

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

**GENETICKY PODMÍNĚNÁ VARIABILITA
METABOLIZMU LÉČIV**

MUDr. Ondřej Slanař

AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE

Obor farmakologie a toxikologie

Srpen 2006

GENETICKY PODMÍNĚNÁ VARIABILITA METABOLIZMU LÉČIV

Dizertační práce byla vypracována v rámci prezenčního doktorského studia ve Farmakologickém ústavu 1. LF UK a VFN v Praze.

Autor: MUDr. Ondřej Slanař
Farmakologický ústav 1. LF UK a VFN
Na Bojišti 1, 120 00 Praha 2

Školitel: prof. MUDr. František Perlík, DrSc.
Farmakologický ústav 1. LF UK a VFN
Albertov 4, 128 00 Praha 2

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba dizertační práce se koná dne

před komisí pro obhajoby dizertačních prací, oborová rada č. 10

Farmakologie a toxikologie v

.....

v hodin.

S dizertací je možno se seznámit na odd. vědy děkanátu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze 2, Kateřinská 32.

Předseda oborové rady

prof. MUDr. Sixtus Hynie, DrSc.

Albertov 4, 128 00 Praha 2

Souhrn

Metabolismus léčiv je jednou ze základních podmínek eliminace podané dávky z organismu. Enzymatické systémy se u člověka vyznačují významnou interindividuální variabilitou aktivity, která je podmíněna jak genetickými, tak i epigenetickými faktory. Klinické projevy individuálních rozdílů mezi jednotlivci mohou být značné; od selhání terapie až po projevy toxicity a častý výskyt lékových interakcí.

Cílem práce bylo posoudit vliv geneticky podmíněné variability odbourávání léčiv na jejich farmakokinetiku a farmakodynamiku a stanovit možnosti aplikace vybraných postupů fenotypizace/genotypizace v podmínkách klinické praxe, např. při posouzení predispozic v rámci hodnocení průběhu a vzniku onemocnění nebo pro predikci lékové odpovědi (NÚL). Dizertační práce shrnuje zejména publikované práce z této oblasti.

U látky tramadolu jsme se zabývali geneticky podmíněnými změnami farmakokinetiky a léčivem navozené miózy ve skupině zdravých dobrovolníků se známým genotypem enzymu 2D6 cytochromu P450 (CYP2D6). Nejnižší koncentrace hlavního aktivního metabolitu (*O*-demetyltramadolu) a zároveň nejvyšší koncentrace mateřské látky jsme naměřili ve všech odběrových intervalech u pomalých metabolizátorů (PM) ve srovnání s intermediárními (IM) a rychlými metabolizátory (EM). Podle získaných výsledků by bylo možné použít metabolického poměru (MR) koncentrací tramadolu/*O*-demetyltramadolu k fenotypovému odlišení PM od EM s více než 99%ní přesností. U maximální léčivem navozené miózy (E_{max}) dochází k částečnému překryvu hodnot mezi genotypovými skupinami, nicméně u žádného z PM není E_{max} vyšší než 1mm. Fenotypizace CYP2D6 je tradičně prováděna pomocí metabolického poměru kumulativní exkrece debrisoquinu a jeho metabolitů v moči. Zabývali jsme se exkrecí této látky u zdravých dobrovolníků se známým genotypem. Exkrece je podle očekávání také závislá na genotypu CYP2D6. Naše publikace navíc popisuje nový a dosud neznámý metabolit 3,4-dehydrodebrisoquin, jehož eliminace do moči je u lidí závislá na aktivitě CYP2D6. Zahrnutí nového metabolitu do tradičního metabolického poměru (MR) ovlivňuje získané výsledky. Zda vede pomínutí metabolitu k chybnému zařazení fenotypizovaných subjektů, případně u jakého procenta vyšetření k této chybě dochází, není známo. Práce je rovněž ilustrací možností, které skýtají nejmodernější analytické metody v oblasti farmakogenetiky.

GENETICKY PODMÍNĚNÁ VARIABILITA METABOLIZMU LÉČIV

Pro fenotypizaci CYP1A2 jsme použili coffein a odpovídající metabolický poměr paraxantin/coffein ze slin. Hodnotili jsme vliv onemocnění jaterní cirhózy na MR jako ukazatel metabolické funkce jater. Metabolický poměr u nemocných byl statisticky významně nižší než u zdravých subjektů. Fenotypizace coffeinem může přispět k objektivizaci metabolické kapacity jater u tohoto onemocnění.

Dále jsme sledovali, zda je aktivita CYP2D6 predisponujícím faktorem pro vznik a nebo progresi familiární adenoamatózní polypózy. Frekvence PM se ve skupině pacientů signifikantně nelišila od zdravých kontrolních subjektů, ale velikost souboru 30 pacientů nebyla pro tento účel dostačující. Nalezli jsme nicméně vyšší metabolický poměr u pacientů s prokázanými maligními změnami v polypech ve srovnání s pacienty bez přítomnosti maligních změn. Tato tendence může naznačovat podíl CYP2D6 na progresi onemocnění.

