

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

**POLYMORFISMUS U VYBRANÝCH  
BIOTRANSFORMAČNÍCH  
ENZYMŮ**

Bakalářská práce

**Vedoucí bakalářské práce:** Mgr. Eva Novotná, Ph.D.

**Hradec Králové, 2015**

**Martina Červená**

**„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“**

**Dne**

**Podpis**

**Ráda bych chtěla touto cestou poděkovat Mgr. Evě Novotné, Ph.D. za její cenné rady a připomínky a zároveň za její velkou ochotu a pomoc při zpracování této práce.**

# Abstrakt

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biochemických věd**

**Kandidát:** Martina Červená

**Vedoucí práce:** Mgr. Eva Novotná, Ph.D.

**Název bakalářské práce:** Polymorfismus u vybraných biotransformačních enzymů

Polymorfismus biotransformačních enzymů je jeden z faktorů interindividuální variability, který významně ovlivňuje metabolismus eobiotik i xenobiotik. Tyto geneticky podmíněné změny metabolismu často korelují s riziky vzniku některých významných onemocnění, anebo v případě změn lékového metabolismu korelují s účinností léčby či s rizikem vzniku vedlejších nežádoucích účinků. Nestandardní metabolismus však sehrává v některých případech i ochrannou roli. Tato bakalářská práce se zabývá polymorfismem u vybraných biotransformačních enzymů. Je popsán také obecný význam a charakter biotransformačních enzymů a vysvětlen genetický polymorfismus jako základ polymorfismu enzymů. V rámci bakalářské práce jsou vybrány některé významné enzymy, které metabolizují xenobiotika, u nichž je následně popsán polymorfismus společně s jeho klinickými důsledky.

**Klíčová slova:** genetický polymorfismus, biotransformace, enzym, xenobiotikum

# Abstract

**Charles University in Prague**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biochemical Sciences**

**Candidate:** Martina Červená

**Supervisor:** Mgr. Eva Novotná, Ph.D.

**Title of bachelor thesis:** Polymorphism of selected biotransformation enzymes

Polymorphism of biotransformation enzymes is one of the factors of inter-individual variability, which significantly affects the metabolism of xenobiotics and eobiotics. These genetically determined metabolic changes often correlate with the risk development of some significant diseases, or in the case of changes in drug metabolism they correlate with treatment efficacy or with the risk of developing unwanted side-effects. Abnormal metabolism plays however in some cases the protective role. This thesis deals with polymorphism of selected biotransformation enzymes. The general scope and nature of biotransformation enzymes is also described and the genetic polymorphism as the basis of polymorphism of enzymes is then explained. In the framework of this thesis are selected some important xenobiotic metabolising enzymes and their polymorphism with its clinical implications in subsequently described.

**Keywords:** genetic polymorphism, biotransformation, enzyme, xenobioti

# Obsah

<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>1. VÝZNAM BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ .....</b>	<b>10</b>
1.1. PRVNÍ FÁZE BIOTRANSFORMACE .....	12
1.2. DRUHÁ FÁZE BIOTRANSFORMACE .....	12
<b>2. POLYMORFISMUS .....</b>	<b>14</b>
2.1. GENETICKÝ POLYMORFISMUS .....	14
2.1.1. <i>Druhy genetického polymorfismu</i> .....	14
2.2. POLYMORFISMUS ENZYMŮ OBECNĚ.....	17
2.2.1. <i>Nomenklatura polymorfních forem enzymů</i> .....	18
<b>3. POLYMORFISMUS ENZYMŮ PRVNÍ FÁZE .....</b>	<b>19</b>
3.1. CYTOCHROMY P450.....	19
3.1.1. <i>CYP1A1</i> .....	22
3.1.2. <i>CYP1A2</i> .....	23
3.1.3. <i>CYP1B1</i> .....	25
3.1.4. <i>CYP 2A6</i> .....	25
3.1.5. <i>CYP2B6</i> .....	27
3.1.6. <i>CYP2C8</i> .....	29
3.1.7. <i>CYP2C9</i> .....	30
3.1.8. <i>CYP2C19</i> .....	31
3.1.9. <i>CYP2D6</i> .....	33
3.1.10. <i>CYP2E1</i> .....	34
3.1.11. <i>CYP3A4</i> .....	36
3.2. FLAVINOVÉ MONOOXYGENASY .....	37
3.3. ALKOHOLDEHYDROGENASA.....	40
3.4. ALDEHYDDEHYDROGENASA.....	40
3.5. EPOXIDHYDROLASA .....	41

3.6. BUTYRYLCHOLINESTERASA .....	42
<b>4. POLYMORFISMUS ENZYMŮ DRUHÉ FÁZE .....</b>	<b>43</b>
4.1. GLUTATHION- <i>S</i> -TRANSFERASA .....	43
4.2. <i>N</i> -ACETYLTRANSFERASA 2 .....	45
4.3. THIOPURIN- <i>S</i> -METHYLTRANSFERASA .....	46
4.4. KATECHOL- <i>O</i> -METHYLTRANSFERASA .....	47
4.5. UDP-GLUKURONOSYLTRANSFERASA .....	48
4.6. SULFOTRANSFERASA .....	49
4.7. TRANSPORTÉRY .....	50
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>52</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>54</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>57</b>

# Úvod

Už odpradávná lidstvo pozorovalo rozdílné účinky látek na různé jedince. Za tuto různorodou vnímavost k určitým látkám mezi jedinci i mezi jednotlivými etnickými skupinami zodpovídá několik faktorů, které ovlivňují aktivitu biotransformačních enzymů. Jedním z těchto faktorů je genetický polymorfismus, jehož výsledkem je vznik vícero variant jednoho genu nacházející se u 1 % dané populace (Mladosičová a kol. 2014). Geneticky podmíněné změny v celkové katalytické aktivitě biotransformačních enzymů mohou být kvalitativní (funkční) i kvantitativní (množstevní) a mohou pro organismus znamenat určité výhody i nevýhody (Mráčková 1998).

Tato bakalářská práce se zabývá polymorfismy u vybraných biotransformačních enzymů a jejich klinickými důsledky, mezi něž patří zejména ovlivnění lékového metabolismu (selhání terapie, nedostatečný terapeutický účinek, nežádoucí účinky, vznik lékových interakcí, předávkování) nebo ovlivnění detoxikace organismu od prokarcinogenních i jiných cizorodých látek a z toho plynoucí rozdílná vnímavost jedinců k rozvoji karcinogenního procesu a jiných onemocnění.

Vyšetření genových polymorfismů se provádí buď určením fenotypu (stanovení aktuální katalytické aktivity enzymu v organismu) nebo určením genotypu (stanovení genetické výbavy jedince pro kódovaný enzym). Vyšetření genotypu, které je jednodušší i levnější se provádí nejčastěji tzv. metodou RFLP (stanovení polymorfismu délky restrikčních fragmentů), čemuž většinou předchází zmnožení cílové DNA pomocí polymerasové řetězové reakce (Skálová a kol. 2011). Za normálních okolností se stanovení polymorfismu biotransformačních enzymů běžně neprovádí. Podnětem k vyšetření může být například nestandardní odpověď pacienta na léčbu, nebo různorodé reakce mezi jedinci na stejnou léčbu. Tyto jevy spolu s klinickým využitím genotypizace spadají do oblasti farmakogenetiky, která se zabývá zejména geneticky podmíněnou různorodostí v odpovědi organismu na podání léku (Riedlová a Richterová 2008).

Současná perspektiva farmakogenetického oboru spočívá ve snaze o individualizování terapie a optimalizaci dávkování podle předpokládané odpovědi pacienta na konkrétní léčivo na základě znalosti jeho genetických predispozic. V současnosti se v běžné klinické praxi provádí pouze několik rutinních genotypizací před zahájením, nebo během terapie vybranými léčivy s cílem omezit vznik nežádoucích účinků nebo zvýšit účinnost terapie. Díky malému množství validních



studii zatím nelze zavést další stanovení genotypů do rutinní praxe. Nicméně zájem odborníků o odhalování polymorfismu biotransformačních enzymů za účelem individualizování terapie stále roste (Slanař 2012, Riedlová a Richterová 2008).

Cílem této bakalářské práce je poskytnout stručný přehled o polymorfismu vybraných enzymů člověka, které metabolizují xenobiotika. Charakterizovat široký význam polymorfie enzymů a zdůraznit tak nezanedbatelnou úlohu v ovlivnění biotransformace, a to zejména v ovlivnění metabolických aktivit enzymů, nebo jejich množství. Snahou je co nejaktuálněji zmapovat nejvýznamnější literárně známé možnosti polymorfie vybraných lidských biotransformačních enzymů a uvést je na příkladech, neboť je každým rokem identifikováno mnoho nových polymorfismů. Dílčím cílem je také osvětlit souvislost genetického polymorfismu se zvýšenými riziky vzniku nádorových a jiných onemocnění.

# 1. Význam biotransformačních enzymů

Lidský organismus denně absorbuje ze svého okolí velké množství nejrůznějších látek. Mohou to být látky, které organismus využívá pro svou potřebu například ve formě stavebních kamenů pro výstavbu nových biomolekul, nebo jako zdroj energie. Těmto látkám se říká eobiotika a zastupují většinu všech látek přijatých organismem. Mezi ně řadíme živiny, vodu, vzduch, minerály, vitamíny a všechny látky organismu vlastní. Ostatními látkami, které organismus přijímá z okolí jsou tzv. xenobiotika neboli látky pro organismus cizí. Xenobiotika nemají fyziologické funkce, jako tomu bylo u eobiotik. Jsou to látky cizorodé, pro organismus potencionálně toxické. K nejznámějším patří polychlorované bifenylly (PCB), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) a dioxiny, které jsou v organismu aktivovány na kancerogenní, mutagenní a toxické produkty (Kvasničková 1995). Dále mezi xenobiotika patří ostatní kontaminanty životního prostředí a průmyslové produkty, léčiva, potravinová aditiva, kosmetické produkty, či návykové látky (Kvasničková 1995). Xenobiotika mohou být přírodního i syntetického původu. Jiné rozdělení reprezentuje xenobiotika podle chemického složení na polární a nepolární sloučeniny. Polární (hydrofilní) xenobiotika jsou dobře rozpustná ve vodě, procházejí buněčnými membránami hůře a to aktivním transportem za pomoci přenašečů, transportována krví jsou ve volné formě a jsou rychleji vylučována močí. Nepolární (hydrofobní, lipofilní) xenobiotika jsou nerozpustná či špatně rozpustná ve vodě, v krvi jsou transportována ve vazbě na transportní bílkovinu albumin a proto dochází k jejich pomalejšímu vylučování. Volně difundují přes buněčné membrány a někdy se v nich mohou i vázat (Fontana a kol. 2013). Protože jsou tyto látky pro organismus tzv. rizikové, organismus si proti nim vyvinul obranné mechanismy. Jedná se o omezení vstupu xenobiotik, metabolismus (biotransformaci) xenobiotik prostřednictvím biotransformačních enzymů a o účinnou eliminaci z organismu (Skálová a kol. 2011).

Organismus se chrání před vstupem xenobiotik tzv. fyziologickými bariérami jako je např. kůže, sliznice, hematoencefalická bariéra nebo buněčná membrána. Lipofilní sloučeniny však samovolně difundují přes membrány po koncentračním spádu a tak se do organismu přece jen vstřebávají. Nejčastějším příkladem je vstup cizorodých látek skrze trávicí trakt tedy perorální cestou, dále inhalační cestou skrze respirační systém, transdermální cestou či injekčním podáním. V neposlední řadě mohou xenobiotika pronikat do organismu i skrze vnější poranění. Po absorbování xenobiotika

organismem putuje cizorodá látka tělní cirkulací a je dále distribuována v organismu. Klíčovou úlohu v distribuci xenobiotik hrají především fyzikálně-chemické vlastnosti látek, jako jsou zejména lipofilita a ionizace. Ty zabezpečují např. jejich vazebnost na plazmatické bílkoviny či tkáňové proteiny nebo jejich ukládání v tukové tkáni (Fontana a kol. 2013).

Dalším obraným způsobem organismu vůči xenobiotikům je jeho eliminační schopnost. K vylučování (eliminaci) xenobiotik z organismu dochází nejčastěji močí, stolicí, potem či dechem, ale také mateřským mlékem (Skálová a kol. 2011). Jen velmi malá část látek se může vylučovat z organismu v nezměněné podobě. Většina xenobiotik i xenobiotik absorbovaných organismem musí projít nejprve metabolickými změnami, aby došlo k jejich snadnějšímu vyloučení z organismu. Metabolismus xenobiotik je tedy zásadní obranná funkce organismu proti nim (Fontana a kol. 2013).

Metabolismus xenobiotik zahrnuje transportní procesy a biotransformační reakce (Skálová a kol. 2011). Organismus se při tom obecně snaží změnou chemické struktury o to, aby xenobiotikum, jakožto látku pro něj nepotřebnou, dále nevyužitelnou ba dokonce potencionálně toxickou, co nejefektivněji přeměnil na látku jinou, pro organismus méně toxickou. Aby ji zabránil vstupu do ostatních tkání či orgánů, nebo aby ji snadněji eliminoval (Kvasničková 1995).

Transportní procesy, které jsou zahrnuty do metabolismu xenobiotik, zabezpečují transportní proteiny. Transportní proteiny v plasmatických membránách významně regulují prostup xenobiotik do různých orgánů a tkání (Skálová a kol. 2011).

Samotná biotransformace je výrazem pro chemickou přeměnu látek v organismu. Biotransformační reakce jsou zpravidla enzymaticky katalyzované biochemické reakce, při kterých dochází k více či méně rozsáhlým změnám v chemické struktuře látek. Protože má produkt reakce (tzv. metabolit) jinou chemickou strukturu než výchozí látka, mění se tak např. jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, interakce s biologickým systémem, biologická aktivita, nebo jeho chování v organismu (Kvasničková 1995). Biotransformační enzymy dokážou svoji aktivitou substrát aktivovat z neaktivního nebo jen málo aktivního na aktivnější, nebo již aktivní substrát přeměnit až na toxický. Anebo dokážou naopak aktivní substrát deaktivovat na neaktivní formu (Fontana a kol. 2013, Kvasničková 1995).

Hlavním orgánem biotransformace xenobiotik jsou játra. Biotransformace však může probíhat i v jiných místech organismu a to konkrétně v místech vstupu xenobiotik. Kromě jater tedy k biotransformaci dochází i v plicích, ledvinách, kůži,

gastrointestinálním traktu (GIT), centrálním nervovém systému (CNS), placentě, či krevní plasmě (Fontana a kol. 2013, Stiborová a kol. 1999).

Do procesu biotransformace bývá zařazen i aktivní transport xenobiotik a jejich metabolitů přes membrány, označován jako třetí fáze biotransformace (Kotlářová a Skála 2011).

## **1.1. První fáze biotransformace**

V první fázi biotransformace jsou do základní molekuly xenobiotika zavedeny polární funkční skupiny (-OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -SH). Vznikají tak polárnější produkty, které se snadněji vylučují z organismu močí (Kotlářová a Skála 2011). Anebo produkty připravené k následné konjugaci. Označení pro tuto fázi se v různých literaturách značně liší. Nejčastěji je první biotransformační fáze označována jako vlastní biotransformace. Jindy jako fáze nesyntetická, či jako konverze. Hlavními reakcemi první fáze jsou oxidace, redukce a hydrolýza. Mezi nejvýznamnější biotransformační enzymy první fáze totiž patří oxidasy, reduktasy a hydrolasy (Ehrmann a kol. 2010). Mezi oxidační biotransformace řadíme hydroxylace, dealkylace, oxidační deaminace, oxidační dehalogenace, *N*-oxidace, *S*-oxidace, oxidace aldehydů a ketonů (Skálová a kol. 2011).

Některé produkty první fáze s dostatečnou polaritou mohou být vyloučeny z organismu přímo, většina z nich však podléhá dalším reakcím ve druhé fázi biotransformace (Kvasničková 1995).

## **1.2. Druhá fáze biotransformace**

Druhá biotransformační fáze označovaná jako konjugační či syntetická spočívá v interakci mezi produktem (metabolitem) z první fáze biotransformace, respektive s jeho funkčními skupinami a tzv. konjugačním činidlem. Výsledkem je konjugát, látka více polární a tedy lépe vylučitelná močí či žlučí, nebo látka podléhající další reakci. Konjugačním činidlem je nejčastěji polární endogenní látka typu kyseliny glukuronové, glutathionu, sulfátu, glycinu. Nejčastějšími reakcemi druhé fáze jsou glukuronizace, sulfatace, *N*-acetylace, metylace, konjugace s aminokyselinou (AK), konjugace s glutathionem (Tab. 1) (Dostálek a kol. 2006, Ehrmann a kol. 2010).

Tabulka 1. Základní reakce 1. a 2. fáze biotransformace (Skálová a kol. 2011).

<b>1. fáze biotransformace</b>	<b>2. fáze biotransformace</b>
oxidace	glukuronidace
redukce	sulfonace
hydrolýza	Metylace
hydratace	Acetylace
izomerie	konjugace s glutathionem
	konjugace s aminokyselinami

## 2. Polymorfismus

Slovo polymorfismus vzniklo složením dvou řeckých slov, slova *polys* = mnohý a slova *morfé* = tvar (Kratochvíl 2013). Jak tato řecká slova napovídají, termín polymorfismus je česky jednoduše označován jako mnohotvárnost, vícetvárnost či různorodost (Zahradníček 2013). Polymorfismus znamená schopnost zaujímat více forem a to v různých významech. Existuje v mnoha odlišných podobách a vyskytuje se téměř ve většině vědních odvětví (Kratochvíl 2013).

