

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie

POLYMORFISMY GENU CYP2D6 V ČESKÉ POPULACI

Rigorózní práce

2006

Mgr. Helena Buzková

Prohlašuji, že jsem tuto rigorózní práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Praha, 31. 5. 2006

Mgr. Helena Buzková

Za zasvěcení do problematiky a za odbornou pomoc při experimentální části práce děkuji MUDr. Ondřeji Slanařovi.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	6
1 ÚVOD.....	9
2 TEORETICKÝ ÚVOD.....	11
2.1 Cytochrom P450	11
2.2 Genetický polymorfismus systému CYP.....	13
2.2.1 Genotyp.....	13
2.2.2 Fenotyp	14
2.3 Metody farmakogenetiky.....	14
2.3.1 Fenotypizace	15
2.3.2 Genotypizace	15
2.3.2.1 SSCP – jednořetězcový konformační polymorfismus.....	16
2.3.2.2 PCR v reálném čase	16
2.3.2.3 Minisekvenování.....	17
2.3.2.4 Pyrosekvenování.....	17
2.3.2.5 DNA biočipy.....	17
2.3.3 Porovnání metodik.....	18
2.4 CYP2D6.....	19
3 CÍL PRÁCE	23
4 METODY	25
4.1 Použité reagensie a přístroje	25
4.2 Studovaná skupina populace.....	25
4.3 Izolace DNA z krve	26
4.3.1 Izolace DNA vysolovací metodou.....	26
4.3.2 Izolace DNA pomocí QIAamp blood mini kitu	27
4.3.3 Příprava gelů	28
4.4 Genotypování.....	29
4.4.1 Obecná charakteristika genotypování.....	29
4.4.1.1 PCR (Polymerase Chain Reaction).....	29
4.4.1.2 "Nested" PCR.....	32
4.4.1.3 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	32

4.4.2	Polymorfismus CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*6.....	33
4.4.3	Genová delece; CYP2D6*5.....	37
4.4.4	Duplikace genu; CYP2D6*MxN.....	38
4.5	Zpracování výsledků.....	39
5	VÝSLEDKY.....	41
5.1	Polymorfismus CYP2D6*3 – 2549A>del.....	41
5.2	Polymorfismus CYP2D6*4 – 1846G>A a CYP2D6*6 – 1707T>del.....	42
5.3	Genová delece; CYP2D6*5.....	44
5.4	Duplikace genu; CYP2D6*MxN.....	45
5.5	Frekvence výskytu jednotlivých fenotypů.....	46
6	DISKUSE.....	49
7	ZÁVĚR.....	55
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	57

SEZNAM ZKRATEK

A	nukleová base, adenin
bp	páry bází
C	nukleová base, cytosin
CI	konfidenční interval
CYP	cytochrom P450
dH ₂ O	destilovaná voda
dATP	deoxyadenosin trifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EM	extenzivní metabolizátor
F	primer ve směru 5'→3' původního vlákna DNA (forward)
g	gravitační tíhové zrychlení
G	nukleová base, guanin
IM	intermediální metabolizátor (intermedial metabolizer)
inj. H ₂ O	injekční voda
mRNA	mediátorová RNA
NADPH	redukovaný nikotinamidadenin dinukleotid fosfát
ot./min	otáčky centrifugy za minutu
PCR	polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PM	pomalý metabolizátor (poor metabolizer)
R	primer ve směru 3'→5' původního vlákna DNA (reverse)
RBC pufr	lyzační pufr pro erytrocyty (Red Blood Cells)
RFLP	analýza délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
RM	rychlý metabolizátor (rapid metabolizer)
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	PCR v reálném čase (real time PCR)

SDS	dodecyl sulfát sodný
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
SSCP	konformační polymorfismu jednořetězcové DNA (single strand conformation polymorphism)
T	nukleová báze, thymin
TBE	pufrovací roztok (tris-báze, kyselina boritá, EDTA)
u	mezinárodní jednotka aktivity enzymu
UM	utrarychlý metabolizátor (ultrarapid metabolizer)
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

ÚVOD

1 ÚVOD

Cytochrom P450 je jedním z hlavních enzymových komplexů, který se účastní I. fáze biotransformace léčiv, endogenních i specifických exogenních látek u člověka. Aktivita jednotlivých isoenzymů je geneticky determinována a může být ovlivněna fyziologickým nebo patologickým stavem organismu, vlivy vnějšího prostředí, indukci a nebo inhibicí způsobenou různými xenobiotiky. Podle katalytické kapacity se v populaci rozlišují především okrajové skupiny pomalých a rychlých až velmi rychlých metabolizátorů. Tato variabilita je způsobena polymorfismem cytochromu P450 a je jedním z hlavních faktorů způsobující interindividuální variabilitu lékové odpovědi.

Nadrodinu cytochromů P450 tvoří 51 rodin, ze kterých jsou pouze první tři: CYP1, CYP2 a CYP3 zodpovědné za metabolismus léčiv a xenobiotik u člověka. Obzvláště polymorní alely isoenzymu CYP2D6 způsobující variabilitu lékové odpovědi mají výrazný klinický dopad. Jedním z hlavních důvodů je fakt, že CYP2D6 katalyzuje přibližně 20-30 % běžně užívaných léčiv [1] a frekvence výskytu fenotypu pomalého metabolizátora se v závislosti na rasové příslušnosti pohybuje od 0,8 % do 7 % [2].

Cílem studie je popsat frekvenci výskytu vybraných variantních alel genu CYP2D6 v české populaci a porovnat ji s literárními údaji z ostatních populací se zaměřením na populace evropské.

Praktická část mé práce je tedy zaměřena na zmapování výskytu variantních alel CYP2D6 v české populaci. Konkrétně stanovuji genotyp pro duplikaci genu CYP2D6, jeho delecii a variantní alely CYP2D6*3, *4, *6 Sachsovou metodou [3] u 223 zdravých dobrovolníků. Na základě takto určeného genotypu lze s 98,7% jistotou předpovědět i fenotyp daného jedince [4]. V diskusní část porovnávám mnou získané údaje alelické frekvence polymorfismu CYP2D6 s údaji ostatních populací se zaměřením na evropské národnosti.

V teoretické části se zabývám problematikou stanovení genotypu, uvádím rozdílné metodické přístupy, charakterizuji systém cytochromu P450 a detailněji popisují isoenzym CYP2D6.

TEORETICKÝ ÚVOD

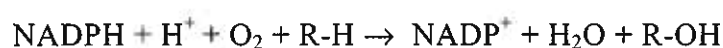
2 TEORETICKÝ ÚVOD

Cytochrom P450 je důležitá skupina enzymů účastnící se I. fáze biotransformace léčiv. Významná interindividuální variabilita aktivity cytochromů může být zapříčiněna polymorfismem genů kódujících jednotlivé proteiny. Různé genetické odchylky predisponují jedince k odlišnostem v metabolismu léčiva a tedy i v jeho eliminaci, mohou vést k rozlišné vnímavosti a nepředvídatelné odpovědi na léčbu. V klinické praxi se pak můžeme, po podání terapeutické dávky léčiva, setkat s případy pacientů u nichž má léčba žádoucí terapeutický efekt, s případy, u kterých je léčba neefektivní a se skupinou pacientů, u kterých je efekt léčby doprovázen nežádoucími účinky charakteristickými pro vysoké plazmatické koncentrace léčiva.

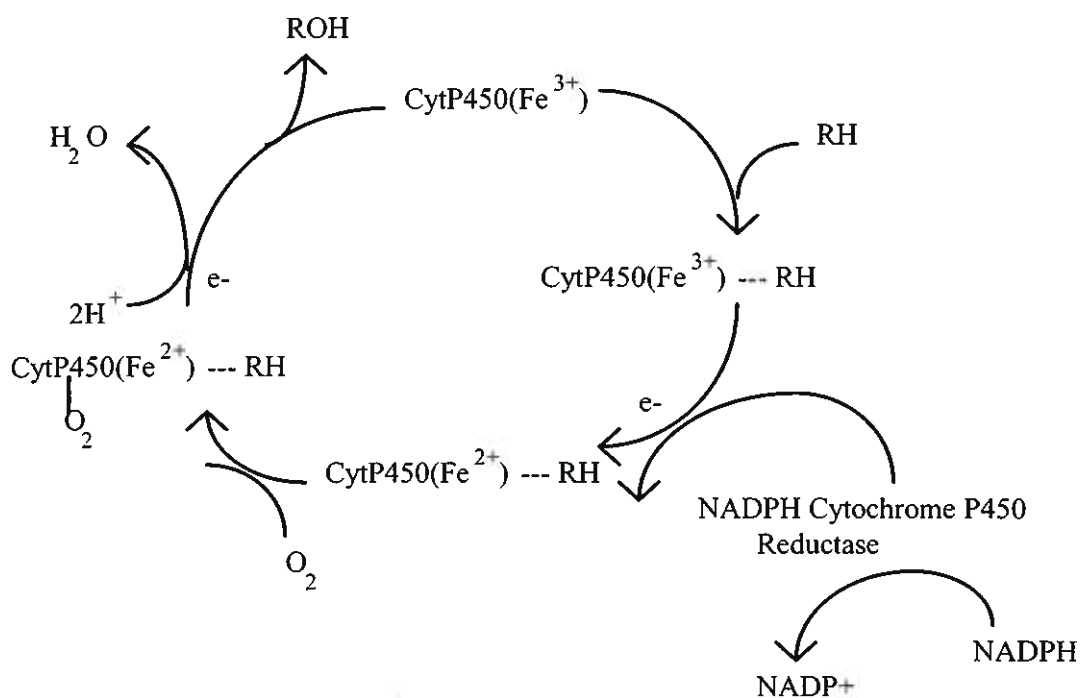
2.1 Cytochrom P450

Názvosloví jednotlivých isoenzymů cytochromu P450 se v současnosti řídí nomenklaturním doporučením založeném na shodě v aminokyselinové sekvenci. (<http://drnelson.utmen.edu/CytochromeP450>) [5]. P v názvu znamená pigment a 450 je označení spektrálního maxima, které vykazuje cytochrom po redukci a vazbě s CO. Nadrodina enzymu je označena zkratkou CYP (**CY**tochrom **P450**), následuje dělení do rodin označených arabským číslem (CYP2), podrodin označených písmenem (CYP2D), kompletní zkratka pro jednotlivé isoenzymy je doplněna ještě jednou číslicí (CYP2D6). 40% shoda v aminokyselinové sekvenci je podmínkou pro zařazení enzymů do jedné rodiny, 55% shoda pak do jedné podrodiny. I malé změny v aminokyselinovém pořadí mají za následek velké změny v aktivitě enzymu, případně změny v substrátové specifitě.