Přiložené kasuistiky ilustrují zásadní význam fenotypu PM pro výskyt závažné myelotoxicity jako následek podávání velmi nízkých dávek azathioprinu. Myelosuprese se u pacientky objevila krátce po zahájení léčby v dávce 50 mg/den. Retrospektivně potvrzený kompletní deficit aktivity thiopurin S-metyltransferázy (TPMT) způsobeným homozygotním genotypem pro funkčně deficitní alelu *TPMT*3A* byl příčinou vzniku závažného nežádoucího účinku.

Závěrem lze konstatovat, že farmakokinetika některých léčiv v organizmu a jejich farmakodynamické účinky jsou významně závislé na genotypu enzymatických cest jejich biotransformace, a případný geneticky podmíněný deficit odbourávání léčiva může být příčinou závažných nežádoucích účinků. Fenotypizace může být zatížena potenciální chybou vyplývající z přítomnosti neznámých metabolitů, ale zároveň umožňuje posoudit aktuální stav metabolismu, např. progresi jaterních onemocnění. Znalost aktivity biotransformačních procesů před zahájením léčby a odpovídající individualizace dávkování může přispět k racionalizaci farmakoterapie.

Summary

Drug metabolism is one of the key processes allowing to eliminate the administered dose. High interindividual variability of the activity of drug metabolizing enzymes is caused by many genetic and epigenetic factors. This variation can result in substantial differences in clinical response to the drug, ranging from failure of the therapy to appearance of toxic side effects or frequent onset of drug-drug interactions.

The aim of the thesis was to evaluate the influence of genetically determined variability in drug metabolizing enzymes activity on the drug pharmacokinetics, pharmacodynamics and to assess whether either phenotyping or genotyping can be effectively applied under the naturalistic conditions of routine clinical practice, for e.g. as a prediction tool during to assess individual risk of development and progress of a disease or to forecast the drug response. The thesis mainly summarizes previously published articles on the topic.

We have studied genetically determined variability of tramadol pharmacokinetics as well as drug-induced miosis in healthy volunteers with known CYP2D6 status. The lowest blood concentrations of principal active metabolite O-demethyltramadol accompanied by the highest levels of the parent compound at all sampling intervals up to 12 hours post-dose were found in the group of poor metabolizers (PMs) in comparison with intermediate (IMs) and extensive metabolizers (EMs). Our results suggest that the metabolic ratio of blood concentrations of tramadol/O-demethyltramadol could be used to distinguish PM and EM subjects with more than 99% confidence. Maximal values of drug-induced miosis (E_{max}) are partly overlapped among the genotype groups, but administration of tramadol lead to higher E_{max} than 1mm in none of the PMs.

Traditionally, CYP2D6 phenotype is examined by a metabolic ratio of cumulative excretion of debrisoquine and its metabolites in urine. We have studied the excretion of this compound in healthy volunteers with known CYP2D6 genotype. As expected, the administered dose is excreted in genotype-dependent manner, but we have found new, so far unknown metabolite 3,4-dehydrodebrisoquine that also displays genotype-dependent excretion. The inclusion of this new metabolite into the traditional metabolic ratio influences the results. It is however unknown, whether omitting of 3,4-dehydrodebrisoquine in the metabolic ratio leads to misclassification of PM subjects or not, and if so, what could be the frequency of this diagnostic mistake. The study also illustrates the possibilities of the most advanced analytical techniques in the pharmacogenetic scientific field.

GENETICKY PODMÍNĚNÁ VARIABILITA METABOLIZMU LÉČIV

We have also studied possible influence of liver cirrhosis on the metabolic ration of paraxanthin/caffeine in saliva as a phenotyping method to determine CYP1A2 activity. Metabolic ratio was significantly lower in patients than in healthy control subjects. It is therefore a suitable method to measure remaining metabolic capacity of the liver in this disease state.

Further we have studied, if deficiency in CYP2D active is a susceptibility factor for development or progression of familial adenomatous polyposis. The frequency of PMs in the group of patients did not differ substantially from that of healthy subjects, but the relatively small size of the group of patients with this rare disease does not allow to make fully conclusive conclusions. Nevertheless, higher metabolic ratio has been found in a subgroup of patients with malignant changes in the polypes in comparison to the patients without any malignancy during clinical examinations. This tendency can indicate influence of CYP2D6 activity on the progression of the disease.