### 2.1. Genetický polymorfismus

Genetický polymorfismus, stejně tak jako mutace, představuje změny genetické informace v sekvenci nukleové kyseliny. Mutace i genetický polymorfismus jsou zdrojem genetické variability jedince. Výsledkem mutace je vznik více variant jednoho určitého genu v určitém lokusu. Téměř každý lidský gen existuje v několika variantách. Je-li jejich výskyt v populaci náhodný, to znamená méně než 1 %, jedná se o mutaci. Za genetický polymorfismus je potom označován stav, kdy pro určitý gen existují nejméně dvě různé varianty genu, tj. alely, které se vyskytují v populaci u více než 1 % (Řehout a kol. 2003, Mladosičová a kol. 2014).

Pojem genetický polymorfismus je obecně velmi široký a lze ho rozdělit podle objektu studia na několik skupin (Řehout a kol. 2003).

#### 2.1.1. Druhy genetického polymorfismu

##### Polymorfismus DNA

Veškerá variabilita lidského genomu má podklad ve variabilitě na úrovni DNA. Každá variabilita na fenotypové úrovni je též podmíněna variabilitou v sekvenci DNA. (Řehout a kol. 2003).

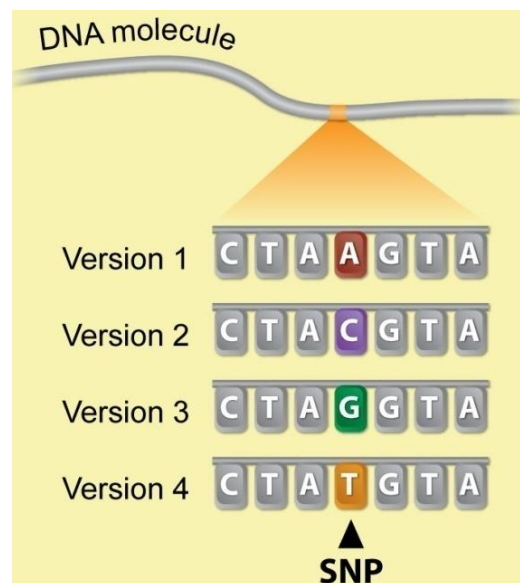
Ve fenotypu se ovšem projevuje pouze malá část variability DNA. Exony kódujících genů totiž tvoří jen několik málo procent genomové DNA. Zbylou část genomové DNA tvoří introny a nekódující sekvence. Vzhledem k degeneraci genetického kódu nemusí vždy změna jednoho nukleotidu v sekvenci DNA nutně znamenat změnu v aminokyselině, kterou kóduje, proto se ani tato změna v sekvenci DNA nemusí vždy projevit ve fenotypu. Z těchto skutečností je patrné, že existuje velké

množství polymorfismů ve struktuře DNA, ale převážná většina z nich se ve fenotypu nemusí projevit a lze je detekovat pomocí metod analýzy DNA. Nejčastější formy genetického polymorfismu jsou jednonukleotidové polymorfismy (SNP) a repetitivní sekvence (Otová a kol. 2013).

### Jednonukleotidové polymorfismy

SNP (z angl. Single Nucleotide Polymorphism) je zkratka pro jednonukleotidový, neboli bodový polymorfismus. SNP stejně jako bodová mutace označuje nejčastěji záměnu jednoho nukleotidu v sekvenci DNA za jiný, či jednonukleotidovou delecí, nebo jakoukoliv jinou jednonukleotidovou změnu v molekule DNA. Ne všechny jednonukleotidové změny jsou tedy bodové mutace. Aby mohla být změna v sekvenci DNA klasifikována jako SNP, musí být přítomna alespoň u 1 % z celkové populace, jinak se jedná o bodovou mutaci (*Learn.Genetics* 2014, Mladosievičová a kol. 2014).

SNP se vyskytuje v lidském genomu v 1 z každých 300 nukleotidových párů bází. To znamená zhruba 10 milionů SNP v rámci celého genomu (*Genetics Home Reference* 2015). Každý SNP v genomu může mít až čtyři verze, jednu pro každý nukleotid, adenin (A), cytosin (C), guanin (G) a thymin (T) (Obr. 1). Nejčastější substitucí je záměna C za T. SNP se nacházejí v kódujících i nekódujících oblastech genomu a celkově zodpovídají za 90 % genetické variability každého jedince (*Learn.Genetics* 2014).



Obr. 1. Čtyři verze pro každý SNP v genomu (*Learn.Genetics* 2014).

### Repetitivní sekvence

Mnohonásobně se opakující sekvence nukleotidů v DNA rozptýlené po celém genomu v nekódujících oblastech mezi geny nebo uvnitř genů (v intronech) se nazývají repetitivní sekvence. Jsou-li tyto sekvenční kopie uspořádány v blocích, v řadě za sebou, jde o tandemové repetice. Od nich se liší jednotlivé kopie rozptýlené v genomu, označované jako rozptýlené repetice (Šeda 2006).

Tandemové repetice se mohou dělit podle délky repetitivního úseku DNA na:

satelity

minisatelity

mikrosatelity

Satelity jsou tandemové repetice s nejdelším opakujícím se úsekem DNA, tento úsek DNA disponuje s cca 20 – 1000 párů bází (bp). S ohledem na polymorfismus jsou klíčové mikrosatelity s nejkratší repetitivní sekvencí 1 – 5 bp. Polymorfnní mikrosatelity jsou v genomu velmi časté a lze je nazývat zkráceně STR – short tandem repeats, nebo VNDR – variable number of di-nucleotide repeats. Praktické uplatnění těchto polymorfismů spočívá např. v identifikaci osob v soudním lékařství, či v ověřování rodičovství. Dalším důležitým využitím mikrosatelitů je vytváření genetických map pomocí hybridizace in situ (Otová a kol. 2013).

### **Polymorfismus biochemický**

Biochemické polymorfismy jsou veškeré polymorfismy, které lze nalézt v proteinové struktuře (Zvárová a kol. 2001). Patří sem např. polymorfismy enzymů, transportních proteinů, receptorových proteinů, proteinů iontových kanálů a polymorfismy mnoha dalších biologicky funkčních proteinů (Skálová a kol. 2011).

Jak bylo řečeno výše, k polymorfním změnám dochází již v nukleotidové sekvenci DNA. To se vždy může či nemusí projevit, jako změna v primární struktuře proteinu (Otová a kol. 2013).

Podstatou biochemického polymorfismu je výskyt několika strukturně nebo funkčně odlišných variant jednoho proteinu, jehož syntéza je řízena z jednoho lokusu (Řehout a kol. 2003). Vzniklé varianty proteinu mají rozdílnou primární strukturu (sekvenci AK), tím pádem mohou mít různý počet prostetických skupin, velikost a uspořádání molekuly (Řehout a kol. 2003). Změna v sekvenci AK v proteinu se projeví i změnou elektrického náboje proteinové varianty (Zvárová a kol. 2001).



Nejběžnějším příkladem biochemického polymorfismu jsou jednotlivé typy hemoglobinů -  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . Každý z nich je determinován vlastním strukturním genem, ale všechny pochází z téhož lokusu. Většinou se jedná pouze o změnu v jedné AK (Řehout a kol. 2003).

## 2.2. Polymorfismus enzymů obecně

Geneticky podmíněné rozdíly v metabolismu každého jedince jsou výsledkem polymorfismu enzymů. Jeho produktem je vícero variant proteinů, v tomto případě enzymů, s četností výskytu nad 1% v dané populaci. Polymorfni změna ve struktuře genu kódující enzym, může mít za následek vznik enzymu s pozměněnou katalytickou aktivitou či změnu produkovaného množství daného enzymu. Jinými slovy jde o kvalitativní i kvantitativní změny v produkci enzymu (Mráčková 1998).

Konkrétně zvýšená či snížená aktivita biotransformačního enzymu nebo jeho zvýšené (amplifikace) či snížené (delece) množství v organismu může vést k mnoha komplikacím od variabilních lékových odpovědí (předávkování, vznik lékových interakcí, nedostatečný terapeutický účinek, selhání terapie), přes sníženou detoxikaci organismu, k zvýšené aktivaci prokarcinogenů, vedoucí nejen ke zvýšení vnímavosti k procesu karcinogeneze ale i k iniciaci jiných onemocnění (Mráčková 1998, Skálová a kol. 2011).

Například při zvýšení metabolické aktivity enzymu dojde k rychlejšímu rozpadu léčiv metabolizovaných tímto enzymem, což vede k nedostatečným koncentracím léčiva v organismu pacienta, a tudíž není dosaženo požadovaného farmakologického účinku. V opačném případě, při snížení metabolické aktivity enzymu se určitá léčiva metabolizují pomaleji, jejich koncentrace překračuje požadovanou koncentraci léčiva v organismu a může dojít až k předávkování pacienta. Zároveň kumulace léčiv v organismu často souvisí se vznikem různých nežádoucích účinků a rozvojem některých onemocnění (Slanař 2002).

Dojde-li vlivem polymorfismu enzymu k ovlivnění metabolické funkce enzymu tak, že se zvýší aktivace prokarcinogenů na karcinogeny, dochází tak k produkci nadměrného množství reaktivních metabolitů. Reaktivní metabolity se vážou s DNA a vytvářejí adukty, které mají potenciál způsobovat mutace a nakonec vedou až ke vzniku rakoviny (Sachse a kol. 2003).

Nebo naopak mohou změny v produkci biotransformačních enzymů vést k určitému zvýhodnění organismus (rychlejší deaktivace reaktivních metabolitů, snížená produkce potencionálně toxických látek), což může působit na tkáně protektivně před rozvojem karcinogenního procesu (Mráčková 1998).

Projevem polymorfismu enzymu ve fenotypu mohou být tzv. ultra rychlí, rychlí, intermediární a pomalí metabolizátoři. U jedinců, kteří mají v genotypu obě alely kódující enzymy se zvýšenou metabolickou aktivitou, nebo alely kódující zvýšenou expresi enzymu, probíhá metabolismus určitého substrátu zvýšenou rychlostí, proto se označují často jako ultra rychlí metabolizátoři (UM). Pomalí metabolizátoři (PM) mají naopak v genotypu obě alely kódující enzymy se sníženou nebo žádnou aktivitou a metabolismus daného substrátu probíhá obtížněji nebo vůbec. V obou těchto případech se jedná o homozygotní jedince. Homozygoti se dvěma standardními (běžnými) alelami se fenotypově projevují jako rychlí metabolizátoři (RM). U heterozygotů, kde je jedna alela defektní a jedna standardní je enzymová aktivita buď normální, nebo jen lehce snížená, to jsou intermediární metabolizátoři (IM) (Coleman 2010, Slanař 2002).

### **2.2.1. Nomenklatura polymorfních forem enzymů**

Pro přehlednost je v tomto textu použita *kurzíva*, jedná-li se o gen nebo variantu genu (alelu), např. gen *CYP1A1*, nebo varianta genu *CYP1A1\*2*. Jedná-li se v textu o enzym, je použito standardní písmo (např. enzym CYP1A1).

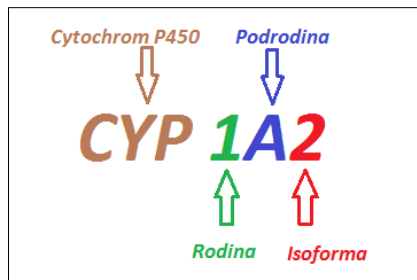
Polymorfní forma enzymu se obvykle píše s \* a s číslem pro alelickou variantu. Standardní alela (angl. wild-type allele) jakožto běžná, normální alela a zároveň hlavní exprimovaná forma enzymu v populaci se často označuje \*1, např. *CYP2B6\*1*. Každá polymorfní varianta genu může obsahovat pouze jeden nebo více SNP. Například CYP 2B6 má, kromě standardní varianty ještě osm významných alelických variant, mezi něž patří *CYP 2B6\*4* a *CYP2B6\*6*, kde *CYP2B6\*4* má pouze jeden SNP, kdežto *CYP2B6\*6* má SNP dva. U polymorfní alely *CYP2B6\*4* se SNP může označovat A785G nebo A>G785. To znamená, že adenin u standardní alely je u polymorfní alely nahrazen guaninem a to v místě tripletu 785 v genu *CYP2B6\*4*. Nicméně se může tento SNP označovat také jako K262R, protože v tomto případě dochází k náhradě aminokyseliny lyzinu (K) za arginin (R) v AK pozici 262 (Coleman 2010).

## 3. Polymorfismus enzymů první fáze

### 3.1. Cytochromy P450

Významně rozšířenou nadrodinou biotransformačních enzymů jsou cytochromy P450. Jedná se o hemoproteiny, nazývané také jako hemové enzymy, které mají naprosto zásadní úlohu v metabolismu xenobiotik a některých eobiotik. Písmeno P v názvu je zkratkou pro pigment a 450 označuje vlnovou délku, kterou cytochromy P450 v redukovaném stavu a při vazbě oxidu uhelnatého vykazují v UV-VIS spektru jako typické maximum. Od prvního popsání cytochromu P450 z roku 1948 v podání Klingenberga bylo do současné doby objeveno velké množství (až několik tisíc) odlišných genů kódujících cytochromy prokaryontních i eukaryontních organismů (Stiborová a kol. 1999). V lidském genomu je jich 57 a bylo identifikováno 35 isoform, z nichž 18 je schopno metabolizovat xenobiotika (Skálová a kol. 2011). Rozdíly mezi nimi spočívají v primární struktuře, fyzikálně – chemických vlastnostech, substrátové specifitě, katalytické aktivitě, nebo indukovatelnosti. Všechny ale obsahují konzervované sekvence oblastí v blízkosti vazného místa pro hem (Stiborová a kol. 1999).

Každý doposud popsáný cytochrom P450 spadá do jedné velké nadrodiny (superfamily), která se skládá z několika rodin P450. Tyto enzymové rodiny se ještě dále dělí na podrodiny a na konkrétní isoformy (Kvasničková 1995). Zkratku CYP (cytochrom P450) zavedli Nebert a spolupracovníci za účelem zjednodušení nomenklatury cytochromů. Systematické názvosloví genů a forem cytochromů P450 vypadá například takto: CYP1A2. Prvním číslem za zkratkou CYP je označena rodina cytochromů P450. Následuje velké písmeno označující podrodinu. Poslední číslice v názvosloví charakterizuje konkrétní isoformu (Obr. 2). Do jedné rodiny náleží enzymy (proteiny), které mají shodnou aminokyselinovou sekvenci ze 40 %. Z 60 % se pak shoduje aminokyselinová sekvence u enzymů z jedné podrodiny (Stiborová a kol. 1999).

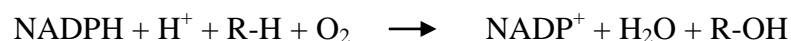


Obr. 2. Systematické názvosloví cytochromů P450 (Vytvořeno podle Stiborová a kol. 1999).

Cytochromy P450 mají charakter membránových proteinů, které jsou nejčastěji lokalizovány na hladkém endoplasmatickém retikulu (mikrosomech), nebo méně často v membránách mitochondrií, a to u buněk různých tkání, zejména jater, ale i plic, ledvin, nadledvin, kůže, mozku, nebo tenkého střeva. Jak vyplývá z lokalizace CYP v buňce, dělíme je na mikrosomální monooxygenasy a mitochondriální monooxygenasy (Anzenbacher a Zanger 2010).

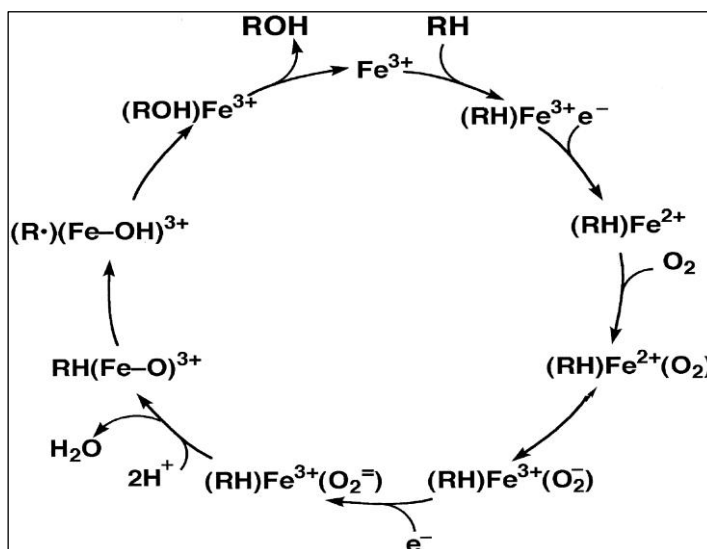
S cytochromem P450 úzce spolupracuje další enzym v endoplasmatickém retikulu, a to NADPH-CYP-reduktasa. Jedná se o flavoprotein složený z jednoho polypeptidového řetězce, jednoho flavinmononukleotidu (FMN) a jednoho flavinadeninindinukleotidu (FAD). Tento enzym zprostředkovává cestu přenosu elektronu z NADPH na mikrosomální CYP. Dodávku elektronů pro CYP tentokrát z NADH zabezpečují cytochrom  $b_5$  a cytochrom  $b_5$ - reduktasa (Skálová a kol. 2011).

