojové teplotě jsme centrifugovali 1 minutu při

8000x g. Filtr jsme vyhodili a eppendorfky s izolovanou DNA jsme skladovali v lednici při 4°C.

Genotyp MDR1 a CYP2C8 jsme stanovili pomocí metody PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) za využití specifických restrikčních enzymů a navržených primerů pro jednotlivé reakce. Byla provedena analýza pěti bodových polymorfismů v genu CYP2C8 (CYP2C8*2, CYP2C8*3 –v exonu 3 a 8, CYP2C8*4 a CYP2C8 P404A) a čtyř SNPs v genu MDR1 (v exonech 26, 21, 17 a 12). Použité metody jsou detailně popsány v příložených pracích *in extenzo*.

Délky vzniklých restrikčních fragmentů jsme vizualizovali pod UV osvětlením na agarózovém gelu (procentuelní složení gelu jsme upravovali podle délky vzniklých fragmentů a jejich optimální viditelnosti) po proběhlé elektroforéze. Do připraveného gelu jsme nanесли 7 µl vzniklého PCR-RFLP produktu smíchaného s 10 µl nanášecího pufru (1x Loading Dye Solution (Fermentas)). Do poslední jamky gelu jsme vždy nanесли marker (GeneRuler 50bp DNA Ladder (o koncentraci 0,1µg/ µl; Fermentas)) se známými délkami DNA fragmentů pro vyhodnocení délky vzniklých fragmentů v PCR-RFLP. Elektroforézou se jednotlivé iontově nabitě fragmenty PCR-RFLP rozdělily podle velikostí. Po následném obarvení gelu v roztoku TBE pufru s ethidium bromidem (asi 25 minut) byly viditelné jako jednotlivé bandy (proužky) různě vzdálené od startu podle své délky.

V další části práce jsme pro hodnocení bezpečnosti léčby amiodaronem využili standardní biochemická a hematologická vyšetření nemocnice, záznam EKG a analyzovali jsme lékařskou dokumentaci pacientů. Použitá laboratorní diagnostika je detailně popsána na <http://ulbld.lf1.cuni.cz/seznam-lab-vysetreni>.

Pro stanovení koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu byla použita HPLC analýza, viz publikace Plomp et al. 1983 [78]. Kolonu a reagentie pro stanovení dodala společnost Chromsystems, detailně na <http://www.chromsystems.com/de/produkte/therapeutisches-drug-monitoring/amiodaron/reagenzienkits/amiodaron-desethylamiodaron-reagenzienkit-fuer-die-hplc-analytik>.

Protokoly studií byly schváleny Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

3.1 Statistické vyhodnocení dat

Analyzovaný soubor zdravých dobrovolníků a pacientů jsme rozdělili podle výskytu jednotlivých genotypů CYP2C8 a MDR1. Získaná data jsme popsali deskriptivní statistikou. Četnost zastoupení genotypů jsme porovnali pomocí χ^2 kvadrátu, k otestování rozdílů ve skupinových průměrech jsme aplikovali dvouvýběrový t test při normálním rozdělení hodnot, nebo jsme použili Mann-Whitney W test pro porovnání mediánů. Data jsme statisticky zpracovali na 5% hladině významnosti. Očekávanou distribuci genotypů v populaci jsme vypočetli pomocí Hardy-Weinbergovy rovnice a vypočetli jsme 95% interval spolehlivosti.

4 Výsledky

Výsledky z prvního okruhu disertační práce byly plně publikované a jsou přílohou č. 1 a 2. Ve výsledkové části proto uvádím jen jejich stručné shrnutí. Druhý okruh mé práce nebyl dosud publikován, proto uvádím detailní popis výsledků a jejich analýzy.

Charakteristiky sledovaných souborů pacientů

Pro stanovení frekvence výskytu vybraných variantních alel jsme využili krevní vzorky od mladých zdravých dobrovolníků české národnosti získané po podepsání informovaného souhlasu. Pro stanovení genotypu MDR1 bylo zařazeno 90 mužů a 99 žen ve věku od 23 do 28 let. Pro stanovení genotypu CYP2C8 jsme náhodně vybrali vzorky od 94 mužů a 67 žen, průměrného věku $24,3 \pm 1,6$ let.

Distribuci koncentrací amiodaronu jsme nejdříve sledovali u širšího souboru pacientů české národnosti, kterým byla kontrolně měřena koncentrace amiodaronu. Bylo celkem analyzováno 978 vzorků od 602 mužů a 376 žen ve věku od 40 do 90 let.

Pro poslední okruh naší práce jsme zařadili pacienty, po získání jejich informovaného souhlasu, kteří užívali amiodaron v perorální lékové formě v indikaci profylaxe či léčby supraventrikulárních, komorových přetrvávajících nebo paroxysmálních tachyarytmií. Demografický popis zařazeného souboru pacientů shrnuje tabulka 15.

Odběr vzorku pro stanovení koncentrace amiodaronu byl proveden po ukončení období nasyčovací dávky (tj. nejméně po 2 měsících od zahájení léčby).

Tab. 15: Demografická data zařazených pacientů

n (počet)	63
věk(roky)	$72,33 \pm 9,91$
váha (kg)	$81,94 \pm 15,98$
výška (cm)	$171,86 \pm 8,22$
BMI (kg/m^2)	$27,72 \pm 4,85$
průměrná dávka amio (mg/kg/den)	$2,03 \pm 0,57$
počet užívaných léků/pacienta	$7,57 \pm 1,96$

\pm SD (směrodatná odchylka)

4.1 Frekvence genotypů v české populaci

Během analýzy genotypů jsme vzorky bez variantní alely označili jako wild-type (wt/wt), při detekci jedné variantní alely jsme použili označení pro heterozygota – wt/v, vzorky s oběma variantními alelami jsem značili jako v/v. Přítomnost bodových mutací jsme zjišťovali pomocí metodiky PCR-RFLP.

4.1.1 Frekvence polymorfismů CYP2C8 u zdravých dobrovolníků

Analyzovali jsme 161 náhodně získaných vzorků od zdravých dobrovolníků. Dle dostupné literatury jsme stanovovali alely CYP2C8*2, CYP2C8*3, CYP2C8*4 a neoznačenou alelu P404A s možným vlivem na aktivitu enzymu. Zjištěný výskyt alelické a genotypové frekvence souhrnně uvádí tabulka 16.

Ve shodě s ostatními pracemi o výskytu variantních alel v evropské populaci byly nejhojněji se vyskytující alely v české populaci CYP2C8*3 G416A a CYP2C8*3 A1196G. Obě alely se vyskytují v kompletní vazbě a frekvence variantní alely byla pro obě záměny 10,9%, 3 jedinci byli homozygoté s variantní alelou. Alelická frekvence druhé nejčastěji se vyskytující alely v bělošské populaci CYP2C8*4 byla 5,9% v našem vzorku, pouze jeden subjekt měl přítomny obě variantní alely. Ve stanoveném souboru nebyl nalezen žádný subjekt s homozygotním genotypem variantní alely CYP2C8*2, tato alela se v bělošské populaci téměř nevyskytuje. Jen jeden subjekt byl heterozygot s touto variantní alelou, frekvence variantní alely byla 0,3%, tedy ve shodě s ostatními bělošskými populacemi. Alelu P404A, která byla doposud nalezena jen u japonské populace, jsme v našem vzorku detekovali s alelickou frekvencí 0,03%. Relativní frekvence možných kombinací genotypů popisuje tabulka 17.

Výsledky byly v úplné shodě s očekávanými frekvencemi vypočtenými dle Hardy-Weinbergovy rovnice, to svědčí o jejich normální distribuci v české populaci. Frekvence výskytu alel CYP2C8*2, CYP2C8*3, CYP2C8*4 jsou ve shodě s frekvencemi stanovenými u ostatních bělošských populací.

Obrázek 6 znázorňuje upravené fotografie agarózových gelů s PCR fragmenty a popisuje jednotlivé genotypy pro CYP2C8*2, CYP2C8*3, P404A.

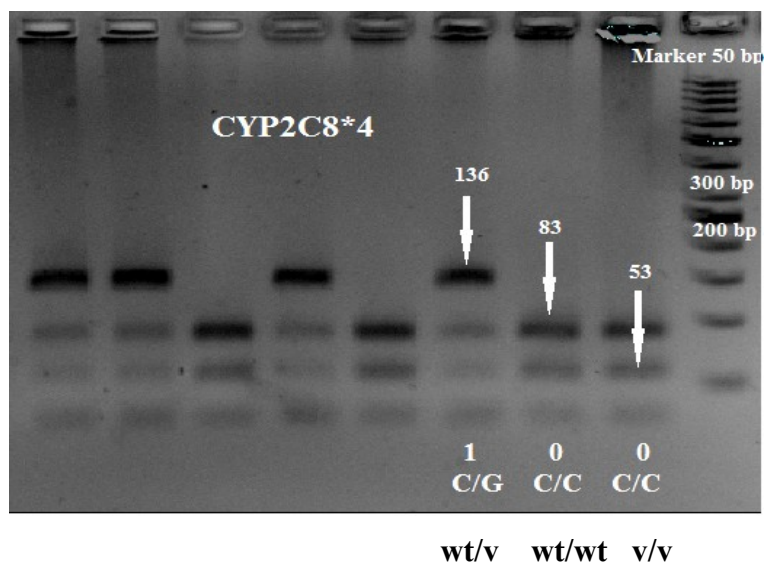
Tab. 16: Pozorované a očekávané frekvence (f) CYP2C8 variantních alel v české populaci

Názvosloví <i>CYP2C8</i>	SNPs	Efekt	Alela		Genotyp		CI		Očekávaná f
			Pozorovaná		Pozorovaná		95%		
				f		f			
*2	A805T	I269F	A	0,997	wt/wt	0,994	1,000	0,982	0,994
			T	0,003	wt/v	0,006	0,000	0,000	0,006
					v/v	0,000	0,000	0,000	0,000
*3	G416A	R139K	G	0,891	wt/wt	0,801	0,863	0,740	0,794
			A	0,109	wt/v	0,180	0,240	0,120	0,194
					v/v	0,019	0,040	0,001	0,012
*3	A1196G	K399R	A	0,891	wt/wt	0,801	0,863	0,740	0,794
			G	0,109	wt/v	0,180	0,240	0,120	0,194
					v/v	0,019	0,040	0,001	0,012
*4	C792G	I264M	C	0,941	wt/wt	0,888	0,937	0,840	0,885
			G	0,059	wt/v	0,106	0,153	0,058	0,111
					v/v	0,006	0,018	0,006	0,003
P404A	C1210G		C	0,966	wt/wt	0,932	0,970	0,893	0,933
			G	0,034	wt/v	0,068	0,107	0,029	0,066
					v/v	0,000	0,000	0,000	0,001

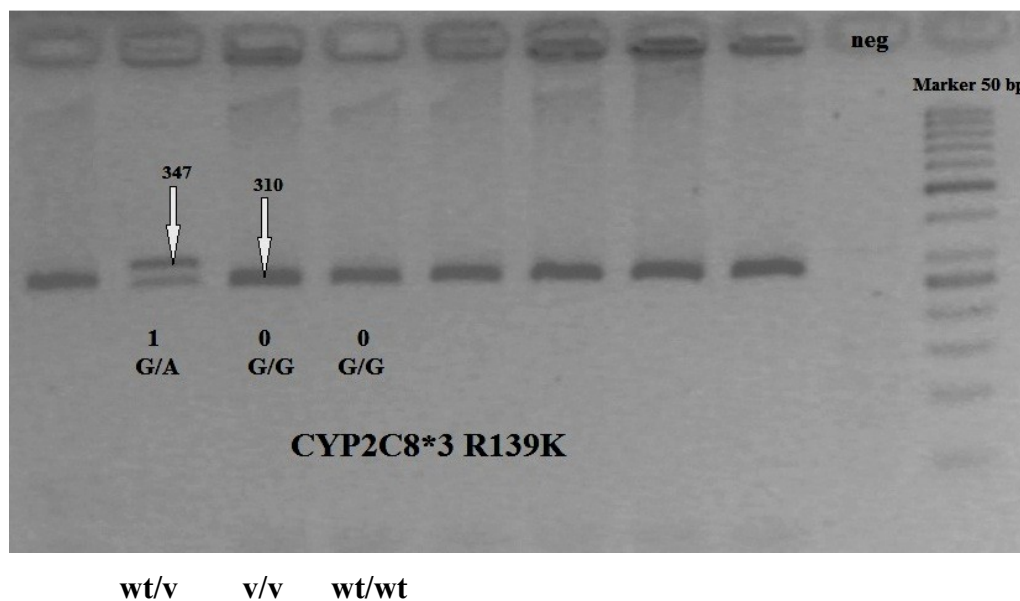
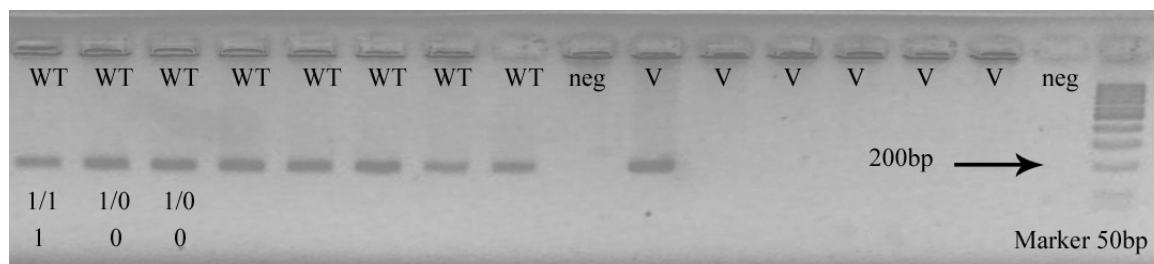
Tab. 17: Relativní frekvence možných kombinací genotypů nejčastěji se vyskytujících variantních alel u české populace CYP2C8*3 (alely R139K a K399R se vyskytují v kompletní vazbě, proto jsou uvedené společně) a CYP2C8*4.

	G416A exon 3, alela CYP2C8*3, A1196G exon 8, alela CYP2C8*3			
	Genotyp	G/G A/A	G/A A/G	A/A G/G
C792G exon 5, alela CYP2C8*4,	C/C	0,702	0,168	0,019
	C/G	0,087	0,019	0,000
	G/G	0,006	0,000	0,000

Obr. 6: Příklad agarózových gelů PCR fragmentů polymorfismů CYP2C8*2, CYP2C8*3, P404A vizualizovaných UV osvětlením po obarvení ethidium bromidem.