Case reports demonstrating a crucial role of PM phenotype of thiopurinomethyltransferase (TPMT) on the development of serious myelotoxicity in patients receiving very small doses of azathioprine are included in the thesis as well. Bone marrow suppression was diagnosed in a young patient shortly after beginning of therapy with 50mg of azathioprine per day. Complete deficiency TPMT resulting in the occurrence of this side effect has been retrospectively proven by phenotyping and confirmed by detecting homozygous presence *TPMT*3A* allele in the genome.

It can be finally concluded, that the pharmacokinetics of some drugs and their pharmacodynamic effects are substantially dependent on the genotype of the drug metabolizing enzymes. The deficiency of the biotransformation activity can lead to onset of serious adverse drug reactions. Phenotyping can be influenced by a presence of unknown metabolites of the probe substance, but in the same time it can be useful method to evaluate actual metabolism status of the liver, i.e. can be used to follow the liver disease progression. The knowledge about the activity of biotransformation processes prior to the drug exposure and subsequent individualization of the dosing can result in rationalization of pharmacotherapy.

Obsah

Souhrn	4
Summary	6
Obsah	8
Seznam zkratek.....	9
Seznam vlastních publikací.....	10
Citační ohlas	11
Poděkování.....	12
Úvod.....	13
Metabolismus léčiv	13
Geneticky podmíněná variabilita aktivity metabolických cest.....	14
Enzymy podílející se na metabolismu léčiv	15
Cytochrom P450.....	15
Genetický polymorfismus vybraných metabolických cest 1. fáze	
biotransformace	16
CYP2D6	16
CYP2C9	18
CYP2C19.....	20
CYP2E1.....	21
Ostatní enzymy cytochromu P450	21
Cholinesteráza	21
Ostatní enzymy I. fáze biotransformace	21
Genetický polymorfismus vybraných metabolických cest 2. fáze	
biotransformace	22
Glukuronyltransferázy	22
Sulfonyltransferázy	22
N-acetyltransferázy.....	22
Gluthation S transferázy.....	23
Metyltransferázy	23
Metody posouzení aktivity metabolických cest.....	24
Cíle práce.....	27
Metody	28
Výsledky a diskuze.....	29
Závěr	36
Použitá literatura	37

Seznam zkratk

AUC	plocha pod křivkou koncentrací léčiva
AUD	plocha pod křivkou dat (farmakodynamického účinku) léčiva
Cl _{ren}	clearance renální
Cl _{tot}	clearance celková
C _{max}	maximální pozorovaná koncentrace
CYP	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EM	rychlý metabolizátor
FRET	fluorescence resonance emission transfer
GC	plynová chromatografie
GST	glutathion S-transferáza
IM	intermediární metabolizátor
INR	international normalized ratio
MR	metabolický poměr
NAT	N-acetyltransferáza
PCR	polymerázová řetězová reakce
PM	pomalý metabolizátor
RFLP	analýza délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
SD	směrodatná odchylka
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
T _{1/2}	biologický poločas
TPMT	thiopurin S-metyltransferáza
UM	velmi rychlý metabolizátor
UPLC MS-TOF	ultraperformance liquid chromatography-coupled time of flight mass spectrometry
XO	xantinoxidáza

Seznam vlastních publikací

Sumární IF = 17,724

1. Zhen Y, Slanar O, Krausz K, Chen C, Slavik J, McPhail KL, Zabriskie TM, Perlik F, Gonzalez FJ, Idle JR. 3,4-Dehydrodebrisoquine, A Novel Debrisoquine Metabolite Formed From 4-Hydroxydebrisoquine That Impacts The Cyp2d6 Metabolic Ratio. *Drug Metab Dispos* přijato do tisku 2006. (IF 2005=4,015)
2. Slanar O, Nobilis M, Kvetina J, Mikoviny R, Zima T, Idle JR, Perlik F. Miotic action of tramadol is determined by CYP2D6 genotype. *Physiol Res* přijato do tisku 2006. (IF 2005=1,886)
3. Slanar O, Nobilis M, Kvetina J, Idle JR, Perlik F. CYP2D6 polymorphism, tramadol pharmacokinetics and pupillary response. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:75-6. (IF 2005=2,298)
4. Slanar O. Pharmacogenetics in the management of multiple sclerosis - future perspectives and current beginnings. Comment to review article by Monnet and Boneschi: "How to Improve Multiple Sclerosis Treatment: Genetic and Pharmacogenetic Approaches". *Cesk Slov Neurol Neurochir* 2006;69:181-182. (IF 2005=0,070)
5. Frohman EM, Havrdova E, Levinson B, Slanar O. Azathioprine myelosuppression in multiple sclerosis: characterizing thiopurine methyltransferase polymorphisms. *Mult Scler* 2006;12:108-11. (IF 2005=2,832)
6. Slanar O, Urban M, Perlik F. Infračervená pupilometrie pomocí digitální fotografie. *Cas Lek Cesk* 2005;144:273-6; discussion 276-7.
7. Slanar O. Farmakogenetika protinádorové terapie. *Farmakoterapie* 2005:29-33.
8. Slanar O. Farmakogenetika v klinické praxi. *Farmakoterapie* 2005:296-298.
9. Slanar O, Aubrecht J, Perlik F. Noninvasive evaluation of portal-systemic shunting by glyceryl trinitrate. *Physiol Res* 2002;51:413-6. (IF =0,984)
10. Slanar, Perlik. Izoenzym cytochromu P450-1A2 a jeho fenotypizace. *Klin. Farmakol. Farm.* 2002:19-22.
11. Slanar. Genetický polymorfismus metabolismu léčiv. *Postgrad. Med. (Praha)* 2002;4:324-330.
12. Perlik F, Slanar O, Smid M, Petracek J. Attitude of Czech physicians to adverse drug reaction reporting. *Eur J Clin Pharmacol* 2002;58:367-9. (IF=1,955)
13. Slanar O, Perlik F, Jirasek V. Phenotype of cytochrome P450 CYP2D6 in patients with familial adenomatous polyposis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2001;23:145-7. (IF=0,644)
14. Perlik F, Pucelikova T, Slanar O. Použití poměru paraxantin/kofein ze slin u pacientů s jaterní cirhózou. *Cas Lek Cesk* 2001;140:51-3.
15. Slanar O, Pelisek V, Vanecek J. Melatonin inhibits pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide-induced increase of cyclic AMP accumulation and [Ca²⁺]_i in cultured cells of neonatal rat pituitary. *Neurochem Int* 2000;36:213-9. (IF=3,040)
16. Slanar O, Zemkova H, Vanecek J. Melatonin inhibits GnRH-induced Ca²⁺ mobilization and influx through voltage-regulated channels. *Biol Signals* 1997;6:284-90.