Katalytická funkce CYP spočívá v jeho monooxygenasové aktivitě. Monooxygenasy pro svoji aktivitu potřebují donor vodíku, kterým je redukovaný nikotinamidadeninindinukleotidfosfát (NADPH) a molekulární kyslík ( $O_2$ ) (Kvasničková 1995). NADPH-CYP-reduktasa doručí elektron z NADPH na CYP a tím ho redukuje. Redukovaný CYP aktivuje molekulu kyslíku. První z atomů kyslíku je inkorporován do molekuly substrátu a druhý do molekuly vody. Tuto typickou monooxygenasovou reakci znázorňuje následující schéma:



Většina všech reakcí katalyzovaných CYP probíhá výše uvedeným mechanismem, a to v reakčním cyklu cytochromu P450 (Obr. 3), ve kterém je cytochrom znázorněn zjednodušeně jako atom železa (Fe) (Anzenbacher a Zanger

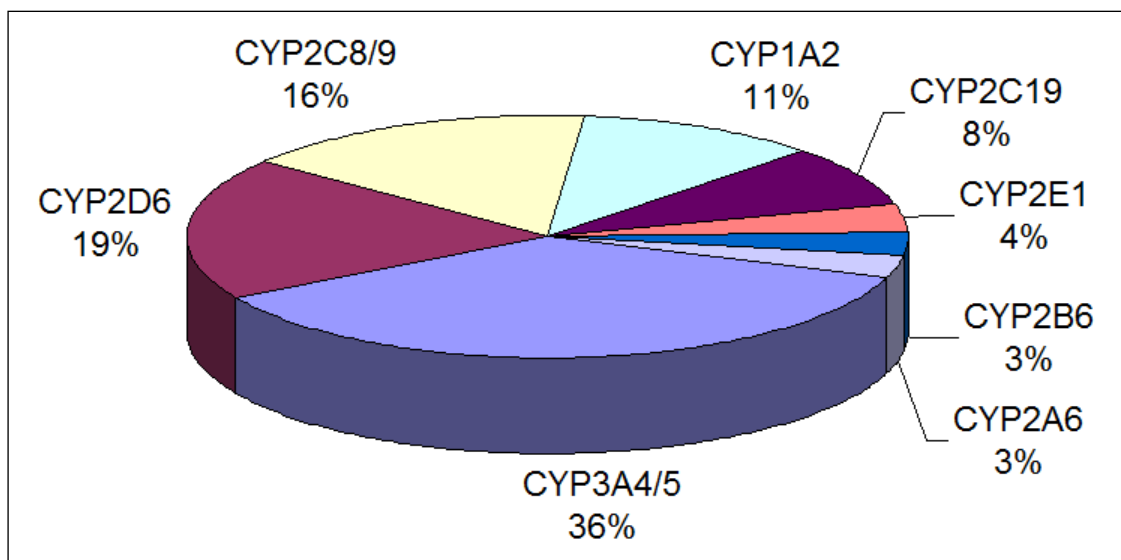
2010). Donorem atomu kyslíku pro oxidační reakce nemusí být vždy striktně molekula vzdušného  $O_2$  ale i peroxidy a peroxikyseliny (Skálová a kol. 2011).



Obr. 3. Reakční cyklus cytochromu P450. Zkratkou RH je označen substrát, ROH označuje monooxygenační produkt a Fe značí atom hemového železa enzymu (Coon 2002).

Cytochromy nedisponují pouze oxidační katalytickou aktivitou ale i reduktasovou aktivitou. CYP za určitých podmínek fungující jako reduktasy redukují molekulu  $O_2$  na kyslíkové radikály a na peroxid vodíku. Tato reduktasová aktivita CYP zvyšující tvorbu kyslíkových radikálů a peroxidů v organismu je podstatou toxického účinku těchto látek. Úloha cytochromů v organismu proto nemusí být striktně pozitivní. Kromě klasické detoxikace xenobiotik nebo aktivace léčiv (Obr. 4) se cytochromy zároveň účastní i potencionálně nebezpečné aktivace protoxidantů a prokarcinogenů a tím pádem i procesu karcinogeneze (Stiborová a kol. 1999).

Kromě významné katalytické funkce mají ještě CYP funkci biosyntetickou. Podílejí se na biosyntéze některých fyziologicky významných sloučenin, jako jsou např. prostaglandiny, steroidní hormony, vitaminy D (Stiborová a kol. 1999).



Obr. 4. Procentuální podíl jednotlivých isoformů cytochromů P450 na metabolismu léčiv (Wikimedia commons 2010).

### 3.1.1. CYP1A1

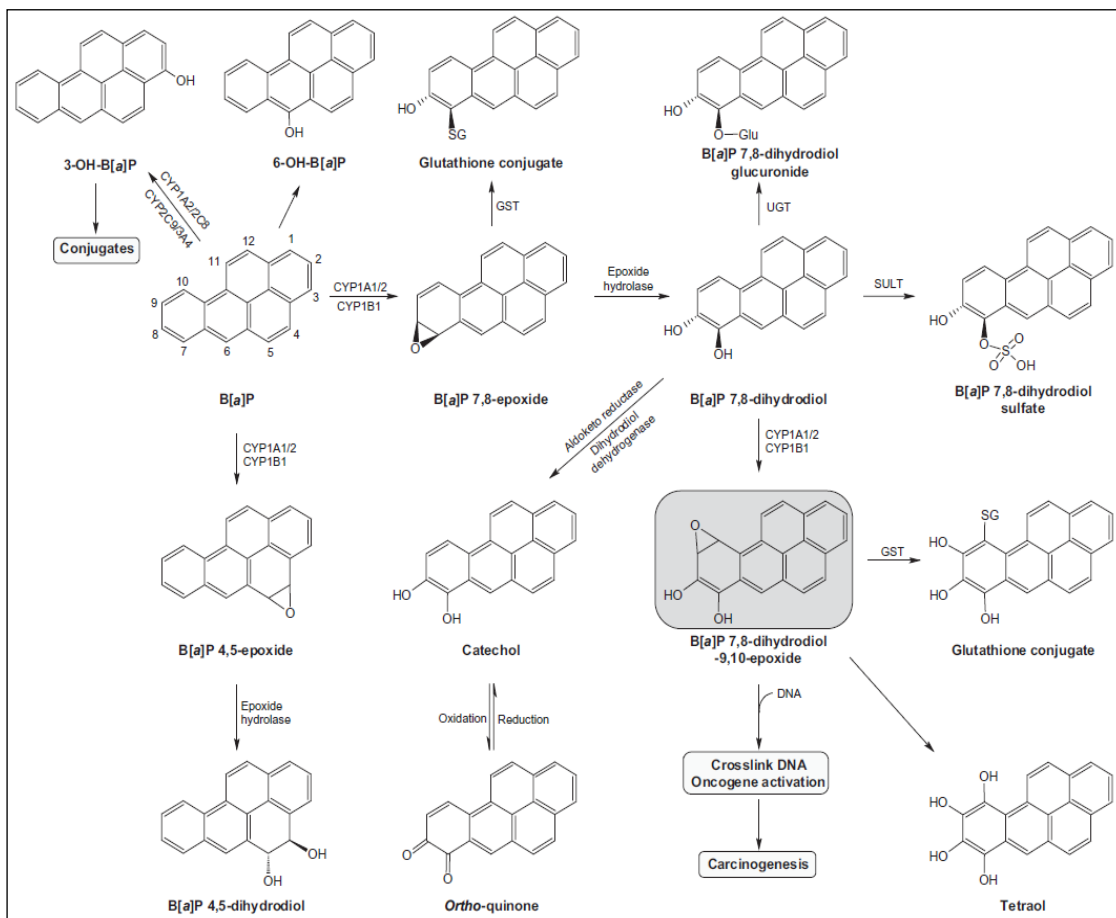
#### Funkce CYP1A1 v organismu

CYP1A1 má (spolu s CYP1A2) klíčovou úlohu v aktivaci prokarcinogenů (např. PAU, HAA). Společně oba tyto CYP aktivují až 90 % všech karcinogenních látek a podílejí se tak na procesu karcinogeneze. Typickým příkladem může být dobře známá transformace benzo-*a*-pyrenu (B[*a*]P) na epoxid (Obr. 5). Dalším substrátem CYP1A1 je např. léčivo theophylin. Mimo xenobiotik se však CYP1A1 podílí také na metabolismu estrogenu. Cytochrom P450 1A1 byl lokalizován převážně v extrahepatálních tkáních, zejména v plicích, ledvinách, GIT, placentě, kůži, prsu, ale i v lymfocytech. V játrech se vyskytuje pouze nepatrně. Tento enzym je silně indukován kouřením a dalšími polutanty životního prostředí. K inhibici CYP1A1 dochází prostřednictvím fluorochinolonů a makrolidů (Ma a Lu 2007, Stiborová a kol. 1999).

#### Polymorfismus CYP1A1

Do roku 2014 bylo v různých populacích nalezeno 13 polymorfních variant genu *CYP1A1* a tři subvarianty (Sim 2014). Mezi nejvíce studované varianty se řadí *CYP1A1*\*2 a *CYP1A1*\*3. Liší se od ostatních pouze v jedné aminokyselině a s největší pravděpodobností zodpovídají za zvýšenou produkci reaktivních metabolitů. S rostoucí produkcí reaktivních metabolitů se zvyšuje i riziko vzniku nádorových onemocnění

(Coleman 2010). U polymorfismu CYP1A1 se předpokládá spojitost se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny plic, nebo prsu (Coleman 2010, Sachse a kol. 2003).



Obr. 5. Metabolická aktivace benzo[*a*]pyrenu (B[*a*]P) katalyzovaná CYP1A1, 1A2 a 1B1. První krok aktivace je formace B[*a*]P 7,8-epoxidu zprostředkovaná CYP1A1, 1A2 a 1B1. Druhý krok, katalyzovaný epoxid hydrolasou, je hydrolyza B[*a*]P 7,8-epoxidu na *trans*-7,8-dihydrodiol. Nakonec CYP1A1, 1A2 a 1B1 katalyzují další oxidaci B[*a*]P 7,8-dihydrodiolu a výsledkem jsou čtyři možné izomery 7,8-diol-9,10-epoxidu. Nejvýznamnější z těchto izomerů je (7*R*, 8*S*)-dihydroxy-(9*S*, 10*R*)-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyren, který je základním karcinogenem (Zhou a kol. 2009b).

### 3.1.2. CYP1A2

#### Funkce CYP1A2 v organismu

CYP1A2 je jedním z hlavních CYP v lidských játrech, který metabolizuje řadu klinických léčiv. Jedná se například o tricyklická antidepresiva (amitriptylin, klomipramin a imipramin), antipsychotika (klozapin, olanzapin), lokální anestetikum ropivakain, antiarytmikum mexiletin, analgetikum paracetamol, *R* isomer warfarinu, theophylin a mnoho jiných xenobiotik. CYP1A2 je zodpovědný za metabolickou aktivaci prokarcinogenů, jako jsou heterocyklické aromatické aminy (HAA),

polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) a 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK). CYP1A2 zároveň metabolizuje několik důležitých endogenních sloučenin (např. steroidy). Typickým substrátem pro CYP1A2 je kofein. Metabolismus kofeinu byl dobře zdokumentován a je základem testu, který se používá k posouzení metabolické aktivity CYP1A2. Exprese CYP1A2 je indukována nebo inhibována řadou chemických látek vstřebaných z potravy nebo životního prostředí (PAU, HAA, NNK, polychlorované bifenylly, kouření, atd.) (Sachse a kol. 2003, Zhou a kol. 2010, Wang a kol. 2012).

### **Polymorfismus CYP1A2**

CYP1A2 vykazuje velkou interindividuální variabilitu v jeho expresi. Vedle indukce např. kouřením nebo pitím kofeinových nápojů je za interindividuální variabilitu CYP1A2 zodpovědný také polymorfismus (Skálová a kol. 2011). V oblasti genu *CYP1A2* existuje podle NCBI dbSNP databáze více než 200 polymorfismů (Wang a kol. 2012). Dosud bylo identifikováno 21 variant alel a řada subvariant na *CYP1A2* genu (Sim 2014). U polymorfní alely *CYP1A2\*1C* bylo prokázáno, že je spojena s poklesem aktivity enzymu u kuřáků. Tato alela může u kuřáků konkrétně způsobovat např. pomalejší metabolismus kofeinu. Tento polymorfismus je klinicky významný, protože kumulující se kofein v organismu zvyšuje riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění u jedinců s touto variantou (alelou) (Womack a kol. 2012). Alela *CYP1A2\*1F* je naopak spojena se zvýšením aktivity kódovaného enzymu kouřením cigaret (Wang a kol. 2012).

Stejně jako u CYP1A1 vede zvýšená metabolická aktivita CYP1A2 vlivem genetického polymorfismu k větší produkci reaktivních metabolitů a zároveň k většímu riziku vzniku rakoviny (Sachse a kol. 2003, Zhou a kol. 2010). S cytochromem P450 1A2 souvisí vznik kolorektálních nádorů a nádorů močového měchýře (Stiborová a kol. 1999).



### 3.1.3. CYP1B1

#### Funkce CYP1B1 v organismu

Dalším významným enzymem v aktivaci prokarcinogenních polycyklických aromatických uhlovodíků, heterocyklických aminů, aflatoxinů a dalších toxických polutantů je CYP1B1. Tento CYP je silně indukovatelný. Jeho důležitým endogenním substrátem je ženský pohlavní hormon estrogen, metabolizuje však i další steroidy a mastné kyseliny. Může souviset s hormon-dependentními typy nádorů, s rakovinou endometria i dalších tkání (Coleman 2010, Jiang a kol. 2014).

#### Polymorfismus CYP1B1

U CYP1B1 bylo do roku 2014 nalezeno 26 polymorfních alel (Sim 2014). Významnou alelou zdá se být *CYP1B1*\*2, která má dva SNP a způsobuje zvýšení exprese CYP1B1 oproti standardní alele. *CYP1B1*\*3 kóduje na pozici 432 místo leucinu valin a katalytická aktivita CYP1B1 je také zvýšená. Oproti standardnímu typu alely se *CYP1B1*\*3 mnohem snadněji indukuje. U *CYP1B1*\*4 je naopak metabolická aktivita snižena, protože dochází k rychlejší degradaci enzymu (Coleman 2010).

Studie z roku 2014 potvrzují, že některé polymorfní alely jsou spojeny s procesy karcinogeneze. Např. polymorfní alela *CYP1B1*\*3 souvisí u kavkazské a asijské populace s rizikem vzniku rakoviny prostaty, močového měchýře a ledvin (Chang a kol. 2014, Jiang a kol. 2014).

### 3.1.4. CYP 2A6

#### Funkce CYP2A6 v organismu

Cytochrom P450 2A6 se u lidí nachází zejména v plicní tkáni a játrech. Metabolizuje substráty, které mají význam pro lidské zdraví, např. nikotin, nitrosaminy, kumarin, látky používané k léčení AIDS (azidothymidin, zidovudin). Navíc aktivuje některé prokarcinogeny (např. tabákově specifický nitrosamin NNK, butadien, 2,6-dichlorbenzotrilit, hexamethylfosforamid, 6-aminochrysen, aflatoxin B1) (Stiborová a kol. 1999). Dále je zapojen do metabolismu tegafuru (cytostatikum) a letrozolu (inhibitor aromatasy používaný při léčbě rakoviny prsu). Interindividuální variabilita

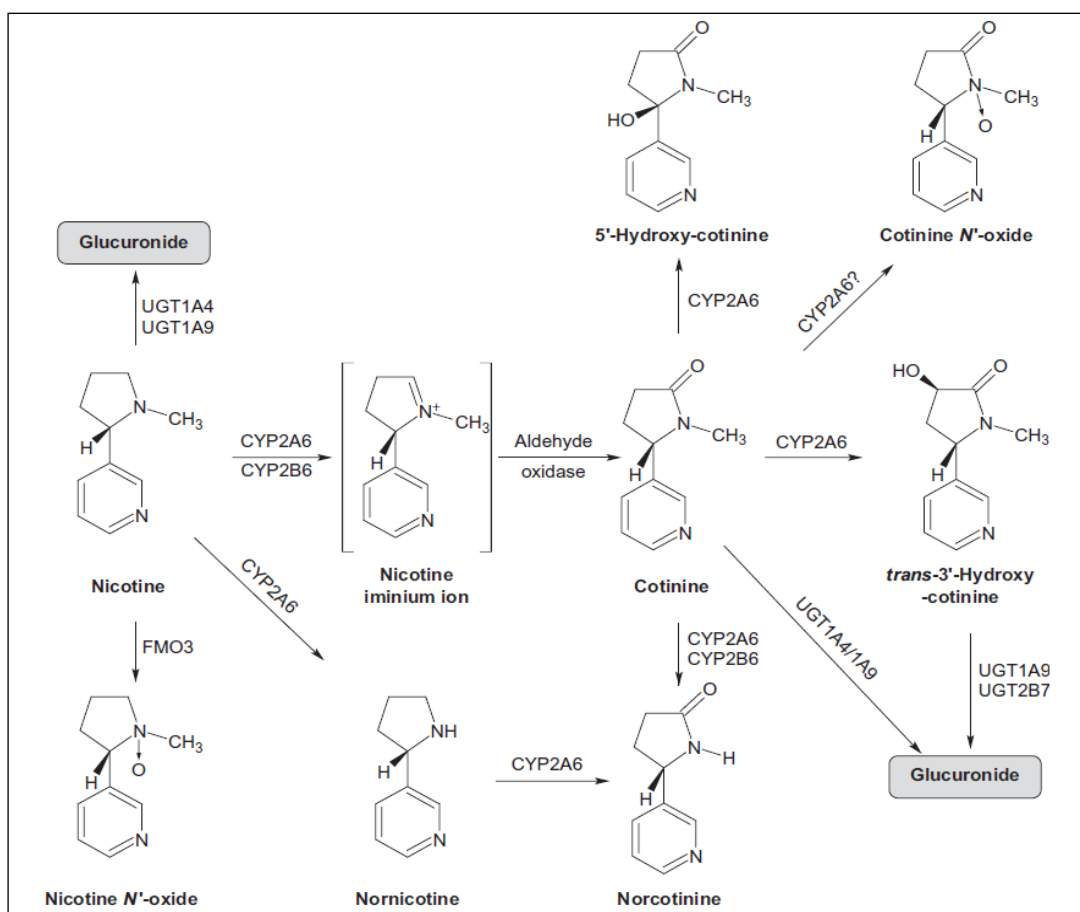
v metabolické aktivitě CYP2A6 je i zde spojena se změnami plazmatických koncentrací léčiv, tudíž s různými odpověďmi na léčbu (Piliguian a kol. 2014).