P404A C1210G



4.1.2 Frekvence polymorfismů MDR1 u zdravých dobrovolníků

Analyzovali jsme 189 náhodně odebraných vzorků od zdravých dobrovolníků. V naší analýze jsme se zaměřili, stejně jako v ostatních významných pracích zabývajících se populační analýzou genotypů, na detekci nejvíce prostudovaných bodových polymorfismů v genu MDR1, které se často vyskytují i společně v tzv. haplotypech.

Variantní alela 3435T v exonu 26, která ovlivňuje míru exprese a funkci MDR1, byla detekovaná s alelickou frekvencí 56,5%. 64 jedinců mělo homozygotní genotyp pro variantní alelu. V české populaci můžeme očekávat 33,9% jedinců se sníženou expresí transportního proteinu Pgp.

V exonu 21 v pozici 2677 jsou známé dvě variantní alely G>T a G>A, které vedou k záměně v sekvenci aminokyselin (Ala839Ser a Ala839Thr v uvedeném pořadí). Frekvence wild-type alely 2677G byla stanovena v 53,4%, variantní alela 2677T se vyskytla v 46,0% a nenašli jsme žádného homozygota s variantní alelou 2677A. 56 subjektů byli homozygoté s wild-type alelou 2677G a 42 jedinců mělo dvě variantní alely 2677T, 2 jedinci byli heterozygoté s alelou 2677A.

40 subjektů byli homozygoté s četnou tichou variantní alelou v exonu 12 1236T (alelická frekvence 44,5%) a 31 subjektů byli homozygoté s variantní alelou -76A v intronu 17 (alelická frekvence 37,6%).

Zjištěné výsledky byly ve shodě s očekávanými frekvencemi vypočtenými dle Hardy-Weinbergovy rovnice. Pozorované a očekávané frekvence MDR1 SNPs a relativní frekvence možných haplotypů shrnují tabulky 18 a 19. Změřené frekvence byly ve shodě s údaji z literatury o frekvenci výskytu variantních alel u evropské populace.

Obrázek 7 znázorňuje upravené fotografie agarózových gelů s popsány PCR fragmenty s určením genotypů v exonu 26 C3435T, v exonu 17 T-76A a exonu 12 C1234T.

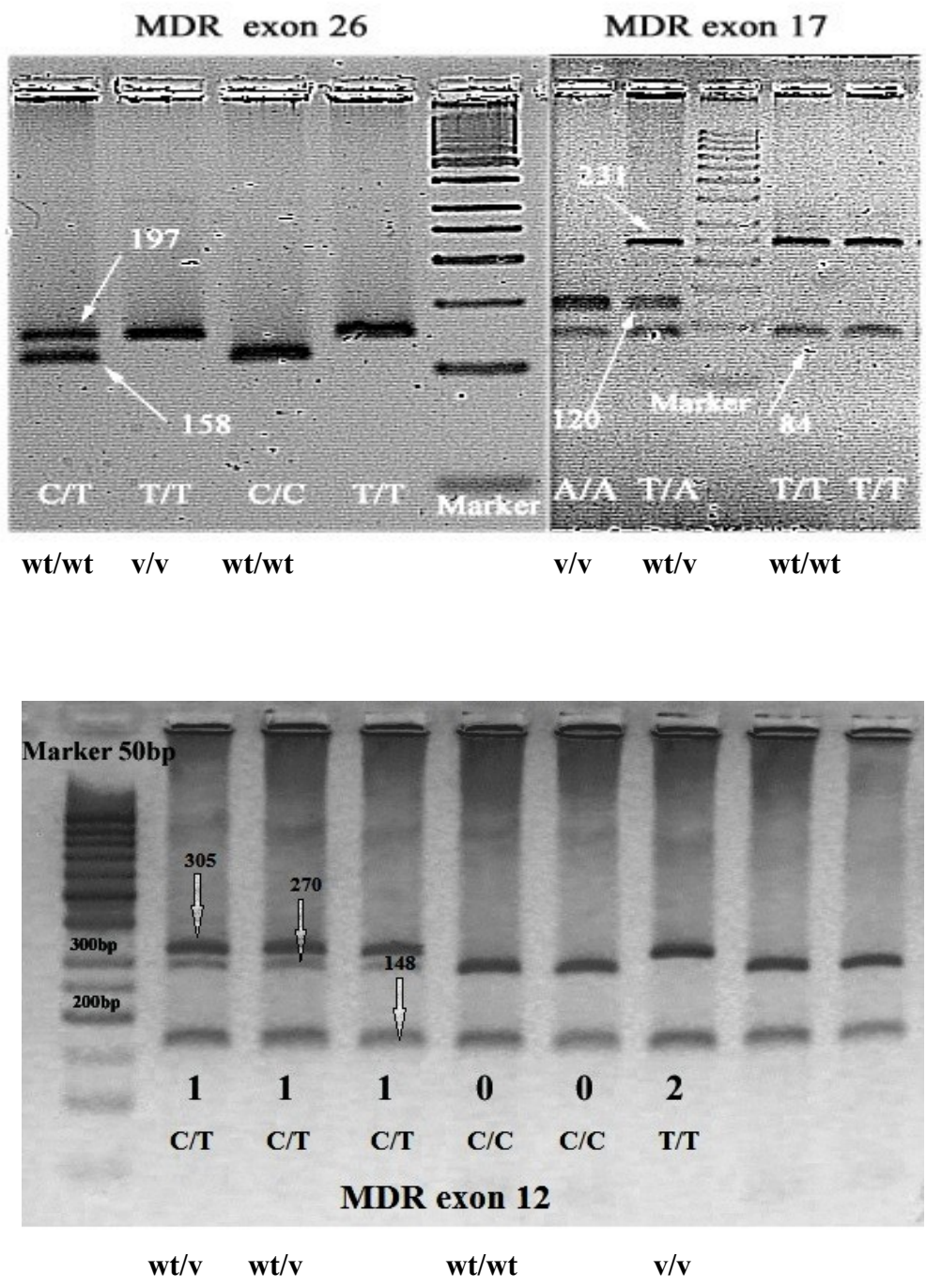
Tab. 18: Pozorované a očekávané frekvence MDR1 variantních alel v české populaci

						Frekvence (f)		
						Pozor- vaná	95% CI	Očeká- vaná
Místo	Pozice	Alela	Efekt	f (%)	Genotyp	%		%
exon 12	cDNA1236	C	?	55,5	C/C	31,7	25,1-38,4	30,6
		T		44,5	C/T	47,1	39,9-54,2	49,4
					T/T	21,2	15,3-26,9	19,9
intron16	Exon17-76	T	?	62,4	T/T	41,3	34,3-48,3	38,9
		A		37,6	T/A	42,3	35,3-49,4	45,8
					A/A	16,4	11,1-21,7	13,7
exon 21	cDNA2677	G	893Ala	53,4	G/G	29,6	23,1-36,1	28,6
		T	893Ser	46,0	G/T	47,1	40,0-54,2	49,2
		A	893Thr	0,53	T/T	22,2	16,3-28,1	21,2
					G/A	1,1	0,5-1,6	0,57
					A/A	0,0	0,0-0,9	0,0
exon 26	cDNA3435				T/A	0,0	0,0-0,9	0,0
		C	Wobble	43,5	C/C	21,2	15,3-26,9	18,9
		T		56,5	C/T	44,9	37,9-52,1	49,1
					T/T	33,9	27,1-40,6	31,9

Tab. 19: Relativní frekvence možných kombinací genotypů u variantních alel C3435T a G2677T/A

	G2677T exon 21			
	Genotyp	G/G	G/T	T/T
C3435T exon 26	C/C	0,19	0,02	0,00
	C/T	0,10	0,34	0,01
	T/T	0,01	0,12	0,21

Obr. 7: Příklad agarózových gelů PCR fragmentů polymorfismů v exonu 26 C3435T, exonu 17 T-76A a exonu 12 C1234T vizualizovaných UV osvětlením po obarvení ethidium bromidem.



4.2 Vliv bodových polymorfismů v genech MDR1 a CYP2C8 u nemocných s amiodaronem

V prvním okruhu disertační práce jsme zjistili, jaká je distribuce genotypů pro známé polymorfismy v naší populaci. V druhé části mé práce jsme navázali sledováním možného vlivu těchto polymorfismů u pacientů, kteří dlouhodobě užívají amiodaron.

Jak bylo ukázáno, amiodaron je substrátem a významným inhibitorem efluxního transmembránového proteinu Pgp a jeho hlavní metabolická cesta je významně katalyzovaná polymorfním enzymem CYP2C8. V literatuře byl opakovaně prokázán možný vliv přítomnosti variantních alel u obou genů na metabolismus léčiv. Byla studována především léčiva s úzkým terapeutickým indexem, s významnými nežádoucími účinky a velkým interakčním potenciálem. Stejně jsou i charakteristiky léčiva amiodaron.

Nejdříve jsme popsali distribuci koncentrací amiodaronu u české populace pacientů dlouhodobě užívajících amiodaron při běžných kontrolách koncentrací léčiva v nemocnici. Je známo, že terapeutická koncentrace amiodaronu a jeho léková odpověď mohou být velmi interindividuálně proměnné a jsou také významně ovlivněné terapeutickými zvyklostmi dané země.

Poté jsme stanovili genotyp u užšího souboru pacientů a provedli analýzu z hlediska genotypových skupin. Z literatury dosud známé genotypové studie s amiodaronem byly především *in vitro* studie, v našem hodnocení jsme sledováním koncentrací amiodaronu a jeho metabolitu a hodnocením bezpečnosti léčby v jednotlivých genotypových skupinách chtěli popsat právě možný vliv SNPs u pacientů dlouhodobě užívajících amiodaron.

4.2.1 Distribuce koncentrací amiodaronu při terapeutickém monitorování

V období dvou let bylo vyšetřeno celkem 978 vzorků (602 mužů, 376 žen) od pacientů užívajících dlouhodobě amiodaron. Vzorky jsme rozdělili do věkových skupin podle dekád a podle pohlaví.

Z našeho souboru je zřejmé, že v jednotlivých věkových skupinách převažovali muži, kromě skupiny 81 až 90 let. Tento trend pravděpodobně odráží nižší incidenci ischemické choroby srdeční u žen do menopauzy a tedy i častější indikaci léčby amiodaronem u mužů.

Koncentrace změřené u žen a mužů jsou v jednotlivých věkových skupinách podobné, vyšší hodnoty jsme zaznamenali u žen ve srovnání s muži pro věkové rozmezí 51 až 60 let, rozdíl mezi skupinami byl statisticky signifikantní na hladině významnosti $p < 0,05$.

Nejnižší změřené koncentrace amiodaronu byly u pacientů nejvyššího věku ve skupině mužů i žen. Rozdíl průměrných hodnot u mužů ve věku 81 až 90 let byl statisticky významný oproti průměrným koncentracím ve věku 61 až 70 let a také skupině pacientů 71 až 80 let, výsledky shrnuje tabulka 20.

Tab. 20: Rozložení koncentrací amiodaronu u jednotlivých věkových skupin

Věková skupina	Počet osob	c Amio (mg/l)	
		Muži	Ženy
40-50	41	1,25 ±0,97	16
51-60	162	1,08±0,79	31
61-70	146	1,28±0,86*	87
71-80	220	1,18±0,82*	194
81-90	33	0,90±0,60	48

* p < 0,05 (věková skupina 81-90 let versus ostatní věkové skupiny)

§ p < 0,05 (věková skupina 51-60 let ženy versus muži)

Až 63,75% vyšetřených pacientů nedosahovalo spodní hranice u nás nejčastěji doporučeného terapeutického rozmezí 1 mg/l. Naopak vyšší koncentrace než je horní doporučená mez terapeutického rozmezí 2,5 mg/l mělo nejvíce pacientů ve věkové skupině 61 až 70 let, celkem z této skupiny pacientů 9,01% . Velmi nízkých koncentrací, menších než nejnižší účinná koncentrace 0,5 mg/l, dosahovala skupina pacientů ve věku 51 až 60 let, především muži, a to až ve 23,32% následované skupinou pacientů ve věku 81 až 90 let (22,22%) (tab. 21).

Tab. 21: Rozdělení souboru pacientů dle dosažených hraničních koncentrací amiodaronu

c Amio (mg/l)	Věk (roky)	40-50 n=57	51-60 n=193	61-70 n=233	71-80 n=414	81-90 n=81
>2,5mg/l	n	5	14	21	24	3
	%	8,77	7,25	9,01	5,80	3,70
≤1mg/l>0,5	n	20	61	78	134	33
	%	35,09	31,61	33,48	32,37	40,74
≤0,5mg/l	n	10	45	38	70	18
	%	17,54	23,32	16,31	16,91	22,22

4.2.2 Alelické frekvence v souboru pacientů dlouhodobě užívajících amiodaron

Změřené alelické a genotypové frekvence v detailně sledovaném souboru pacientů (n=63, z toho 21 žen a 42 mužů) se statisticky neodlišují od frekvencí změřených u náhodně vybrané populace zdravých dobrovolníků (tabulky 22 až 24). Genotypové a alelické frekvence se shodují s očekávanými dle Hardy-Weinbergovy rovnice.

Tab. 22: Alelické frekvence u pacientů léčených amiodaronem (n=63)

MDR		Alelická frekvence(%)	CYP2C8		Alelická frekvence(%)
exon26	C	48,53	*2	A	100
	T	51,47		T	0,00
exon21	G	55,88	*3 139	G	84,99
	T	44,85		A	15,44
	A	0,74	*3 339	A	84,56
exon12	C	57,35		G	15,44
	T	42,65	*4	C	97,06
exon17	T	55,15		G	2,94
	A	44,85	P404A	C	97,06
				G	2,94

Tab. 23: Očekávané a pozorované frekvence genotypů MDR1 u souboru pacientů (n=63)

				Frekvence (f)		
				Pozorovaná	95% CI	Očekávaná
Místo	Pozice	Efekt	Genotyp	%		%
exon 12	cDNA1236	Wobble	C/C	32,35	43,47-21,23	32,89
			C/T	50,00	61,88-38,11	48,92
			T/T	17,65	26,70-8,59	18,19
intron16	Exon17-76	?	T/T	30,88	41,86-19,90	30,41
			T/A	48,53	60,41-36,65	49,47

			A/A	20,59	30,20-10,98	20,12
exon 21	cDNA2677	893Ala	G/G	27,94	38,61-17,28	30,41
		893Ser	G/T	51,47	63,35-39,59	49,47
		893Thr	T/T	19,12	28,46-9,77	20,12
			G/A	1,47	0,00-4,33	0,57
			A/A	0,00	0,00-0,00	0,00
			T/A	0,00	0,00-0,00	0,00
exon 26	cDNA3435	Wobble	C/C	17,65	26,71-8,59	23,55
			C/T	61,76	73,32-50,21	49,96
			T/T	20,59	30,20-10,98	26,49

Tab. 24: Očekávané a pozorované frekvence genotypů CYP2C8 u souboru pacientů (n=63)

Názvosloví	SNPs	Efekt	Genotyp		CI		Očekávaná
			Pozorovaná f		95%		f
*2	A805T	I269F	wt/wt	0,10	0,10	0,10	0,99
			wt/v	0,00	0,00	0,00	0,01
			v/v	0,00	0,00	0,00	0,00
*3	G416A	R139K	wt/wt	0,71	0,82	0,60	0,72
			wt/v	0,28	0,39	0,17	0,26
			v/v	0,01	0,04	0,00	0,02
*3	A1196G	K399R	wt/wt	0,71	0,81	0,60	0,72
			wt/v	0,28	0,39	0,17	0,26
			v/v	0,01	0,04	0,00	0,02
*4	C792G	I264M	wt/wt	0,94	1,00	0,89	0,94
			wt/v	0,06	0,11	0,00	0,06
			v/v	0,00	0,00	0,00	0,00
P404A	C1210G		wt/wt	0,96	1,00	0,91	0,94
			wt/v	0,03	0,07	0,00	0,06
			v/v	0,01	0,04	0,00	0,00

4.2.3 Koncentrace amiodaronu a N-desethylamiodaronu v našem souboru ve srovnání s literaturou

V našem detailně sledovaném souboru pacientů (n=63) byla průměrná denní dávka amiodaronu 159,22 mg/den a průměrná dosažená sérová koncentrace 0,68±0,44 mg/l. Příklady používaného různého dávkování amiodaronu a dosažených koncentrací nalezených v literatuře jsou uvedeny v tabulce 25.