Abstrakta

Počet abstrakt posterů z konferencí: 15

Počet zvaných přednášek na odborných konferencích: 3

Citační ohlas

Počet citací dle databáze Web of Science ke dni 20.7.2006 (s vyloučením autocitací):26

- Slanar O, Nobilis M, Kvetina J, Idle JR, Perlik F. CYP2D6 polymorphism, tramadol pharmacokinetics and pupillary response. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:75-6.
 - Fliegert F et al. 2006
- Slanar O., Perlík F. CYP2D6 polymorphism and miotic effects of tramadol in healthy volunteers DRUG METABOLISM REVIEWS. 36: 114-114 229 Suppl. 1, AUG 2004
 - Fliegert F et al. 2006
- Slanar O, Pelisek V, Vanecek J. Melatonin inhibits pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide-induced increase of cyclic AMP accumulation and [Ca²⁺]_i in cultured cells of neonatal rat pituitary. *Neurochem Int* 2000;36:213-9.
 - Tanyildizi S et al. 2006
 - Fillippa V et al. 2005
 - Somogyvari-Vigh A et al. 2002
 - Takatsuki H et al. 2002
 - Barrett P et al. 2002
 - Ayar A et al. 2001
 - Zemkova H , Vanecek J 2001
 - Schreihofner DA et al. 2001
 - Nelson CS et al. 2001
 - Vaudry D et al. 2000
- Perlik F, Slanar O, Smid M, Petracek J. Attitude of Czech physicians to adverse drug reaction reporting. *Eur J Clin Pharmacol* 2002;58:367-9.
 - Backstrom M, Mjorndal T 2006
 - Backstrom M et al. 2004
 - Tisonova J et al. 2004
 -
- Slanar O, Zemkova H, Vanecek J. Melatonin inhibits GnRH-induced Ca²⁺ mobilization and influx through voltage-regulated channels. *Biol Signals* 1997;6:284-90.
 - Fan W et al. 2004
 - Balik A et al. 2004
 - Takatsuki H et al. 2002
 - Pogan L et al. 2002
 - Anwar MM et al. 2001
 - Anwar MM, Moustafa MA 2001
 - Mei YA et al. 2001
 - Vanecek J, Watanabe K 1999
 - Heidrich JP et al. 2000
 - Vanecek J 1999
 - Pang SF et al. 1998

Poděkování

Především chci poděkovat svému školiteli profesoru MUDr. Františku Perlíkovi, DrSc. za odborné rady, laskavou pomoc a vedení.

Dále děkuji za podnětnou spolupráci zaměstnancům z Farmakologického ústavu 1. lékařské fakulty UK i dalších pracovišť 1. LF UK a VFN a také všem domácím i zahraničním spoluautorům publikací, bez jejichž spolupráce by některé části práce nebylo možné realizovat.

V neposlední řadě také děkuji své rodině a přátelům za trpělivost a podporu.