Biochemicky jsou enzymy cytochromu P450 nespecifické monooxygenasy se systematickým označením 1.14.14.1. Jedná se o hemoprotein typu b, který je pevně vázán na membrány hladkého endoplazmatického retikula živočišných buněk zejména v játrech, ale i ledvinách, sliznici tenkého střeva, plicích, mozku a dalších tkáních [6]. Katalytická funkce cytochromu P450 může být zjednodušeně vyjádřena následující rovnicí:



Substrátem enzymu mohou být jednak látky endogenního původu: steroidy, mastné kyseliny aj.; ale i látky původu exogenního s rozmanitou chemickou strukturou. Reakce je nazývána monooxygenace, protože jen jeden atom kyslíku je inkorporován do substrátu a druhý je redukován na molekulu vody, donorem vodíku je NADPH (redukováný nikotinamidadenindinukleotidfosfát). Podstatou oxidoredukční funkce cytochromu P450 je změna mocenství hemového železa [7]. (obr. 1)



Obr. 1: Katalytický cyklus cytochromu P450, upraveno podle [8]

Pouze 3 rodiny cytochromu P450 (CYP1- 3) z celkově 51 popsaných se účastní I. fázi biotransformace xenobiotik jako jsou např. léčiva, potravinová aditiva, rostlinné alkaloidy, karcinogeny a prokarcinogeny. Cytochromem katalyzované reakce mění funkční skupinu výchozí molekuly s cílem zvýšit její hydrofilitu, a tím snížit resorpci ve střevě nebo zvýšit exkreci látky do moče nebo do žluče, celkově tedy podpořit její eliminaci a snížit její akumulaci v organismu. Kromě detoxifikace organismu mají význam také v procesu kancerogeneze a případné aktivaci prokarcinogenů. CYP 5-51 se účastní procesů biotransformace protizánětlivých endogenních látek (tromboxanů.

prostaglandinů, biosyntézy steroidů a nízkomolekulárních mediátorů biologických funkcí u člověka [9]. Postavení rodiny cytochromů CYP4 je na hranici dvou výše zmíněných skupin.

Vztah enzymu a cílové molekuly je oboustranný, nejčastěji cílová molekula neovlivňuje aktivitu isoenzymu, pak je označována obecně substrátem. Pokud zvyšuje aktivitu enzymového systému, mluvíme o enzymovém induktoru; a jestliže katalytickou aktivitu systému snižuje, označujeme ji jako inhibitora. Tato inhibice může být kompetitivní reverzibilní nebo irreverzibilní. Problematika enzymových indukcí a inhibicí je zmíněna pouze pro ujasnění významu těchto biochemických závislostí.

Pro isoenzymy metabolizující léčiva je charakteristická široká substrátová specifita a překrývání účinku na cílový substrát. Více isoenzymů katalyzuje jeden typ reakce, to umožňuje biotransformaci látky alternativní metabolickou cestou v případech absence, inhibice nebo geneticky modifikované aktivity hlavního metabolizujícího isoenzymu.

2.2 Genetický polymorfismus systému CYP

2.2.1 Genotyp

V současnosti studovaná geneticky předurčená variabilita v katalytické aktivitě cytochromu P450 je způsobena především bodovými mutacemi - jedno či více nukleotidovými polymorfismy (single nucleotide polymorphism - SNP)

Genetický polymorfismus je definován jako bodová mutace v DNA sekvenci - monogenní charakteristický znak, který je v populaci vyjádřen nejméně dvěma fenotypy s alelickou frekvencí výskytu minimálně 1 % [10]. V zásadě se jedná o tři základní typy bodových mutací: substituce (záměna), delece (ztráta) a inserce (vsunutí) nukleotidu do řetězce DNA. Tyto drobné deviace genotypu se mohou vyskytnout v intronech stejně jako v exonech. Pokud se polymorfismus vyskytne v intronu, může dojít např. k multiplikaci zasažených alel a ke změně v míře genové exprese proteinu. Vyskytne-li se bodová mutace v exonu, dochází obvykle ke změně funkčnosti exprimovaného proteinu, nejčastěji ke snížení aktivity katalytické funkce enzymu způsobené např. konformační změnou ve vazebné doméně. Delece nebo inserce nukleotidu způsobuje posun čtecího rámce označované jako „frameshift“ mutace a proto pokračující sekvence již nekóduje

funkční produkt. – „nonsense“ mutace. Substituce ovlivní kodon tak, že dochází k záměně syntetizované aminokyseliny, která může a nemusí mít funkční význam. Zásadní funkční význam však má záměna, která vznikne v rámci stop kodonu (UAA, UAG, UGA) [11].

Ačkoli se bodové mutace vyskytují relativně hojně a prakticky kdekoli v sekvenci nukleotidů, jen několik z nich se projeví odlišnou intenzitou funkční odpovědi.

2.2.2 Fenotyp

Všeobecně na základě genotypu rozlišujeme čtyři základní fenotypy - projevy genetické výbavy jedince. S ohledem na metabolickou kapacitu enzymu dvě ze čtyř fenotypových skupin se zásadně odlišují od běžného populace. Lidé s fenotypem pomalého metabolizátora (PM) jsou homozygoté pro funkčně defektní alelu nebo postrádají celý gen, což způsobuje značné až úplné snížení metabolické kapacity. Naopak zvýšení metabolické kapacity očekáváme u fenotypu rychlého metabolizátora (RM, někdy označovaného i jako ultrarychlý metabolizátor UM), jehož alely bývají duplikované nebo multiplikované. Alely pro fenotyp rychlého metabolizátora jsou dominantní tzn., že fenotyp pomalého metabolizátora je vyjádřen jen u homozygotů pro defektní alely. Klinicky zřetelné rozdíly v rychlosti biotransformace xenobiotik mezi heterozygoty pro variantní alelu (intermediální metabolizátoři - IM), jejichž enzymová aktivita je buď normální nebo jen lehce snížená, a extensivními metabolizátory (EM), kteří mají dvě funkční nepozměněné alely (wild-type), jsou vyjádřeny u špatně tolerovaných léčiv s velice úzkým terapeutickým oknem. U těchto léčiv je biotransformace úzce spjata s jedním isoenzymem a alternativní metabolická cesta plně nekompensuje dráhu hlavní. Frekvence výskytu jednotlivých alel je rozdílná v různých populacích a je dána přirozenou selekcí.

2.3 Metody farmakogenetiky

Farmakogenetika (někdy též zvaná farmakogenomika) se zabývá i výše zmíněnou geneticky podmíněnou variabilitou lékové odpovědi, jejími příčinami na molekulární úrovni a v neposlední řadě sleduje klinickou závažnost této variability. Snahou tohoto farmakologického oboru je vyhledání dostupných metod k predikci významné variability v lékové odpovědi ještě před prvním podáním léčiva s cílem individualizace

a optimalizace terapeutického režimu u konkrétních pacientů. V současné době je popsáno mnohem širší spektrum příčin variability lékové odpovědi na genetické úrovni než jen polymorfismy metabolizujících enzymů. Jedná se také o variabilitu transportních proteinů, receptorů i postreceptorových mechanismů [12]. Přes rychlý rozvoj tohoto oboru dva základní metodické přístupy ke stanovení a objektivizaci významu genetické odchylky zůstávají ve farmakogenetice zachovány. Jedná se o genotypizaci a fenotypizaci jednotlivce.

2.3.1 Fenotypizace

Fenotypizací stanovujeme projev genetické výbavy jedince, který je ovlivněn fyziologickými i patologickými stavy organismu, vlivy vnějšího prostředí, aktuální enzymovou indukci i inhibicí způsobenou přítomnými xenobiotiky. Pro stanovení aktuální aktivity enzymu je podána jednorázově dávka modelového léčiva, které je metabolizováno výhradně enzymem, jehož aktivitu stanovujeme. V definovaných časových intervalech jsou odebírány biologické vzorky (krev, sliny, moč), ve kterých se stanovuje poměr mateřské látky a jejích metabolitů. Podle hraničních hodnot metabolických poměrů jsou jedinci rozděleni do skupin odpovídajících fenotypu pomalých, rychlých, extensivních eventuálně intermediálních metabolizátorů. K fenotypizaci CYP2D6 se nejčastěji používá dextromethorphan, spartein a debrisoquin [13]. Dextromethorphan je v současnosti v zahraničí nejširěji používán pro svoji dostupnost a vysokou bezpečnost. Spartein je preferován u lidí se sníženou renální funkcí a debrisoquin, který je pravděpodobně nejvýhodnější u velmi rychlých metabolizátorů, byly první modelové látky používané k fenotypizaci CYP2D6. Jejich nevýhodou je možný výskyt závažných nežádoucích účinků. Metoprolol je další potenciální látkou, jehož nevýhodou je variabilní korelace s ostatními modelovými léčivy. Ostatní látky nejsou v současné době běžně ke stanovení používány.

2.3.2 Genotypizace

Genotypováním detegujeme polymorfni variantní alely genu pro příslušný enzym, aktivitu enzymu poté určujeme nepřímo predikcí fenotypu. Většina genotypovacích strategií je založena na metodách molekulární biologie, kde v prvním kroku izolujeme leukocytární DNA, navazuje amplifikace požadovaného úseku DNA polymerasovou

řetezovou reakcí (PCR) se sadou specifických primerů následovanou analýzou jednotlivých alel, např. analýzou délky restrikčních fragmentů (RFLP - restriction fragment length polymorphism). Ta se provádí horizontální elektroforézou, buď v agarosovém gelu (délka restrikčních fragmentů je větší než 40bp) nebo polyakrylamidovém gelu pro fragmenty menší než 40bp. [14] PCR-RFLP je jednou z nejdostupnějších metod, její detailní popis je součástí metodické části mé práce, protože i já jsem ji použila k detekci genotypu s následnou predikcí fenotypu pro CYP2D6 isoenzym.

2.3.2.1 SSCP – jednořetězcový konformační polymorfismus

Metoda analýzy SSCP (jednořetězcového konformačního polymorfismu - single strand conformation polymorphism) je jednoduchou a dostatečně senzitivní technikou k detekci mutací typu záměny jedné baze [15]. Metoda je založena na principu různé migrace jednořetězcových molekul DNA, které se liší svou sekundární strukturou (konformací) v nativním (nedenaturačním) polyakrylamidovém gelu (obvykle 6%, typicky 0.4 mm silný, v TBE pufru). Unikátní konformace jednořetězcového fragmentu DNA je dána intramolekulárními interakcemi uvnitř DNA sekvence. Tato konformace je závislá na teplotě a iontové síle. Již tak malý rozdíl jako je záměna jedné baze způsobí změnu konformace a rozdílnou pohyblivost při elektroforéze za dodržení podmínky nedenaturace. Rozdíl v konformaci může tedy být způsoben odlišností pouze jediné baze v sekvenci DNA. Tato citlivá technika zachycuje 100 % mutací v DNA fragmentech menších než 200 bází a 80 % mutací v DNA fragmentech menších než 400 bází [16].

2.3.2.2 PCR v reálném čase

Flexibilita PCR v reálném čase nám poskytuje další možnost, jak odhalovat alelické varianty. Metoda je založena na stanovování množství fluorescence produktů PCR po každém cyklu pomocí fluorescenčních sond a stanovování počtu cyklů potřebných pro dosažení „prahové fluorescence“. Stanovování se děje na základě měření změn fluorescence (rozsvěcení nebo zhasnutí) fluorescenční sondy. Pro systémy TagMan a FRET byly vyvinuty přesné protokoly k detekci bodových mutací. Bodové mutace v produktu PCR, který je homologní se sondou, lze detegovat pomocí analýzy jejich teploty tání. podstatou detekce pomocí fluorescence jsou výše zmiňované sondy nebo

přidaná barviva, která fluoreskují pouze pokud jsou navázána na dvouřetězcovou DNA, která se se zvyšující teplotou rozplétá. Pokud v produktu není žádná bodová mutace – sonda je plně komplementární k přirozenému (wild-type) řetězci, pak dochází k tání produktu za charakteristické teploty, která je vyšší než pokud se v produktu vyskytnou jednonukleotidové záměny. Jednonukleotidová záměna G-T sníží teplotu tání o nejméně 3 °C, záměna A-C pak alespoň o 10 °C [17]. Podle přístrojového vybavení lze analýzu teploty tání PCR produktů sledovat v reálném čase.