Tab. 25: Koncentrace amiodaronu a N-desethylamiodaronu v našem souboru ve srovnání s různými dávkami léčiva v literatuře

Podaná dávka	Amiodaron (mg/l)	N-desethylamiodaron (mg/l)	Ref.
200 mg/d	1,06±0,43	1,04±0,34	[79]
	1,45±0,50	1,38±0,74	[80]
400 mg/d	1,93±0,80	1,79±0,65	[79]
	3,05±1,36	2,33±1,22	[80]
600 mg/d	3,46±1,50	2,79±1,17	[79]
	3,78±1,61	2,92±1,40	[80]
vlastní měření <159,22 mg/d	0,68±0,44	0,54±0,31	

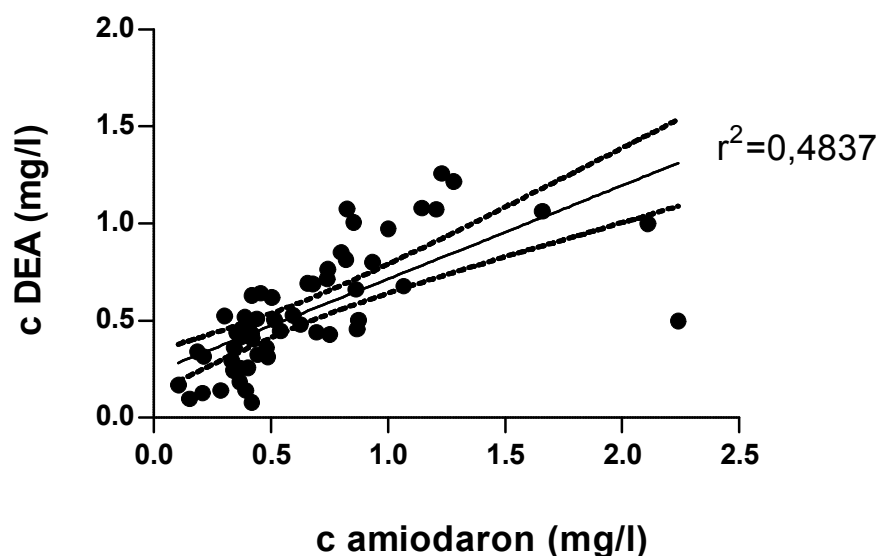
Průměrné změřené koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu rozdělené do jednotlivých terapeutických skupin jsou uvedené v tabulce 26. V měření vyšel klesající metabolický poměr pro zvyšující se koncentraci parentní látky.

Mezi koncentracemi amiodaronu a jeho hlavního metabolitu N-desethylamiodaronu jsme našli trend lineární závislosti, graf 1.

Tab. 26: Distribuce koncentrací amiodaronu a N-desethylamiodaronu pro vybraný soubor pacientů (n=63)

Terapeutické rozmezí mg/l	Počet pacientů	cAmio	cDEA	cDEA/cAmio
< 0,5	29	0,36±0,10	0,34±0,15	0,98±0,42
≥0,5 ≤ 1	23	0,74±0,15	0,67±0,20	0,91±0,22
>1 ≤ 1,5	7	1,19±0,09	1,06±0,23	0,89±0,15
>1,5 ≤ 2,5	4	1,90±0,32	0,85±0,31	0,45±0,21
> 2,5	0	0	0	0

Graf 1: Korelace koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu N-desethylamiodaronu



4.2.4 Koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu N-desethylamiodaronu u genotypových skupin CYP2C8

Nejdříve jsme v našem měření sledovali závislost metabolického poměru v jednotlivých genotypových skupinách CYP2C8 pro různá terapeutická rozmezí, nenašli jsme statisticky významný rozdíl, výsledky shrnuje tabulka 27.

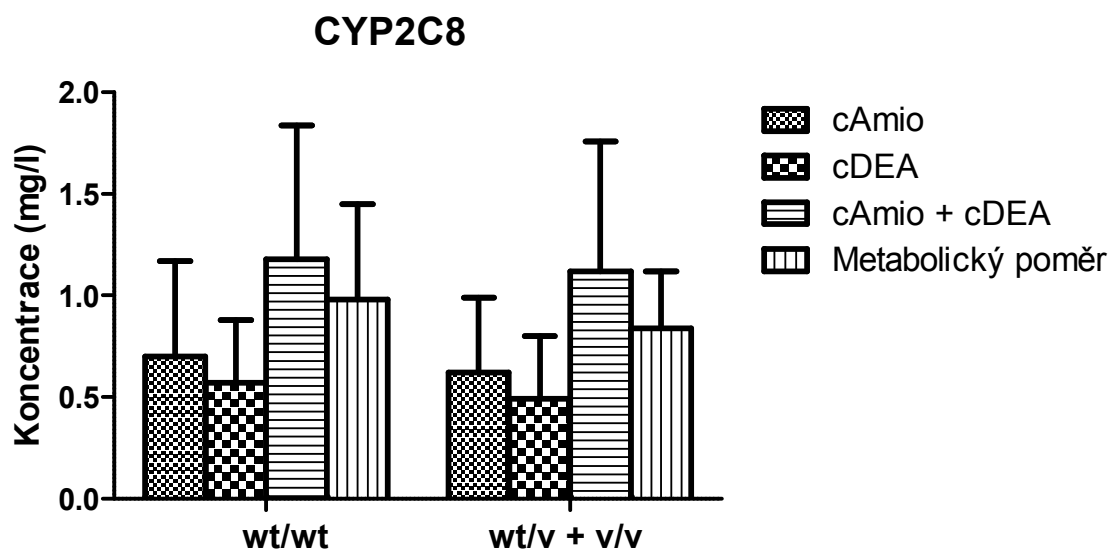
Z měření jsme zjistili, že u případů s alespoň jednou variantní alelou ze čtyř vyšetřovaných variantních alel - CYP2C8*2 (v souboru nebyl nalezen žádný jedinec s variantní alelou), CYP2C8*3, CYP2C8*4 a alely P404A byl naměřen mírně nižší metabolický poměr plazmatických koncentrací amiodaronu a jeho aktivního metabolitu 0,84 oproti jedincům s wild-type homozygotním genotypem ve všech alelách, kde tento poměr byl 0,98. Rozdíly nebyly statisticky signifikantní, výsledky jsou vyjádřené v grafu 2.

Tab. 27: Závislost metabolického poměru u genotypu CYP2C8 pro jednotlivá terapeutická rozmezí

Terapeutické rozmezí	Počet pacientů	cDEA/cAmio	cDEA/cAmio
<i>mg/l</i>	<i>n</i>	<i>wt/wt</i>	<i>wt/v + v/v</i>
< 0,5	30	1,07±0,60	0,91±0,35
≥0,5 ≤ 1	23	0,97±0,21	0,80±0,21
>1	10	0,63±0,30	0,72±0,35

rozdíl mezi skupinami wt/v+v/v versus wt/wt nebyl statisticky významný pro všechny hodnoty

Graf 2. Koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu v jednotlivých genotypových skupinách pro CYP2C8



4.2.5 Koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu *N*-desethylamiodaronu u genotypových skupin MDR1

Nejdříve jsme v našem měření sledovali závislost metabolického poměru v jednotlivých genotypových skupinách MDR1 pro různá terapeutická rozmezí, statisticky významný rozdíl jsme zaznamenali mezi genotypem s oběma wild-type alelami a homozygotním genotypem s variantní alelou v exonu 17 pro rozmezí $\geq 0,5 \leq 1$, výsledky shrnují tabulky 28 – 31.

Tab. 28: Závislost metabolického poměru u genotypu MDR1 exon 26 pro jednotlivá terapeutická rozmezí

Terapeutické rozmezí	Počet pacientů	cDEA/cAmio	cDEA/cAmio	cDEA/cAmio
<i>mg/l</i>	<i>n</i>	<i>wt/wt</i>	<i>wt/v</i>	<i>v/v</i>
< 0,5	30	0,88±0,40	0,96±0,52	1,39±1,11
$\geq 0,5 \leq 1$	23	0,77±0,29	0,97±0,17	0,75±0,45
>1	10	0,00	0,64±0,33	0,61±0,30

rozdíl mezi skupinami v/v versus wt/wt, wt/v versus wt/wt nebyl statisticky významný pro všechny hodnoty

Tab. 29: Závislost metabolického poměru u genotypu MDR1 exon 21 G>T pro jednotlivá terapeutická rozmezí

Terapeutické rozmezí	Počet pacientů	cDEA/cAmio	cDEA/cAmio	cDEA/cAmio
<i>mg/l</i>	<i>n</i>	<i>wt/wt</i>	<i>wt/v</i>	<i>v/v</i>
< 0,5	30	1,00±0,48	1,00±0,61	0,93±0,39
$\geq 0,5 \leq 1$	23	0,78±0,21	0,79±0,49	0,83±0,44
>1	10	0,75±0,39	0,55±0,41	0,60±0,36

rozdíl mezi skupinami v/v versus wt/wt, wt/v versus wt/wt nebyl statisticky významný pro všechny hodnoty

Tab. 30: Závislost metabolického poměru u genotypu MDR1 exon 12 pro jednotlivá terapeutická rozmezí

Terapeutické rozmezí	Počet pacientů	cDEA/cAmio	cDEA/cAmio	cDEA/cAmio
<i>mg/l</i>	<i>n</i>	<i>wt/wt</i>	<i>wt/v</i>	<i>v/v</i>
< 0,5	30	0,98±0,48	1,04±0,57	1,03±0,40
≥0,5 ≤ 1	23	0,79±0,24	0,77±0,44	0,83±0,44
>1	10	0,49±0,30	0,45±0,40	0,60±0,36

rozdíl mezi skupinami v/v versus wt/wt, wt/v versus wt/wt nebyl statisticky významný pro všechny hodnoty

Tab. 31: Závislost metabolického poměru u genotypu MDR1 exon 17 pro jednotlivá terapeutická rozmezí

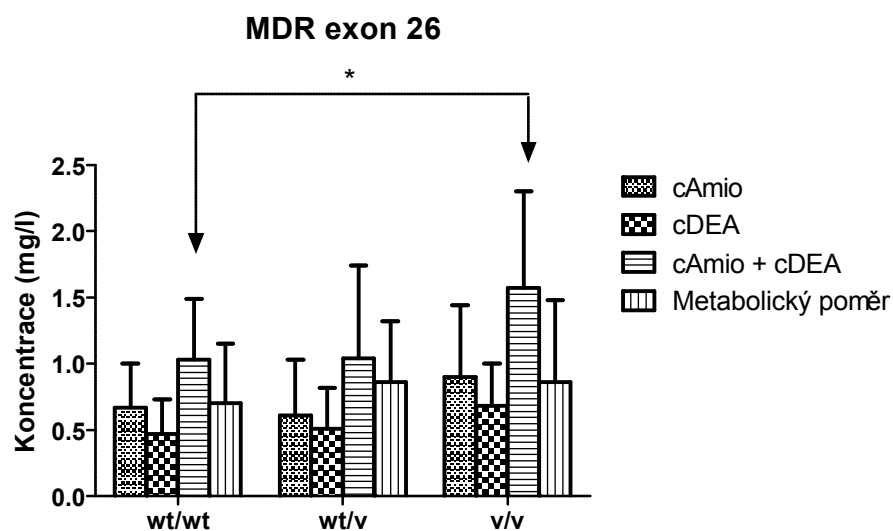
Terapeutické rozmezí	Počet pacientů	cDEA/cAmio	cDEA/cAmio	cDEA/cAmio
<i>mg/l</i>	<i>n</i>	<i>wt/wt</i>	<i>wt/v</i>	<i>v/v</i>
< 0,5	30	0,91±0,31	1,12±0,61	0,89±0,43
≥0,5 ≤ 1	23	1,02±0,16*	0,88±0,24	0,66±0,10
>1	10	0,69±0,34	0,70±0,34	0,47±0,00

* $p < 0,05$ (v/v versus wt/wt), ostatní $p - NS$ (při porovnání skupin v/v versus wt/wt, wt/v versus wt/wt)

U zjištěných polymorfismů v genu MDR1 jsou patrné vyšší koncentrace u jedinců s homozygotním variantním genotypem v exonu 26 a v exonu 21 G>T, jak znázorňuje graf 3. Homozygoté s variantní alelou v exonu 26 měli vyšší součet koncentrací amiodaronu a jeho metabolitu 1,57 mg/l oproti homozygotům s wild-type alelou, kde tento součet byl 1,03 mg/l, rozdíl byl statisticky významný na hladině významnosti $p < 0,05$. Stejný trend byl pozorován pro variantní alelu 2677T v exonu 21 (koncentrace 1,37mg/l pro homozygotní variantní genotyp a 1,19 pro genotyp u homozygotů s wild-type alelou) a pro mutaci v poloze exonu 12 (homozygoté s variantní alelou dosahovali průměrných koncentrací 1,46mg/l oproti průměrné koncentraci 1,28 mg/l u homozygotů bez variantní alely). Rozdíly nebyly statisticky signifikantní. Koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu v jednotlivých genotypových

skupinách v exonu 26 jsou vyjádřené v grafu 3. Výsledky pro další SNPs souhrnně uvádí tabulky 32 až 34. Polymorfismus v exonu 21 G>A není uveden, neboť byl nalezen pouze jeden případ s heterozygotním genotypem, homozygot s variantní alelou žádný.