Úvod

Metabolismus léčiv

Metabolismus léčiv je jednou ze základních podmínek eliminace podané dávky z organismu. Schopnost odbourávat léčiva je zajištěna stejnými metabolickými a transportními systémy, které se jinak podílejí na přeměnách endogenních substancí i látek pocházejících ze stravy. Kromě detoxikace xenobiotik mají metabolické systémy také význam v procesu aktivace některých látek z neaktivních sloučenin na metabolity vyvolávající účinky a to jak žádoucí, tak i nežádoucí. Některá léčiva jsou záměrně podávána ve formě neaktivních substancí (proléčiv), což vede k pozdějšímu a pozvolnějšímu nástupu i doby přetrvávání účinku léčby. Obdobně je dobře popsán význam bioaktivace prokarcinogenů na látky spouštějící proces karcinogeneze.

Metabolické systémy se u člověka, ale i u živočichů vyznačují významnou interindividuální variabilitou aktivity, která je podmíněna jak genetickými, tak i epigenetickými faktory. Hlavním podnětem pro rozvoj vedoucí k variabilitě biotransformačních enzymů, jakou známe dnes, bylo pravděpodobně vzájemné soužití zástupců živočišné a rostlinné říše, při kterém postupně vznikaly rostlinné toxiny. Ty na jedné straně zvyšují atraktivitu pro opylovače a predátory parazitů, a zároveň posilují obranné systémy rostlin vůči ostatním živočišným druhům. Například velmi rychlý rozvoj rodiny 2 cytochromu P450 začal probíhat přibližně před 400 miliony let, tedy v období, kdy první živočišné druhy přejímaly suchozemský způsob života a začaly se živit rostlinnými druhy, jež tak byly donuceny syntetizovat méně chutné a více toxické metabolity. Odpovědí živočišné strany bylo následné posílení detoxikačních systémů. Podobně jako v případě ostatních protektivních mechanismů organismu, které jsou rovněž variabilní mezi příslušníky populací (např. HLA systém, genetická obrana proti malárii ...), umožňuje i geneticky podmíněná variabilita biotransformačních enzymů přežití alespoň některých příslušníků populace i v případech kontaktu s neobvyklými chemickými sloučeninami nebo při infekčních epidemiích a chemických katastrofách.

Geneticky podmíněná variabilita aktivity metabolických cest

Geneticky podmíněné změny aktivity enzymů metabolizujících léčiva představují významný zdroj odlišnosti farmakokinetických parametrů léčiv mezi jedinci, které mohou způsobovat odlišné terapeutické odpovědi pacientů. Individuální rozdíly mezi jednotlivci mohou být značné; od selhání terapie až po projevy toxicity a výrazný výskyt lékových interakcí. Variabilita metabolické aktivity je způsobena přítomností několika typů alel pro daný enzym předurčující různou aktivitu kódovaného proteinu. V populaci se tak vyskytují alely, u jejichž nositelů můžeme předpokládat rychlý metabolismus substrátů daného enzymu (rychlí metabolizátoři, EM), a alely, které způsobují značné snížení metabolické kapacity enzymu u jejich nositele (pomalí metabolizátoři, PM). Alely pro fenotyp EM jsou dominantní tzn., že fenotyp PM je vyjádřen jen u homozygotů pro defektní alely, ale u heterozygotů je enzymová aktivita buď normální nebo jen lehce snížená (intermediální metabolizátoři, IM). Frekvence výskytu funkčně deficitní mutace nad 1 % je podmínkou pro formální označení této odchylky v DNA za polymorfismus. Pokud je výskyt variantních alel v odlišných populacích různý, může být také enzym v jedné populaci polymorfní a v jiné nikoli.

V souladu s teorií o rozvoji geneticky podmíněné variability enzymových pochodů je i selekce udržování výskytu jednotlivých alel v různých populacích. Podle Darwinovského modelu je totiž z hlediska přežití a reprodukce výhodnější heterozygotní genotyp než homozygotní. Tak jsou alely udržovány v populaci na základě rovnováhy mezi výskytem výhodného a nevýhodného genotypu. Dobře známým příkladem je polymorfismus glukóza-6-fosfát dehydrogenázy, pro jehož variantní alely jsou hemizygotní muži a homozygotní ženy vystaveny značnému riziku těžkého poškození (nebo smrti) neonatální žloutenkou a hemolýzou, ale heterozygoté jsou více odolní vůči malárii.

Enzymy podílející se na metabolismu léčiv

Cytochrom P450

Cytochromy P450 patří mezi proteiny se zásadní úlohou v katabolismu většiny léčiv a xenobiotik, metabolismu některých endogenních substrátů (tromboxanů, prostaglandinů) a také při biosyntéze steroidů.