### **Polymorfismus CYP2A6**

V genu *CYP2A6* existuje rozsáhlá genetická variabilita, která přispívá k výrazným změnám v aktivitě cytochromu. Do roku 2012 bylo identifikováno 38 variant genu *CYP2A6* (Sim 2014). Většina z nich byla spojena se snížením nebo dokonce ztrátou enzymatické funkce. Piliguian a kol. (2014) zveřejnili o dva roky později ve své studii sedm nových alel u afroamerické populace. I nově identifikované polymorfní alely inhibují expresi enzymu a proto snižují celkovou metabolickou aktivitu CYP2A6. V současnosti existuje 45 známých alelových variant a řada subvariant na *CYP2A6* genu (Piliguian a kol. 2014).

Polymorfismus CYP2A6 má významný vliv na tvorbu závislosti na tabáku. Nikotin, hlavní návyková látka v tabáku, je metabolicky inaktivován enzymem CYP2A6 na kotinin (Obr. 6). Polymorfní změny tohoto cytochromu působí velké interindividuální rozdíly v míře metabolismu nikotinu. Míra metabolismu nikotinu dokáže zásadně změnit kuřácké chování a ovlivnit kuřácké návyky (např. množství vykouřených cigaret, riziko vzniku závislosti, úspěchy v odvykání kouření). Polymorfní alely *CYP2A6* kódují většinou enzymy se sníženou nebo žádnou aktivitou, nebo dokonce enzymy úplně chybí. Metabolismus nikotinu je u kuřáka s těmito alelami zpomalen a prodlouží se jeho biologický poločas. Kuřák nepocítuje tak velkou chuť na cigaretu a zároveň se snadněji vyrovná se závislostí (Skálová a kol. 2011, Piliguian a kol. 2014).

Polymorfismus CYP2A6 je v tomto případě nejvýznamnějším inhibátorem exprese tohoto enzymu. Snížená metabolická aktivita CYP2A6 ovlivňuje nejenom chování kuřáků, ale zároveň snižuje riziko vzniku rakoviny plic, jelikož prokarcinogenní nitrosamin NNK, obsažený v tabákovém kouři, není aktivován. Indukce CYP2A6 je možná prostřednictvím glukokortikoidů. Zvýšené hladiny glukokortikoidů, např. námahou či stresem, tedy urychlují metabolismus nikotinu a ovlivňují tak kuřácké návyky a spotřebu cigaret prostřednictvím CYP2A6 (Skálová a kol. 2011).



Obr. 6. Metabolismus nikotinu zprostředkovaný lidským CYP2A6. U lidí se 70-80 % nikotinu C-oxiduje zejména CYP2A6 na iminový ion, který je dále metabolizován na kotinin. Formace iminového iontu z nikotinu prostřednictvím CYP2A6 je krok, který určuje rychlost C-oxidace. Alternativně může být nikotin demetylován CYP2A6 a CYP2B6 na nornikotin (Zhou a kol. 2009b).

### 3.1.5. CYP2B6

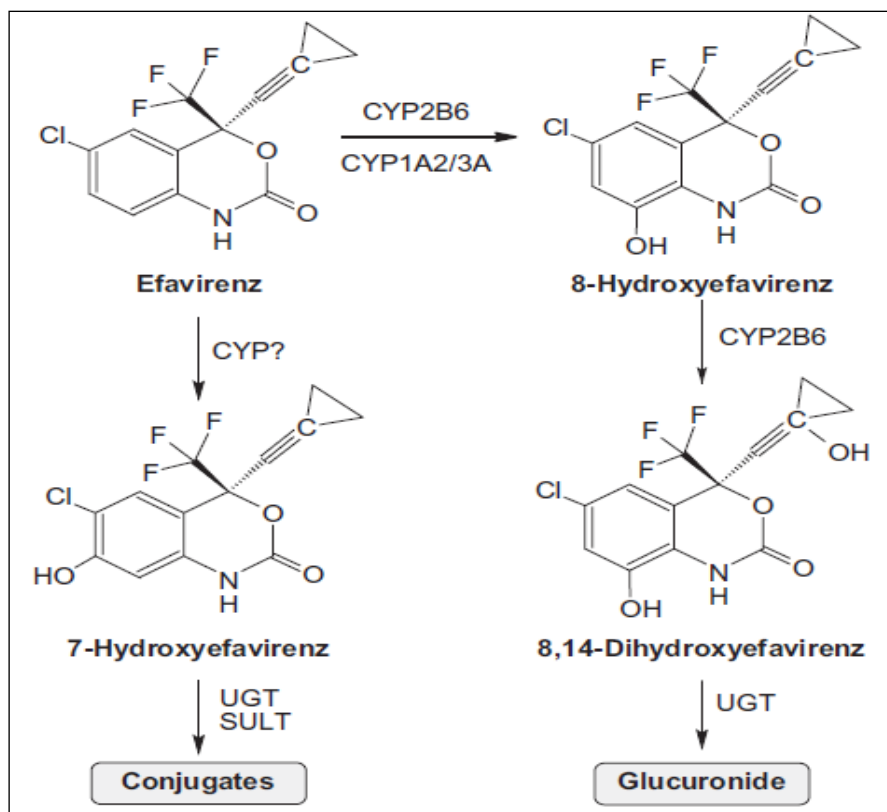
#### Funkce CYP2B6 v organismu

Hlavní význam CYP2B6 spočívá pravděpodobně v metabolismu léčiv (Mukonzo a Owen 2014). CYP2B6 přeměňuje protinádorová léčiva cyklofosamid a ifosamid, antidepresivum bupropion, nukleosidové inhibitory reverzní transkriptasy efavirenz (Obr. 7) a nevirapin, metadon a ostatní léčiva (Flockhart 2007). Spolu s CYP2A6 se podílí na metabolismu nikotinu. Mimo to metabolizuje i některé karcinogenní látky (Mukonzo a Owen 2014). CYP2B6 se vyskytuje kromě jater také v plicích a GIT (Stiborobá a kol. 1999). CYP2B6 může být významně indukován např. fenobarbitalem, fenytoinem či rifampicinem, nebo inhibován clopidogrelem, či vorikonazolem (Flockhart 2007).

## Polymorfismus CYP2B6

CYP2B6 je vysoce polymorfní. Z 38 polymorfních variant a více než 30 subvariant genu pro CYP2B6 jsou pouze dvě nebo tři skutečně významné (Sim 2014). Alela *CYP2B6\*6* obsahuje dva SNP. Jeden z nich zodpovídá za defektní expresi enzymu. Tato defektní exprese vede k tvorbě kratšího proteinu, který má pouze čtvrtinu katalytické aktivity, oproti normálnímu enzymu. Varianta *CYP2B6\*6* je velmi rozšířená, neboť se běžně vyskytuje u 60 % populace z Papuy-Nové Guiney, u 40 % Afroameričanů, Afričanů, Číňanů, Hispánců, dále u 28 % kavkazské populace a u 17 % Japonců. Varianty *CYP2B6\*4* a *CYP2B6\*9* mají každá pouze jeden SNP a vyskytují se jen vzácně. Další významnější alela je *CYP2B6\*18*, která kóduje téměř nefunkční enzym a vyskytuje se u 10 % Afričanů (Coleman 2010).

Snížená metabolická aktivita CYP2B6 podmíněná genetickými vlivy přispívá k interindividuálním rozdílům v clearanci některých léčiv. Např. polymorfní alela *CYP2B6\*6* snižuje clearanci efavirenzu a nevirapinu, což může souviset s problémy v CNS (bolestí hlavy, změnami nálad, únavou). Alela *CYP2B6\*9* souvisí s individuální clearancí cyklofosfamidu, bupropionu či metadonu. Mimo to je polymorfismus CYP2B6 spojen s citlivostí k akutní myeloidní leukemii (Coleman 2010, Daraki a Zachaki 2014, Mukonzo a Owen 2014).



Obr. 7. Metabolismus efavirenzů zprostředkovaný CYP2B6 a ostatními cytochromy. CYP2B6 je hlavní katalyzátor sekvenční hydroxylace efavirenzů spolu s menším podílem CYP1A2 a CYP3A4. Efavirenz podléhá CYP2B6 zprostředkované primární oxidační hydroxylaci na 8-hydroxyefavirenz (většina) a 7-hydroxyefavirenz (menšina), a sekundárnímu metabolismu na 8,14-dihydroxyefavirenz (Zhou a kol. 2009b).

### 3.1.6. CYP2C8

#### Funkce CYP2C8 v organismu

Cytochrom P450 2C8 metabolizuje některá léčiva (např. chemoterapeutikum paklitaxel, antidiabetika rosiglitazon a repaglinidid, nebo ibuprofen) (Flockhart 2007).

#### Polymorfismus CYP2C8

U CYP2C8 bylo identifikováno 14 polymorfních variant a 3 další subvarianty (Sim 2014). Jejich význam však není příliš velký. Za zmínku stojí varianta *CYP2C8\*3*, u které byl prokázán pokles aktivity kódovaného enzymu (Hertz a kol. 2013). Nositelé polymorfních varianty *CYP2C8\*3* mají sníženou metabolickou aktivitu CYP2C8. V případě léčby rakoviny prsu paklitaxelem dochází k jeho pomalejšímu odbourávání a

ke kumulaci v organismu. Tím se zvyšuje riziko vzniku paklitaxel-indukované neuropatie (Hertz a kol. 2013).

### 3.1.7. CYP2C9

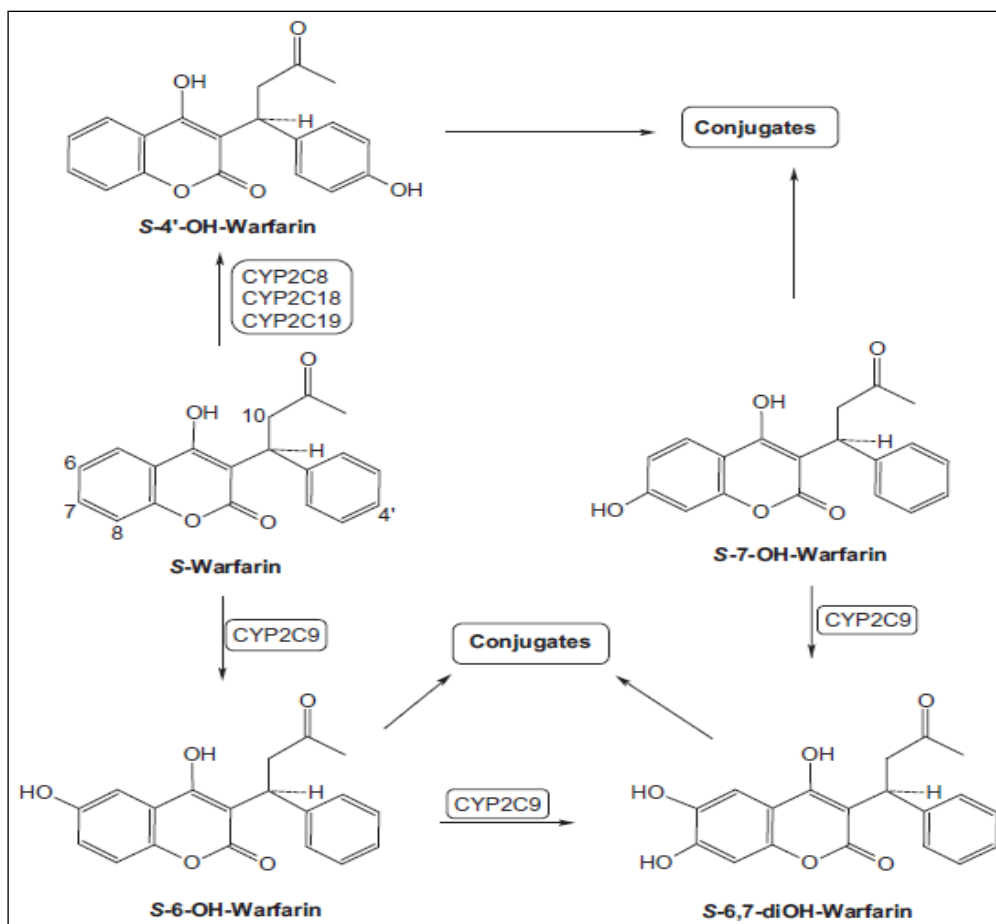
#### Funkce CYP2C9 v organismu

CYP2C9 metabolizuje řadu klinických léčiv jako je warfarin (Obr. 8), tolbutamid, glipizid, fenytoin, losartan nebo ibuprofen (Van Booven 2010). Prostřednictvím CYP2C9 jsou metabolizovány i endogenní sloučeniny jako je kyselina arachidonová, 5-hydroxytryptamin a kyselina linolová. CYP2C9 je indukován rifampicinem. V minulosti bylo prokázáno, že léčba rifampicinem důsledně zvyšuje clearanci léků metabolizovaných tímto enzymem. Inhibitorem pro CYP2C9 je mimo jiné amiodaron a flukonazol (Retti a Jones 2005, Van Booven 2010).

#### Polymorfismus CYP2C9

Polymorfnní varianty genu *CYP2C9* mají zásadní farmakogenetický význam (García-Martín a kol. 2006). V regulačních a kódujících oblastech genu *CYP2C9* byl popsán velký počet SNP. Podle databáze existuje 60 alelických variant a několik subvariant (Sim 2014). Několik těchto polymorfismů je spojeno s výrazně sníženou aktivitou enzymu v porovnání se standardním typem alely v *in vitro* experimentech. Pro zpomalený metabolismus většiny substrátů CYP2C9 jsou u bělochů významné alely *CYP2C9\*2* a *CYP2C9\*3*. U černošských populací jsou to spíše alely *CYP2C9\*5*, *\*6*, *\*8* a *\*11* (García-Martín a kol. 2006, Van Booven 2010).

Snížení metabolické aktivity CYP2C9, způsobené genetickými vlivy, zpomaluje metabolismus určitých léčiv a hraje tak významnou roli v patogenezi nežádoucích, nedostatečných, nebo toxických účinků léčiv. Polymorfismus CYP2C9 je významný zejména pro metabolismus hypoglykemizujících antidiabetik, která při zpomaleném metabolismu u PM mohou vyvolávat závažné hypoglykémie (Slanař 2002). Speciálně pro substráty CYP2C9, jako je *S*-warfarin nebo fenytoin, může vést snížená metabolická kapacita vlivem genetických polymorfismů k toxicitě při běžných terapeutických dávkách. Proto např. pacienti s alelami *CYP2C9\*2* a *CYP2C9\*3* vyžadují nižší dávky warfarinu pro dosažení podobného antikoagulačního účinku jako u pacientů s alespoň jednou standardní alelou (García-Martín a kol. 2006, Van Booven, 2010).



Obr. 8. Metabolismus *S*-warfarinu katalyzovaný CYP2C9 a jinými cytochromy. Warfarin vykazuje stereo- a regio-selektivní metabolismus. *S*-warfarin převážně metabolizuje CYP2C9 na 6- a 7-hydroxylované metabolity (Zhou a kol. 2009b).

### 3.1.8. CYP2C19

#### Funkce CYP2C19 v organismu

Stejně tak, jako u předchozí isoformy je CYP2C19 nepostradatelný při metabolismu mnoha léčiv. Typickými substráty jsou např: antiepileptika diazepam, fenytoin a fenobarbiton, inhibitory protonové pumpy esomeprazol, lansoprazol a omeprazol, antidepresiva amitriptylin, citalopram, klomipramin, imipramin, trimipramin a další (Flockhart 2007). Jedná se o enzym, který je přítomen hlavně v játrech, ale vykazuje také významnou katalytickou aktivitu ve střevní stěně. Množství CYP2C19 lze výrazně indukovat o 25–100 % zejména barbituráty nebo etanolem (Hagymási a kol. 2011, Stiborová a kol. 1999).