Graf 3. Koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu v jednotlivých genotypových skupinách v exonu 26



* p < 0,05

Tab. 32: Koncentrace amiodaronu a metabolitu u polymorfismu MDR1 v exonu 21 G>T

Exon21 G-T	cAmio	cDEA	Součet cAmio+cDEA	Metabolický poměr
wt/wt	0,76±0,46	0,56±0,31	1,19±0,76	0,86±0,37
wt/v	0,59±0,38	0,52±0,30	1,08±0,61	1,00±0,48
v/v	0,80±0,54	0,59±0,33	1,37±0,77	0,81±0,40

Tab. 33: Koncentrace amiodaronu a metabolitu u polymorfismu MDR1 v exonu 12

Exon 12	cAmio	cDEA	Součet cAmio+cDEA	Metabolický poměr
wt/wt	0,74±0,48	0,58±0,36	1,28±0,80	0,88±0,36
wt/v	0,59±0,36	0,49±0,27	1,04±0,55	0,98±0,49
v/v	0,84±0,54	0,63±0,31	1,46±0,73	0,90±0,33

Tab. 34: Koncentrace amiodaronu a metabolitu u polymorfismů MDR1 v exonu 17

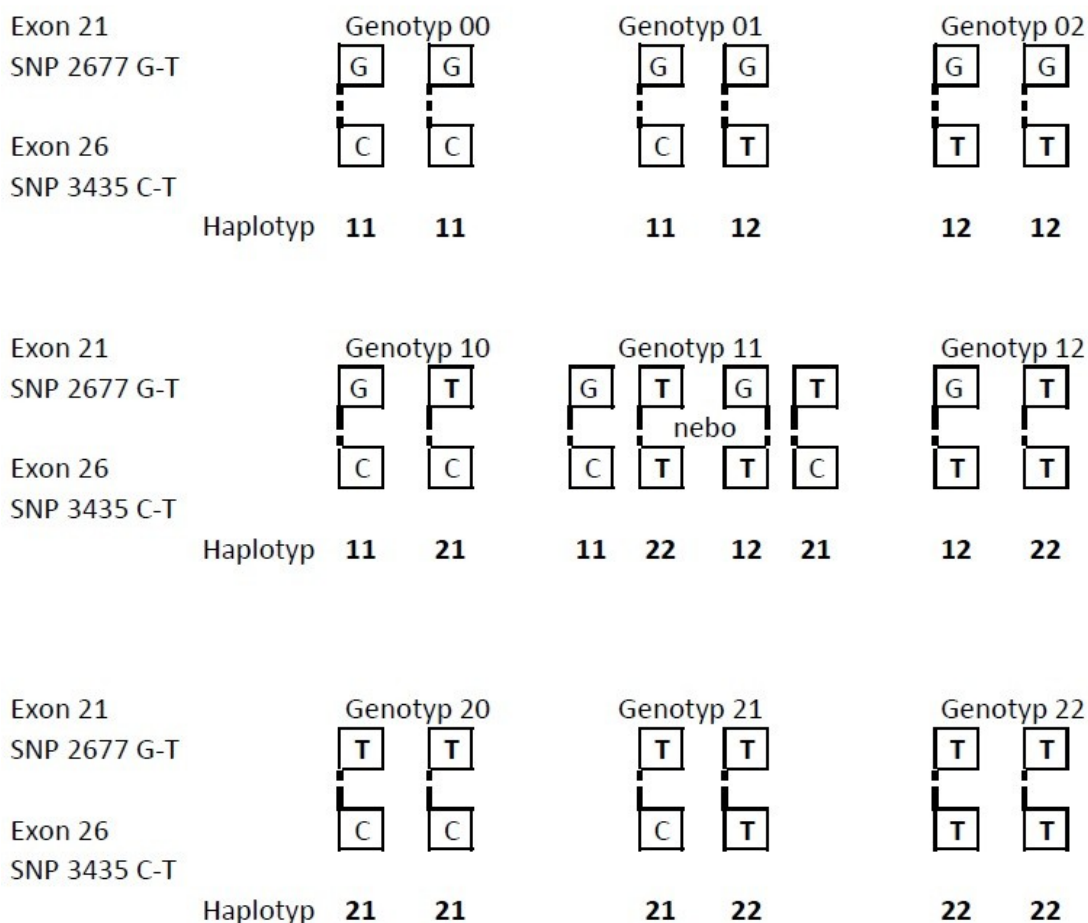
Exon 17	cAmio	cDEA	Součet cAmio+cDEA	Metabolický poměr
wt/wt	0,76±0,46	0,63±0,31	1,38±0,69	0,91±0,27
wt/v	0,61±0,39	0,53±0,31	1,12±0,63	1,00±0,51
v/v	0,72±0,54	0,44±0,26	1,08±0,77	0,79±0,37

4.2.6 Vliv haplotypových skupin na koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu N-desethylamiodaronu u polymorfismů MDR1 a CYP2C8

Pro zjištění vlivu haplotypových skupin jsme vycházeli z práce Johna et al. 2002 [46]. Nejdříve jsme závislost haplotypů otestovali na menší skupině pacientů, vytvořili jsme tři skupiny vždy po deseti pacientech, 10 homozygotů s wild-type alelou, 10 heterozygotů a 10 homozygotů s variantní alelou, tzn. že vzorek pacientů nebyl náhodně vybraný soubor, ale byl definován genotypem. Ve stanovení jsme porovnávali tyto haplotypové skupiny – haplotyp 11, 12, 21, 22. Kódování haplotypů bylo následující – 1 odpovídá sekvenci v exonu 21, 2677G a v exonu 26, 3435 C, 2 se rovná sekvenci v exonu 21, 2677T a v exonu 26, 3435 T. Kombinace haplotypů a výsledných genotypů názorně zobrazuje obrázek 8 a výsledky shrnuje tabulka 35. Mezi skupinami jsme neprokázali statisticky významný rozdíl (NS), pouze pro haplotyp 11, 21 a 22 je naznačený trend pro možný rozdíl mezi skupinami ($p = 0,06, 0,05$ a $0,08$, jednotlivě). Z měření je zřejmé, že jedinci s haplotypy 12 a 22 dosahují vyšších koncentrací parentní látky a jejího metabolitu. Výsledky porovnání genotypů s různými kombinacemi haplotypů uvádí tabulka 36. Pro statistické hodnocení byly zahrnuty

genotypy s více než 8 vzorky (genotyp 00, 11 a 22) a byl použit Kruskal-Wallis test, statistická významnost mezi třemi genotypy nebyla nalezena.

Obr. 8: Kombinace haplotypů a výsledných genotypů pro polymorfismy MDR1



Tab. 35: Dosažené koncentrace pro jednotlivé haplotypové skupiny 11, 12, 21 a 22 u vybraného souboru pacientů dle genotypu (n=30).

Počet jedinců	n	f	cAmio	cDEA	Součet cAmio+cDEA	Metabolický poměr
haplotyp 11	19	0,63	0,59±0,32	0,56±0,30	1,15±0,59	1,00±0,40
bez haplotypu 11	11		0,92±0,61	0,66±0,36	1,58±0,84	0,79±0,28
p			0,06	NS	NS	NS
haplotyp 21	3	0,1	0,34±0,06	0,28±0,16	0,63±0,22	0,78±0,32

bez haplotypu 21	27		0,75±0,48	0,63±0,31	1,38±0,71	0,94±0,38
p			0,07	0,05	0,06	NS
haplotyp 12	3	0,1	0,88±0,70	0,76±0,28	1,64±0,98	1,13±0,56
bez haplotypu 12	27		0,69±0,45	0,57±0,32	1,27±0,69	0,90±0,35
p			NS	NS	NS	NS
haplotyp 22	19	0,63	0,81±0,54	0,66±0,34	1,47±0,79	0,93±0,35
bez haplotypu 22	11		0,54±0,24	0,47±0,24	1,01±0,44	0,92±0,43
p			NS	NS	0,08	NS

Tab. 36: Vliv MDR1 genotypů vymezených polymorfismy 2677G-T v exonu 21 a 3435C-T v exonu 26 na koncentrace amiodaronu a jeho metabolitu

Genotyp/ haplotyp	Počet jedinců	cAmio	cDEA	Součet cAmio+cDEA	Metabolický poměr
00/11-11	8	0,62±0,24	0,51±0,26	1,13±0,45	0,85±0,36
01/11-12	1	0,30	0,53	0,83	1,74
02/12-12	0	-	-	-	-
10/11-21	2	0,35±0,08	0,30±0,22	0,64±0,31	0,81±0,45
11/11-22	8	0,66±0,42	0,67±0,34	1,33±0,75	1,12±0,36
12/12-22	2	1,17±0,69	0,88±0,27	2,05±0,96	0,83±0,26
20/21-21	0	-	-	-	
21/21-22	1	0,34	0,25	0,59	0,72
22/22-22	8	0,93±0,63	0,65±0,36	1,58±0,82	0,79±0,32

Následně jsme vliv haplotypů MDR1 sledovali u celkového souboru pacientů užívajících dlouhodobě amiodaron (n=63). Jako statisticky významné se ukázalo, že pacienti bez haplotypu 21 dosahují vyšších plazmatických koncentrací než pacienti s haplotypem 21. Potom jsme prokázali statistickou závislost pro haplotyp 12, kdy pacienti s tímto haplotypem měli vyšší koncentrace než pacienti bez něj. Pro haplotyp 22 jsme závislost nepozorovali, proto není v tabulce uveden. Haplotyp 12, pro který jsme našli statistickou významnost, jsme následně rozdělili podle přítomnosti alespoň jedné stanovované variantní alely CYP2C8, statisticky významný rozdíl mezi skupinami jsme neprokázali. U případů s alespoň jednou

variantní alelou jsme pozorovali klesající metabolický poměr, tzn. že dle očekávání byly průměrné koncentrace metabolitu v této skupině nižší oproti jedincům bez variantní alely CYP2C8, rozdíl ale nebyl statisticky signifikantní. Výsledky shrnují tabulky 37 a 38.

Tab. 37: Koncentrace pro jednotlivé haplotypové skupiny 11, 12 a 21 u souboru pacientů dlouhodobě užívajících amiodaron (n=63).

Počet jedinců	n	cAmio	cDEA	Součet cAmio+cDEA	Metabolický poměr
haplotyp 11	47	0,63±0,40	0,52±0,29	1,11±0,63	0,95±0,36
bez haplotypu 11	16	0,82±0,53	0,64±0,32	1,44±0,74	0,96±0,55
haplotyp 21	5	0,40±0,21	0,39±0,24	0,78±0,44	0,97±0,38
bez haplotypu 21	58	0,71±0,45*	0,57±0,30	1,25±0,69	0,91±0,35
haplotyp 12	10	0,92±0,58	0,71±0,31	1,63±0,85	0,89±0,37
bez haplotypu 12	53	0,64±0,40	0,52±0,29	1,11±0,61*	0,93±0,35

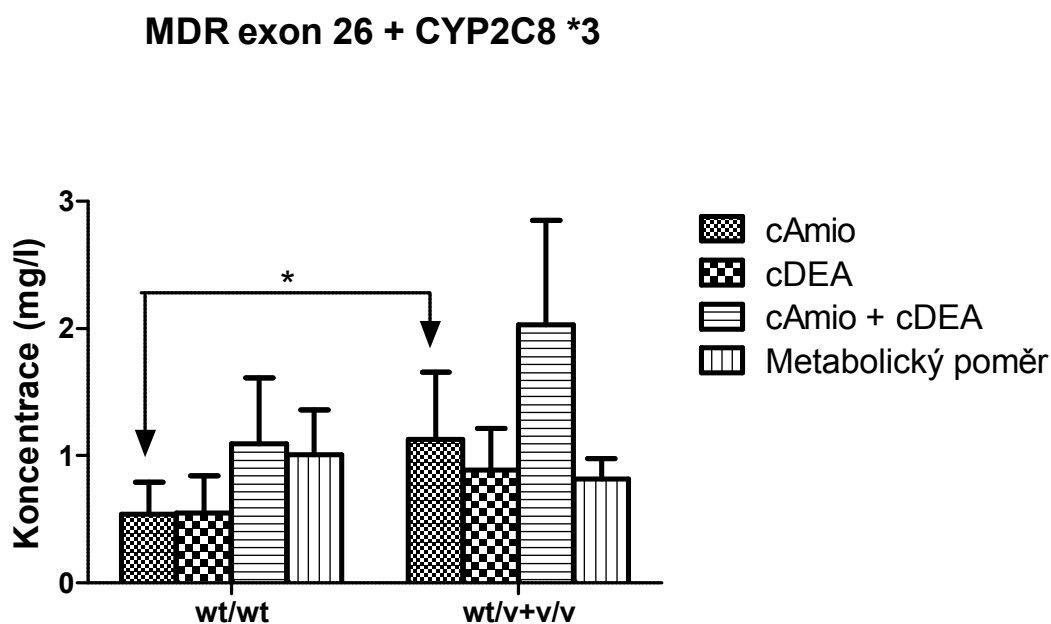
*p < 0,05

Tab. 38: Soubor pacientů s haplotypem 12 rozdělený podle přítomnosti alespoň jedné sledované variantní alely CYP2C8

Počet jedinců	n	cAmio	cDEA	Součet cAmio+cDEA	Metabolický poměr
	10	Haplotyp 12			
CYP2C8 s variantní alelou	5	0,89±0,54	0,72±0,42	1,61±0,93	0,84±0,20
CYP2C8 bez variantní alely	5	0,96±0,68	0,61±0,12	1,10±0,38	1,38±0,51
	53	Bez haplotypu 12			
CYP2C8 s variantní alelou	15	0,55±0,26	0,48±0,25	1,02±0,48	0,92±0,32
CYP2C8 bez variantní alely	38	0,68±0,44	0,53±0,31	1,16±0,67	0,93±0,37

Při porovnání pouze homozygotů s variantní alelou MDR1 v exonu 26 současně za přítomnosti jedné variantní alely CYP2C8*3 (n=3) (homozygotní jedinec nebyl v tomto souboru nalezen) s jedinci s oběma wild-type alelami MDR1 v exonu 26 a oběma wild-type alelami CYP2C8 (n=6) jsme mezi skupinami našli statisticky významný rozdíl. Výsledky znázorňuje graf 4.