2.3.2.3 Minisekvenování

Dalším možným přístupem v detekci bodových mutací jsou metody založené na principu sekvenování nukleotidového vlákna. U minisekvenování se jedná o prodloužení 3'-konce primeru o jediný značený nukleotid, který slouží jako terminátor. Technologie je určena pro ověření jednonukleotidových polymorfismů v sekvencích bazí a umožňuje spolehlivě odlišit jednotlivé alely genů. Primer se váže svým 3'-koncem v těsném sousedství polymorfního místa. K prodloužení primeru DNA-polymerasou dojde pouze tehdy, jestliže značený nukleotid v reakci je komplementární k bázi v cílovém místě. Produkty prodloužených primerů jsou analyzovány elektroforeticky a vyznačují se odlišnou mobilitou v gelu [18].

2.3.2.4 Pyrosekvenování

V současnosti se často zmiňuje metoda pyrosekvenování, je založená na sekvenování syntézou. Každé správné připojení dNTP je doprovázeno uvolněním proporcionalního množství pyrofosfátu, který okamžitě emituje viditelné světlo z luciferasou katalyzované reakce. Nukleotidovou sekvenci je možno určit v reálném čase podle píků na pyrogramu [19].

2.3.2.5 DNA biočipy

Význam polymorfismů cytochromu P450 je již natolik všeobecně uznáván, že byly vyvinuty komerčně dostupné biočipové technologie pro všechny klinicky významné bodové mutace isoenzymů CYP2D6 a CYP2C19 (firma ROCHE). Biočipy jsou založeny na principu hybridizační reakce, která proběhne mezi DNA vzorku a specificky fluorescenčně značeným jednořetězcovým oligonukleotidem upevněným na nosiči,

obvykle na membráně nebo skleněné destičce. Oligonukleotidy slouží jako DNA proby a k amplifikační reakci dochází jenom za předpokladu naprosté komplementarity. Biočipy tedy dokáží odlišit a identifikovat specifické DNA sekvence (včetně bodových odchylek) v heterogenní směsi genů během velmi krátké doby. Finanční náročnost této metody však limituje její široké použití [18, 20].

2.3.3 Porovnání metodik

Fenotypizace je považována za metodu vhodnější k určení aktuální enzymové aktivity, ale pro klinickou praxi není plně akceptovatelná, především kvůli zatížení organismu nemocného podáváním modelové látky, která přes svou relativní bezpečnost může vyvolat vznik některých specifických nežádoucích účinků. Navíc, takovéto studie bývají často doprovázeny nízkou kompliencí probandů a výsledky mohou být modifikovány obtížně dohledatelnými faktory.

Genotypováním určená genetická predispozice nám dovoluje zařadit pacienta do jedné z fenotypových skupin (PM, IM, EM, RM). Navzdory rychlému rozvoji genotypovacích technik i znalostí klinických souvislostí jednotlivých bodových mutací (SNP) je nutné si stále uvědomovat, že na základě genotypu reálnou enzymovou aktivitu jen předpovídáme. Eventuální přítomnost dosud nepopsaných nebo jen nestanovených SNP, může vést k chybnému zařazení jedince do nesprávné fenotypové skupiny.

Genotyp pacienta se celý život nemění, ale aktuální aktivita enzymu osciluje a je závislá i na negenetických faktorech, jakými jsou např. podávání enzymových induktorů, inhibitorů nebo substrátů, složení stravy, hladiny hormonů a jiných endogenních látek nebo současně probíhající onemocnění. Fakt, že se tedy jedná o nepřímé stanovení aktivity enzymových systémů a finanční nákladnost analýzy jsou hlavní nevýhody genotypování. Mezi výhody bezpochyby patří vyšší compliance ze strany pacienta, který není zatěžován podáváním modelového léčiva, neovlivnění výsledků analýzy aktuálním kontaktem organismu s různými xenobiotiky, možnost většiny molekulárních laboratoří takovéto stanovení provádět a rychlost stanovení i při velkém počtu vzorků. Pokud je prokázán úzký vztah genotypu s fenotypem, používá se ve farmakogenetických studiích genotypování přednostně. Tento vztah je u CYP2D6 prokázán na 98,7% úrovni [4].

2.4 CYP2D6

Isoenzym CYP2D6 je polypeptid o 497 aminokyselinách, jehož relativní množství v lidských játrech je kolem 4 % ze všech cytochrom-P450 enzymů [6]. Navzdory malému procentuálnímu zastoupení je význam CYP2D6 nezanedbatelný. CYP2D6 katalyzuje oxidativní biotransformaci u více než 25 % běžně užívaných léčiv a zatím nebyla plně popsána jeho hlavní endogenní funkce[21]. Typický substrát cytochromu 2D6 je popisován jako lipofilní báze s atomem dusíku v molekule. Spektrum substrátů je velmi široké a zahrnuje léčiva ze skupin tricyklických a SSRI antidepressiv, antipsychotik, antimalarik, lipofilních betablokátorů, antiarytmik a některých opioidů (tab. 1).

Tab.1: Substráty CYP2D6

Ajmalin	Imipramin
Alprenolol	Indoramin
Amiflamin	Lidokain
Amitriptylin	Maprotilin
Amphetamin	Methoxyamphetamin
Aripiprazol	Metiamid
Atomoxetin	Metoclopramid
Bupranolol	Mexiletin
Captopril	Mianserin
Carvediol	Minaprim
Cinnarizin	Nortriptylin
Citalopram	Ondasetron
Chlorpromazin	Paroxetin
Clomipramin	Perhexilin
Clozapin	Perphenazin
Codein	Phenacetin
Debrisoquin	Phenformin
Deprenyl	Propafenon
Desipramin	Propranolol

Desmethylocitalopram	Quinidin
Dexfenfluramin	Risperidon
Dextromethorphan	S-metoprolol
Dihydrokodein	Sparteín
Encainid	Tamoxifen
Ethylmorphin	Thioridazin
Flecainid	Timolol
Flunarizin	Tomoxetin
Fluoxamin	Tramadol
Fluoxetin	Trifluoperidol
Fluperlapin	Trimepranol
Fluphenazin	Tropisetron
Galanthamin	Venlafaxin
Haloperidol	Zuclopenthixol

Gen cytochromu CYP2D6 je lokalizován na dlouhém raménku 22. chromosomu (22q13.1), má 9 exonů a skládá se z funkčního genu pro CYP2D6 a dvou pseudogenů CYP2D7, CYP2D8. Tento genový lokus je vysoce polymorfni, do dnešního dne bylo popsáno více než 80 variantních alel. Všechny alelové varianty jsou detailně popsány na webových stránkách názvoslovné komise pro lidské cytochromy [22]. Alely jsou označeny zkratkou CYP2D6 a dále arabskou číslicí s hvězdičkou, CYP2D6*1 je označení pro alelu bez mutací, tzv. wild-type, přirozený typ. Alely způsobující předčasné ukončení syntézy proteinu: CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*6, CYP2D6*8, CYP2D6*11, CYP2D6*15, CYP2D6*19, CYP2D6*20, CYP2D6*38, 40, CYP2D6*42, CYP2D6*44, alely kódující nefunkční enzym normální délky: CYP2D6*7, CYP2D6*12, CYP2D6*14, CYP2D6*18, delece celého genu CYP2D6*5 a přepis hybridního genu CYP2D7 a CYP2D8 jsou alelické variantní formy způsobující ztrátu nebo snížení aktivity enzymu a tím i fenotyp pomalého metabolizátora. Fenotypové skupiny byly prvně popsány při studiu metabolismu debrisoquinu (1977) a následně sparteinu (1979) [23], proto byl polymorfismus CYP2D6 původně nazýván polymorfismus debrisoquin/sparteinového typu.

Frekvence výskytu jednotlivých variantních alel se liší podle rasové příslušnosti jedince. Sachs *et al.* [3] stanovil frekvenci výskytu alely *1 jako 36,4%, *4 odpovídala 20,7% a u 0,9 % německé populace se vyskytla delece genu (CYP2D6*5). Své stanovení prováděl genotypováním a ověřoval fenotypováním u 589 zdravých dobrovolníků německé národnosti. Tyto hodnoty pak rámcově charakterizují celou kavkazskou – bělošskou populaci. Nejčastější defektní alelou kavkazské populace je CYP2D6*4 (asi 20 %), která zapříčiňuje fenotyp pomalého metabolizátora. Incidence variantních alel a PM v různých populacích je znázorněna v tabulce 2. PM je nejvíce v bělošské populaci 6-10 %, v populaci asijské a arabské je asi 1 % PM, údaje o africké populaci nejsou úplně jednotné, všeobecně je akceptován pětiprocentní výskyt PM. Existují i případy amplifikace nebo duplikace genu, které s sebou nesou zvýšení katalytické aktivity enzymu, takoví jedinci jsou pak označováni jako ultrarychlí metabolizátoři. UM je v kavkazské populaci obdobně jako PM, tedy 1-7 %, v asijské populaci pak opět méně přibližně 1-2 %.

Tab.2: Relativní alelická frekvence vybraných CYP2D6 variantních alel ([24], [21])

		Alelická frekvence (%)			
		Kavkazská populace	Asijská populace	Afro-americká populace	Arabská populace
CYP2D6	*3	2-3	0,2	0,2	0
	*4	12-21	1	2	1-4
	*5	2-7	6	4	1-3
	*6	1	0	0	0,7
	*10	1-2	51	6	3-9
	*17	0	0	20-35	3-9
	PM	7 %	1 %	5 %	1 %

Frekvence výskytu jednotlivých variantních alel CYP2D6 je nejpodrobněji prostudována v kavkazské populaci. Jednotlivé výzkumné týmy obvykle stanovovali

alelické frekvence nejčastějších bodových mutací a svá stanovení rozšiřovali dle oblasti zájmu. Přehled těch základních alelických variant je v tabulce 10.

Pokud je léčivo biodegradováno CYP2D6 enzymem, pak jsou u PM tendence ke kumulaci dávek léčiva, u UM naopak dochází k snižování plazmatických hladin aktivního léčiva pod terapeutickou hodnotu. Mezi nežádoucí účinky substrátů CYP2D6 u jedinců s variantní alelou nesoucí fenotyp PM se počítá např. kardiotoxicita tricyklických antidepresiv, arytmie u antiarytmik, snížená až chybějící analgesie po podání kodeinu, ekcesivní betablokáda s bradykardií při léčbě betablokátory aj [25]. Značně vyjádřené toxické projevy po podání perhexilinu a phenforminu u PM dokonce vedly ke stažení těchto léčiv z trhu.

Snaha o individualizaci terapie v závislosti na genotypu vedla nedávno k publikaci korekcí doporučených dávek při terapii deprese v jednotlivých fenotypových skupinách pacientů [26]. Všeobecně snaha vypočítat podle genotypu doporučené dávky (G-SDR - genotype-specific dose recommendation) je založena na znalosti tří podmínek:

- 1) Doporučovaná terapeutická dávka musí být odvozena z rozsáhlých klinických studií na geneticky smíšené populaci.

- 2) Farmakokinetické odlišnosti mezi různými genotypy/fenotypy musí být popsány klinickými studii na zdravých dobrovolnících a potvrzeny skupinami pacientů

- 3) Frekvence výskytu variantních alel v cílené populaci musí být konkrétně popsána [27].

Při znalosti těchto tří podmínek může farmakogenetika zvýšit bezpečnost a účinnost léčby, docílit možnosti snáze předvídat vznik nebezpečných nežádoucích účinků ještě před zahájením léčby a napomoci individualizaci farmakoterapie.