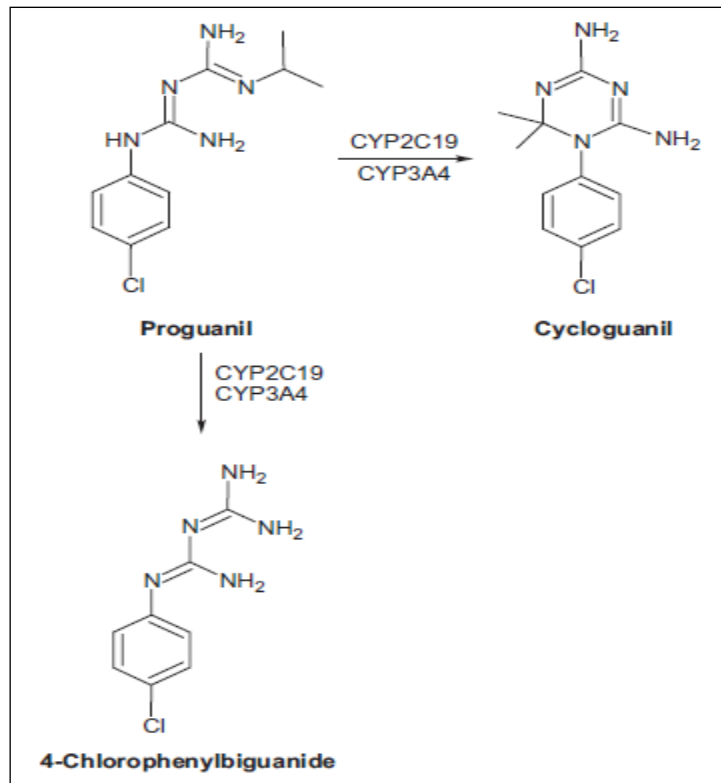
## Polymorfismus CYP2C19

I genetické polymorfismy CYP2C19 se vyskytují s různou frekvencí mezi různými etnickými skupinami. *CYP2C19\*1* představuje standardní typ alely. U pomalých metabolizátorů byly nejčastěji pozorovány dvě alely: *CYP2C19\*2* a *CYP2C19\*3*. U obou alel vede předčasný stop-kodon ke zkrácení proteinu a zároveň k neaktivnímu enzymu. *CYP2C19\*2* se vyskytuje výhradně u bělochů, *CYP2C19\*3* se vyskytuje především u Asiatů. Tito pomalí metabolizátoři představují 2–6 % jedinců evropského původu, 15–20 % Japonců a 10–20 % Afričanů (Hagymási a kol. 2011). Pro zatím bylo prokázáno 34 polymorfních alel a několik dalších subvariant (Sim 2014). Významná je například alela *CYP2C19\*17*, která je zodpovědná za ultra rychlý metabolismus zejména léčiv (Hagymási a kol. 2011).

Zrychlený nebo zpomalený rozpad léčiv, metabolizovaných CYP2C19, je podnětem k individuálním úpravám dávkování s ohledem na fenotyp nebo genotyp CYP 2C19. Pro antidepressiva metabolizovaná CYP2C19 byla nedávno publikována předběžná doporučení úpravy dávkování, kde autoři metaanalýzy Kirchheiner a kol. (2011) odhadli doporučené dávky podle farmakokinetických dat v jednotlivých fenotypových skupinách z dříve publikovaných prací (Slanař 2002).

Antimalarikum proguanil je prostřednictvím CYP2C19 standardně přeměňováno z neaktivního proléčiva na aktivní léčivo (Obr. 9). Díky geneticky podmíněným změnám v metabolické aktivitě enzymu však může snadno docházet k neefektivní terapii malárie (Slanař 2002).





Obr. 9. Metabolismus proguanilu zprostředkovaný CYP2C19 a CYP3A4. Proguanil je metabolizován na aktivní metabolit cykloguanil a neaktivní metabolit 4-chlorofenylbiguanid (Zhou a kol. 2009b).

### 3.1.9. CYP2D6

#### Funkce CYP2D6 v organismu

Cytochrom P450 2D6 je jedním z nejvíce sledovaných CYP ve vztahu ke genetickému polymorfismu, přestože tvoří pouze malé procento všech jaterních CYP (cca. 2–4 %). Vedle jater je tento cytochrom exprimován také v oblastech CNS, včetně substantia nigra. CYP2D6 je jedním z nejdůležitějších enzymů podílejících se na metabolismu xenobiotik, jelikož je odpovědný za metabolismus a odstranění přibližně 25 % klinicky používaných léčiv. Mezi ně patří některá antidepresiva, antipsychotika, antiarytmika, antiemetika, beta-blokátory a opiáty. Z endogenních látek jsou typickými substráty např. serotonin nebo neurosteroidy. Některé léky fungují jako inhibitory aktivity CYP2D6 a některé jako induktory exprese CYP2D6, což vede ke snížení nebo zvýšení katalytické aktivity CYP2D6 a to se může projevit jako lékové interakce (Lynch a Price 2007, Teh a Bertilsson 2012, Wang a kol. 2009).

## **Polymorfismus CYP2D6**

Gen kódující *CYP2D6* patří k tzv. nejpolymerfnějším. Existuje cca 105 alelických variant a řada subvariant (Sim 2014). Mezi nimi jsou plně funkční alely, alely se sníženou funkcí i nefunkční alely. Výsledkem je široké spektrum aktivity enzymu CYP2D6 a zároveň různé metabolické profily jedinců pro tento enzym. Mezi různými etnickými skupinami existuje značná variabilita v distribuci *CYP2D6* alel, což vede k různému procentuálnímu zastoupení PM, IM a RM v dané populaci. Nejběžnější alela u Asiatů (alelová frekvence > 50 %), a tím i možná nejčastější *CYP2D6* alela na světě je *CYP2D6\*10*. I přesto, že se tato alela vyznačuje sníženou funkcí, je v asijské populaci identifikováno pouze 1 % PM. Mezi nejvýznamnější polymorfní varianty patří *CYP2D6\*2*, *\*3*, *\*4*, *\*5*, *\*10*, *\*17*, *\*41* (Ingelman-Sundberg 2005, Zhou 2009a).

Polymorfismus CYP2D6 má nepříznivý vliv zejména na odbourávání velkého množství léčiv a proto má u pacientů velký význam genotypizace a fenotypizace CYP2D6 (Skálová a kol. 2011).

### **3.1.10. CYP2E1**

#### **Funkce CYP2E1 v organismu**

Cytochrom P450 2E1 má velký toxikologický význam zejména proto, že metabolizuje některé toxické a karcinogenní látky (většinou o malé molekulové hmotnosti) a přeměňuje je na reaktivní metabolity. Kromě jater se vyskytuje v plicích, střevě, nebo v jícnu. Nejznámější úloha CYP2E1 spočívá v metabolismu ethanolu. Mimo ethanol enzym biotransformuje endogenní látky, např. aceton, nebo acetal. Z exogenních látek biotransformuje CYP2E1 např. PAH, nitrosaminy, organická rozpouštědla, karcinogenní heterocykly, nebo léčiva (anestetika halotan, enfluran, isofluran a methoxyfluran, analgetikum paracetamol, hypnotika zopiclone a eszopiklon a další). Chlorzoxazon je charakteristický substrát CYP2E1 a zároveň se používá jako marker aktivity CYP2E1 při fenotypizaci populace (Coleman 2010, Flockhart 2007, Skálová a kol. 2011).

CYP2E1 je snadno indukovatelný. Induktorem bývá často jeho substrát. V tomto případě se jako nejznámější induktor udává ethanol, poté aceton, isoniazid, nebo proces hladovění (endogenní syntéza acetonu). Za variabilní expresí enzymu však může stát i genetický polymorfismus. Indukce, nebo polymorfní exprese CYP2E1 může způsobit,

v přítomnosti xenobiotik, trvale zvýšenou produkci reaktivních metabolitů a reaktivních forem kyslíku, což je pravděpodobně hlavním zdrojem poškození jater, nebo zvýšeného rizika vzniku rakoviny (Stiborová a kol. 1999).

### **Polymorfismus CYP2E1**

U genu kódujícího CYP2E1 bylo popsáno velmi málo polymorfních alel oproti ostatním (CYP) biotransformačním enzymům. Databáze udává pouhých sedm variant a deset subvariant (Sim 2014). I přes malou četnost známých polymorfních variant, jsou jejich nositelé o to více náchylnější k onemocnění jater z alkoholismu a k rakovině (Coleman 2010).

Za zmínku stojí alely *CYP2E1*\*5, \*5B, \*6 a \*7B. Alela *CYP2E1*\*6 se nachází asi u 8 % bělošské populace. Alela *CYP2E1*\*5B se nachází pouze u 2 % bělochů, ale je mnohem častější u východních populací a Mexičanů. A varianta *CYP2E1*\*7B existuje asi u 7 % bělochů. Literatura udává, že Japonci mají o 30–40 % nižší aktivitu CYP2E1 v porovnání s bělochy (Coleman 2010).

Některé varianty *CYP2E1*, exprimované častěji než standardní typ alely, zdvojnásobují riziko vzniku rakoviny nosohltanu u kuřáků, způsobují nízkou porodní hmotnost u dětí kuřáček, a také zvyšují riziko vzniku rakoviny jícnu. Polymorfní alela *CYP2E1*\*6 je spojena se zvýšeným rizikem vzniku alkoholismu, rakoviny plic a periferní neuropatie. Homozygoti pro alelu *CYP2E1*\*5B mohou častěji trpět non-alkoholickou steatohepatitidou. Polymorfní alela *CYP2E1*\*5 omezuje indukovatelnost a aktivitu kódovaného enzymu, proto tato varianta souvisí s nižším rizikem rakoviny plic a rakoviny močového měchýře ve východních populacích. Zároveň souvisí také s vyššími riziky vzniku rakoviny tlustého střeva a konečníku u kuřáků, ale nikoliv u nekuřáků. Jedinci nesoucí polymorfní alelu *CYP2E1*\*7B mohou být ohroženi vyšším rizikem rakoviny plic (Coleman 2010).

### 3.1.11. CYP3A4

#### Funkce CYP3A4 v organismu

Nejvýznamnější cytochrom P450 je co do obsahu v lidských tkáních i co do množství substrátů, které metabolizuje, cytochrom P450 3A4. Jedná se o nejrozšířenější a nejuniverzálnější lidský CYP. CYP3A4 přeměňuje až 50 % klinicky používaných léčiv, které buď aktivuje z neaktivního proléčiva na aktivní formu, anebo je rozkládá za účelem vyloučení. Přeměňuje velké množství karcinogenních xenobiotik (např. přírodní produkty aflatoxin B1 a aflatoxin G1, aromatické aminy, PAU a jiné). Z endogenních látek metabolizuje zejména steroidní sloučeniny, např. testosteron, progesteron, kortisol, 17-beta-estradiol. Kromě jater je CYP3A4 přítomen i ve střevě, v mozku, nebo u plodu. CYP 3A4 podléhá významné indukci např. barbituráty, glukokortikoidy, rifampinem, fenobarbitalem a fenytoinem. Na druhou stranu je inhibován např. ketokonazolem, flukonazolem, nebo grapefruitovou šťávou. Grapefruitový významně inhibují aktivitu CYP3A4, což může mít vliv na metabolismus řady léčiv, metabolizovaných CYP3A4. V některých případech může dojít při požití grapefruitové šťávy k fatálním interakcím s některými léky (Flockhart 2007, Stiborová a kol. 1999).

#### Polymorfismus CYP3A4

Pro cytochrom P450 3A4 bylo prozatím hlášeno 26 genových variant a několik subvariant (Sim 2014), které se však vyskytují velmi vzácně (< 1 %). Mezi alely s minimální funkcí ve srovnání se standardním typem patří *CYP3A4\*6* a *CYP3A4\*17*. Alely s mírně sníženou nebo změněnou aktivitou jsou: *CYP3A4\*2*, *\*8*, *\*11*, *\*12*, *\*13*, *\*16* a *\*18*. Nicméně velkou interindividuální variabilitu CYP3A4 má na svědomí spíše indukce a inhibice než genetický polymorfismus (Lee a Goldstein 2005, Sim 2014, Skálová a kol. 2011).

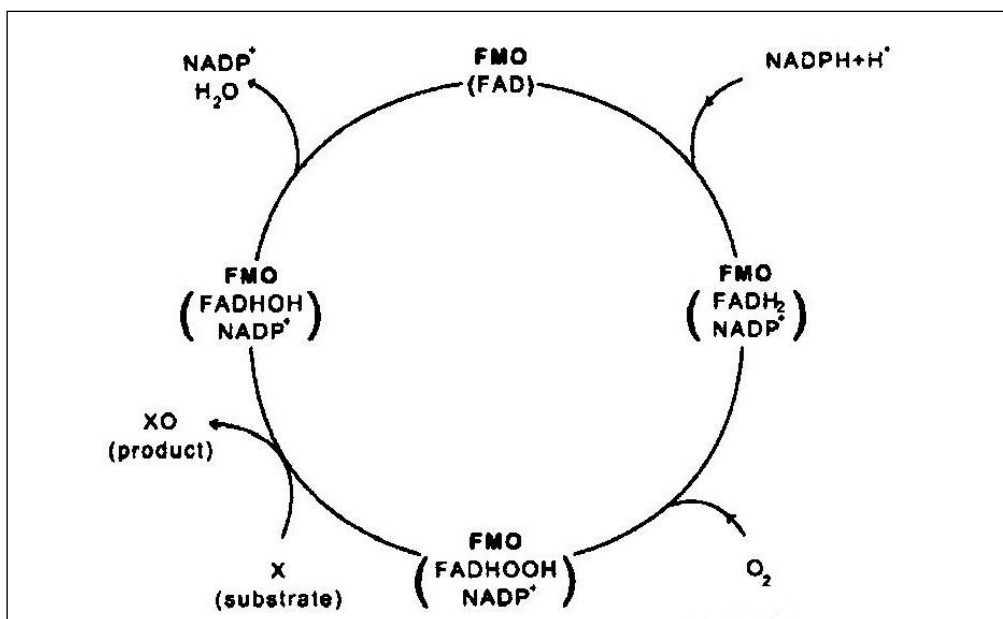
## 3.2. Flavinové monooxygenasy

Kromě CYP, které jsou nepochybně nejvýznamnějšími oxidasami xenobiotik, plní oxidační funkci v biotransformaci xenobiotik i další enzymy např. flavinové monooxygenasy (FMO) (Skálová a kol. 2011).

Jejich úkolem je, stejně jako u ostatních oxidas, převedení lipofilních xenobiotik na polárnější sloučeniny, které budou schopné eliminace, anebo mají za úkol aktivaci neaktivních sloučenin. Flavinové monooxygenasy katalyzují např. oxidaci organických sloučenin, které mají ve své struktuře N, S, Se nebo P nukleofilní heteroatom. Katalyzují také oxidaci některých anorganických iontů ( $\text{HS}^-$ ,  $\Gamma$ ,  $\text{CNS}^-$ ) (Anzenbacher a Zanger 2012, Cashman a Zhang 2006, Skálová a kol. 2011).

FMO jsou membránové proteiny lokalizované na hladkém endoplasmatickém retikulu. Jejich exprese je u lidí soustředěna hlavně v játrech, plicích, ledvinách, mozku a tenkém střevě (Cashman a Zhang 2006).

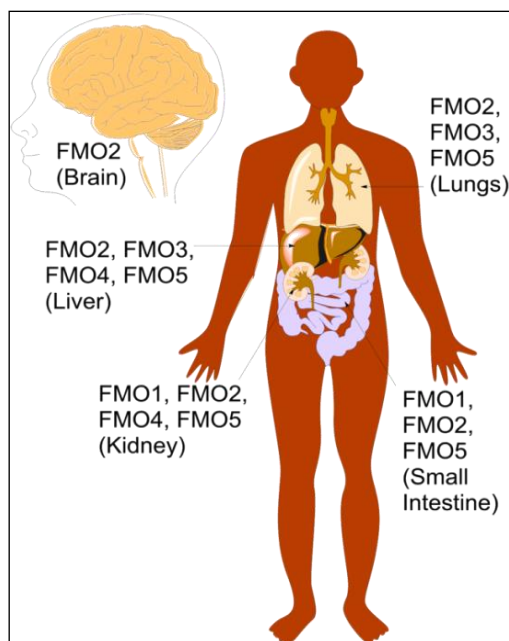
Přestože mají FMO i CYP monooxygenasovou aktivitu, jejich reakční mechanismy se značně liší. I zde je donorem vodíku redukovaný NADPH, ale prostetickou skupinou je u FMO molekula flavinadenindinukleotidu (FAD). Reakční cyklus FMO je iniciován tvorbou komplexu enzym-substrát. Tím dochází ke konformační změně, která zvyšuje rychlost přenosu vodíku z NADPH na FAD. NADPH je oxidován a FAD redukován na  $\text{FADH}_2$ . Molekula  $\text{O}_2$  se pak může vázat na  $\text{FADH}_2$  a vzniká hydroperoxid. Následně je jeden atom kyslíku inkorporován do molekuly substrátu a druhý atom kyslíku zůstává vázán v podobě hydroxidů. Hydroxid je však nestabilní a spontánně konvertuje na FAD za uvolnění molekuly vody (Obr. 10) (Stiborová a kol. 2004).