Graf 4: Kombinace genotypových skupin polymorfismů MDR1 v exonu 26 a variantní alely CYP2C8*3



* $p < 0,05$

4.2.7 Vliv amiodaronu na EKG a biochemické parametry v jednotlivých genotypových skupinách

U vybraného souboru pacientů jsme hodnotili parametry EKG, které amiodaron ovlivňuje. Sledovali jsme interval QT, komplex QRS a tepovou frekvenci (TF). Z biochemických parametrů jsme hodnotili jaterní enzymy - aspartátaminotransferázu (AST), alaninaminotransferázu (ALT), gama-glutamyltransferázu (GGT), alkalickou fosfatázu (ALP), kreatinin, ureu, celkový bilirubin, thyreotropní hormon (TSH) a iontovou rovnováhu (Na^+ , K^+ , Cl^-).

Výsledky hodnot získaných z křivky EKG shrnují tabulky 39 až 43. Mezi genotypovými skupinami CYP2C8 (homozygoté s wild type alelou oproti jedincům s alespoň jednou sledovanou variantní alelou CYP2C8) a hodnocenými parametry EKG jsme neprokázali vzájemný vztah.

V genu MDR1 jsme u skupiny homozygotů s wild-type alelou v exonu 26, v exonu 21 G-T a v exonu 12 zaznamenali vyšší hodnoty QT intervalu oproti ostatním genotypům, rozdíl nebyl statisticky významný. Pro exon 17 byl vztah opačný, hodnoty QT intervalu byly větší u genotypu s oběma variantními alelami a rozdíl byl statisticky významný na hladině významnosti $p < 0,05$.

Tab. 39: Průměrné hodnoty EKG pro genotypové skupiny CYP2C8

	CYP2C8	
EKG	wt/wt	wt/v+v/v
QT (ms)	432±0,05	415±0,07
QRS (ms)	137±0,16	121±0,06
TF	67,29±13,11	69,55±10,43

Tab. 40: Průměrné hodnoty EKG pro genotypové skupiny MDR1 exon 26

	MDR exon 26		
EKG	wt/wt	wt/v	v/v
QT (ms)	456±0,06	421±0,06	418±0,06
QRS (ms)	124±0,07	119±0,04	103±0,03
TF	65,75±19,20	68,69±10,60	68,36±9,04

Tab. 41: Průměrné hodnoty EKG pro genotypové skupiny MDR1 exon 21

	MDR exon 21 G-T		
EKG	wt/wt	wt/v	v/v
QT (ms)	447±0,07	424±0,05	407±0,05
QRS (ms)	117±0,06	118±0,04	108±0,02
TF	69,00±15,00	66,73±11,11	69,69±11,29

Tab. 42: Průměrné hodnoty EKG pro genotypové skupiny MDR1 exon 12

	MDR exon 12		
EKG	wt/wt	wt/v	v/v
QT (ms)	452±0,06	422±0,05	409±0,05
QRS (ms)	119±0,06	108±0,04	108±0,02
TF	65,47±9,08	69,07±14,17	69,50±11,77

Tab. 43: Průměrné hodnoty EKG pro genotypové skupiny MDR1 exon 17

	MDR exon 17		
EKG	wt/wt	wt/v	v/v
QT (ms)	415±0,06	423±0,05	458±0,07*
QRS (ms)	115±0,03	112±0,04	130±0,07
TF	67,84±10,73	68,10±10,96	68,17±17,73

*P < 0,05

Biochemické parametry kreatininu, urey a jaterního enzymu GGT jsme rozdělili podle pohlaví, neboť jejich doporučená referenční rozmezí se liší pro ženské a mužské pohlaví. Pouze pro GGT u mužů byl naznačený možný vztah s genotypem. Pro genotyp CYP2C8 jsme zjistili statisticky nevýznamně vyšší hodnoty pro wild-type homozygotní genotyp. U polymorfismů MDR1 jsme tento trend našli u mužů pouze pro exon 26 a exon 21 G-T, kdy výskyt variantní alely byl spojen s vyššími hodnotami enzymu GGT. V exonech 12 a 17 jsme tento vztah nepozorovali. Z měření jsme vyloučili hodnotu pacienta, u kterého právě probíhala akutní cholelithiáza a vedla k vysokým hodnotám GGT (14 μ kat/l). Výsledky shrnují tabulky 44 až 48. Pro ostatní jaterní enzymy ALT, AST a ALP, kreatinin a ureu jsme nepozorovali žádný vztah ke genotypovým skupinám. Stejně i pro parametry iontové rovnováhy (Na^+ , K^+ , Cl^-) jsme nezaznamenali rozdíl do 5% výskytu mezi jednotlivými skupinami. Ani jsme nepozorovali u žádného pacienta větší výkyv hodnot (nad 5%) od normálních hodnot referenčního rozmezí.

Tab. 44: Průměrné hodnoty biochemických parametrů v závislosti na genotypu CYP2C8

	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Urea (mmol/l)	GGT ($\mu\text{kat/l}$)	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Urea (mmol/l)	GGT ($\mu\text{kat/l}$)
	CYP2C8 - ženy			CYP2C8 - muži		
wt/wt	106,47 \pm 37,91	7,63 \pm 3,43	0,59 \pm 0,37	113,17 \pm 27,79	7,44 \pm 3,14	1,20 \pm 1,34
wt/v+v/v	106,43 \pm 55,45	8,94 \pm 5,99	0,53 \pm 0,22	121,32 \pm 31,32	7,77 \pm 2,82	0,97 \pm 0,56

Tab. 45: Průměrné hodnoty biochemických parametrů v závislosti na genotypu MDR1 exon 26

	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Urea (mmol/l)	GGT ($\mu\text{kat/l}$)	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Urea (mmol/l)	GGT ($\mu\text{kat/l}$)
	MDR1 exon 26 - ženy			MDR1 exon 26 - muži		
wt/wt	122,67 \pm 56,77	7,95 \pm 5,59	0,81 \pm 0,62	123,44 \pm 34,98	8,50 \pm 5,11	0,70 \pm 0,23
wt/v	96,14 \pm 30,40	7,76 \pm 3,49	0,47 \pm 0,22	114,96 \pm 28,83	7,47 \pm 2,45	1,35 \pm 1,38
v/v	125,60 \pm 63,26	8,98 \pm 6,73	0,70 \pm 0,32	111,31 \pm 24,28	6,83 \pm 1,47	0,80 \pm 0,44
wt/v+v/v	108,25 \pm 44,19	8,61 \pm 4,59	0,55 \pm 0,26	113,04 \pm 27,04	7,36 \pm 2,24	1,29 \pm 1,35

Tab. 46: Průměrné hodnoty biochemických parametrů v závislosti na genotypu MDR1 exon 21 G-T

	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Urea (mmol/l)	GGT ($\mu\text{kat/l}$)	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Urea (mmol/l)	GGT ($\mu\text{kat/l}$)
	MDR1 exon 21 G-T - ženy			MDR1 exon 21 G-T - muži		
wt/wt	98,14 \pm 42,44	6,55 \pm 3,61	0,76 \pm 0,39	118,82 \pm 32,41	8,17 \pm 4,06	0,71 \pm 0,37
wt/v	120,36 \pm 47,85	9,66 \pm 4,98	0,43 \pm 0,19	121,32 \pm 29,98	7,66 \pm 2,81	1,28 \pm 1,33
v/v	83,00 \pm 2,65	6,23 \pm 1,21	0,70 \pm 0,44	100,46 \pm 16,91	6,63 \pm 2,02	1,22 \pm 1,24

Tab. 47: Průměrné hodnoty biochemických parametrů v závislosti na genotypu MDR1 exon 12

	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Urea (mmol/l)	GGT ($\mu\text{kat/l}$)	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Urea (mmol/l)	GGT ($\mu\text{kat/l}$)
	MDR1 exon 12 - ženy			MDR1 exon 12 - muži		
wt/wt	100,86 \pm 40,37	6,73 \pm 3,48	0,63 \pm 0,41	116,00 \pm 30,91	8,13 \pm 3,66	1,33 \pm 1,57
wt/v	112,92 \pm 47,45	8,95 \pm 4,88	0,49 \pm 0,24	123,30 \pm 30,36	7,63 \pm 2,98	0,94 \pm 0,73
v/v	84,00 \pm 2,83	6,30 \pm 1,70	0,88 \pm 0,46	100,46 \pm 16,91	6,63 \pm 2,02	1,22 \pm 1,24

Tab. 48: Průměrné hodnoty biochemických parametrů v závislosti na genotypu MDR1 exon 17

	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Urea (mmol/l)	GGT ($\mu\text{kat/l}$)	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Urea (mmol/l)	GGT ($\mu\text{kat/l}$)
	MDR1 exon 17 - ženy			MDR1 exon 17 - muži		
wt/wt	92,67 \pm 30,83	5,70 \pm 1,12	0,61 \pm 0,35	105,79 \pm 19,15	7,24 \pm 2,53	1,19 \pm 1,27
wt/v	114,77 \pm 43,21	9,73 \pm 4,70	0,44 \pm 0,20	124,40 \pm 31,82	7,31 \pm 2,82	1,07 \pm 1,21
v/v	98,00 \pm 67,67	6,17 \pm 5,01	1,09 \pm 0,16	114,11 \pm 32,85	8,61 \pm 4,11	1,11 \pm 0,86

Pro parametr funkce štítné žlázy, TSH, jsme našli možný vztah mezi genotypovými skupinami. Hodnoty TSH jsme získali pouze od 45 pacientů. Pro genotypové skupiny u enzymu CYP2C8 byly hodnoty TSH vyšší u homozygotů s wild-type alelou - 5,73 U/l v porovnání se skupinou s alespoň jednou variantní alelou v genotypu CYP2C8 - 2,16 U/l, tento rozdíl byl statisticky významný. U polymorfismů MDR1 jsme pozorovali trend mezi genotypovými skupinami homozygotů s wild-type alelou a homozygoty s variantní alelou v exonu 26 a 12 ($p = 0,055$ a $0,08$ jednotlivě), v exonu 21 G-T a exonu 17 jsme tento trend nepozorovali. Výsledky shrnuje tabulka 49 a 50 a znázorňuje graf 5.

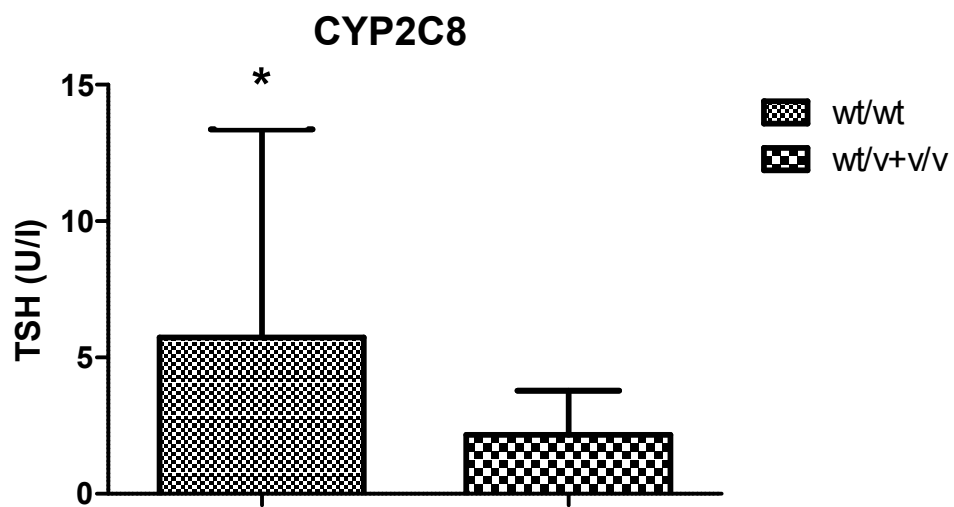
Tab. 49: Průměrné hodnoty TSH v závislosti na genotypu MDR1, exon 26 a exon 21 G2677T

TSH (U/l)	Počet jedinců	MDR1 exon 26	Počet jedinců	MDR1 exon 21 G-T
wt/wt	7	2,31±1,53	11	2,29±1,94
wt/v	30	4,71±7,66	25	5,49±8,27
v/v	8	5,62±3,90	9	4,45±3,67
p		0,055		NS

Tab. 50: Průměrné hodnoty TSH v závislosti na genotypu MDR1, exon 12 a exon 17

TSH (U/l)	Počet jedinců	MDR1 exon 12	Počet jedinců	MDR1 exon 17
wt/wt	13	2,29±1,81	16	4,25±3,32
wt/v	23	5,77±8,58	22	5,34±8,84
v/v	9	4,45±3,67	7	2,43±1,57
p		0,08		NS

Graf 5: Hodnoty TSH pro jednotlivé genotypové skupiny CYP2C8



5 Diskuze

V prvním okruhu mé práce jsme změřili frekvence nejčastěji se vyskytujících funkčních polymorfismů v genech CYP2C8 a MDR1 u zdravých dobrovolníků české národnosti.

Při výběru alel pro studium bodových polymorfismů jsme vycházeli z dostupné literatury a z možného významu bodových mutací v klinické praxi [27, 45, 46, 81]. Genotyp jsme stanovili metodu PCR-RFLP, která je rutinně používanou metodou k detekci jednobodových záměn. Je to často používaná, levná a snadno reprodukovatelná robustní metoda pro stanovení genotypu. Výsledky našeho měření byly zpracovány v publikacích [82, 83].

Frekvence výskytu funkčně deficitních alel se u jednotlivých etnik liší, proto i výskyt neaktivního enzymu se může v populaci odlišovat. Znalost výskytu alelických frekvencí pro jednotlivé populace je významná k dotváření ucelené světové genové mapy a pro vytváření budoucích farmakokinetických a farmakodynamických studií, optimalizaci dávky a terapie pacientů. Znalost frekvence funkčně variantních alel umožňuje aplikovat výsledky klinických studií prováděných se smíšenými populacemi

Genetický polymorfismus v genu CYP2C8 byl popsán až v roce 2001 [23], následně řada studií zaznamenala rozdíly ve výskytu variantních alel u jednotlivých etnik. Alela CYP2C8*3 je nejčastěji spojována se změněným metabolismem substrátů izoenzymu CYP2C8, je to také nejčastěji se vyskytující alela v bělošské populaci, to shodně potvrdilo i naše stanovení. Tato alela se často vyskytuje ve vazbě s variantní alelou CYP2C9*2 a společně ovlivňují metabolismus celé řady obvykle užívaných léčiv. Další alela, která má z literatury potvrzený vliv na metabolismus léčiv, je alela CYP2C8*2, která se vyskytuje vzácně v bělošské populaci a v asijské populaci úplně chybí. S vysokou frekvencí byla tato alela identifikována v afrických populacích. Shodně s těmito tvrzeními jsme i v české populaci alelickou frekvenci prokázali jen v 0,3%. Alela CYP2C8*4 se stejně jako v ostatních evropských populacích vyskytuje v nízké frekvenci, 0,059%. Tabulka 51 shrnuje zastoupení alel u různých populací včetně našeho měření.