3 CÍL PRÁCE

Cílem této studie bylo popsat frekvenci výskytu vybraných variantních alel genu CYP2D6 v české populaci a porovnat ji s dostupnými literárními údaji z ostatních populací se zaměřením na populace evropské.

1. 1. 1.

1. 1. 2.

1. 1. 3.

1. 1. 4.

1. 1. 5.

1. 1. 6.

1. 1. 7.

1. 1. 8.

1. 1. 9.

1. 1. 10.

1. 1. 11.

1. 1. 12.

1. 1. 13.

1. 1. 14.

1. 1. 15.

1. 1. 16.

1. 1. 17.

1. 1. 18.

1. 1. 19.

1. 1. 20.

METODY

4 METODY

4.1 Použité reagensie a přístroje

Veškeré použité reagensie byly získány od těchto firem:

jednotlivé složky reakční směsi pro PCR – Fermentas, Litva

Top Vision LE CQ Agarose – Fermentas, Litva

QIAmp Blood Mini Kit – QIAGEN, Německo

Agarosa Serva – Serva, Německo

jednotlivé složky pro izolaci DNA vysolovací metodou – Sigma, USA

primery - VBC Genomics, Rakousko

Použité přístroje:

Analytické předvážky – CHIRANA P3/200, Chirana, ČR

Analytické váhy – LB-1050/1, MIM, Maďarsko

Centrifuga – MPW 360, Mechanika Precyzyjna, Polsko

Elektroforetická vana – Sub-cell Model 192, BIO-RAD, USA

Elektroforetický zdroj – PowerPac HC, BIO-RAD, USA

Inkubátor – EN025, Nüve, Turecko

Lázeň – Isotemp 202, Fisher Scientific, USA

Minicentrifuga – MiniSpin plus, Eppendorf, Německo

pH metr – MS 22, Laboratorní přístroje Praha, ČR

Termocycler - MyCycler gradient thermal cycler, BIO-RAD, USA.

Transiluminátor – EFX 20MX, Vilber Lourmat, Francie

a dále: vortex, magnetická míchačka, mikrovlnná trouba, tavička folií, lednice, mrazáky

4.2 Studovaná skupina populace

Skupinu zdravých dobrovolníků z řad studentů vysokých škol tvořilo 223 navzájem nepříbuzných jedinců české národnosti (89 žen a 134 mužů). Vzorky krve byly odebrány po podepsání informovaného souhlasu všech jedinců.

4.3 Izolace DNA z krve

Vzorky krve byly odebrány do jednorázových evakuovaných odběrných zkumavek s přídatkem K_2EDTA . Některé ze vzorků byly ihned zpracovány, jiné byly zmrazeny a zpracovány později. Izolace DNA probíhala buď vysolovací metodou nebo za použití kitu na izolaci DNA – QIAmp Blood Mini Kitu.

4.3.1 Izolace DNA vysolovací metodou

Materiál použitý k izolaci DNA

- RBC pufr – 10mM Na_3PO_4 , 150mM NaCl, 1mM $MgCl_2$, pH 7,4
- Bristol
- Proteinasa K (20 mg/ml)
- 10% SDS
- 5M NaCl
- 96% ethanol
- TE pufr - 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

- Centrifuga
- Inkubátor

Do velké kónické zkumavky (50 ml) jsem přenesla 5 ml krve a 20 ml RBC pufru, který je lyzačním roztokem pro erythrocyty. Směs jsem promíchala na vortexu a ponechala 30 minut ve vodní lázni s ledem. Po vyjmutí z vodní lázně jsem směs centrifugovala 10 minut při 3000 ot./min (805x g). Supernatant se zlyzovanými erythrocyty jsem odstranila. Ke zbylým leukocytům jsem přidala RBC pufr (25 ml). Směs jsem promíchala na vortexu a opět na 30 minut ponechala ve vodní lázni s ledem. Následovala centrifugace 10 minut při 3000 ot./min (805x g). Pokud po slití pufru se zbytky erythrocytů vznikla bílá sedlina (peleta), pokračovala jsem dále, jinak jsem opakovala přidání pufru, lýzu a centrifugaci do úplného vyčištění. Ke vzniklé peletě jsem přidala 3 ml Bristolu a pořádně promíchala na vortexu. Přidala jsem 300 μ l proteinasy K a 300 μ l 10% SDS. Vzniklou reakční směs jsem nechala inkubovat ve vodní lázni při 55 °C čtyři hodiny, nebo při 37 °C přes noc. Po inkubaci jsem do zkumavky přidala

900 μ l NaCl a cca 2 minuty jsem směs míchala na vortexu. Po centrifugaci 30 minut při 5000 ot./min (2236x g) jsem opatrně přenesla supernatant do zkumavky s 8 ml vychlazeného 96% ethanolu. Směs jsem mírně promíchala a DNA, která po sražení vyplavala na hladinu, jsem namotala na sterilní skleněnou tyčinku a nechala ji oschnout za laboratorní teploty. Ochlou tyčinku s namotaným vláknem DNA jsem opláchla v eppendorfci se 150 μ l TE pufru. Finální DNA jsem uložila do lednice (4 °C).

Izolaci DNA lze přerušit po lýze erytrocytů a přidání Bristolu. Směs protřepeme a uložíme v hlubokomrazícím mrazáku (cca -84 °C).

4.3.2 Izolace DNA pomocí QIAmp blood mini kitu

Materiál potřebný k izolaci DNA

- QIAGEN proteasa
- Pufr AL
- 96% ethanol
- Pufr AW1
- Pufr AW2
- Pufr AE

- Vortex
- Inkubátor
- Centrifuga

Do řádně popsanych eppendorfek jsem postupně nanesla 20 μ l QIAGEN proteasy, 200 μ l krve a 200 μ l pufru AL. V případě menšího objemu krve než 200 μ l jsem reakční směs doplnila sterilním fyziologickým roztokem. Obsah eppendorfek jsem důkladně promíchala na vortexu a nechala inkubovat 10 minut ve vodní lázni při 56 °C. Po vyndání z lázně a lehkém klepnutí (kvůli odstranění kapky z víčka) jsem přidala 200 μ l 96% vychlazeného ethanolu a míchala po dobu 15 s na vortexu. Celý objem jsem přelila do plastové soupravy QIAmp Mini Column s filtrem a centrifugovala 1 minutu při 8000x g. Po přefiltrování celého objemu jsem vložila filtr do nové spodní nádoby – Collection Tube a filtrát jsem vyhodila. Na filtr jsem nanesla 500 μ l pufru AW1 a centrifugovala jsem celou sestavu 1 minutu při 8000x g. Opět jsem filtr vložila do nové

Collection Tube a filtrát také vyhodila. Na filtr jsem nanesla 500 μ l pufru AW2 a centrifugovala jsem vše po dobu šesti minut při 14100x g. Do sterilní eppendorfky jsem vložila filtr, nanesla na něj 200 μ l pufru AE a nechala inkubovat při pokojové teplotě. Eppendorfku s filtrem jsem centrifugovala 1 minutu při 8000x g. Filtr jsem vyhodila. Finální DNA je obsažena ve filtrátu v eppendorfce.

4.3.3 Příprava gelů

K přípravě gelů na horizontální elektroforézu jsem použila dva typy agaros. Agarosu od firmy Serva jsem použila na přípravu 2% gelu pro kontrolu vzniku PCR produktu. Agarosu od firmy Fermentas jsem použila při přípravě 3% a 3,5% gelu pro odečítání délky vzniklých fragmentů DNA po restrikci.

Gely jsem připravovala ve skleněné kádince smícháním naváženého množství agarosy a 1x TBE pufru dle schématu:

2,0% gel	3,50 g agarosy do 175 ml 1x TBE pufru
3,0% gel	5,25 g agarosy do 175 ml 1x TBE pufru
3,5% gel	6,13 g agarosy do 175 ml 1x TBE pufru nebo 9,28 g agarosy do 265 ml 1x TBE pufru

K agarose a TBE pufru jsem přidala 10 ml destilované vody, aby se neměnila potřebná koncentrace gelu, protože při následném vaření i míchání dochází k odpařování vody. Naváženou směs jsem nechala cca 3 minuty míchat na magnetické míchačce. Poté jsem na kádinku přiložila porcelánovou pokličku a dala jsem směs do mikrovlnné trouby na 6 – 8 minut při 450 W. Směs na přípravu 3,5% gelu o objemu 265 ml jsem v mikrovlnné troubě nechala cca 15 minut. Po úspěšném uvaření agarosového gelu (z mléčně zbarvené suspenze se stane čirý gel bez bublinek) jsem kádinku s gelem nechala cca 7 – 10 minut na magnetické míchačce za stálého míchání vychladnout. Poté jsem nalila gel do připravené formy s potřebným typem a množstvím hřebenů a nechala jej vychladnout. Nově připravený gel jsem buď hned použila nebo jej zatavila do folie a uskladnila v ledničce.

Formu na přípravu 2% gelu tvořila 10 cm dlouhá a 24,5 cm široká vanička se dvěma hřebeny, které dohromady vytvořily 104 jamek. Formu na přípravu 3% a 3,5% gelu tvořila 10 cm dlouhá a 24,5 cm široká vanička se dvěma hřebeny, které dohromady vytvořily 52 jamek. Při přípravě 3,5% gelu vytvořeného použitím 265 ml TBE jsem

použila 15 cm dlouhou a 24,5 cm širokou vaničku se dvěma hřebeny, které dohromady vytvořily 52 jamek.

4.4 Genotypování

4.4.1 Obecná charakteristika genotypování

Genotypování je jedním z procesů, kterým lze stanovit výskyt poškozených míst v DNA. Pokud jsou tato místa – genetické změny – přítomna u více než 1 % zkoumané populace, můžeme tento jev nazvat genetickým polymorfismem. Genetické změny velmi často ovlivňují expresi genu, zvyšují nebo snižují aktivitu genového produktu nebo mohou poškodit sestřih mRNA a poškodit tak její stabilitu.

Polymorfismy v některých genech mohou mít za následek velké individuální rozdíly v rychlosti odbourávání substrátů metabolické cesty.

K určení genotypu jsem použila nejčastěji používanou metodu PCR-RFLP – polymerasovou řetězovou reakci s následnou analýzou délky restričních fragmentů.

4.4.1.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerasová řetězová reakce slouží k amplifikaci (zmnožení počtu vláken) části DNA, o které víme, že obsahuje místo výskytu zkoumaného polymorfismu. Při provedení PCR je nutná přítomnost termostabilní DNA Taq polymerasy, která vyžaduje stálé složení reakční směsi během celého procesu. Toho je dosaženo přítomností pufru pro DNA Taq polymerasu. V reakční směsi jsou také zapotřebí hořčičnaté ionty v podobě $MgCl_2$, dNTP (deoxyribonukleotidtrifosfáty), sterilní PCR voda a primery, které jednoznačně označují úsek DNA určený k amplifikaci.

DNA Taq polymerasa je schopná syntetizovat komplementární vlákno k vláknu původnímu tak, že k existujícímu úseku komplementárního vlákna přidává nové nukleotidy ve směru 5'>3' nového vlákna. Tímto existujícím úsekem je v našem případě primer, který je syntetizován uměle nejčastěji jako 17 - 22 bazí dlouhý oligonukleotid. Pro vytvoření primerů je potřeba znát přesnou sekvenci DNA, kterou zjistíme v internetové databázi GenBank [28].