Obr. 10. Reakční cyklus flavinové monoxygenasy (Anzenbacher a Zanger 2012).

### Funkce flavinové monoxygenasy v organismu

U člověka existuje 5 známých isoformů flavinových monoxygenas (FMO1-FMO5). Jednotlivé formy FMO se od sebe odlišují různou tkáňovou distribucí (Obr. 11) a substrátovou specifitou. Tkáňová distribuce jednotlivých forem FMO je jiná u plodu (převažuje exprese FMO1) i u dospělého jedince (převažuje FMO3). FMO katalyzují zejména biotransformační reakce zvané *N*-oxidace, *S*-oxidace, *Se*-oxidace, nebo *P*-oxidace. Substráty pro tyto reakce mohou být např. primární, sekundární, terciární aminy, fosfonáty, hydraziny, thioly, sulfidy, thiamidy, thiokarbamidy, thiopuriny, selenidy, selenokarbamidy a jiné. Endogenním substrátem pro FMO je trimethylamin. Dosud nebyl u člověka nalezen žádný významný induktor FMO, ani nebyl popsán významný regulační proces exprese. I přesto existuje mezi jedinci velká variabilita v aktivitě těchto enzymů (Coleman 2010, Anzenbacher a Zanger 2012).



Obr. 11. Tkáňová distribuce jednotlivých forem FMO u dospělého člověka (Wikipedia 2015).

### Polymorfismus flavinové monooxygenasy

Interindividuální rozdíly v aktivitě FMO jsou způsobeny velkým množstvím genetických polymorfismů v genu pro FMO. Polymorfismus byl zaznamenán u všech pěti isoform FMO. Nejméně variabilní je *FMO4*, která má 30 polymorfních variant genu. Naopak nejvíce polymorfní isoforma je *FMO2*, která má 57 variant. Studie *FMO3* dosud odhalily cca deset polymorfních alel spojených se sníženou aktivitou, sedm alel pro neaktivní protein a dvě alely se zvýšenou aktivitou *FMO3*. Přibližně 20-25 % bělochů má nejméně jednu nebo více defektních alel ve svém genotypu (Coleman 2010).

Polymorfismus v genech pro FMO není nijak významný, protože substráty FMO mohou být metabolizovány i ostatními enzymy jakou jsou CYP. Výjimku tvoří polymorfismus v genu pro *FMO3*. *FMO3* je hlavní jaterní isoforma dospělého jedince, jejíž význam spočívá v biotransformaci trimethylaminu na *N*-oxid. Mimo jiné metabolizuje i nikotin, nebo léčiva jako je clozapin, amfetamin, metamfetamin, sulindak, nebo tamoxifen. Geneticky podmíněné snížení metabolické aktivity *FMO3* způsobuje poruchu zvanou trimethylaminurie, také známou jako tzv. fish odor syndrome (Coleman 2010, Anzenbacher a Zanger 2012).

### 3.3. Alkoholdehydrogenasa

#### Funkce alkoholdehydrogenasy v organismu

Alkoholdehydrogenasa (ADH) katalyzuje nejen oxidaci etanolu, ale i dalších primárních a sekundárních alkoholů na příslušné aldehydy a ketony. Tento enzym je lokalizován v cytosolu buněk a je přítomen ve vysokých koncentracích v játrech a žaludeční sliznici. Jedná se o dimerní metalloprotein, který má ve své molekule atom zinku. ADH zabezpečuje přeměnu jak alkoholů přijatých konzumací nápojů, tak i alkoholů přirozeně obsažených v potravinách, nebo alkoholů produkovaných bakteriemi GIT. ADH u lidí kóduje sedm různých genů. Rozdělují se však do pěti ADH tříd. První třída ADH se totiž skládá ze 3 isoenzymů, které jsou kódovány geny *ADH1A*, *ADH1B* a *ADH1C*. Alkoholdehydrogenasy jednotlivých tříd se od sebe liší strukturou, tkáňovou distribucí, nebo substrátovou specifitou (Quertemont 2004, Skálová a kol. 2011).

#### Polymorfismus alkoholdehydrogenasy

Ve všech sedmi genech pro ADH bylo dosud nalezeno celkem 103 SNP. Pro gen *ADH1B* existují v různých populacích tři polymorfní varianty (*ADH1B\*1*, *ADH1B\*2*, *ADH1B\*3*). A pro gen *ADH1C* existují dvě (*ADH1C\*1*, *ADH1C\*2*) (Quertemont 2004). Geneticky podmíněné rozdíly v metabolické aktivitě alkoholdehydrogenas mohou souviset s riziky vzniku alkoholové závislosti. Alely *ADH1B\*2*, *ADH1B\*3* a *ADH1C\*1* mají zvýšenou katalytickou aktivitu, etanol je odbouráván rychleji a riziko vzniku alkoholové závislosti je sníženo. Se zvýšeným rizikem alkoholismu naopak může souviset alela *ADH1B\*1* (Birley a kol. 2009).

### 3.4. Aldehyddehydrogenasa

#### Funkce aldehyddehydrogenasy v organismu

Druhý stupeň metabolismu ethanolu je zprostředkován zejména aldehyddehydrogenasou (ALDH). Tento enzym katalyzuje oxidaci aldehydů za vzniku karboxylových kyselin. Stejně jako ADH, ALDH používají  $\text{NAD}^+$  jako kofaktor při detoxikaci endogenních i exogenních aldehydů. ALDH se nacházejí v mnoha tkáních těla, ale v té nejvyšší koncentraci jsou obsaženy v játrech. V buňce mohou být ALDH



umístěny jak v cytosolu, tak v mitochondriích i v mikrosomech. U lidí existují různé isoformy ALDH a rozdělují se do několika rodin. Ve všech ALDH rodinách existují konstitutivní i indukované formy enzymů. Nejvýznamnější isoformy z hlediska oxidace acetaldehydu jsou ALDH1A1, ALDH1B1 a ALDH2 (Quertemont 2004).

### **Polymorfismus aldehyddehydrogenasy**

Největší klinický význam má nepochybně polymorfismus genu *ALDH2*, který je spojen se snížením rizika vzniku alkoholismu. Polymorfní alela *ALDH2\*2* kóduje neaktivní formu enzymu, a to v případě homozygotních jedinců může vést k úplné ztrátě aktivity ALDH2. Vzhledem k tomu, že je mitochondriální ALDH2 hlavním enzymem v metabolismu acetaldehydu, jedinci nesoucí *ALDH2\*2* alely vykazují vysoké koncentrace acetaldehydu v krvi po příjmu i malého množství alkoholu. Kumulace acetaldehydu je pravděpodobně zodpovědná např. za bolesti hlavy, nevolnost, zrudnutí obličeje, sucho v ústech a za další nepříjemné účinky spojené s požitím alkoholu a tzv. kocovinou. Zkušenosti s těmito nepříjemnými příznaky by měli jedince nesoucí alely *ALDH2\*2* vést k větší zdrženlivosti v konzumaci alkoholu a snižovat tak riziko vzniku závislosti na alkoholu. Alela *ALDH2\*2* byla nalezena u bělochů, či černochů velmi zřídka, zato u Asiatů se vyskytuje v 50 % populace (Quertemont 2004, Crabb a kol. 2004).

## **3.5. Epoxidhydrolasa**

### **Funkce epoxidhydrolasy v organismu**

Epoxidy jsou reaktivní meziprodukty vznikající při degradaci některých prokarcinogenních látek. Epoxidhydrolasa (EPH) katalyzuje hydrolýzu těchto i jiných epoxidů za vzniku méně reaktivních diolů (transdihydrodiolů), které lze následně konjugovat a snadněji vyloučit. Obecná úloha EPH spočívá v aktivaci i detoxikaci některých léčiv a ostatních xenobiotik, zejména polutantů životního prostředí. Enzym EPH existuje u lidí ve 4 isoformách, kde EPHX1 je mikrosomální forma a EPHX2 je forma cytosolová. Zbylé dvě formy se značí EPHX3 a EPHX4. EPHX1 se vyskytuje převážně v játrech, ale i v ostatních tkáních (Pinarbasi a kol. 2010).

## **Polymorfismus epoxidhydrolasy**

I v genech pro epoxidhydrolasy bylo objeveno mnoho různých polymorfismů. V genu EPHX1 existují dva hlavní SNP, které významně ovlivňují metabolickou aktivitu EPHX1a spolu s tím i predispozice k rakovině. Polymorfní varianta, která má poloviční metabolickou kapacitu oproti standardní variantě, může být spojena se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny jícnu. Vyskytuje se u 50 % japonské populace a označuje se EPHX1 Y113H (nebo T337C). Druhá významná polymorfní varianta zodpovídá za zrychlený metabolismus o 25 % proti standardní variantě. Díky dostatečně rychlé detoxikaci reaktivních epoxidů působí tato varianta EPHX1 H139R (nebo A416G) v organismu ochrannou funkcí a snižuje se i náchylnost k rakovině. Oba tyto SNP také souvisejí s interindividuální variabilitou v clearanci warfarinu a karbamazepinu zejména u asijských populací. Vedle těchto dvou důležitých polymorfismů bylo v genu EPHX1 nalezeno více než 29 dalších SNP (Coleman 2010, Pinarbasi a kol. 2010).

## **3.6. Butyrylcholinesterasa**

### **Funkce butyrylcholinesterasy v organismu**

Butyrylcholinesterasa (BChE), také známá jako pseudocholinesterasa, je enzym hydrolyzující nejen acetylcholin, ale i jeho strukturní deriváty (např. succinylcholin používaný jako myorelaxant při operacích). Hydrolyzuje také ostatní léčiva jako aspirin, prokain, nebo atropin. A v neposlední řadě zodpovídá za metabolismus kokainu a heroinu (Skálová a kol. 2011, Negrao a kol. 2013).

### **Polymorfismus butyrylcholinesterasy**

Genetický polymorfismus v genu BChE může být klinicky významný, je-li pacient při klinickém zákroku paralyzován succinylcholinovým myorelaxans. Až 4 % kavkazské populace mají alely se sníženou katalytickou aktivitou. Odbourávání succinylcholinu probíhá pomaleji a prodlužuje se tak jeho účinek, jelikož pacienti zůstávají paralyzováni i po probuzení z narkosy. Opravdový problém nastává u jedinců, kteří mají alelu značenou *BChE AA* nebo *BChE SS*, která kóduje BChE s prakticky nulovou aktivitou. 96 % kavkazské populace nosí však standardní alelu, která se značí *BChE UU* (Coleman 2010).

## 4. Polymorfismus enzymů druhé fáze

### 4.1. Glutathion-S-transferasa

#### Funkce glutathion-S-transferasy v organismu

Konjugační reakce s glutathionem mohou probíhat buď spontánně (tj. neenzymaticky), anebo jsou katalyzovány skupinou enzymů nazývanou glutathion-S-transferasy (GST). Konjugace s glutathionem patří mezi nejvýznamnější reakce II. fáze biotransformace. Glutathion přitom vytváří konjugáty s xenobiotiky nebo častěji s jejich metabolity (s elektrofilními produkty I. fáze biotransformace). Vzniklé glutathionové konjugáty (hydrofilnější thioethery) lze vyloučit žlučí, nebo je lze přeměnit na deriváty kyseliny merkapturové a vyloučit močí. Katalytická funkce glutathion-S-transferasy však nespočívá pouze v detoxikaci xenobiotik, ale zároveň i v aktivaci některých látek na reaktivnější produkty. Běžnými substráty glutathion-S-transferasy jsou elektrofilní sloučeniny endogenního i exogenního původu jako chinony, epoxidy, hydroperoxydy, nitrosloučeniny, alkyl- a arylhalogenidy a nenasycené alifatické uhlovodíky. Mezi léčiva metabolizovaná prostřednictvím GST patří např. cyklofosamid, melfalan, acetaminofen, klozapin, furosemid, felbamat, nebo paracetamol. Typickými substráty endogenního původu jsou zejména prostaglandiny a leukotrieny, steroidy, peroxydy vodíku, nebo lipidové hydroperoxydy (Josephy 2010).

Existují dvě velké nadrodiny glutathion-S-transferas: mikrosomální GST a cytosolové GST. Mikrosomální GST jsou kódovány třemi geny (*MGST1–MGST3*). Strukturálně se jedná o homotrimery a označují se zkratkou MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism), což napovídá, že se podílejí na metabolismu prostaglandinů a leukotrienů. Cytosolové GST kóduje 19 genů a rozdělují se do 8 tříd (rodin) na základě sekvenční podobnosti. Třídy GST jsou značeny řeckými písmeny ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ,  $\kappa$ ,  $\zeta$ ,  $\omega$ ,  $\delta$ ). Nicméně v názvu genu je řecké písmeno označující třídu nahrazeno odpovídajícím velkým písmenem (Tab. 3). Homodimerní forma enzymu je vyjádřena např. *GSTA1-1* a heterodimerní forma např. *GSTA1-2*. Jednotlivé třídy GST se od sebe liší zejména tkáňovou lokalizací, substrátová specifita je naopak velmi podobná. Díky této překrývající se substrátové specifitě může být určité xenobiotikum konjugováno prostřednictvím většího počtu isoform GST. Kromě cytosolu

a mikrosomů se mohou GST vyskytovat i v mitochondriích (Anzenbacher a Zanger 2012, Josephy 2010).

Tabulka 3. Cytosolové glutathion-S-transferasy (Vytvořeno podle Josephy 2010).

GST třída	Název genu cytosolové GST
Alfa	<i>GSTA1, GSTA2, GSTA3, GSTA4, GSTA5</i>
Mý	<i>GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4, GSTM5</i>
Pi	<i>GSTP1</i>
Theta	<i>GSTT1, GSTT2, GSTT4</i>
Kappa	<i>GSTK1</i>
Zéta	<i>GSTZ1</i>
Omega	<i>GSTO1, GSTO2</i>
Sigma	<i>GSTS1</i>

Metabolická aktivita GST může být indukována některými barbituráty, PAU, nebo antioxidanty. Inhibice GST je možná prostřednictvím endogenních látek jako je bilirubin, hematin, žlučové kyseliny, nebo kyselina linolenová. Nicméně, malou část interindividuálních rozdílů v expresi a aktivitě GST tvoří i genetický polymorfismus (Skálová a kol. 2011).

### **Polymorfismus glutathion-S-transferasy**

Polymorfnní změny v genech glutathion-S-transferas jsou velmi běžné, co do počtu i do rozšíření mezi etnickými skupinami. Mezi nejvíce studované genotypy patří GST M1, GSTT1 a GSTP1. Nejběžnější polymorfismy GST jsou delece genů pro GSTM1 a GSTT1. Homozygotní jedinci s nefunkční isoformou GSTM1 tvoří asi 50 % kavkazské a asijské populace. Homozygoti s nefunkční isoformou GSTT1 tvoří cca 20 % kavkazské a afroamerické populace a 50 % asijské. V genu *GSTP1* bylo také nalezeno několik SNP ovlivňujících aktivitu enzymu. Snížená metabolická aktivita GST může korelovat s riziky některých druhů rakovin (např. kolorekta, prostaty, prsu) a jiných onemocnění v důsledku zvýšeného oxidačního stresu (Josephy 2010).