Z vývojového hlediska jsou cytochromy P450 velmi staré hemoproteiny, které se ubikviterně vyskytují v mikro- i makro-organismech, a dnes jich známe několik set. Pro snadnější orientaci se používá klasifikace řadící jednotlivé proteiny do rodin a podrodin. Označení každého enzymu se podle ní skládá ze zkratky CYP (**CY**tochrme **P450**), za kterou následuje arabská číslice značící rodinu, písmeno identifikující podrodinu a arabská číslice charakterizující konkrétní enzym (např. CYP2D6). Enzymy patřící do jedné rodiny mají podle arbitrárně stanovených kritérií více než 40 % shodné aminokyselinové sekvence, v podrodině je podobnost alespoň 55 %. Existující triviální názvy se používají častěji u bakteriálních cytochromů než u lidských.

V lidském těle byly nalezeny cytochromy patřící do 14 rodin a 20 podrodin. Z hlediska metabolismu léčiv mají největší význam zástupci 4 rodin. Cytochromy jsou vázány v membránách hladkého endoplazmatického retikula a mitochondrií zejména v játrech, ale i v ledvinách, plicích, sliznici tenkého střeva, mozku, nadledvinách, pohlavních žlázách a dalších orgánech. Jednotlivé enzymy cytochromu P450 metabolizující léčiva a xenobiotika nejsou přísně substrátově specifické. U řady látek je popsáno několik metabolických cest katalyzovaných více cytochromy.

Genetický polymorfismus vybraných metabolických cest 1. fáze biotransformace

CYP2D6

Tento protein cytochromu P450 patří mezi enzymy, u nichž je možný klinický dopad polymorfizmu na farmakoterapii všeobecně uznáván, protože je katalyzujícím enzymem řady často používaných léčiv ze skupin včetně antidepressiv, antipsychotik, analgetik betablokátorů a antiarytmik. Přehled léčiv-substrátů CYP2D6 podává tabulka 1.

Polymorfismus enzymu je extenzivně vyjádřený - jsou známy desítky polymorfních alel. V evropských populacích (včetně naší) je přibližně 5 – 10 % PM a méně než 5 % příslušníků evropských populací může být klasifikováno jako velmi rychlí metabolizátoři (UM) s výrazně vyšší aktivitou CYP2D6 než RM. Příslušníci asijských populací mají v průměru aktivitu CYP2D6 nižší, ale frekvence PM je v nich pouze okolo 1 %. V asijských populacích je vyšší frekvence alel, které predikují lehce sníženou aktivitu CYP2D6 (fenotyp IM) při nižším výskytu alel predisponujících k fenotypu PM. Tento jev je příčinou snížení doporučeného dávkování některých léčiv u pacientů asijských populací.

Pomalí metabolizátoři jsou vystaveni supratherapeutickým hladinám řady léčiv, ale důsledky jsou závislé na konkrétním léčivu, šíři jeho terapeutického okna a také na eventuální přítomnosti alternativních metabolických cest, které mohou zajistit biodegradaci v případě deficitu CYP2D6. Například výrazná toxicita perhexilinu a phenforminu u PM vedla ke stažení těchto léčiv z trhu. Při léčbě beta blokátory je možným důsledkem jejich zpomaleného metabolismu u PM ekcesivní β -blokádá s bradykardií, a naopak UM mohou mít ke konci dávkovacího intervalu nedostatečnou terapeutickou odpověď s dekompenzací krevního tlaku.

Tabulka 1. Příklady substrátů metabolizovaných CYP2D6

alprenolol	hydrocodon
ajmalin	imipramin
amitriptylin	methoxyamphetamin
bufuralol	metoprolol
bupranolol	mexilitin
captopril	mianserin
cinarizin	nortriptylin
citalopram	ondansetron
clomipramin	paroxetin
Chlorpromazin	perhexilin
codein	perphenazin
debrisoquin	propafenon
deprenyl	propranolol
desipramin	risperidon
dextromethorphan	spartein
dexfenfluramin	thioridazin
encainid	timolol
flecainid	tramadol
fluoxetin	trifluoperidol
fluvoxamin	trimepranol
flunarizin	tropisetron
fluphenazin	tomoxetin
galantamin	venflaxin
haloperidol	

Snížená až chybějící analgezie u PM je popsána po podání codeinu, jehož účinnost je závislá na tvorbě vlastního aktivního metabolitu morfinu cestou CYP2D6. Kromě neefektivní léčby jsou navíc PM vystaveni typickým nežádoucím účinkům codeinu, které jsou způsobeny vlastním proléčivem.

Snaha o individualizaci terapie v závislosti na genotypu vedla nedávno k publikaci korekcí doporučených dávkování při terapii deprese v jednotlivých fenotypových skupinách pacientů (tabulka 2). Jedná se ovšem o předběžné odhady jsou založené mnohdy pouze na farmakokinetických datech získaných ve velmi malých souborech pacientů. Validitu těchto dat bude nutné ještě ověřit, nicméně ilustrují současné znalosti závislosti farmakokinetiky antidepressiv na CYP2D6, které v budoucnu mohou vést ke změně doporučeného dávkování až o 80 % pro PM. Pro pacienty s fenotypem UM jsou zatím známá ojedinělá data, jež naznačují nutnost zvýšit dávkování některých antidepressiv 2 až 3krát.