Za vhodných teplotních podmínek (94 °C) dojde v reakční směsi k denaturaci původního (templátového) vlákna DNA a při snížení teploty na teplotu tání primerů

dojde k vytvoření vodíkových můstků primerů s komplementární sekvencí v jednom z původních vláken. Nasednutím primeru je přesně určeno místo odkud bude DNA amplifikována a také jakým směrem (od 3' konce primeru). V další fázi - po zvýšení teploty na 72 °C – dochází k prodlužování řetězce primeru přidáváním dalších deoxynukleotidů na jeho 3' konec. Při jednom cyklu vznikne z jednoho vlákna jen jedna kopie. Po každém cyklu denaturace, nasednutí primerů a jejich následném prodloužení vznikají produkty, které jsou v dalších cyklech použity jako nové šablony pro další reakci. Produkt se tedy tvoří geometrickou řadou – z x vláken získáme po n cyklech x^n kopií, což je pro dvě původní vlákna po 35 cyklech cca $3,44 * 10^{10}$ kopií.

Výslednou kvalitu PCR produktu ovlivňuje kvalita izolované DNA, počet cyklů a délka jejich elongačních intervalů, složení reakční směsi, kvalita použité polymerasy a také typ termocycleru. U některých termocyclerů může docházet k delším prodlevám při změnách teplot nebo teplota nemusí být homogenní a mohou tak vznikat nespecifické produkty.

Obecné podmínky PCR reakce jsou:

- 5 minut denaturace DNA při 94 °C
- 35 cyklů : denaturace DNA při 94 °C
 nasednutí primerů při teplotě tání
 prodlužování primerů při 72 °C
- 5 minut při 72 °C – terminální elongace
- uchovávání při 10 °C

Obecné složení reakční směsi pro PCR

- celkový objem reakční směsi 20 nebo 15μl
- sterilní PCR voda
- pufr pro DNA Taq polymerasu
- DNA Taq polymerasa
- deoxyribonukleotidy
- primery (R a F)
- MgCl₂

- vzorek DNA

Reakční směs jsem připravovala za chlazení na ledovém bločku. Nejprve jsem do eppendorfky napipetovala kromě DNA výše popsané složky reakční směsi a vše pořádně promíchala. Tuto směs jsem rozpipetovala do jednotlivých PCR zkumavek a nakonec jsem za chlazení přidala DNA. PCR reakce probíhala v termocykleru MyCycler gradient thermal cycler od firmy BIO-RAD, USA.

Konečný produkt amplifikace byl detekován elektroforézou na 2% agarosovém gelu. Pokud reakce proběhla úspěšně, byla v gelu (po obarvení např. ethidium bromidem a následné vizualizaci na transiluminátoru) vidět jen jedna řada bandů - proužků - stejně vzdálených od místa nanesení do gelu. Vzdálenost proužku od startu je závislá na velikosti výsledného produktu a můžeme si ji kontrolovat pomocí markeru, který tvoří několik různých proužků o známých délkách fragmentů DNA. Pokud v gelu není viditelný žádný proužek, tak PCR neproběhla, pokud je vidět více proužků, tak PCR proběhla, ale s nespecifickým nasednutím primerů a vznikly i nespecifické produkty. Zabránit vzniku nespecifických produktů lze pouze optimalizací podmínek reakce. Všechna stanovení jsem prováděla v sériích s pozitivní i negativní kontrolou.

Na 2% agarosový gel jsem nanesla 7 μ l PCR produktu s 10 μ l nanášecího pufru 1x Loading Dye Solution (Fermentas) a do poslední jamky 6 μ l markeru GeneRuler 50bp DNA Ladder (o koncentraci 0,1 μ g/ μ l; Fermentas). Elektroforézu jsem nechala probíhat 30 minut při 100 V v prostředí 1x TBE pufru. Gel jsem potom cca 25 minut barvila v ethidium bromidu, které jsem ze zásobního roztoku (10 mg/ml) naředila 1x TBE puftrem na konečnou koncentraci 5 μ g/ml. Obarvené gely jsem vizualizovala na transiluminátoru.

U vzorků, u kterých jsem potvrdila vznik PCR produktu, jsem provedla restrikci specifickými restrikčními enzymy.

Složení 10x TBE pufru:

- 109 g TRIS báze (ne TRIS HCl)
- 55,6 g kyseliny borité
- 9,3 g EDTA
- přidat injekční vodu do 1 litru, upravit na pH = 8 pomocí koncentrované HCl

- před použitím naředit injekční. vodou na požadovanou koncentraci
- skladovat v ledničce

Složení markeru:

- 110 µl alikvotu GeneRuler 50bp DNA Ladder
- 110 µl nanášejícího pufru 6x Loading Dye Solution
- 440 µl čerstvě otevřené sterilní PCR vody

4.4.1.2 "Nested" PCR

V sadě dvou na sebe navazujících PCR reakcí nejprve amplifikujeme úsek, kde templátem je genomická DNA. Následuje další PCR tzv. "nested" reakce, kde templátem je produkt reakce předcházející. Pro první reakci se použije první sada oligonukleotidů, v druhé, "nested" reakci, se použijí oligonukleotidy, které jsou navrženy pro fragment vzniklý v první PCR reakci.

4.4.1.3 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP je metodou, při které analyzujeme délky vzniklých restrikčních fragmentů. K PCR produktu nanese se specifické restrikční enzymy – endonukleasy – které rozeznávají určitou sekvenci bází (většinou do osmi deoxyribonukleotidů). Endonukleasy bývají voleny tak, aby štěpily produkt pouze v místě, kde by mohlo dojít k jednonukleotidové záměně bází. A tak podle volby endonukleasy je štěpen buď produkt, kde k záměně bází došlo, anebo produkt, kde se záměna bází nevyskytuje. Správnost výskytu polymorfismu lze ověřit sekvenováním DNA.

Po úspěšném průběhu restrikce vznikne naštěpený nebo nenaštěpený PCR produkt. Velikost DNA fragmentů zjišťujeme horizontální elektroforézou v agarosovém gelu o různých koncentracích. Gel po elektroforéze barvíme cca 25 minut v ethidium bromidu a poté vizualizujeme na transiluminátoru. Délku vzniklých fragmentů zjistíme porovnáním s délkou fragmentů markeru GeneRuler 50bp DNA Ladder, jejichž velikost je přesně určená.

Gely, kterými jsem potvrdila vznik PCR produktu i délku vzniklých fragmentů, jsem vyfotila digitálním fotoaparátem Sony, uložila na médium a vytiskla do laboratorního deníku.

4.4.2 Polymorfismus CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*6

Pro určení těchto bodových mutací jsem nejprve provedla první ze série "Nested" PCR reakcí. V této reakci vznikají dlouhé amplikony, proto je i upraveno složení reakce a prodloužena elongační doba reakce (LA PCR).

Primery použité pro první ze série "Nested" PCR:

- LA F01 :
5– GGC CTA CCC TGG GTA AGG GCC TGG AGC AGG A-3'
- LA R01 :
5' -CTC AGC CTC AAC GTA CCC CTG TCT CAA ATG CG- 3'

Složení reakční směsi pro LA PCR (vztaženo na jeden vzorek):

- 1,50 µl 10x pufru pro DNA Taq polymerasu MIX
- 3,75 µl dNTP
- 0,36 µl primeru LA F01
- 0,36 µl primeru LA R01
- 0,96 µl MgCl₂ (25mM)
- 0,30 µl polymerasy Taq DNA poly MIX
- 0,60 µl DMSO
- 6,80 µl sterilní PCR vody
- 1,50 µl DNA

Podmínky PCR reakce:

- 2 minuty při 94 °C
- 35 cyklů – 20 s při 94 °C, 70 s při 57 °C a 345s při 68 °C
- 7 minut při 68 °C
- chlazení při 10 °C

PCR produkt jsem naředila PCR vodou v poměru 1:4 a použila jej jako templát v následujících reakcích.

Mutace v genu CYP2D6*3 – 2549A>del, jedná se o posun čtecího rámce (frameshift) způsobující snížení aktivity enzymu, byla zjišťována modifikovanou metodou podle práce Sachse *et al.* [3].

Primery použité pro "Nested" PCR:

- P51 : 5' -GCT GGG GCC TGA GAC TT- 3'
- D2 : 5' -GGC TGG GTC CCA GGT CAT AC- 3'

Složení reakční směsi pro PCR (vztaženo na jeden vzorek):

- 2,00 µl 10x pufru pro DNA Taq polymerasu
- 2,00 µl dNTP
- 0,4 µl primeru P51
- 0,4 µl primeru D2
- 0,96 µl MgCl₂ (25mM)
- 0,15 µl polymerasy Taq DNA pol
- 14,09 µl sterilní PCR vody
- 1 µl naředěného DNA produktu "Nested" PCR reakce

Podmínky PCR reakce:

- 2 minuty při 94 °C
- 25 cyklů – 30 s při 94 °C, 40 s při 60 °C a 60 s při 72 °C
- 7 minut při 72 °C
- chlazení při 10 °C

Produkt PCR reakce měl velikost 201bp. Následná restrikce probíhala enzymem BsaAI 18 hodin při 37 °C. Velikost restrikčních fragmentů byla

- 201bp pro homozygota (wt/wt; *1/*1)
- 201bp, 180bp a 20bp pro heterozygota (v/wt; *1/*3)

- 180bp a 20bp pro variantního homozygota (v/v; *3/*3)

Složení restrikční směsi (pro jeden vzorek):

- 0,3 µl enzymu BsaAI
- 2,3 µl pufru 10x Buffer NEB
- 7,4 µl sterilní PCR vody

Enzym BsaAI štěpí vzniklý produkt v místech, kde se vyskytuje tato sekvence [29]. Jednopísmený kód Y značí bazi C nebo T, kód R značí bazi G nebo A.

5'...Y A C ↓ G T R...3'

3'... R T G ↑ C A Y ...5'

Velikost restrikčních fragmentů jsem ověřovala elektroforézou na 3% agarosovém gelu. Elektroforéza probíhala při 100 V po dobu 65 minut. V 15 cm dlouhém gelu bylo 52 jamek.

Mutace v genu CYP2D6*4 – 1846G>A, jedná se o chybu v překlada (defective splicing) způsobující snížení aktivity enzymu, a mutace genu CYP2D6*6 – 1707T>del, jedná se o frameshift snižující aktivitu enzymu, byla zjišťována současně (multiplex) v jedné zkumavce modifikovanou metodou podle práce [3].

Primery použité pro PCR:

- P*3 : 5' -CCT GGG CAA GAA GTC GCT GGA CCA G- 3'
- P2: 5' -GAG ACT CCT CGG TCT CTC G - 3'

Složení reakční směsi pro PCR (vztaženo na jeden vzorek):

- 2,00 µl 10x pufru pro DNA Taq polymerasu
- 2,00 µl dNTP
- 0,4 µl primeru P*3
- 0,4 µl primeru P2
- 0,96 µl MgCl₂ (25mM)

- 0,15 µl polymerasy Taq DNA pol
- 14,09 µl sterilní PCR vody
- 1,00 µl naředěného DNA produktu "Nested" PCR reakce

Podmínky PCR reakce:

- 2 minuty při 94 °C
- 25 cyklů – 30 s při 94 °C, 40 s při 60 °C a 60 s při 72 °C
- 7 minut při 72 °C
- chlazení při 10 °C

Produkt PCR reakce měl velikost 353bp. Restrikce probíhala enzymem Bst NI 18 hodin při 37 °C. Velikost restrikčních fragmentů byla

- 190bp a 163bp pro homozygota (wt/wt; *1/*1)
- 190bp, 163bp, 139bp a 23bp pro heterozygota (v/wt; *1/*6)
- 190bp, 139bp a 23bp pro homozygota (v/v; *6/*6)
- 353bp, 190bp a 163bp pro heterozygota (v/wt; *1/*4)
- 353bp pro variantního homozygota (v/v; *4/*4)
- 353bp, 190bp, 139bp a 23bp pro heterozygota (v/wt; *4/*6)

Složení restrikční směsi (pro jeden vzorek):

- 0,3 µl enzymu Bst NI
- 2,3 µl pufru 10x Buffer NEB
- 7,4 µl sterilní PCR vody

Enzym Bst NI štěpí vzniklý produkt v místech, kde se vyskytuje tato sekvence [29].