## 4.2. *N*-acetyltransferasa 2

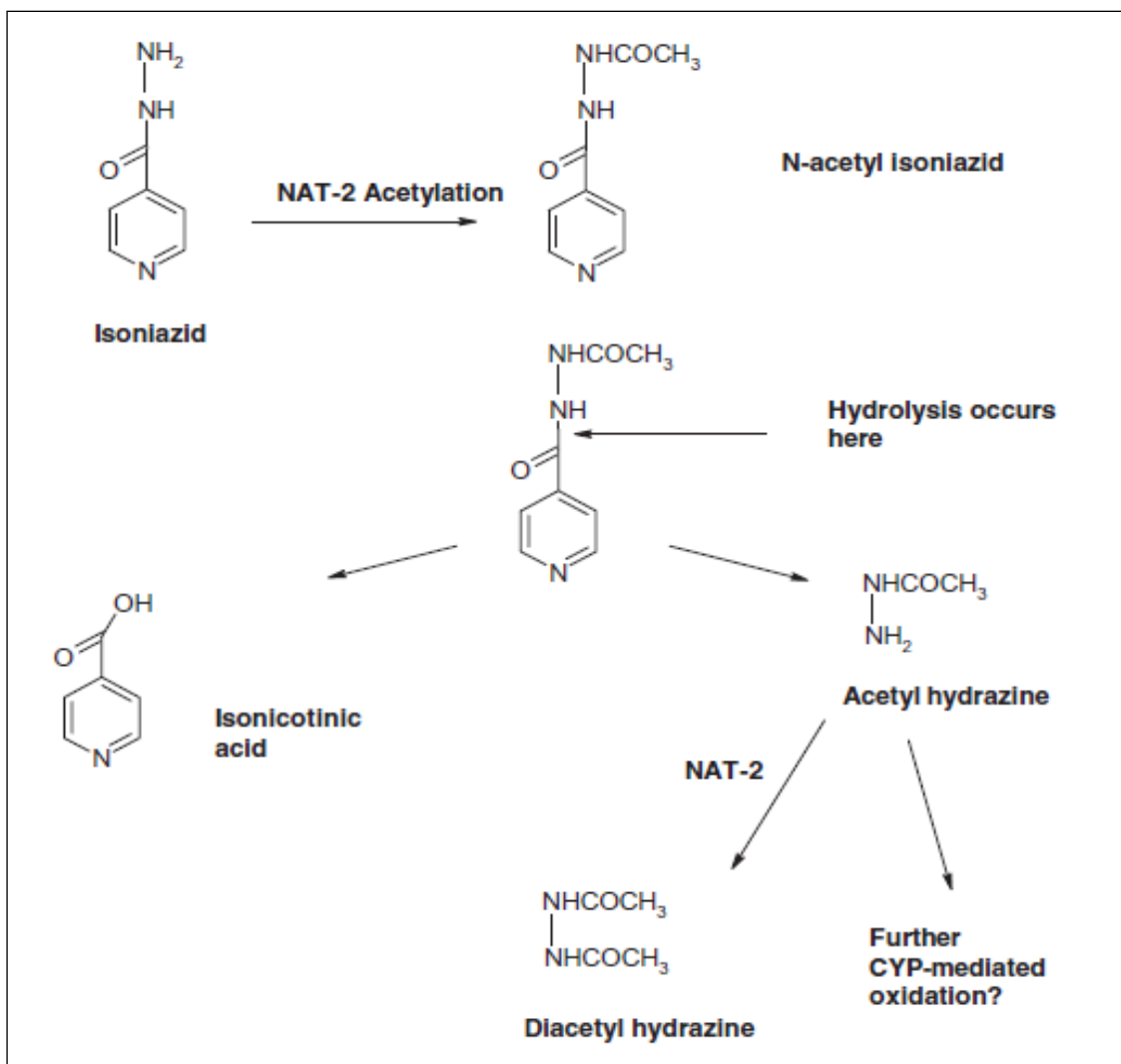
### Funkce *N*-acetyltransferasy 2 v organismu

*N*-acetyltransferasa 2 (NAT2) je cytosolický enzym typický pro játra nebo střeva, který katalyzuje konjugační reakci zvanou *N*-acetylaci. *N*-acetylace probíhá ve dvou krocích, kde je nejprve acetyl, pocházející z acetyl-CoA, navázán na cysteinový zbytek enzymu. Následně je acetyl z enzymu přenesen a navázán na aminoskupinu substrátu. Acetylované produkty (acetamidy) pak mohou být vylučovány močí (Anzenbacher a Zanger 2012).

NAT2 je oproti isoformě NAT1 významnější v detoxikaci, inaktivaci či aktivaci xenobiotik, neboť NAT2 metabolizuje široké spektrum běžných cizorodých látek, zahrnující karcinogeny i léčiva. Typické chemické sloučeniny metabolizované tímto enzymem jsou aromatické aminy a hydraziny, mezi které patří léčiva: isoniazid (Obr. 12), sulfonamidy, hydralazin, prokainamid, dapson, fenelzin, klonazepam, nitrazepam, amonafid, kofein a další. Enzymová aktivita NAT2 může být inhibována řadou inhibitorů (ibuprofen, jodoacetát, tamoxifen), zatímco mechanismy indukce nejsou dosud zcela jasné. Naopak geneticky podmíněná variabilita v aktivitě NAT2 je světu známá už přes 50 let (Zelenková 2000, Skálová a kol. 2011).

### Polymorfismus *N*-acetyltransferasy 2

Polymorfismus NAT2 zodpovědný za rozdílný metabolismus antituberkulotika isoniazidu, byl vůbec prvním zdokumentovaným polymorfismem u biotransformačních enzymů. Od té doby bylo dosud nalezeno 29 alelických variant NAT2, z nichž je většina spojena se sníženou aktivitou. Studování jedinci se pak dělí na pomalé a rychlé acetylátory, jejichž poměry se v různých populacích liší. Klinický význam polymorfismu NAT2 je spojen s defektním metabolismem léčiv, který vede k významným nežádoucím účinkům (periferní neuropatii, leukopenii, přecitlivělosti). Zároveň polymorfismus NAT2 souvisí s interindividuálními rozdíly v inaktivaci nebo v aktivaci karcinogenů, a proto může být spojen se zvýšenými riziky, nebo naopak s ochranou proti některým nádorovým onemocněním (Dostálek a kol. 2006, Zelenková 2000, Slanař 2002).



Obr. 12. Acetylace isoniazidu katalyzovaná *N*-acetyltransferasou 2 (Coleman 2010).

### 4.3. Thiopurin-*S*-methyltransferasa

#### Funkce thiopurin-*S*-methyltransferasy v organismu

Cytosolový enzym thiopurin-*S*-methyltransferasa (TSMT) katalyzuje méně častou konjugační reakci xenobiotik, tzv. *S*-methylaci. Této konjugaci podléhají zejména thioly a dochází při ní k navázání methylové skupiny na molekulu substrátu přes atom síry. Donorem methylu je v tomto případě *S*-adenosylmethionin (Skálová a kol. 2011). Hlavní úloha TSMT v metabolismu xenobiotik spočívá v biodegradaci významných aromatických a heterocyklických thiopurinových léčiv, např. 6-merkaptopurinu, 6-thioguaninu a azathioprinu, které se používají jako protinádorová léčiva a imunosupresiva při transplantacích, autoimunitních onemocněních,

idiopatických střevních zánětech, roztroušené skleróze nebo hematoonkologických onemocněních zejména u dětí (Slanař 2012).

### **Polymorfismus thiopurin-S-methyltransferasy**

V genu pro TSMT bylo identifikováno několik významných polymorfismů, snižujících metabolickou aktivitu enzymu. Mezi čtyři nejčastější defektní alely patří *TSMT\*2*, *\*3A*, *\*3B* a *\*3C* (Riedlová a RichtEROVÁ 2008). V indoevropské populaci existuje 0,3 % jedinců s nedetekovatelnou hladinou metabolické aktivity TSMT a 11 % má tuto aktivitu významně sniženou (Zelenková 2000, Slanař 2012). Důsledkem nestandardní aktivity TSMT je snížená degradace léčiv, která vede ke kumulaci léčiv v organismu a ke vzniku nežádoucích účinků jako jsou myelosuprese, hepatotoxicita, neurotoxicita, záněty sliznic, tumory mozku, nebo akutní leukemie. Fenotypování TSMT je v současnosti zavedeno do rutinní klinické praxe a to za účelem určit vhodné individuální dávkování a omezit vznik nežádoucích účinků (Slanař 2002, Riedlová a RichtEROVÁ 2008).

## **4.4. Katechol-O-methyltransferasa**

### **Funkce katechol-O-methyltransferasy v organismu**

Konjugační reakce, při které se methylová skupina váže na molekulu substrátu přes kyslík, se nazývá *O*-methylace a stejně jako u *S*-methylace je i u této reakce donorem methylu *S*-adenosylmethionin. Tato reakce je katalyzovaná katechol-*O*-methyltransferasou (COMT), mezi jejíž typické substráty patří fenolické sloučeniny, zejména katecholy. Eobiotickými substráty COMT jsou např. katecholaminové neurotransmitery adrenalin, noradrenalin nebo dopamin, dále melanin a ostatní podobné sloučeniny. Xenobiotickými substráty COMT jsou např. levodopa, tj. léčiva používaná při léčbě Parkinsonovy choroby, methyldopa, což jsou antihypertenziva používaná hlavně k léčbě hypertenze v těhotenství, dále isoprenalin, dobutamin nebo rimiterol. Mezi xenobiotika metabolizovaná COMT patří mimo jiné i flavonoidy a katechiny obsažené v čaji. Většina COMT je v lidských tkáních všudypřítomná, nicméně existují rozdíly v distribuci mezi cytosolickou a membránově vázanou formou (Anzenbacher a Zanger 2012).

## **Polymorfismus katechol-*O*-methyltransferasy**

Polymorfismus COMT není nijak vzácný. Z bělošské populace bylo identifikováno 25 % PM, 25% RM a zbylých 50 % bělošské populace jsou jedinci s normální aktivitou COMT. U RM dochází např. k rychlejšímu odbourání levodopa, což může znamenat selhání terapie Parkinsonovy choroby (Skálová a kol. 2011). Kromě toho mohou polymorfnní změny COMT souviset s několika dalšími poruchami jako je schizofrenie, alkoholismus nebo nádory mozku (Anzenbacher a Zanger 2012).

## **4.5. UDP-glukuronosyltransferasa**

### **Funkce UDP-glukuronosyltransferasy v organismu**

Nejběžnější konjugační reakce v metabolismu xenobiotik se nazývá glukuronidace, tj. konjugace s kyselinou glukuronovou. Tato konjugace je katalyzovaná prostřednictvím UDP-glukuronosyltransferasy (UGT), která pro svoji činnost potřebuje koenzym NAD<sup>+</sup> a transportní systémy zajišťující přenos tohoto koenzymu z cytosolu do lumen mikrosomů a následně export vzniklých produktů zpět do cytosolu. UGT je tedy mikrosomální enzym vyskytující se hlavně v játrech, ale i ve většině ostatních tkání. Tkáňová distribuce UGT se liší totiž podle jednotlivých enzymových rodin. Substráty vhodné pro glukuronidaci jsou zejména sloučeniny s nukleofilním heteroatomem O, S, nebo N (např. alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny, aminy, amidy a thioly) a výsledkem jejich konjugace s kyselinou glukuronovou jsou tzv. *O*-, *S*-, nebo *N*-glukuronidy. Tyto produkty mají téměř vždy sníženou biologickou aktivitu, či toxicitu a lze je snadno vyloučit močí. Mezi léčiva metabolizovaná UGT patří paracetamol, oxazepam, morfin a mnoho dalších. Důležitým endogenním substrátem pro UGT je bilirubin nebo steroidní hormony (Skálová a kol. 2011).

Enzymová nadrodina UGT se dělí na 4 rodiny UGT (1, 2, 3 a 8), ale pro člověka mají hlavní význam rodiny 1 a 2. Pro rodinu UGT1 existuje pouze jeden gen, který může kódovat až 9 isoforem UGT (UGT1A1, UGT1A3–UGT1A10). Rodina UGT2 se dále dělí na dvě podrodiny označované UGT2A a UGT2B. Pro podrodinu UGT2A existuje jen jediná lidská isoforma UGT2A1. Zato podrodina UGT2B kóduje sedm různých isoforem UGT (2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15, 2B17, 2B28) (Anzenbacher a Zanger 2012).



Expres UGT může být indukována různými léčivy jako je rifampicin, fenytoin, nebo fenobarbital. Naopak snížení exprese můžou mít na svědomí induktory jako diazepam, nebo cyklosporin (Skálová a kol. 2011).

### **Polymorfismus UDP-glukuronosyltransferasy**

Ze všech polymorfních změn UGT má nepochybně největší klinický význam polymorfismus isoformy UGT1A1. UGT1A1 je hlavní enzym zodpovědný za glukuronidaci bilirubinu, a proto změna jeho metabolické aktivity koreluje se změnami poměru konjugovaného a nekonjugovaného (volného) bilirubinu v krvi. Důsledkem geneticky podmíněného snížení metabolické aktivity UGT1A1 může být nekonjugovaná hyperbilirubinemie, Gilbertův syndrom nebo Criglerův-Najjarův syndrom. Polymorfní alela *UGT1A1*\*28 zodpovídá za sníženou expresi enzymu známou jako Gilbertův syndrom. Tento syndrom nemá sám o sobě žádné patologické důsledky, ale může být příčinou nežádoucích až toxických účinků některých léčiv, která nejsou dostatečně rychle deaktivována UGT1A1 (Coleman 2010, Dostálek a kol. 2006). Criglerův-Najjarův syndrom se vyskytuje ve dvou formách. Těžká forma s úplnou delecí enzymu UGT1A1, vede k neschopnosti konjugovat bilirubin a následně k pronikání nekonjugovaného bilirubinu do mozku a nervového systému, kde způsobuje těžké neurologické poškození (u novorozenců až úmrtí). Mnohem častější je lehká forma Criglerova-Najjarova syndromu se sníženou metabolickou aktivitou UGT1A1. Genetický polymorfismus UGT samozřejmě ovlivňuje kromě metabolismu bilirubinu i metabolismus léčiv a ostatních xenobiotik, nicméně jejich klinický dopad není tak významný, jako v případě bilirubinu (Dostálek a kol. 2006).

## **4.6. Sulfotransferasa**

### **Funkce sulfotransferasy v organismu**

Sulfotransferasa (SULT) je enzym katalyzující přenos sulfonové funkční skupiny ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) z univerzálního donoru (3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát) na substráty obsahující hydroxylové skupiny nebo aminoskupiny, nejčastěji alkoholy, fenoly nebo aminy. Tato konjugační reakce katalyzovaná SULT se nazývá sulfonace. Z endogenních sloučenin podléhají sulfonaci zejména neurotransmitery jako dopamin, noradrenalin nebo serotonin, a nebo steroidní a thyroïdní hormony. Z xenobiotik podléhají sulfonaci

např. hydroxylované aromatické aminy, hydroxylované PAU, nebo léčiva paracetamol či tamoxifen a mnoho dalších (Anzenbacher a Zanger 2012). Produkty sulfonace jsou snadno vylučitelné organické sulfáty. Některé produkty mohou být nestabilní a dále podléhají hydrolýze za vzniku reaktivních metabolitů, které se mohou vázat s DNA, vytvářet adukty a iniciovat tak chemickou karcinogenezi (Skálová a kol. 2011, Anzenbacher a Zanger 2012). Sulfotransferasy se vyskytují v cytosolu i v membránách buněk jater, plic, ledvin, střeva nebo u plodu (Anzenbacher a Zanger 2012). U lidí existují tři významné enzymové rodiny SULT1, SULT2 a SULT3 (Skálová a kol. 2011).

### **Polymorfismus sulfotransferasy**

Katalytická aktivita SULT je stejně jako u ostatních enzymů ovlivněna i geneticky podmíněnou variabilitou. Nejvýznamnější polymorfismus byl odhalen u isoformy SULT1A1. Pro tuto isoformu existují tři varianty, *SULT1A1\*1* (standardní alela), *SULT1A1\*2* a *SULT1A1\*3*. Polymorfní varianta *SULT1A1\*2* se liší od ostatních pouze v jedné aminokyselině, přesto má velký vliv na stabilitu a katalytickou aktivitu isoformy SULT1A1. *SULT1A1\*2* se vyskytuje u 32 % kavkazské populace a její aktivita je snížena (Coleman 2010). Polymorfní *SULT1A1\*2* ovlivňuje zejména metabolismus tamoxifenu, neboť jedincům s touto variantou zůstávají aktivní metabolity tamoxifenu v těle delší dobu, což na jednu stranu zvyšuje účinnost tohoto léčiva, ale na druhou stranu se zvyšuje riziko nežádoucích vedlejších účinků (Coleman 2010, Skálová a kol. 2011). Některé genetické polymorfismy nalezené u isoformy SULT1A3 mají také svůj význam, protože souvisejí s interindividuální variabilitou v odbourávání paracetamolu (Skálová a kol. 2011).

## **4.7. Transportéry**

Jako transportéry neboli přenašeče se označují proteiny lokalizované v membráně, které uskutečňují přenos látek přes lipidovou dvojvrstvu. Velké množství těchto membránových proteinů umožňuje spíše transport eobiotik, ale existuje i několik desítek transportních proteinů, které přenášejí zejména xenobiotika (Skálová a kol. 2011).

Mezi proteiny podléhající polymorfismu patří i transportní proteiny z rodiny SLC i ABC. U transportních systémů BCRP, P-gP, MRP a OATP bylo zjištěno mnoho

polymorfismů, ale o jejich klinickém významu je dosud známo jen málo (Coleman 2010).

## Závěr

Výskyt polymorfních alel u příslušného biotransformačního enzymu souvisí se změnami jeho enzymové aktivity a to buď ovlivněním jeho funkčnosti, nebo jeho množstvím. Polymorfní alely mohou totiž kódovat defektní nebo nefunkční enzymy anebo geneticky podmíněnou indukci nebo delecii enzymu. Zvýšení nebo snížení metabolické aktivity vede k nestandardní biotransformaci a to může iniciovat vznik nejrůznějších onemocnění (Mráčková 1998).