Tabulka 2. Předběžná doporučení pro úpravu dávkování (v procentech doporučených dávek) pro pacienty v jednotlivých fenotypových skupinách.

Léčivo	Fenotypová skupina		
	EM	IM	PM
amitriptilin	120 %	90 %	50 %
clomipramin	120 %	90 %	60 %
desimipramin	130 %	30 %	30 %
fluvoxamin	110 %	100 %	90 %
imipramin	130 %	80 %	30 %
maprotilin	130 %	80 %	40 %
mianserin	110 %	90 %	70 %
nortriptilin	120 %	90 %	50 %
paroxetin	110 %	90 %	70 %
venlafaxin	130 %	80 %	20 %

CYP2C9

U genu kódujícího tento enzym cytochromu je popsáno 5 alelických variant, z nichž dvě vedou k syntéze proteinů se sníženou katalytickou aktivitou, a to v prvním případě na přibližně 12 %, ve druhém na 5 % ve srovnání s plně funkčním proteinem. Vliv posledních dvou nedávno popsaných alel na enzymovou aktivitu není zatím známý. Léčiva odbourávaná tímto enzymem jsou uvedena v tabulce 3. Polymorfismus CYP2C9 je významný zejména pro metabolismus hypoglykemizujících antidiabetik, která mohou při zpomaleném metabolismu u PM vyvolávat závažné hypoglykemie. Dalším významným léčivem je S-warfarin. Při udržovací terapii 128 pacientů warfarinem bylo k udržení INR v rozmezí 2,0 % - 3,0 % přibližně 7 % pacientů, kterým byla podávána dávka menší než 15 mg týdně, ale přibližně 4 % pacientů potřebovala více než 60 % mg warfarinu týdně. Podle jiných studií je rozdíl mezi potřebnou dávkou warfarinu k udržení terapeutické antikoagulace až 120násobný.

Tabulka 3. Příklady substrátů metabolizovaných CYP2C9

amitriptylin	glibenclamid
antipyrin	ibuprofen
diclofenac	indomethacin
dronabinol (THC)	losartan
carbamazepin	phenytoin
flurbiprofen	piroxicam
glimepirid	tolbutamid
glipizid	torsemid
	S-warfarin

Podle Furuya a spol. je mezi pacienty, kteří potřebují nejnižší dávku (5 - 15 mg/týden), 90 % nositelů jedné z variantních alel, a naopak u lidí s nejvyšší potřebnou dávkou je více než 80 % homozygotních nosičů nemutované alely (EM). Aithal a spol. v jiné studii ukázali, že u pacientů stabilizovaných na nízké dávce warfarinu je mezi nositeli jedné nebo více variantních alel pěti až šestinásobně větší pravděpodobnost překročení terapeutického intervalu během iniciačního vzestupu INR po zahájení terapie než u běžné populace pacientů. Navíc měli tito pacienti čtyřikrát větší riziko vzniku krvácivých komplikací. Výsledky jiné studie provedené Taubem a spol. potvrzují nižší potřebné dávky u pacientů s variantními alelami, zároveň však nepotvrzují zvýšené riziko nežádoucích účinků ve srovnání s kontrolní skupinou. Dosud provedené studie tak sice dávají určitou racionální podporu pro zdůvodnění alespoň části z poměrně značné variability dávkování k účinné udržovací antikoagulační terapii, a možná i významu polymorfizmu CYP2C9 na hypersenzitivitu pacientů, zatím je však tato data nutno považovat pouze za počátek poznání úlohy CYP2C9 pro antikoagulační terapii warfarinem. Existuje totiž řada dalších otázek, jež je třeba vyjasnit, např. konkretizace vlivu jednotlivých variantních alel na metabolismus warfarinu *in vivo* na dostatečné skupině pacientů, vztah genotypu CYP2C9 k poměru S-/R-warfarinu v plazmě a zejména vyjasnění jeho úlohy pro vznik krvácivých komplikací atd. V současné době je také známo, že polymorfizmy dalších genů významným způsobem ovlivňují odpověď na podávání warfarinu, a proto není snaha o individualizaci dávkování pouze na základě analýzy CYP2C9 dostatečně věrohodná.

CYP2C19

V evropských populacích se vyskytují přibližně 3 % PM pro enzym CYP2C19, mezi jehož substráty patří i velmi často používaná léčiva jako omeprazol nebo některá antidepresiva. Přehled léčiv metabolizovaných CYP2C19 je uveden v tabulce 4.