Jednopísmený kód W značí bazi A nebo T.

5'... C C ↓ W G G... 3'

3'... G G W ↑ C C... 5'

Velikost restrikčních fragmentů jsem ověřovala elektroforézou na 3% agarosovém gelu. Elektroforéza probíhala při 100 V po dobu 60 minut. V 10 cm dlouhém gelu bylo 52 jamek.

4.4.3 *Genová delece; CYP2D6*5*

Delece v genu CYP2D6*5 byla zjišťována modifikovanou metodou podle práce [3].

Primery použité pro PCR:

- P13 : 5' -ACC GGG CAC CTG TAC TCC TCA- 3'
- P24: 5' -GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C- 3'
- P81: 5' -CGT CTA GTG GGG AGA CAA AC- 3'

Složení reakční směsi pro PCR (vztaženo na jeden vzorek):

- 1,50 µl 10x *LA pufru pro DNA Taq poly mix
- 3,75 µl dNTP
- 0,45 µl primeru P13
- 0,45 µl primeru P24
- 0,45 µl primeru P81
- 0,60 µl DMSO
- 1,38 µl MgCl₂ (25mM)
- 0,30 µl polymerasy Taq DNA poly MIX
- 6,12 µl sterilní PCR vody
- 1,50 µl DNA

Podmínky PCR reakce:

- 2 minuty při 94 °C
- 35 cyklů – 20 s při 94 °C, 70 s při 57 °C a 345s při 68 °C
- 7 minut při 72 °C
- chlazení při 10 °C

Velikost fragmentů jsem ověřovala elektroforézou na 1% agarosovém gelu. Elektroforéza probíhala při 100 V po dobu 90 minut. V 10 cm dlouhém gelu bylo 24 jamek.

4.4.4 Duplikace genu; *CYP2D6***MxN*

Duplikace genu, která zvyšuje množství syntetizovaného aktivního enzymu, byla zjišťována allele-specific/long range PCR modifikovanou metodou podle práce [3].

Primery použité pro PCR:

- *cyp17*: 5' -TCC CCC ACT GAC CCA ACT CT- 3'
- *cyp32*: 5' -CAG GTG CAG GGC ACC TAG AT- 3'

Složení reakční směsi pro PCR (vztaženo na jeden vzorek):

- 1,50 μ l 10x pufru pro DNA Taq poly mix
- 3,75 μ l dNTP
- 0,45 μ l primeru *cyp17*
- 0,45 μ l primeru *cyp32*
- 1,38 μ l $MgCl_2$ (25mM)
- 0,45 μ l DMSO
- 0,30 μ l polymerasy Taq DNA pol
- 6,70 μ l sterilní PCR vody
- 1,50 μ l DNA

Podmínky PCR reakce:

- 2 minuty při 94 °C
- 35 cyklů – 20 s při 94 °C, 70 s při 57 °C a 345s při 68 °C
- 7 minut při 68 °C
- chlazení při 10 °C

Velikost PCR produktů jsem ověřovala elektroforézou na 1% agarosovém gelu. Elektroforéza probíhala při 100 V po dobu 90 minut. V 10 cm dlouhém gelu byl pouze jeden hřeben (24 jamek).

4.5 Zpracování výsledků

Předpokládané genotypové frekvence byly vypočítány podle Hardy-Weinbergova vztahu:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 \quad \text{kde platí } p + q = 1$$

p = frekvence výskytu wild-type alely vypočítaná z pozorovaných genotypových frekvencí
– počet homozygotů pro wild-type alelu + polovina počtu heterozygotů

q = frekvence výskytu variantní alely vypočítaná z pozorovaných genotypových frekvencí
– počet homozygotů pro variantní alelu + polovina počtu heterozygotů

p² = frekvence výskytu homozygotů pro wild-type alely (bez výskytu SNP)

q² = frekvence výskytu homozygotů pro variantní alely (výskyt SNP v obou alelách)

2pq = frekvence výskytu heterozygotů (výskyt SNP pouze v jedné alele)

Konfidenční interval byl vypočítán ze vztahu :

$$CI = p \pm 1,96 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

kde *p* značí pozorovanou genotypovou frekvenci a *n* je počet všech alel (tedy dvojnásobný počet jedinců).

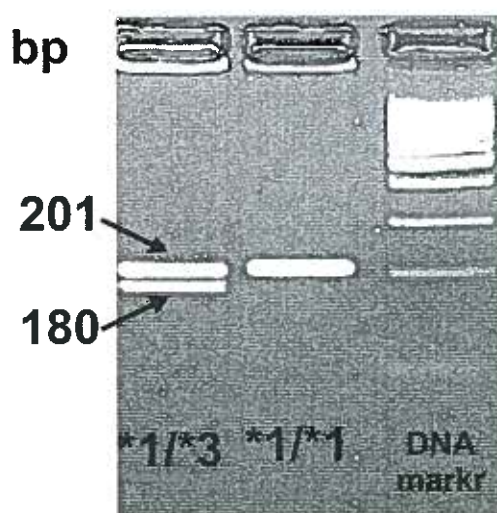
V programu STATGRAPHICS Plus byl proveden χ^2 test a byla jím určena hladina spolehlivosti, na které platí nulová hypotéza, že mezi pozorovanými genotypovými frekvencemi u jednotlivých sledovaných souborů neexistuje rozdíl.

VÝSLEDKY

5 VÝSLEDKY

U všech 223 zdravých dobrovolníků z řad studentů české národnosti (89 žen a 134 mužů ve věkovém rozmezí 20–29 let) byl stanoven genotyp pro tyto variantní alely genu CYP2D6: CYP2D6*MxN, CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5 a CYP2D6*6. Pro stanovení těchto variantních alel jsem se rozhodla podle doporučení Gaedigk *et al.*, jehož výzkumná skupina opakovaně potvrdila, že genotypizací CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5 a CYP2D6*6 je možno identifikovat 98,7 % pomalých metabolizátorů v populaci [4].

5.1 Polymorfismus CYP2D6*3 – 2549A>del



Obr. 2: Velikost restrikčních fragmentů u polymorfismu genu CYP2D6*3 (2549A>del), po Bsa AI restrikci (3% agarosový gel)

- 201bp pro homozygota (wt/wt; *1/*1)
- 201bp, 180bp a 20bp pro heterozygota (v/wt; *1/*3)
- 180bp a 20bp pro variantního homozygota (v/v; *3/*3)

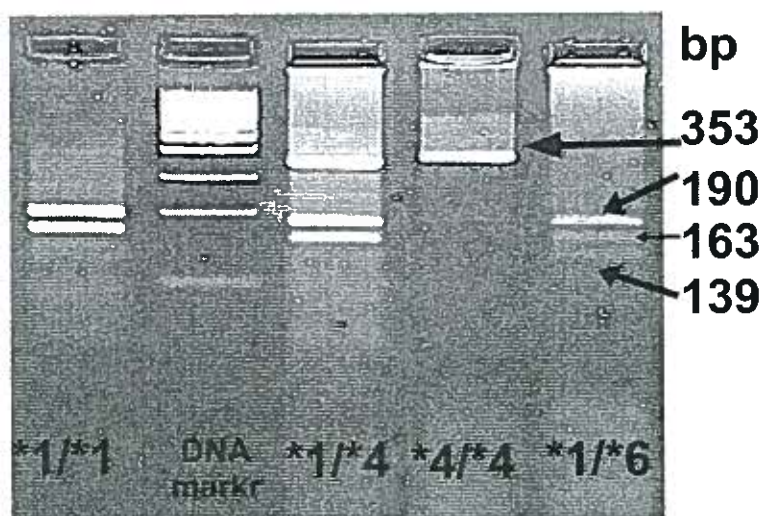
Tab. 3: Srovnání pozorovaných genotypových frekvencí s předpokládanými genotypovými frekvencemi u isoenzymu CYP2D6*3

Sledovaná alela	Genotyp. skupina	Počet jedinců	Pozorovaná genotyp. frekvence	Alelická frekvence	Předpokl. genotyp. frekvence	% (95%CI)
	wt	218	0,9775	0,9887	0,9777	96,3848 - 99,1318
CYP2D6*3	ht	5	0,0224		0,0221	0,8681 - 3,6161
	v	0	0	0,0112	0,0001	0,0000 - 0,0000

Výsledky χ^2 testu dobré shody pozorované a předpokládané genotypové frekvence:

CYP2D6*3 $\chi^2 = 0,013$ P = 0,9934

5.2 Polymorfismus CYP2D6*4 – 1846G>A a CYP2D6*6 – 1707T>del



Obr. 3: Velikost restrikčních fragmentů u polymorfismu genu CYP2D6*4 (1846G>A) a CYP2D6*6 (1707T>del) v 3% agarosovém gelu

Tab. 4: Velikost restrikčních fragmentů u polymorfismu genu CYP2D6*4 (1846G>A) a CYP2D6*6 (1707T>del)

Genotyp	*1/*1	*1/*6	*6/*6	*1/*4	*4/*4	*4/*6
Velikost restrikčních fragmentů (bp)				353	353	353
	190	190	190	190		190
	163	163		163		
		139	139			139
		23	23			23

Tab. 5: Srovnání pozorovaných genotypových frekvencí s předpokládanými genotypovými frekvencemi CYP2D6*4 a CYP2D6*6 provedené v jedné- multiplex reakci

Sledovaná alela	Genotyp. skupina	Počet jedinců	Pozorovaná genotyp. frekvence	Alelická frekvence	Předpokl. genotyp. frekvence	% (95%CI)
CYP2D6*4	wt	133	0,5964	0,7713	0,5949	55,0879 - 64,1946
	ht	78	0,3497		0,3527	30,5515 - 39,4036
	v	12	0,0538	0,2287	0,0523	3,2869 - 7,4753
CYP2D6*6	wt	222	0,9955	0,9977	0,9955	98,9314 - 100,1716
	ht	1	0,0044		0,0044	0,0000 - 1,0685
	v	0	0,0000	0,0022	0,0000	0,0000 - 0,0000

Výsledky χ^2 testu dobré shody pozorované a předpokládané genotypové frekvence:

CYP2D6*4 $\chi^2 = 0,004$ P = 0,9982

CYP2D6*6 $\chi^2 = 0,001$ P = 0,9995

5.3 Genová delece; CYP2D6*5

Tab. 6: Srovnání pozorovaných genotypových frekvencí s předpokládanými genotypovými frekvencemi CYP2D6*5

Sledovaná alela	Genotyp. skupina	Počet jedinců	Pozorovaná genotyp. frekvence	Alelická frekvence	Předpokl. genotyp. frekvence	% (95%CI)
	wt	209	0,9372	0,9686	0,9382	91,4707 - 95,9732
CYP2D6*5	ht	14	0,0627		0,0608	4,0267 - 8,5292
	v	0	0	0,0313	0,0009	0,0000 - 0,0000