Zásadní dopad na lidské zdraví mají polymorfismy například u takových biotransformačních enzymů, které katalyzují aktivaci prokarcinogenních látek na karcinogenní (převážně CYP1A1, 1A2, 2E1 a 3A4) (Stiborová a kol. 1999). Dojde-li vlivem polymorfismu ke zvýšení aktivity tohoto enzymu, analogicky se zvyšuje i aktivace prokarcinogenních látek a vzniká větší množství reaktivních metabolitů. Reaktivní metabolity vytvářejí DNA adukty, které mají potenciál způsobovat mutace a zvyšují se tak predispozice jedince k rozvoji chemické karcinogeneze a ke vzniku nádorových onemocnění (Sachse 2003). Mimo rakoviny zodpovídá polymorfismus biotransformačních enzymů i za ostatní poruchy metabolismu vyúsťující v další onemocnění. Příkladem může být polymorfní varianta *CYP1A2\*1C* kódující méně aktivní CYP1A2 u kuřáků, která způsobuje pomalejší odbourávání kofeinu. Výsledkem kumulace kofeinu v organismu je zvýšené riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Womack 2012). Dalším příkladem jsou homozygotní jedinci pro *CYP2E1\*5B*, kteří častěji trpí non-alkoholickou steatohepatitidou (Coleman 2010). Další poruchou způsobenou genetickým polymorfismem může být trimethylaminurie neboli tzv. fish odor syndrom u jedinců s méně funkční *FMO3* (Anzenbacher a Zanger 2012)

Co se týče biotransformačních enzymů, které metabolizují léčiva, má i jejich polymorfismus zásadní dopad na lidské zdraví, neboť zodpovídá za interindividuální variabilitu v odpovědi na léčbu. To znamená, že každý pacient má jiné genetické predispozice pro metabolismus daného léčiva, jímž je léčen. Je-li aktivita enzymu metabolizujícího léčivo snížena nebo zvýšena, může dojít k selhání farmakoterapie, vzniku vedlejších nežádoucích účinků nebo předávkování (Slanař 2002). Příkladem toho může být léčba rakoviny prsu paklitaxelem. Jelikož pacienti s polymorfní alelou *CYP2C8\*3* odbourávají paklitaxel pomaleji, léčivo se kumuluje v organismu a to zvyšuje riziko vzniku paklitaxel-indukované neuropatie (Hertz a kol. 2013). Klinickým

důsledkem polymorfismu CYP2C9 je mimo jiné i nedostatečná aktivace antimalarika proguanilu na aktivní léčivo, což může vést k selhání léčby malárie (Slanař 2002). Za selhání léčby Parkinsonovy choroby zodpovídá zrychlené odbourávání léčiva levodopa, které je geneticky podmíněné zvýšením metabolické aktivity COMT (Skálová a kol. 2011). Důsledkem nestandardní aktivity TSMT je kumulace léčiv v organismu s následným vznikem nežádoucích účinků jako jsou myelosuprese, hepatotoxicita, neurotoxicita, záněty sliznic, tumory mozku, nebo akutní leukemie (Riedlová a Richterová 2008).

Nežádoucím účinkům a neúčinné farmakoterapii lze v některých případech předcházet, a to stanovením genotypu nebo fenotypu enzymu metabolizujícího léčivo. V současné době je v rutinní klinické praxi zavedena genotypizace jen několika málo genů, z nichž nejžádanější farmakogenetické vyšetření jsou genotypizace *TSMT*, *CYP2C9*, *UGT1A1* a dalších. Díky genotypizaci lze předpovědět rychlost odbourání / aktivování léčiva a z toho lze usuzovat na změny dávkování. Tomu se říká individualizace léčby nebo také personalizovaná medicína. Příkladem je genotypizace *CYP2C9* před zahájením léčby *S-warfarinem* a následná redukce dávek v případě nálezů polymorfních alel *CYP2C9\*2* a *CYP2C9\*3* (Riedlová a Richterová 2008, Slanař 2012). Dosud byly popisovány pouze nepříznivé vlivy polymorfismu, avšak polymorfismus biotransformačních enzymů může znamenat pro lidský organismus i výhody. Například polymorfní varianta *EPHX1 H139R* zodpovídá za zrychlený metabolismus, díky dostatečně rychlé detoxikaci reaktivních epoxidů působí tato varianta ochrannou funkcí a snižuje se i náchylnost k rakovině (Coleman 2010).

V rámci této bakalářské práce byly vybrány některé významné biotransformační enzymy, u nichž byly následně popsány jejich dosud nejznámější polymorfismy. Na příkladech bylo uvedeno, jaké jsou důsledky některých polymorfních změn biotransformačních enzymů, a zároveň byla osvětlena souvislost polymorfismu se zvýšenými riziky vzniku rakoviny nebo jiných onemocnění.

## Seznam použitých zkratek

A	adenin
ADH	alkoholdehydrogenasa
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
AK	aminokyseliny
ALDH	aldehyddehydrogenasa
ATP	adenosintrifosfát
B[a]P	benzo- <i>a</i> -pyren
BChE	butyrylcholinesterasa
bp	páry bází
C	cytosin
CNS	centrální nervový systém
CYP	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EPH	epoxidhydrolasa
FAD	flavinadenindinukleotid
Fe	železo
FMN	flavinmononukleotid
FMO	flavinové monooxygenasy
G	guanin
GIT	gastrointestinální trakt
GST	glutathion- <i>S</i> -transferasa
HAA	heterocyklické aromatické aminy

IM	intermediární metabolizátor
K	lyzin
MAPEG metabolism	membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione
NAD <sup>+</sup>	oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NAT2	N-acetyltransferasa 2
NNK	4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon
O <sub>2</sub>	kyslík
P	pigment
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenoly
PM	pomalý metabolizátor
R	arginin
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RH	substrát reakce
RM	rychlý metabolizátor
RNA	ribonukleová kyselina
ROH	monooxygenační produkt reakce
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
STR	short tandem repeats
T	thymin

TSMT	thiopurin- <i>S</i> -methyltransferasa
UV-VIS	ultrafialový-viditeľný
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
VNDR	variable number of dinucleotid repeat



## Seznam použité literatury

Anzenbacher P., Zanger U. M. (2012) *Metabolism of Drug and Other Xenobiotics*. John Wiley & Sons. 1 vyd.

Birley A. J., James M. R., Dickson P. A., Montgomery G. W., Heath A. C., Martin N. G., Whitfield J. B. (2009) ADH single nucleotide polymorphism associations with alcohol metabolism *in vivo*. *Hum mol genet.* 18(8), 1533-1542. doi: 10.1093/hmg/ddp060.

Cashman J. R., Zhang J. (2006) Human flavin-containing monooxygenases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46(2), 65-100. doi: 10.1146 / annurev.pharmtox.46.120604.141043.

Coleman M. D. (2010) *Human Drug Metabolism*. John Wiley & Sons. 2. vyd.

Coon M. J. (2002) Enzyme ingenuity in biological oxidations: a trail leading to cytochrome P450. *J Biol Chem.* 277(32), 28351-28363.

Crabb D. W., Matsumoto M., Chang D., Jsi M. (2004) Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc Nutr Soc.* 63(1), 49-63. doi: 10.1079 / PNS2003327.

Daraki A., Zachaki S., Koromila T., Diamantopolou P., Pantelias G. E., Sambani C., Aleporou V., Kollia P., Manola K. N. (2014) The G516T CYP2B6 germline polymorphism affects the risk of acute myeloid leukemia and is associated with specific chromosomal abnormalities. *PloS One.* 9(2). doi: 10.1371 / journal.pone.0088879.

Dostálek M. a kol. (2006) *Farmakokinetika*. Grada Publishing a.s. 1. vyd.

Ehrmann J., Hůlek P. a kol. (2014) *Hepatologie*. Grada Publishing a. s. 2. vyd.

Flockhart D. A. (2007) *Drug Interactions – Cytochrome P450 Drug Interaction Table*. [cit. 2015-02-01].

Dostupné z: <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/clinical-table/>

Fontana J., Trnka J., Maďa P., Ivák P., a kol. (2013) *Játra a biotransformace xenobiotik – Funkce buněk a lidského těla. Multimediální skripta*. [cit. 2015-03-12].

Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/ix-travici-soustava/5-jatra-a-biotransformace-xenobiotik/>

García-Martín E., Martínez C., Ladero J. M., Aqúndez J. A. (2006) Interethnic and intraethnic variability of CYP 2C8 and CYP 2C9 polymorphisms in healthy individuals. *Mol Diagn Ther.* 10(1), 29-40. doi:10,1007 / BF03256440.

*Genetics Home Reference – What are single nucleotide polymorphisms (SNPs)?*  
Poslední revize 28. 04. 2015. [cit. 2015-04-30].

Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/genomicresearch/snp>

Hagymási K., Müllner K., Herszényi L., Tulassay Z. (2011) Update on the Pharmacogenomics of Proton Pump Inhibitors. *Pharmacogenomics.* 12(6), 873-888. doi: 10.2217/pgs.11.4.

Hertz D. L., Roy S., Motsinger-Reif A. A., Drobish A., Clark L. S., McLeod H. L., Carey L. A., Dees E. C. (2013) CYP2C8\*3 increases risk of neuropathy in breast cancer patients treated with paclitaxel. *Ann Oncol.* 24(6), 1472-1478. doi: 10.1093/annonc/mdt018.

Chang I., Fukuhara S., Wong D. K., Gill A., Mitsui Y., Majid S., Saini S., Yamamura S., Chiyomaru T., Hirata H., Ueno K., Arora S., Shahryari V., Deng G., Tabatabai Z. L., Greene K. L., Shin D. M., Enokida H., Shiina H., Nonomura N., Dahiya R., Tanaka Y. (2014) Cytochrome P450 1B1 polymorphisms and risk of renal cell carcinoma in men. *Tumor Biol.* 35(10), 10223-10230. doi: 10.1007/s13277-014-2292-3.

Ingleman-Sundberg M. (2005) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* 5, 6-13. doi:10.1038/sj.tpj.6500285.

Jiang W., Sun G., Xiong J., Xi X., Shi Z. (2014) Association of *CYP1B1* L432V polymorphism with urinary cancer susceptibility: a meta-analysis. *Diagn Pathol.* 9, 113. doi: 10.1186/1746-1596-9-113.

Joseph P. D. (2010) Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum Genomics Proteomics.* 2, 876-940. doi: 10.4061/2010/876940.

Kirchheiner J., Brosen K., Dahl M. L., Gram L. F., Kasper S., Roots I., Sjöqvist F., Spina E., Brockmüller J. (2001) CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages. *Acta Psychiatr Scand.* 104(3), 173-192.

Kotlářová L., Skála B. (2011) Cílená detoxikace jako podpora účinné farmakoterapie. *Practicus.* 10(3), 28-31.

Kratochvíl B. (2013) *Polymorfismus 1 – základní pojmy, význam, teorie*. [cit. 2015-03-17]. Dostupné z: <http://tresen.vscht.cz/min/sites/default/files/Polymorfismus%20I%20-%20z%C3%A1kladn%C3%AD%20pojmy,%20v%C3%BDznam,%20teorie%202013.pdf>

Kvasničková E. (1995) *Xenobiochemie*. Praha Karolinum. 1. vyd.

Lee S. J., Goldstein J. A. (2005) Functionally defective or altered CYP3A4 and CYP3A5 single nucleotide polymorphisms and their detection with genotyping tests. *Pharmacogenomics.* 6(4), 357-371. doi: 10,1517 / 14622416.6.4.357.

*Learn.Genetics – Making SNPs Make Sense*. Poslední revize 22. 06. 2014. [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: <http://learn.genetics.utah.edu/content/pharma/snips/>

Lynch T., Price A. (2007) The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician*. 76(3), 391-396.

Ma G., Lu A. Y. (2007) CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and *in vivo* studies. *Drug Metab Dispos*. 35(7), 1009-1016. doi: 10.1124 / dmd.107.015826.

Mráčková G. (1998) Metabolický polymorfismus: faktor individuální vnímavosti k procesu karcinogeneze. *Biologické listy*. 63(3), 161-184.

Mukonzo J. K., Owen J. S., Oqwal-Okeng J., Kuteesa R. B., Nanzigu S., Sewankambo N., Thabane L., Gustafsson L. L., Ross C., Aklillu E. (2014) Pharmacogenetic-based efavirenz dose modification: suggestions for an African population and the different CYP2B6 genotypes. *PLoS One*. 9(1), 86919. doi: 10.1371/journal.pone.0086919.

Negrao A. B., Pereira A. C., Guindalini C., Santos H. C., Messas G. P., Laranjeira R., Vallada H. (2013) Butyrylcholinesterase genetic variants: association with cocaine dependence and related phenotypes. *Plos One*. 8(11), 80505. doi: 10.1371/journal.pone.0080505.

Pilguian M., Zhu A. Z., Zhou Q., Benowitz N. L., Ahluwalia J. S., Sanderson C. L., Tyndale R. F. (2014) Novel CYP2A6 variants identified in African Americans are associated with slow nicotine metabolism in vitro and in vivo. *Pharmacogenet Genomics*. 24(2), 118-128. doi: 10.1097/FPC.0000000000000026.

Pinarbasi H., Silig Y., Pinarbasi E. (2010) Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms. *Mol Med Rep*. 3(4), 723-727. doi: 10.3892/mmr\_00000324.

Quertemont E. (2004) Genetic polymorphism in ethanol metabolism: acetaldehyde contribution to alcohol abuse and alcoholism. *Molecular Psychiatry*. 9(6), 570-581. doi:10.1038/sj.mp.4001497.

Rettie A. E., Jones J. P. (2005) Clinical and toxicological relevance of CYP 2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45(2), 477-494. doi: 10.1146 / annurev.pharmtox.45.120403.095821.

Riedlová P., Richterová R. (2008) Farmakogenetika v laboratorní praxi. *FONS.* 18(1), 20-24.

Řehout V. a kol. (2003) *Základy genetiky a poradenství – Genetický polymorfismus.* [cit. 2014-07-10]. Dostupné z: [http://www.zsf.jcu.cz/cs/katedra/katedra-klinickyh-a-preklinickyh-oboru/import/ucebni\\_texty/zaklady-genetiky-a-poradenstvi/10.pdf/view](http://www.zsf.jcu.cz/cs/katedra/katedra-klinickyh-a-preklinickyh-oboru/import/ucebni_texty/zaklady-genetiky-a-poradenstvi/10.pdf/view)

Sachse C., Bhambra U., Smith G., Lightfoot J. T., Barrett J. H., Scollay J., Garner R. C., Boobis A. R., Wolf C. R., Gooderham N. J. (2003) Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *Br J Clin Pharmacol.* 55(1), 68-76. doi: 10.1046/j.1365-2125.2003.01733.x.

Sim S. C. (2014) *The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database.* [cit. 2015-02-01]. Dostupné z: <http://www.cypalleles.ki.se/>

Skálová L., Boušová I. a kol. (2011) *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik.* Praha Karolinum. 1. vyd.

Slanař, O. (2002) Genetický polymorfismus metabolismu léčiv. *Postgraduální medicína.* 4(3), 324-330.

Slanař O. (2012) Farmakogenomika – současnost, budoucnost, perspektiva. *Klin Farmakol Farm.* 26(3), 126-130.

Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy.* 93(4), 229-237.

Stiborová M., Hudeček J., Páca J., Martínek V. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické listy.* 98(10), 876-890.

Šeda O., Liška F., Šedová L. (2006) *Aktuální genetika – Multimediální učebnice lékařské biologie, genetiky a genomiky – Repetitivní DNA*. [cit. 2014-07-11].

Dostupné z: [http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/repetitivni\\_dna.htm](http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/repetitivni_dna.htm)

Teh L. K., Bertilsson L. (2012) Pharmacogenomics of CYP 2D6: molecular genetics, interethnic differences and clinical importance. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27(1), 55-67. doi: 10.2133/dmpk.DMPK-11-RV-121.

Van Booven D., Marsh S., McLeod H., Carrillo M. W., Sangkuhl K., Klein T. E., Altman R. B. (2010) Cytochrom P450 2C9 - CYP 2C9. *Pharmacogenet Genomics.* 20(4), 277-281. doi: 10.1097/FPC.0b013e3283349e84.

Wang B., Yang L., Zhang X., Huang S., Bartlam M., Zhou S. F. (2009) New insights into the structural characteristics and functional relevance of the human cytochrome P450 2D6 enzyme. *Drug Metab Rev.* 41(4), 573-643. doi: 10.1080/03602530903118729.

Wang H., Zhang Z., Han S., Lu Y., Feng F., Yuan J. (2012) CYP1A2 rs762551 polymorphism contributes to cancer susceptibility: a meta-analysis from 19 case-control studies. *BMC Cancer.* 12, 528. doi:10.1186/1471-2407-12-528.

*Wikimedia commons – Proportion of drugs metabolized by different CYPs.png*. Poslední revize 06. 02. 2010. [cit. 2015-03-21]. Dostupné z: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Proportion\\_of\\_drugs\\_metabolized\\_by\\_differen\\_t\\_CYPs.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Proportion_of_drugs_metabolized_by_differen_t_CYPs.png)

*Wikipedia – Flavin-containing monooxygenase*. Poslední revize 16. 02. 2015. [cit. 2015-03-17]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Anatomy\\_Pic\\_Big\\_Labels.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Anatomy_Pic_Big_Labels.png)

Womack Ch. J., Saunders M. J., Bechtel M. K., Bolton D. J., Martin M., Luden N. D., Dunham W., Hancock M. (2012) The influence of a CYP1A2 polymorphism on the ergogenic effects of caffeine. *J Int Soc Sports Nutr.* 9(1), 7. doi:10.1186/1550-2783-9-7.

Zahradníček T. (2013) Slovník cizích slov. TZ-one. 1.vyd.

Zelenková O. (2000) Farmakogenetika lékového metabolismu. *Postgraduální medicína*. 2(6), 688-692.

Zhou S. F. (2009a) Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet*. 48(11), 689-723. doi: 10.2165/11318030-000000000-00000.

Zhou S. F., Liu J. P., Chowbay B. (2009b) Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev*. 41(2), 89-295. doi: 10.1080/03602530902843483.

Zhou S. F., Wang B., Yang L. P., Liu J. P. (2010) Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. *Drug Metab Rev*. 42(2), 268-354. doi: 10.3109/03602530903286476.

Zvárová J., Mazura I., Svatoš, J. (2001) Stochastická genetika. Genetický polymorfismus. Praha Karolinum. 1. vyd.