Tab. 51: Distribuce CYP2C8 alelické frekvence u různých populací

CYP2C8	Země	Počet subjektů	Alelická frekvence	Reference	
*2	Česká republika	161	0.003	[82]	
	Zanzibar	165	0.139	[84]	
	US (Afroameričani)	82	0.183	[23]	
	Anglie (severovýchod)	116	0.004	[26]	
	Německo (západ)	122	0.016	[85]	
	Japonsko	360	0.000	[86]	
	Ghana	204	0.170	[87]	
	Malajsie	123	0.008	[88]	
	*3	Česká republika	161	0.109	[82]
		Zanzibar	165	0.021	[84]
US (Afroameričani)		82	0.018	[23]	
Anglie (severovýchod)		107	0.150	[26]	
Německo (západ)		122	0.140	[85]	
Japonsko		360	0.000	[86]	
Ghana		204	0.000	[87]	
Malajsie		123	0.012	[88]	
Faerské ostrovy		311	0.069	[89]	
Španělsko		130	0.15	[90]	
Švédsko	1503	0.095	[91]		
*4	Česká republika	161	0.059	[82]	
	Zanzibar	165	0.006	[84]	
	US (Afroameričani)	107	0.075	[26]	
	Anglie (severovýchod)	122	0.074	[85]	
	Německo (západ)	360	0.000	[86]	
	Japonsko	204	0.000	[87]	
	Ghana	123	0.000	[88]	
	P404A	Česká republika	161	0.034	[82]
Japonsko		200	0.000	[86]	

Gen MDR1 patří k vysoce polymorfním oblastem. Jako první byl identifikovaný SNP G2677T v exonu 21 [92], poté následoval první systematický screening MDR1 SNPs. Později se pro polymorfismy v exonu 26 C3435T a 21 G2677T zjistila významná vazba mezi wild-type a variantní alelou a mezi homozygotním a heterozygotním genotypem [51], to jsme potvrdili i v našem stanovení. Dále jsme v našem souboru studovali SNPs C1236T a T-76A v exonech 12 a 17. Distribuce variantní alely 3435T v exonu 26 je mezi bělošskou a asijskou populací podobná, s výjimkou japonské populace, kde byl zaznamenán signifikantně významný rozdíl pro genotyp T3435T.

Mnohem častější výskyt wild-type alely 3435C byl pozorován pro africké populace. To je vysvětlováno teorií, že převaha homozygotního genotypu C3435C má být výhodou u této populace v odolnosti proti gastrointestinálním infekcím. Distribuce variantní alely 2677A v exonu 21 a 1236T v exonu 12 se mezi bělošskou a asijskou populací významně neliší. Porovnání frekvencí genotypů mezi jednotlivými národy shrnuje tabulka 52. Naše výsledky vyšly ve shodě s ostatními měřeními u evropských národů, statisticky významný rozdíl byl nalezen pouze pro genotyp T3435T v exonu 26 u polské populace a další statisticky významné rozdíly byly s asijskými populacemi.

Tab. 52: Porovnání genotypových frekvencí MDR1 mezi jednotlivými národy

Národnost	Češi [83]	Němci [81]	Poláci [93]	Portugalci [94]	Rusové [95]	Angličané [96]
počet	(n=189)	(n=461)	(n=122, 139)	(n=100)	(n=290; 59)	(n=190)
pozice	exon 26 C3435T					
CC	21.2	20.8	42.0*	12.0	21.4	24.0
CT	45.0	50.5	41.0*	47.0	48.6	48.0
TT	33.9	28.6	0.17 *	41.0	30.0	28.0
pozice	exon 21 G2677T/A					
GG	29.6	30.9	33.8	31.0	30.3	N.a.
GT	47,1	49.2	46.8	43.0	44.9	N.a.
GA	1,1	2.0	0.7	N.a.	4.1	N.a.
TT	22,2	16.1	17.3	26.0	18.3	N.a.
AA	0	0	0	N.a.	0	N.a.
AT	0	1,8	1,4	N.a.	2,4	N.a.

pozice	exon 12 T1236C					
CC	31.7	34.4	35.0	N.a.	24.0	N.a.
CT	47.1	49.2	46.8	N.a.	56.0	N.a.
TT	21.2	16.4	18.0	N.a.	20.0	N.a.
pozice	intron16 ex17/T-76A					
TT	41.3	28.4	N.a.	N.a.	N.a.	N.a.
TA	42.3	50.8	N.a.	N.a.	N.a.	N.a.
AA	16.4	20.8	N.a.	N.a.	N.a.	N.a.
Asiaté						
Národnost počet	Číňané[97] (n=96)	Indové[97] (n=87)	Japonci[98, 99] (n=114, 48)			
pozice	exon 26 C3435T					
CC	25.0	18.4	35.0*			
CT	43.8	36.8	53.0*			
TT	31.3	44.8	12.0*			
pozice	exon 21 G2677T/A					
GG	16,7	13,8*	N.a.			
GT	33,3	31,0*	N.a.			
GA	8,3	8,1*	N.a.			
TT	26,0	41,4*	N.a.			
AA	1,0	0	N.a.			
AT	14,6	5,8*	N.a.			
pozice	exon 12 T1236C					
CC	8.3*	13.8*	14.6*			
CT	39.6*	44.6*	47.9*			
TT	52.1*	48.3*	37.5*			

N.a. – nestanoveno

* P < 0,05 v porovnání s českou populací

Výsledky z obou našich stanovení pro gen MDR1 i CYP2C8 byly v dobré shodě s daty nalezenými u ostatních bělošských populací a odpovídaly očekávaným frekvencím vypočteným dle Hardy-Weinbergovy rovnice.

Námi změřené výsledky v prvním tematickém okruhu jsou významné pro navržení mnoha klinických aplikací a jejich realizaci v praxi u české populace. Poznotek, že frekvence

výskytu sledovaných bodových mutací v naší populaci je shodná s ostatními bělošskými populacemi, umožňuje sjednotit interpretaci a výsledky získané měřeními v klinických studiích s jedinci odlišných národností a také nám umožňuje předvídat účinek farmakoterapie u českého pacienta. Neposledně nám získané výsledky poskytly důležitý vědecký podklad pro další studium farmakogenetických vlivů v druhém tematickém okruhu mé práce.

V druhé části práce jsme zjišťovali vliv stanovených polymorfismů na působení léčiva amiodaronu a jeho metabolitu N-desethylamiodaronu u vybraného souboru pacientů při dlouhodobé terapii. Amiodaron má z farmakologického hlediska některé zvláštnosti projevující se např. úzkým terapeutickým rozmezím (nejčastěji u nás doporučené terapeutické rozmezí je 1 – 2,5 mg/l), abnormálně komplikovanou farmakokinetikou, která je závislá na enzymatických a transportních systémech vykazujících významný polymorfismus, mnoha nežádoucími účinky a celou řadou interakcí při polyfarmakoterapii.

Pro amiodaron je známé, že se používané udržovací dávky mohou lišit u jednotlivých komunit. Například na americkém kontinentu je tendence pacientům předepisovat vyšší dávky během udržovací terapie amiodaronem ve srovnání s našimi zvyklostmi. Ve střední Evropě se užívají udržovací dávky mezi 200 a 400 mg/den pětkrát až sedmkrát týdně, naproti tomu v USA se užívají dávky i vyšší než 400mg/den. Odlišné dávkování může být příčinou rozdílného výskytu nežádoucích účinků (až 75%) v USA oproti České republice (do 25%). Maximální denní dávka v našem souboru byla 200mg sedm dní v týdnu. Vyšetření koncentrací u širšího souboru pacientů potvrdilo, že ve více než polovině případů, 63,75%, pacienti dosahovali nižších koncentrací léčiva, než je spodní hranice u nás doporučeného terapeutického rozmezí 1 mg/l. Nejnižší koncentrace měli pacienti ve věkovém rozmezí 81-90 let. Žádný pacient z detailně sledovaného souboru neměl koncentrace vyšší než horní mez doporučeného terapeutického rozmezí 2,5 mg/l. Odráží to pravděpodobně určitou opatrnost s dávkováním amiodaronu u nás.

Všechny tyto okolnosti vedly k našemu zájmu o zjištění možného vlivu bodových polymorfismů CYP2C8 a MDR1 na působení amiodaronu. Pro naši vědeckou práci jsme vycházeli z pilotních publikací studujících možný vliv těchto bodových záměn na biotransformaci amiodaronu především *in vitro* [27, 60]. Naším cílem bylo zjistit možnost využití výsledků k optimalizaci terapie amiodaronem. V závěru jsme soubor hodnotili z pohledu výskytu nežádoucích účinků amiodaronu a jeho velmi závažných klinických interakcí. V detailně sledovaném souboru pacientů (n=63) dlouhodobě užívajících amiodaron

jsme stanovili genotyp. Změřené frekvence variantních alel v genu MDR1 a CYP2C8 u vybraného vzorku pacientů odpovídaly distribuci v bělošské populaci a byly ve shodě s očekávanými frekvencemi vypočtenými dle Hardy-Weinbergovy rovnice.

Při rozdělení souboru do genotypových skupin klesal shodně pro všechny skupiny metabolický poměr se zvyšující se koncentrací parentní látky. Mezi parentní látkou a hlavním metabolitem N-desethylamiodaronem jsme našli korelaci. Ve skupině pacientů, kde se vyskytovala alespoň jedna variantní alela CYP2C8, jsme zaznamenali nižší metabolický poměr parentní látky a jejího metabolitu. Rozdíl mezi skupinami nebyl statisticky signifikantní na hladině významnosti $p < 0,05$.

Dále jsem zjistili, že homozygotní genotyp s variantní alelou v genu MDR1 v exonu 26 T3435T a 21 T2677T vedl k vyšším koncentracím amiodaronu i jeho metabolitu ve srovnání s genotypovými skupinami s wild-type alelou. To se shoduje se znalostmi z literatury, že variantní alely mění expresi proteinu a tím mohou zvyšovat dosažené koncentrace jeho substrátu. Statisticky významný rozdíl jsme potvrdili pro součet koncentrací amiodaronu a jeho metabolitu mezi homozygoty s variantní alelou a homozygoty s wild-type alelou v exonu 26.

Při testování haplotypů MDR1 v exonu 26 C3435T a 21 G2677T u vybraného vzorku pacientů jsme ověřili, že četnost stanovených haplotypů 11, 12, 21 a 22 odpovídá populačním datům. Haplotyp 11 se vyskytoval v 63,33%, haplotyp 22 měl stejnou frekvenci. Haplotypy 21 a 12 se vyskytly v 10%. Pacienti s haplotypem 11 a 21 dosahovali nejnižších koncentrací amiodaronu, pro haplotyp 21 toto bylo statisticky signifikantní. Ve shodě s výsledky studie Johne et al. [46] statisticky významně nejvyšších koncentrací dosáhli pacienti s haplotypem 12 pro součet koncentrací amiodaronu a jeho metabolitu. Analýzy haplotypů jsou důležité, neboť pomáhají sjednotit rozporuplné výsledky ze studií, kde je analýza zaměřena výhradně na stanovení jednoho bodového polymorfismu. Když jsme jedince s haplotypem 12, pro který vyšly statisticky významně vyšší koncentrace léčiva, rozdělili podle přítomnosti alespoň jedné variantní alely CYP2C8, nenašli jsme statisticky významný rozdíl mezi skupinami. Ale při testování skupiny s homozygotním genotypem s variantní alelou MDR1 T3435T a heterozygotním genotypem s variantní alelou CYP2C8*3 (homozygota jsme u této vybrané skupiny nenalezli) jsme prokázali statisticky významně vyšší koncentrace pro skupinu s variantní alelou MDR1 a CYP2C8. Výsledky opět vyšly ve shodě s údaji z literatury, kdy za přítomnosti variantní alely v exonu 26 dochází ke snížené expresi proteinu Pgp a tím se do systémového oběhu dostává více léčiva. Dále přítomnost funkčně defektní alely CYP2C8 může snížit katalytickou aktivitu enzymu a zpomalit tak odbourávání parentní látky [26, 45].

V další části práce jsme sledovali parametry bezpečnosti léčby a parametry EKG v jednotlivých genotypových skupinách pacientů dlouhodobě užívajících amiodaron. Ze známé farmakodynamiky amiodaronu jsme očekávali možný vliv funkčních polymorfismů v genu MDR1 a CYP2C8 na parametry EKG, především interval QT a komplex QRS, zesílením jeho elektrofyzilogických účinků. Tuto závislost jsme pro jednotlivé genotypové skupiny neprokázali. Naopak při rozdělení pacientů do genotypových skupin pro variantní alely genu MDR1 byly dosahované hodnoty QT a QRS vyšší u pacientů s wild-type genotypem, což je v rozporu s naším předpokladem. Tento paradox může být způsoben malou velikostí vzorku zařazených pacientů nebo i současně užívanou medikací, především léčiv ze skupiny betablokátorů (celkem 40 pacientů užívalo současně některý z betablokátorů), které také významně ovlivňují interval QT a komplex QRS. Ale i častá přítomnost dalších komorbidit u pacientů užívajících amiodaron může ovlivnit parametry EKG.

Pro sledované parametry bezpečnosti - kreatinin, ureu, celkový bilirubin jsme nepozorovali v našem vzorku pacientů genotypově ovlivněnou závislost hodnot biochemických parametrů, ani jsme ji neočekávali.

Při sledování jaterních enzymů jsme u enzymů ALT, AST a ALP neprokázali žádný vztah ke genotypovým skupinám. Pouze enzym GGT vykazoval nižší statisticky nesignifikantní hodnoty pro variantní genotyp CYP2C8. To může pouze teoreticky korelovat s předpokladem, že za přítomnosti variantní alely CYP2C8 vzniká méně aktivního metabolitu DEA, pro který se uvádí, že může být dokonce toxičtější než jeho mateřská látka. Pro genotyp MDR1 tuto závislost vykazovali při rozdělení souboru dle pohlaví pouze muži za přítomnosti variantní alely 3435T v exonu 26 a alely 2677T v exonu 21. Opět teoreticky vyšší hodnoty GGT enzymu mohou odrážet to, že jsou jaterní buňky vystaveny za přítomnosti variantních alel MDR1 většímu množství vstřebaného léčiva do systémového oběhu. Rozdíl mezi skupinami ale nebyl statisticky významný, abychom tyto teorie potvrdili.