Výsledky χ^2 testu dobré shody pozorované a předpokládané genotypové frekvence:

CYP2D6*5 $\chi^2 = 0,013$ P = 0,9934

5.4 Duplikace genu; CYP2D6*MxN

Tab. 7: Srovnání pozorovaných genotypových frekvencí s předpokládanými genotypovými frekvencemi u multiplikovaných alel

Sledovaná alela	Genotyp. skupina	Počet jedinců	Pozorovaná genotyp. frekvence	Alelická frekvence	Předpokl. genotyp. frekvence	% (95%CI)
	wt	209	0,9372	0,9686	0,9382	91,4707 -
						95,9732 4,0267
CYP2D6*MxN	ht	14	0,0627		0,0608	- 8,5292
	v	0	0	0,0313	0,0009	0,0000 -
						0,0000

Výsledky χ^2 testu dobré shody pozorované a předpokládané genotypové frekvence:

CYP2D6*5 $\chi^2 = 0,013$ P = 0,9934

Tab. 8: Alelické frekvence CYP2D6*1, CYP2D6*3, CYP2D6 *4, CYP2D6 *5, CYP2D6*6 a CYP2D6*MxN

CYP2D6 alely	Počet alel	Alelická frekvence (%)	95%CI
*MxN	14	3,1	1,5-4,75
*3	5	1,1	0,1-2,1
*4	102	22,9	19,0-26,8
*5	14	3,1	1,5-4,75
*6	1	0,2	0,1-0,66
Celkem variantních alel	136	30,5	26,2-34,8
*1 -wt	310	69,5	65,2-73,7
Celkem	446	100,0	

5.5 Frekvence výskytu jednotlivých fenotypů

Frekvence výskytu alelové duplikace (CYP2D6*MxN) nesoucí fenotyp ultrarychlého metabolizátora byla 3,1 %. Výskyt alel CYP2D6 predisponující jedince k snížené enzymové aktivitě : CYP2D6*3, CYP2D6 *4, CYP2D6 *5 a CYP2D6*6 byla 1,1 %, 22,9 %, 3,1 % a 0,2 %. V souvislosti s výskytem jednotlivých alel byl fenotyp PM přiřazen 15 subjektům (6.7 %) (95% CI: 3,4-10,0 %), všichni z nich měli dvě defektní alely. Dvanáct z nich byli homozygoté pro CYP2D6*4, jeden byl heterozygot v kombinaci CYP2D6*4/CYP2D6*3 variantních alel, další v kombinaci CYP2D6*4/CYP2D6*6, a poslední z patnácti pomalých metabolizátorů měl delecí genu současně s CYP2D6*4 variantní alelou.

84 subjektů (37,6 %) byli heterozygoti, intermediální metabolizátoři s jednou variantní alelou CYP2D6*3, CYP2D6 *4, CYP2D6 *5.

111 (49,5 %) subjektů jsem klasifikovala jako homozygotní extensivní metabolizátory bez variantních alel, jednalo se o wild-typy-přirozené typy.

Genovou duplikaci jsem stanovila u 14 dobrovolníků, pět z nich neslo také CYP2D6*4, jeden byl dokonce současně homozygotem pro CYP2D6*4 alely. Proto jsem ze všech subjektů označila 8 (3,6 %) jako CYP2D6 ultrarychlé metabolizátory. (tab. 9) U zbývajících pěti jedinců nesoucích současně multiplikaci alely CYP2D6*MxN a CYP2D6*4 alelu není možná na základě mnou určených variantních alel přiřadit odpovídající fenotyp, protože nejsem schopna odlišit, zda je multiplikována alela CYP2D6*4, snižující aktivitu enzymu, nebo zda je multiplikována jiná část. Tato neurčená část odpovídá 2,2 %, což je ve shodě i s poznáním Gaedigk *et al*, jehož výzkumná skupina na základě těchto stanovení určuje 98,7 % fenotypů v populaci všeobecně [4]. Nejčastější variantní alelou byla CYP2D6*4, která tvořila 75 % ze všech stanovených variantních alel.

Tab. 9: Prevalence CYP2D6 genotypů

Fenotyp		CYP2D6 alely		Počet dobrovolníků	%	95%CI
bez aktivní alely	PM	*4*4		8	3,6	1,9-5,3
		MxN		1	0,4	0-1,0
		*5		3	1,3	0,3-2,4
	*4*3		1	0,4	0,2-1,1	
	*4*6		1	0,4	0,2-1,1	
	*4*5		1	0,4	0,2-1,1	
1 aktivní alela	IM	*1*3		4	1,8	0,6-3,0
		*1*4		70	31,4	27,1-35,7
		*1*5		10	4,5	2,6-6,4
přirozený typ -wild type	EM	*1*1		111	49,8	45,1-54,4
2 a více aktivních alel	UM	MxN		8	3,6	1,9-5,3
	-	MxN *4		5	2,2	0,9-3,6
celkem				223	100	

DISKUSE

6 DISKUSE

Cílem této studie bylo popsat frekvenci výskytu vybraných variantních alel CYP2D6 u zdravé české populace. Sledovala jsem jednonukleotidové polymorfismy (SNP) genu CYP2D6 v pěti pozicích označených jako - CYP2D6*1, CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5, CYP2D6*6 a CYP2D6*MxN u 223 zdravých dobrovolníků.

Jednotlivé naměřené genotypové frekvence ve všech pozicích jsem porovnávala s genotypovými frekvencemi vypočítanými podle rovnice Hardy-Weinbergovy rovnováhy. χ^2 testem bylo prokázáno, že mezi předpokládanými a experimentem určenými frekvencemi není statisticky významný rozdíl.

Prevalence všech variantních alel CYP2D6 je v české populaci 30,4 %. Ve své práci jsem sledovala výskyt jen nejběžnějších variantních alel v kavkazské populaci. Nesledovala jsem např. výskyt alely CYP2D6*2, protože má jen velmi nepatrně vyjádřený fenotyp zpomaleného metabolismu oproti přirozené alele CYP2D6*1 [30]. Dále jsem nesledovala alely s nízkou frekvencí výskytu jako např. CYP2D6*8 (frekvence výskytu 0,1 % [24], CYP2D6*9 (2 % [27]), CYP2D6*10 (1,5 % v kavkazské populaci [27] tato variantní alela je významná pro mongoloidní populaci 40,8 % [31]), CYP2D6*11 (0,1 %), CYP2D6*12 (0,1 %), CYP2D6*14 (0,1 %), CYP2D6*15 (0,1 %) nebo CYP2D6*17 (0,1 %) a další [24] [3]

Mnou stanovenou frekvenci pomalých metabolizátorů metodou genotypování u 223 zdravých dobrovolníků (6,7 % PM) jsem porovnávala s analýzou fenotypu u 126 zdravých českých dobrovolníků v dříve provedené studii [32]. Prevalence pomalých metabolizátorů stanovených fenotypováním byla 3,97 %. Metabolický status byl stanoven z metabolického poměru mateřské látky - sparteinu a jeho metabolitu dehydrosparteinu v moči. Jedinci s metabolickým poměrem větším než 20 byli v této studii označeni za pomalé metabolizátory pro CYP2D6. Porovnáním obou frekvencí statistickým testem (χ^2 test) jsem prokázala rozdíl na hranici statistické významnosti. Tato neúplná shoda může být způsobena variabilitou v citlivosti analytické metody použité pro stanovení hladin dehydrosparteinu v moči, případně sběrem a vytvářením aliqotů vzorků moči, jejich skladováním, stabilitou sparteinu i dehydrosparteinu, celkově tedy komplikovanějším protokolem fenotypizační studie přímo závislým na spolupráci s dobrovolníkem. Interindividuální rozdíly stejně jako vliv prostředí (indukce, inhibice

enzymů, životní styl, celkový zdravotní stav atd.) mohou také ovlivnit výsledné hodnoty. Navzdory všem těmto komplikacím je fenotypování považováno za metodu vhodnější k určení aktuální metabolické aktivity jednotlivých pacientů než genotypování.

Bylo opakovaně ověřeno, že genotypizací CYP2D6*3, 2D6*4, 2D6*5, a*6 je možno s dostatečnou citlivostí testu identifikovat pomalé metabolizátory v populaci. Rozhodla jsem se tedy získané výsledky alelických frekvencí isoenzymu CYP2D6 (tab. 10) a frekvencí výskytu PM (tab. 11) porovnat s obdobnými genotypizačními studiemi provedenými u evropských populací. (obr. 4)

Tab. 10: Rozložení CYP2D6 alelických variant napříč evropskými populacemi

CYP2D6 variantní alely		*MxN	*3	*4	*5	*6	Ref
Molekulární důsledek		Duplikace genu	Posun čtecího rámce 2549A>del	Chybný překlad 1846G>A	Genová delece	Posun čtecího rámce 1707T>del	
Funkční následek		Zvýšení enzymové aktivity	Snížení enzymové aktivity	Snížení enzymové aktivity	Snížení enzymové aktivity	Snížení enzymové aktivity	
Alelická frekvence (%)	Kavkazané	1-5	2-3	12-21	2-7	1	[33]
	Evropané	-	3,4	19,4	2,6	1,3	[24]
	Chorvaté (200)	-	2,7	14,0	1,0	1,5	[34]
	Finové (122)	-	5,7	11,1	3,3	-	[35]
	Francouzi (171)	2,9	2,0	14,9	2,3	-	[36]
	Holandřané (765)	-	1,8	18,4	-	0,4	[37]
	Němci (589)	1,9	2,0	20,7	2,0	0,9	[3]
	Norové (118)	-	1,3	20,0	1,2	-	[38]
	Poláci (300)	-	1,3	23,0	-	-	[39]
	Španělé (105)	4,3	0,9	13,8	3,3	0,9	[40]
	Švédové (128)	-	1,4	24,4	4,3	0,9	[41]
	Rusové (290)	1,7	1,0	18,2	2,4	1,2	[30]
	Češi (223)	3,1	1,1	22,9	3,1	0,2	-

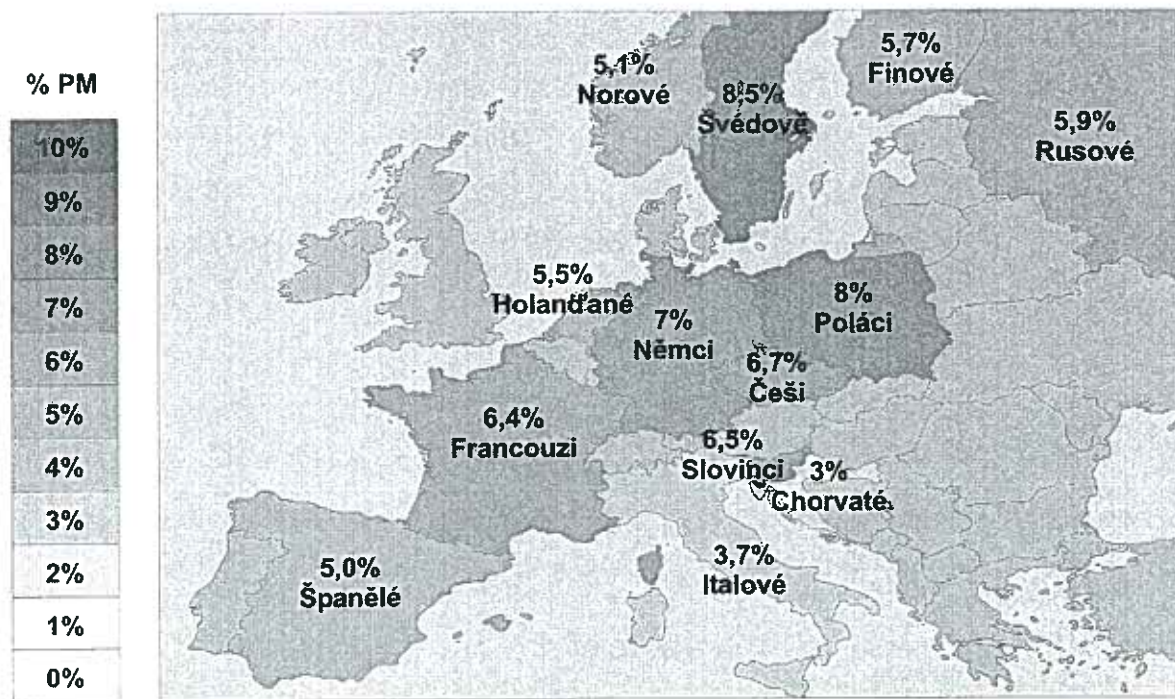
Porovnání výskytu pomalých metabolizátorů, jejichž status je předpovězen podle genotypovacích analýz, jsem provedla na základě údajů z následujících studií [34] [3, 41] [37, 42] [38] [35] [30] [39] [40] [36] [43].