Ze sledovaných parametrů bezpečnosti jsme našli genotypově závislý výskyt zvýšených hodnot hormonu TSH, který vypovídá o funkci štítné žlázy. Thyreopatie jsou relativně častým nežádoucím účinkem při terapii amiodaronem, vyskytují se u 3 až 25% pacientů a jedná se o nežádoucí účinek asociovaný s vysokými koncentracemi léčiva. V metaanalýze 13 randomizovaných studií byl výskyt hypothyreózy a thyreotoxikózy pozorován u 7 a 1,4% oproti 1,1 a 0,5% u pacientů s placebem [100]. Hlavními mechanismy vzniku toxicity jsou podobnost amiodaronu s molekulou T3 a T4, především v oblasti diiodofenylového kruhu, který je zřejmě vazebnou doménou T3 na jeho receptorech, dále je to

přítomnost dvou atomů jódu v molekule amiodaronu a současně spolupůsobí přímý cytotoxický vliv amiodaronu [71].

Distribuce TSH v rámci genotypových skupin odpovídá možnému trendu vyšších hodnot TSH u pacientů s variantním genotypem MDR1 v exonech 26 ($p=0,055$) a 12 ($p=0,08$). Dosažené průměrné hodnoty TSH u homozygotů s variantní alelou byly hraniční pro suspektní subklinickou hypothyreózu. Předpokládaným mechanismem rozvoje hypothyreózy u variantního genotypu je, že se do organismu vstřebá více mateřské látky, která se odbourává na svůj aktivní metabolit, a thyreopatie jsou nežádoucím účinkem závislým na koncentracích léčiva. Pro enzym CYP2C8 byly změřeny statisticky významně vyšší hodnoty TSH ve skupině s homozygotním wild-type genotypem.

Velmi nízká koncentrace léčiva může být příčinou selhání účinku léčiva a naopak supraoptimální koncentrace významně zvyšuje riziko výskytu závažných nežádoucích účinků a vede paradoxně ke zhoršení prognózy nemocných [68]. U sérových koncentrací mezi 2,5 – 4 mg/l se často vyskytují neurologické a gastrointestinální nežádoucí účinky, pro vyšší koncentrace je zvýšené riziko pulmonální toxicity, která ve většině případů končí infaustně [101]. Metaanalýza dvojitě zaslepených studií (amiodaron versus placebo) prokázala 1% čistého absolutního rizika výskytu této komplikace během jednoho roku léčby s několika zaznamenanými případy úmrtí [71].

Vysazení amiodaronu při výskytu závažných nežádoucích účinků vede už po 2 až 3 dnech k poklesu sérových koncentrací až o 25% a k výraznému zlepšení stavu pacienta. Další redukce sérových koncentrací o 50 až 70% však už trvá mnoho týdnů [65].

V našem souboru detailně sledovaných pacientů byl u tří pacientů amiodaron vysazen pro závažnou bradykardii. U těchto pacientů, kteří netolerovali amiodaron, jsme zjistili přítomnost variantních alel MDR1 v exonu 26 3435T, v exonu 21 pro alelu 2677T a v exonu 12 1236T. Jeden pacient byl homozygot pro všechny výše jmenované variantní alely, jeden pacient byl heterozygot pro všechny tyto alely. Třetí pacient byl homozygot s alelou 3435T v exonu 26 a heterozygot pro zbývající alely v exonu 21 a 12. U dvou pacientů byla zahájena substituce levothyroxinem. U jedné pacientky byl nově rozpoznán intersticiální plicní proces. Pacientku jsme stanovili jako homozygota pro variantní alelu 3435T v exonu 26, 2677T v exonu 21 a heterozygota pro alelu 1236T v exonu 12. Genotyp CYP2C8 nekoreloval s výskytem nežádoucího účinku u žádného z těchto pacientů.

Pacienti v našem souboru užívali průměrně 7,57 léčivých přípravků, nejmenší počet byly dva současně užívané přípravky. Amiodaron významně zpomaluje jaterní i renální metabolismus celé řady léků cestou inhibice izoenzymů cytochromu P450, především CYP3A4 a inhibicí P-glykoproteinu. Klinicky potenciálně závažné a často se vyskytující jsou interakce s digoxinem a warfarinem, při jejich výskytu je nutné léčiva důkladně monitorovat. Další častá interakce amiodaronu v našem souboru byla se simvastatinem a s léčivy ze skupiny betablokátorů. Interakce se simvastatinem je hodnocena jako klinicky velmi závažná, pokud je dávka simvastatinu vyšší než 20mg/den. Mechanismus interakce se vysvětluje zpomalením biotransformace simvastatinu inhibicí CYP3A4 amiodaronem a také zpomalený transmembránový transport simvastatinu inhibicí Pgp a transportérů organických iontů, taktéž amiodaronem. Výsledně dochází ke snížení clearance simvastatinu a tím se zvyšuje riziko vzniku myopatií a především rhabdomyolýzy. V našem souboru dostávali všichni pacienti dávku simvastatinu nižší než 20mg/d. Jeden pacient užíval kombinaci amiodaronu s verapamilem, tato kombinace dle aktuálního souhrnu údajů o přípravku není výrobcem léčiva doporučena pro riziko závažné bradykardie.

Všichni pacienti z našeho souboru, u kterých se vyskytla závažná bradykardie, užívali amiodaron v kombinaci s betablokátořem, u jedné pacientky byl v trojkombinaci s digoxinem. Uvedené kombinace léků mohou vznik významné bradykardie také potencovat.

Na variabilitě farmakokinetických procesů léčiv se podílí celá řada faktorů a může se uplatnit i vliv více kandidátních genů najednou, které se ve svém finálním účinku mohou vzájemně ovlivňovat. Pro farmakogenetická stanovení je nutné uvažovat a analyzovat genetické vlivy komplexně a vytvářet úplné haplotypové analýzy, které sjednocují genetická stanovení.

Naše stanovení je ovlivněné malou velikostí souboru a i heterogenitou zařazených pacientů. Nesmíme zapomínat také na možný vliv lékových interakcí na indukci a inhibici enzymových a transportních systémů, ale také na alternativní metabolické cesty, které mohou suplovat a plně nahradit defektní cestu způsobenou přítomností variantní alely.

I když ve farmakogenetice došlo k mnoha výzkumům a pokrokům, jen málo testů se dostalo až do samotné klinické praxe. Existuje mnoho důvodů, proč je aplikace poznatků do klinické praxe tak nedostatečná – často je to způsobeno nedostatečnou velikostí testovaného souboru, nesprávným vyhodnocením koexistujících faktorů – klinických i vlivů prostředí, špatnou genotypovou strategií, nedostatečným financováním nebo i špatnou fenotypovou

strategií, které neumožňují dostatečně replikovat spojitost mezi různými studii [102]. Farmakogenetická stanovení vyžadují multidisciplinární přístup umožňující analýzu více faktoriálních dat ze studií s dostatečným počtem pacientů.

Náš zájem o studium podílu vlivu izoenzymu CYP2C8 na metabolismus amiodaronu byl ovlivněn výsledky předchozích prací japonských autorů Ohyama et al. a Soyama et al. [27, 60]. V našem souboru pacientů jsme neprokázali statisticky významný vliv SNPs CYP2C8 na tvorbu hlavního metabolitu N-desethylamiodaronu, i když výsledky pro variantní alely měly mírně klesající tendenci koncentrace vznikajícího metabolitu oproti homozygotnímu genotypu s wild type alelou. Naše pozorování frekvencí výskytu genotypů a alelických frekvencí jsou v souladu s nálezy Bahadur et al. v bělošské populaci, které jsou odlišné od frekvence výskytu u populace japonské, Nakajima et al. [86].

Tato pozorování odpovídají současným poznatkům o možném převažujícím vlivu ostatních izoenzymů CYP450 uplatňujících se v metabolismu amiodaronu (<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm>). Z výsledku naší studie se zdá, že podíl SNPs MDR1 zvláště potom v haplotypech se může uplatňovat v osudu amiodaronu daleko významněji. Nelze však vyloučit, že kombinace bodové záměny CYP2C8*3 a MDR1 v exonu 26 společně může významně ovlivňovat přeměnu amiodaronu na jeho metabolit N-desethylamiodaron.

Námi naznačenou možnou genetickou závislost sledovanou izolovaně dvěma genetickými faktory bude nutné ověřit a potvrdit velkým, dostatečně robustním klinickým hodnocením. Pozornost nejen farmaceutických výrobců se upírá na oblasti, kde by bylo možné nové technologie využít při vývoji a kontrole preparátů, proto i naše menší studie se mohou stát základním kamenem nebo impulzem právě pro velké studie, které potom určují směr ve farmakoterapii a vytváří bezpečnou a ekonomickou léčbu pacientů.

6 Závěry

V disertační práci jsme pozorovali frekvenci výskytu funkčních polymorfismů v naší populaci, které podmiňují interindividuální změny v aktivitě metabolizujícího enzymu CYP2C8 a mají vliv na expresi proteinu Pgp. Hodnotili jsme jejich vliv na koncentrace amiodaronu a bezpečnost léčby.

Shrnutí výsledků práce:

- Frekvence výskytu funkčních polymorfismů MDR1 v exonu 26 C3435T, v exonu 21 G2677A/T, v exonu 12 C1236T, v exonu 17 T-76A a CYP2C8 (*2, *3G416A, *3A1196G, *4, P404A) je u zdravé české populace shodná s distribucí v ostatních bělošských populacích. Znalost této skutečnosti je přínosem pro interpretaci výsledků a predikci účinnosti farmakoterapie sledované u jiných populací.
- Genotypově byla definovaná populace pacientů užívajících amiodaron, výsledky mohou být použity pro další následující farmakogenetické studie. Potvrdili jsme, že frekvence výskytu funkčních polymorfismů MDR1 v exonu 26 C3435T, v exonu 21 G2677A/T, v exonu 12 C1236T, v exonu 17 T-76A a CYP2C8 (*2, *3G416A, *3A1196G, *4, P404A) u souboru pacientů užívajících amiodaron je stejná jako u zdravé populace dobrovolníků.
- Vzhledem k výskytu funkčních polymorfismů v genu MDR1 a CYP2C8 jsme sledovali trend závislosti koncentrací mateřské látky a jejího metabolitu na jednotlivých genotypových skupinách. Přítomnost variantní alely v exonu 26 3435T byla spojena se statisticky vyššími koncentracemi léčiva a aktivního metabolitu. Statisticky významnou závislost jsme také prokázali i za současné přítomnosti variantní alely CYP2C8*3 a MDR1 3435T, které vedly k vyšším koncentracím léčiva. Tyto nálezy jsou v souladu s haplotypovou analýzou uváděnou v literatuře. Jedinci s haplotypem 12 dosahovali statisticky významně vyšších koncentrací léčiva.
- Ze sledovaných parametrů bezpečnosti léčby amiodaronem jsme popsali trend ve vztahu hodnoty TSH a genotypu pro polymorfismus MDR1 v exonu 26 a SNPs

CYP2C8. Přítomnost variantní alely v exonu 26 koreluje s vyššími hodnotami TSH.

Zavedení a optimalizace metodik pro stanovení genotypu častých polymorfismů CYP2C8 a MDR1 umožňuje další studium a přizpůsobení farmakoterapie pacientů.

7 Literatura

1. Lazarou, J., B.H. Pomeranz, and P.N. Corey, *Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies*. *Jama*, 1998. **279**(15): p. 1200-5.
2. Evans, D.A., *N-acetyltransferase*. *Pharmacol Ther*, 1989. **42**(2): p. 157-234.
3. Daly, A.K., *Pharmacogenetics and human genetic polymorphisms*. *Biochem J*, 2010. **429**(3): p. 435-49.
4. Phillips, K.A., et al., *Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review*. *Jama*, 2001. **286**(18): p. 2270-9.
5. Nelson, D.R., *Cytochrome P450 and the individuality of species*. *Arch Biochem Biophys*, 1999. **369**(1): p. 1-10.
6. Virani, A., et al., *Drug interactions in human neuropathic pain pharmacotherapy*. *Pain*, 1997. **73**(1): p. 3-13.
7. Bozina, N., V. Bradamante, and M. Lovric, *Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk*. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2009. **60**(2): p. 217-42.
8. Anzenbacher, P. and E. Anzenbacherova, *Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics*. *Cell Mol Life Sci*, 2001. **58**(5-6): p. 737-47.
9. Rendic, S. and F.J. Di Carlo, *Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors*. *Drug Metab Rev*, 1997. **29**(1-2): p. 413-580.
10. Crespi, C.L. and V.P. Miller, *The R144C change in the CYP2C9*2 allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase*. *Pharmacogenetics*, 1997. **7**(3): p. 203-10.
11. Cannarozzi, G., et al., *A role for codon order in translation dynamics*. *Cell*, 2010. **141**(2): p. 355-67.
12. Duan, J., et al., *Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(3): p. 205-16.
13. Chekulaeva, M. and W. Filipowicz, *Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(3): p. 452-60.
14. Mishra, P.J., et al., *A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(33): p. 13513-8.
15. Nelson, D.R., et al., *The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature*. *DNA Cell Biol*, 1993. **12**(1): p. 1-51.
16. Nelson, D.R., et al., *Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants*. *Pharmacogenetics*, 2004. **14**(1): p. 1-18.
17. Gray, I.C., et al., *A 2.4-megabase physical map spanning the CYP2C gene cluster on chromosome 10q24*. *Genomics*, 1995. **28**(2): p. 328-32.
18. Capdevila J, et al., *Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid*, in *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981. p. 5362-6.
19. Klose, T.S., J.A. Blaisdell, and J.A. Goldstein, *Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs*. *J Biochem Mol Toxicol*, 1999. **13**(6): p. 289-95.