Tab. 11: Frekvence CYP2D6 pomalých metabolizátorů u eurokavkazanů, stanoveno genotypizací

Fenotyp	Kavkazané (n)	Chorvaté (200)	Němci (589)	Švédové (281)	Italové (360)	Holandřané (765)	Norové (289)	Finové (122)	Rusové (290)	Poláci (300)	Španělé (105)	Francouzi (171)	Slovinci (107)	Češi (223)
PM (%)	7,0	3,0	7,0	8,5	3,7	5,5	5,1	5,7	5,9	8,0	5,0	6,4	6,5	6,7
Reference		[34]	[3]	[41]	[42]	[37]	[38]	[35]	[30]	[39]	[40]	[36]	[43]	

V rozložení CYP2D6 alel stejně jako v prevalenci PM se česká populace statisticky neodlišuje od ostatních evropských populací (stanoveno χ^2 testem). Drobné odchylky od průměru, ale bez statistické významnosti, vykazují Finové a Chorvaté. Odlišnost výskytu PM u Finů může být zapříčiněna analýzou na počátku osmdesátých let, kdy se metodiky genotypování teprve rozvíjely. Nižší výskyt PM u Chorvatů zase dobře koresponduje s hypotézou „severo-jížního gradientu“ [44]. Podle této hypotézy frekvence výskytu pomalých metabolizátorů klesá zeměpisně od severu k jihu. Pro analýzu národnostně závislých odlišností ve výskytu PM jsem sbírala pouze data stanovená genotypizací (především nejužívanější metodou PCR-RFLP) na zdravých dobrovolnících z etnicky popsanych skupin. Porovnání četnosti frekvence PM mezi evropskými populacemi je znázorněno na obr. 4.

Obr. 4: Frekvence CYP2D6 pomalých metabolizátorů u eurokavkazanů, stanoveno genotypizací



ZÁVĚR

7 ZÁVĚR

Poznatky této rigorózní práce je možné shrnout následovně:

- 1) Pozorované genotypové frekvence se shodují s předpokládanými genotypovými frekvencemi podle rovnice Hardy-Weinbergovy rovnováhy, což ilustruje jejich normální distribuci v české populaci.
- 2) Frekvence výskytu CYP2D6*1, CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5, CYP2D6*6 a CYP2D6*MxN alel je ve shodě s literárními údaji o výskytu variantních alel v ostatních evropských populacích.
- 3) Frekvence výskytu pomalých metabolizátorů se také statisticky neodlišuje od ostatních kavkazských populací.
- 4) V české populaci je možno očekávat 6,7% prevalenci pomalých metabolizátorů substrátů CYP2D6.
- 5) V české populaci se vyskytuje 3,6 % ultrarychlých metabolizátorů substrátů CYP2D6.

POUŽITÁ LITERATURA

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. Ingelman-Sundberg, M.: Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci.* 25(4):193-200, 2004.
2. Mizutani, T.: PM frequencies of major CYPs in Asians and Caucasians. *Drug Metab Rev.* 35(2-3):99-106, 2003.
3. Sachse, C., J. Brockmoller, S. Bauer, and I. Roots. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet.* 60(2):284-95, 1997.
4. Gaedigk, A., R.R. Gotschall, N.S. Forbes, and S.D. Simon. Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics.* 9(6):669-82, 1999.
5. <http://drnelson.utmen.edu/CytochromeP450>.
6. Anzenbacher, P. and E. Anzenbacherova. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci.* 58(5-6):737-47, 2001.
7. Dostálek, M.: Enzymatický systém cytochromu P450. *Postgraduální medicína.* 8(1):46-54, 2006.
8. <http://home.uchicago.edu>.
9. Zuber, R., E. Anzenbacherova, and P. Anzenbacher. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med.* 6(2):189-98, 2002.
10. Passarge, E., *Color atlas of genetics.* 2001: Thieme.

11. Bultas, J.: Farmakogenetika, účinek léku a lékové interakce. *Remedia*. 15(2):115-119, 2005.
12. Anzerbacher, P.: Úvod do farmakogenetiky. *Klin. farmakol. farmac.* 16(1-2):3-7, 2002.
13. Slanař, O.: Farmakogenetika v klinické praxi. *Farmakoterapie*. 5:296-298, 2005.
14. Daly, A.K.: Development of analytical technology in pharmacogenetic research. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 369(1):133-40, 2004.
15. Hayashi, K.: PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl*. 1(1):34-8, 1991.
16. <https://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-DNA/html/kap6.htm>.
17. Bustin, S.A.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 25(2):169-93, 2000.
18. Šmarda, J.D., J;Pantůček, R;Růžičková, V;Koptíková, J, *Metody molekulární biologie*, ed. 1. 2005, Brno.
19. Zackrisson, A.L. and B. Lindblom. Identification of CYP2D6 alleles by single nucleotide polymorphism analysis using pyrosequencing. *Eur J Clin Pharmacol*. 59(7):521-6, 2003.
20. Brdička, R., *Lidský genom na rozhraní tisíciletí*. 2001, Praha: Grada.

21. Ingelman-Sundberg, M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* 5(1):6-13, 2005.
22. <http://www.imm.ki.se/cypalleles/cyp2d6.htm>.
23. Idle, J.R. and R.L. Smith. Polymorphisms of oxidation at carbon centers of drugs and their clinical significance. *Drug Metab Rev.* 9(2):301-17, 1979.
24. Shimizu, T., H. Ochiai, F. Asell, H. Shimizu, R. Saitoh, Y. Hama, J. Katada, M. Hashimoto, H. Matsui, K. Taki, T. Kaminuma, M. Yamamoto, Y. Aida, A. Ohashi, and N. Ozawa. Bioinformatics Research on Inter-racial Difference in Drug Metabolism I. Analysis on Frequencies of Mutant Alleles and Poor Metabolizers on CYP2D6 and CYP2C19. *Drug Metab Pharmacokinet.* 18(1):48-70, 2003.
25. Eichelbaum, M., H.K. Kroemer, and M.F. Fromm. Impact of P450 genetic polymorphism on the first-pass extraction of cardiovascular and neuroactive drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* 27(2-3):171-199, 1997.
26. Kirchheiner, J. and J. Brockmoller. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* 77(1):1-16, 2005.
27. Meisel, C., T. Gerloff, J. Kirchheiner, P.M. Mrozikiewicz, P. Niewinski, J. Brockmoller, and I. Roots. Implications of pharmacogenetics for individualizing drug treatment and for study design. *J Mol Med.* 81(3):154-67, 2003.
28. www.ncbi.nlm.nih.gov.
29. <http://www.rebase.neb.com>.

30. Gaikovitch, E.A., I. Cascorbi, P.M. Mrozikiewicz, J. Brockmoller, R. Frotschl, K. Kopke, T. Gerloff, J.N. Chernov, and I. Roots. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 59(4):303-12, 2003.
31. Tateishi, T., M. Chida, N. Ariyoshi, Y. Mizorogi, T. Kamataki, and S. Kobayashi. Analysis of the CYP2D6 gene in relation to dextromethorphan O-demethylation capacity in a Japanese population. *Clin Pharmacol Ther.* 65(5):570-5, 1999.
32. Slanar, O., F. Perlik, and V. Jirasek. Phenotype of cytochrome P450 CYP2D6 in patients with familial adenomatous polyposis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 23(3):145-7, 2001.
33. Ingelman-Sundberg, M.: Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 369(1):89-104, 2004.
34. Bozina, N., P. Granic, Z. Lalic, I. Tramisak, M. Lovric, and A. Stavljenic-Rukavina. Genetic polymorphisms of cytochromes P450: CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian population. *Croat Med J.* 44(4):425-8, 2003.
35. Hirvonen, A., K. Husgafvel-Pursiainen, S. Anttila, A. Karjalainen, O. Pelkonen, and H. Vainio. PCR-based CYP2D6 genotyping for Finnish lung cancer patients. *Pharmacogenetics.* 3(1):19-27, 1993.
36. Laforest, L., H. Wikman, S. Benhamou, S.T. Saarikoski, C. Bouchardy, A. Hirvonen, P. Dayer, and K. Husgafvel-Pursiainen. CYP2D6 gene polymorphism in caucasian smokers: lung cancer

- susceptibility and phenotype-genotype relationships. *Eur J Cancer*. 36(14):1825-32, 2000.
37. Tamminga, W.J., J. Wemer, B. Oosterhuis, R.A. de Zeeuw, L.F. de Leij, and J.H. Jonkman. The prevalence of CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in a population of healthy Dutch volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 57(10):717-22, 2001.
 38. Tefre, T., A.K. Daly, M. Armstrong, J.B. Leathart, J.R. Idle, A. Brogger, and A.L. Borresen. Genotyping of the CYP2D6 gene in Norwegian lung cancer patients and controls. *Pharmacogenetics*. 4(2):47-57, 1994.
 39. Niewinski, P., K. Orzechowska-Juzwenko, M. Hurkacz, Z. Rzemislawska, E. Jazwinska-Tarnawska, P. Milejski, and Z. Forkasiewicz. CYP2D6 extensive, intermediate, and poor phenotypes and genotypes in a Polish population. *Eur J Clin Pharmacol*. 58(8):533-5, 2002.
 40. Menoyo, A., E. Del Rio, and M. Baiget. Characterization of variant alleles of cytochrome CYP2D6 in a Spanish population. *Cell Biochem Funct*. 2005.
 41. Yamada, H., M.L. Dahl, L. Lannfelt, M. Viitanen, B. Winblad, and F. Sjoqvist. CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in an elderly Swedish population. *Eur J Clin Pharmacol*. 54(6):479-81, 1998.
 42. Scordo, M.G., A.P. Caputi, C. D'Arrigo, G. Fava, and E. Spina. Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population. *Pharmacol Res*. 50(2):195-200, 2004.

43. Dolzan, V., Z. Rudolf, and K. Breskvar. Human CYP2D6 gene polymorphism in Slovene cancer patients and healthy controls. *Carcinogenesis*. 16(11):2675-8, 1995.
44. Aynacioglu, A.S., C. Sachse, A. Bozkurt, S. Kortunay, M. Nacak, T. Schroder, S.O. Kayaalp, I. Roots, and J. Brockmoller. Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population. *Clin Pharmacol Ther*. 66(2):185-92, 1999.