20. Yano, J.K., et al., *The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38091-4.
21. Daily, E.B. and C.L. Aquilante, *Cytochrome P450 2C8 pharmacogenetics: a review of clinical studies*. Pharmacogenomics, 2009. **10**(9): p. 1489-510.
22. Totah, R.A. and A.E. Rettie, *Cytochrome P450 2C8: substrates, inhibitors, pharmacogenetics, and clinical relevance*. Clin Pharmacol Ther, 2005. **77**(5): p. 341-52.
23. Dai, D., et al., *Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid*. Pharmacogenetics, 2001. **11**(7): p. 597-607.
24. Soyama, A., et al., *Non-synonymous single nucleotide alterations found in the CYP2C8 gene result in reduced in vitro paclitaxel metabolism*. Biol Pharm Bull, 2001. **24**(12): p. 1427-30.
25. Ishikawa, C., et al., *A frameshift variant of CYP2C8 was identified in a patient who suffered from rhabdomyolysis after administration of cerivastatin*. J Hum Genet, 2004. **49**(10): p. 582-5.
26. Bahadur, N., et al., *CYP2C8 polymorphisms in Caucasians and their relationship with paclitaxel 6α-hydroxylase activity in human liver microsomes*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(11): p. 1579-89.
27. Soyama, A., et al., *Amiodarone N-deethylation by CYP2C8 and its variants, CYP2C8*3 and CYP2C8 P404A*. Pharmacol Toxicol, 2002. **91**(4): p. 174-8.
28. Hanioka, N., et al., *Functional characterization of CYP2C8.13 and CYP2C8.14: catalytic activities toward paclitaxel*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2010. **107**(1): p. 565-9.
29. Hanioka, N., et al., *Influence of CYP2C8*13 and CYP2C8*14 alleles on amiodarone N-deethylation*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2010. **108**(5): p. 359-62.
30. Zeldin, D.C., et al., *Biochemical characterization of the human liver cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase pathway*. Arch Biochem Biophys, 1996. **330**(1): p. 87-96.
31. Garcia-Martin, E., et al., *Interethnic and intraethnic variability of CYP2C8 and CYP2C9 polymorphisms in healthy individuals*. Mol Diagn Ther, 2006. **10**(1): p. 29-40.
32. Rodriguez-Antona, C., et al., *Characterization of novel CYP2C8 haplotypes and their contribution to paclitaxel and repaglinide metabolism*. Pharmacogenomics J, 2008. **8**(4): p. 268-77.
33. Zhou, S.F., et al., *Clinical pharmacogenetics and potential application in personalized medicine*. Curr Drug Metab, 2008. **9**(8): p. 738-84.
34. Juliano, R.L. and V. Ling, *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. Biochim Biophys Acta, 1976. **455**(1): p. 152-62.
35. Rosenberg, M.F., et al., *Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis*. J Biol Chem, 1997. **272**(16): p. 10685-94.
36. Aller, S.G., et al., *Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding*. Science, 2009. **323**(5922): p. 1718-22.
37. Dean, M., Y. Hamon, and G. Chimini, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. J Lipid Res, 2001. **42**(7): p. 1007-17.
38. Sun, J., et al., *Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction*. Med Sci Monit, 2004. **10**(1): p. RA5-14.

39. Grundy, M., et al., *P-glycoprotein and breast cancer resistance protein in acute myeloid leukaemia cells treated with the aurora-B kinase inhibitor barasertib-hQPA*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 254.
40. Drach, J., et al., *Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes*. Blood, 1996. **88**(5): p. 1747-54.
41. Raviv, Y., A. Puri, and R. Blumenthal, *P-glycoprotein-overexpressing multidrug-resistant cells are resistant to infection by enveloped viruses that enter via the plasma membrane*. Faseb J, 2000. **14**(3): p. 511-5.
42. Randolph, G.J., et al., *A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6924-9.
43. Sakaeda, T., T. Nakamura, and K. Okumura, *MDR1 genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Biol Pharm Bull, 2002. **25**(11): p. 1391-400.
44. Kioka, N., et al., *P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: normal P-glycoprotein carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **162**(1): p. 224-31.
45. Hoffmeyer, S., et al., *Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3473-8.
46. John, A., et al., *Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene*. Clin Pharmacol Ther, 2002. **72**(5): p. 584-94.
47. Drescher, S., et al., *MDR1 gene polymorphisms and disposition of the P-glycoprotein substrate fexofenadine*. Br J Clin Pharmacol, 2002. **53**(5): p. 526-34.
48. Cvetkovic, M., et al., *OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine*. Drug Metab Dispos, 1999. **27**(8): p. 866-71.
49. Bailey, D.G. and G.K. Dresser, *Interactions between grapefruit juice and cardiovascular drugs*. Am J Cardiovasc Drugs, 2004. **4**(5): p. 281-97.
50. Katoh, M., et al., *Inhibitory effects of CYP3A4 substrates and their metabolites on P-glycoprotein-mediated transport*. Eur J Pharm Sci, 2001. **12**(4): p. 505-13.
51. Kim, R.B., et al., *Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans*. Clin Pharmacol Ther, 2001. **70**(2): p. 189-99.
52. Kroetz, D.L., et al., *Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene*. Pharmacogenetics, 2003. **13**(8): p. 481-94.
53. Doyle, L.A. and D.D. Ross, *Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2)*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7340-58.
54. Bytešník, J., *Management of arrhythmias with amiodarone in the light of new knowledge*. Cor Vasa, 2000. **42**((4)): p. 193-199.
55. Weirich, J. and W. Wenzel, *[Current classification of anti-arrhythmia agents]*. Z Kardiol, 2000. **89** Suppl 3: p. 62-7.
56. Kaye, D.M., et al., *Antiadrenergic effect of chronic amiodarone therapy in human heart failure*. J Am Coll Cardiol, 1999. **33**(6): p. 1553-9.
57. Brien, J.F., et al., *Distribution of amiodarone and its metabolite, desethylamiodarone, in human tissues*. Can J Physiol Pharmacol, 1987. **65**(3): p. 360-4.
58. Fabre, G., et al., *Evidence for CYP3A-mediated N-deethylation of amiodarone in human liver microsomal fractions*. Drug Metab Dispos, 1993. **21**(6): p. 978-85.

59. Trivier, J.M., et al., *Amiodarone N-deethylation in human liver microsomes: involvement of cytochrome P450 3A enzymes (first report)*. Life Sci, 1993. **52**(10): p. PL91-6.
60. Ohyama, K., et al., *A significant role of human cytochrome P450 2C8 in amiodarone N-deethylation: an approach to predict the contribution with relative activity factor*. Drug Metab Dispos, 2000. **28**(11): p. 1303-10.
61. Ha, H.R., et al., *Identification and quantitation of novel metabolites of amiodarone in plasma of treated patients*. Eur J Pharm Sci, 2005. **24**(4): p. 271-9.
62. Benet, L.Z., C.L. Cummins, and C.Y. Wu, *Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes*. Int J Pharm, 2004. **277**(1-2): p. 3-9.
63. Ohyama, K., et al., *Inhibitory effects of amiodarone and its N-deethylated metabolite on human cytochrome P450 activities: prediction of in vivo drug interactions*. Br J Clin Pharmacol, 2000. **49**(3): p. 244-53.
64. Meng, X., et al., *Bioavailability of amiodarone tablets administered with and without food in healthy subjects*. Am J Cardiol, 2001. **87**(4): p. 432-5.
65. Pollak, P.T., T. Bouillon, and S.L. Shafer, *Population pharmacokinetics of long-term oral amiodarone therapy*. Clin Pharmacol Ther, 2000. **67**(6): p. 642-52.
66. Andreasen, F., et al., *Pharmacokinetics of amiodarone after intravenous and oral administration*. Eur J Clin Pharmacol, 1981. **19**(4): p. 293-9.
67. Connolly, S.J., et al., *Concentration response relationships of amiodarone and desethylamiodarone*. Am Heart J, 1988. **115**(6): p. 1208-13.
68. Elizari, M.V., et al., *Morbidity and mortality following early administration of amiodarone in acute myocardial infarction. GEMICA study investigators, GEMA Group, Buenos Aires, Argentina. Grupo de Estudios Multicentricos en Argentina*. Eur Heart J, 2000. **21**(3): p. 198-205.
69. Raeder, E.A., P.J. Podrid, and B. Lown, *Side effects and complications of amiodarone therapy*. Am Heart J, 1985. **109**(5 Pt 1): p. 975-83.
70. Wilson, J.S. and P.J. Podrid, *Side effects from amiodarone*. Am Heart J, 1991. **121**(1 Pt 1): p. 158-71.
71. Connolly, S.J., *Evidence-based analysis of amiodarone efficacy and safety*. Circulation, 1999. **100**(19): p. 2025-34.
72. Manfredi, C., et al., *Measurement of serum amiodarone and desethylamiodarone by HPLC: its usefulness in the follow-up of arrhythmic patients treated with amiodarone*. Int J Clin Pharmacol Res, 1995. **15**(2): p. 87-93.
73. Keyler, D.E., et al., *Monitoring blood levels of selected drugs. Remember to factor in the many confounding variables*. Postgrad Med, 1998. **103**(3): p. 209-12, 215-9, 223-4.
74. Falik, R., et al., *Relationship of steady-state serum concentrations of amiodarone and desethylamiodarone to therapeutic efficacy and adverse effects*. Am J Med, 1987. **82**(6): p. 1102-8.
75. Goldstein, J.A., *Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily*. Br J Clin Pharmacol, 2001. **52**(4): p. 349-55.
76. Eichelbaum, M., M.F. Fromm, and M. Schwab, *Clinical aspects of the MDR1 (ABCB1) gene polymorphism*. Ther Drug Monit, 2004. **26**(2): p. 180-5.
77. Buzkova, H., et al., *Lipid-lowering effect of fluvastatin in relation to cytochrome P450 2C9 variant alleles frequently distributed in the Czech population*. Med Sci Monit, 2012. **18**(8): p. CR512-517.
78. Plomp, T.A., et al., *Simultaneous determination of amiodarone and its major metabolite desethylamiodarone in plasma, urine and tissues by high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr, 1983. **273**(2): p. 379-92.

79. Holt, D.W., et al., *Amiodarone pharmacokinetics*. Am Heart J, 1983. **106**(4 Pt 2): p. 840-7.
80. Heger, J.J., et al., *Clinical efficacy and electrophysiology during long-term therapy for recurrent ventricular tachycardia or ventricular fibrillation*. N Engl J Med, 1981. **305**(10): p. 539-45.
81. Cascorbi, I., et al., *Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects*. Clin Pharmacol Ther, 2001. **69**(3): p. 169-74.
82. Pechandova, K., et al., *Genetic polymorphisms of CYP2C8 in the Czech Republic*. Genet Test Mol Biomarkers, 2012. **16**(7): p. 812-6.
83. Pechandova, K., et al., *Polymorphisms of the MDR1 gene in the Czech population*. Folia Biol (Praha), 2006. **52**(6): p. 184-9.
84. Cavaco, I., et al., *CYP2C8 polymorphism frequencies among malaria patients in Zanzibar*. Eur J Clin Pharmacol, 2005. **61**(1): p. 15-8.
85. Weise, A., et al., *Development and evaluation of a rapid and reliable method for cytochrome P450 2C8 genotyping*. Clin Lab, 2004. **50**(3-4): p. 141-8.
86. Nakajima, M., et al., *Genetic polymorphisms of CYP2C8 in Japanese population*. Drug Metab Dispos, 2003. **31**(6): p. 687-90.
87. Kudzi, W., A.N. Dodoo, and J.J. Mills, *Characterisation of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms in a Ghanaian population*. BMC Med Genet, 2009. **10**: p. 124.
88. Muthiah, Y.D., et al., *Genetic polymorphism of CYP2C8 in three Malaysian ethnics: CYP2C8*2 and CYP2C8*3 are found in Malaysian Indians*. J Clin Pharm Ther, 2005. **30**(5): p. 487-90.
89. Halling, J., et al., *Polymorphism of CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 and CYP2C8 in the Faroese population*. Eur J Clin Pharmacol, 2005. **61**(7): p. 491-7.
90. Garcia-Martin, E., et al., *Interindividual variability in ibuprofen pharmacokinetics is related to interaction of cytochrome P450 2C8 and 2C9 amino acid polymorphisms*. Clin Pharmacol Ther, 2004. **76**(2): p. 119-27.
91. Yasar, U., et al., *Allelic variants of cytochromes P450 2C modify the risk for acute myocardial infarction*. Pharmacogenetics, 2003. **13**(12): p. 715-20.
92. Mickley, L.A., et al., *Genetic polymorphism in MDR-1: a tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors*. Blood, 1998. **91**(5): p. 1749-56.
93. Drozdziak, M., et al., *Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease*. Pharmacogenetics, 2003. **13**(5): p. 259-63.
94. Cavaco, I., et al., *CYP3A4 and MDR1 alleles in a Portuguese population*. Clin Chem Lab Med, 2003. **41**(10): p. 1345-50.
95. Gaikovitch, E.A., et al., *Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population*. Eur J Clin Pharmacol, 2003. **59**(4): p. 303-12.
96. Ameyaw, M.M., et al., *MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity*. Pharmacogenetics, 2001. **11**(3): p. 217-21.
97. Chowbay, B., et al., *Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients*. Pharmacogenetics, 2003. **13**(2): p. 89-95.

98. Tanabe, M., et al., *Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **297**(3): p. 1137-43.
99. Sakaeda, T., et al., *MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects*. Pharm Res, 2001. **18**(10): p. 1400-4.
100. *Effect of prophylactic amiodarone on mortality after acute myocardial infarction and in congestive heart failure: meta-analysis of individual data from 6500 patients in randomised trials*. Amiodarone Trials Meta-Analysis Investigators. Lancet, 1997. **350**(9089): p. 1417-24.
101. Roden, D.M., *Pharmacokinetics of amiodarone: implications for drug therapy*. Am J Cardiol, 1993. **72**(16): p. 45F-50F.
102. Pirmohamed, M., *Pharmacogenetics: past, present and future*. Drug Discov Today, 2011. **16**(19-20): p. 852-61.

Internetové odkazy uvedené v pořadí jako v textu práce:

- I. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/> (únor 2013)
- II. www.pharmgkb.org/ (únor 2013)
- III. <http://www.cypalleles.ki.se/> (únor 2013)
- IV. <http://ulbld.lf1.cuni.cz/seznam-lab-vysetreni> (2006-2009)
- V. <http://www.chromsystems.com/de/produkte/therapeutisches-drug-monitoring/amiodaron/reagenzienkits/amiodaron-desethylamiodaron-reagenzienkit-fuer-die-hplc-analytik> (2006-2009)
- VI. <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm> (únor 2013)

8 Seznam příloh

1. Pechandová K., Buzková H., Matoušková O., Perlík F., Slanař O.: Genetic polymorphism of CYP2C8 in the Czech Republic. *Genet Test Mol Biomarkers*. 16(7), 2012
2. Pechandová K., Buzková H., Slanař O., Perlík F.: Polymorphisms of the MDR1 Gene in the Czech Population. *Folia Biologica*, 52, 184-189, 2006
3. Pechandová K., Buzková H., Slanař O., Perlík F.: Efluxní transmembránový transportér – P-glykoprotein. *Klin. Biochem. Metab.*, 14 (35), 2006

Příloha 1

Pechandová K., Buzková H., Matoušková O., Perlík F., Slanař O.: Genetic polymorphism of CYP2C8 in the Czech Republic. *Genet Test Mol Biomarkers*,16 (7), 2012

Příloha 2

Pechandová K., Buzková H., Slanař O., Perlík F.: Polymorphisms of the MDR1 Gene in the Czech Population. *Folia Biologica*, 52, 2006

Příloha 3

Pechandová K., Buzková H., Slanař O., Perlík F.: Efluxní transmembránový transportér – P-glykoprotein. *Klin. Biochem. Metab.*, 14 (35), 2006