Tabulka 4. Příklady substrátů metabolizovaných CYP2C19

amitriptylin	proguanil
carisoprodol	propranolol
clomipramin	<i>S</i> -mephenytoin
diazepam	<i>R</i> -warfarin
imipramin	citalopram
lansoprazol	trimipramin
omeprazol	moclobemid

U omeprazolu byly pozorovány dvanáctkrát větší hodnoty AUC u PM než u EM po jednorázovém podání. Protože je omeprazol induktorem jiného enzymu cytochromu P450 1A2, mohou být u PM při podávání omeprazolu zároveň značně zvýšené aktivity CYP1A2 a případně i zrychlený metabolismus léčiv a ostatních látek, které jsou pro tento enzym substrátem.

Pro antidepresiva metabolizovaná CYP2C19 byla nedávno publikována předběžná doporučení úpravy dávkování s ohledem na fenotyp nebo genotyp CYP2C19. Autoři metaanalýzy odhadli doporučené dávky podle farmakokinetických dat v jednotlivých fenotypových skupinách z dříve publikovaných prací. Při terapii deprese je zde doporučena redukce dávkování u PM na 60 % obvyklých dávek pro amitriptylin, citalopram, klomipramin, imipramin a na 40 % obvykle podávaných dávek u trimipraminu. Dávkování ve skupině EM bylo odhadnuto na 100 % - 110 % podle konkrétního léčiva, ale rozdíl 10 % je zřejmě příliš malý, aby se jím bylo nutné v běžné praxi u EM zabývat. Ve skupině IM je doporučena redukce dávkování na 80 % s výjimkou trimipraminu, u kterého je opět redukce větší (70 % obvykle podávaných dávek).

CYP2C19 je také enzymem, který katalyzuje přeměnu antimalarika proguanilu na vlastní aktivní metabolit, což může vést k nedostatečně efektivní terapii malárie, zejména v některých asijských populacích s až 20%ním zastoupením PM.

CYP2E1

CYP2E1 je znám především svou účastí na metabolismu etanolu, ale podílí se také na metabolismu řady dalších xenobiotik, jako jsou např. anestetika halotan, enfluran a izofluran. Tento enzym se také spolu s CYP3A4 podílí na vzniku reaktivních hepatotoxických metabolitů paracetamolu. Přestože je znám genetický polymorfismus genu kódujícího tento protein a jeho aktivita se mezi jedinci liší 2-3krát, dosud nebyl rozlišen fenotyp odpovídající PM a EM.

Ostatní enzymy cytochromu P450

Aktivita dalších dvou enzymů, které se významnou měrou podílejí na metabolismu léčiv (CYP3A4 a CYP1A2), je mezi jedinci výrazně variabilní. Spíše než genetický polymorfismus způsobuje pravděpodobně tuto variabilitu mnoho negeneticky podmíněných vlivů, ke kterým jsou oba proteiny poměrně senzitivní (indukce a inhibice léčivy, fyziologickými a patologickými pochody v organismu, stravou ...).

Cholinesteráza

Cholinesteráza vykazuje polymorfismus významný u hydrolýzy succinylcholinu. Gen pro tento enzym má řadu poměrně vzácných alel (jejich množství a řídký výskyt velmi ztěžuje genotypizaci a volbou stanovení aktivity je tak fenotypizace), jejichž výskyt vede u asi 2 % lidí k expresi enzymu se sníženou aktivitou a u dalšího cca 1 % lidí není aktivita vůbec detekovatelná. Důsledkem této metabolické vady může být až na několik hodin prolongovaná apnea.

Ostatní enzymy I. fáze biotransformace

Ostatní enzymy I. fáze biotransformace mají pro metabolismus léčiv minoritní úlohu a jejich polymorfismus je významnější pro metabolismus endogenních a karcinogenních látek (s výjimkou vzniku toxických intermediátů paracetamolu a phenytoinu).

Genetický polymorfismus vybraných metabolických cest 2. fáze biotransformace

Glukuronyltransferázy

Glukuronidace je nejčastější konjugační reakcí při metabolismu léčiv. Studium geneticky podmíněných variabilit těchto konjugací je obtížné, ale byl popsán rozdíl v exkreci konjugované frakce acetaminofenu s přibližně 5%ním výskytem lidí, kteří mají velmi nízké množství vyloučených konjugátů. Tato sugestivní bimodalita však nebyla některými dalšími studii potvrzena. Zvláštním typem vrozené vady glukuronidace je Gilbertův syndrom, při němž je postižen nejen metabolismus bilirubinu, ale je rovněž snížena clearance řady léčiv včetně tolbutamidu, acetaminofenu, rifampicinu a irinotecanu. Genetickým podkladem syndromu u pacientů s mírnějšími projevy je polymorfismus nekódující oblasti genu vedoucí ke snížení exprese genu. Formy se závažnějšími příznaky jsou pravděpodobně způsobeny mutací kódující sekvence genu pro glukuronidázu.

Sulfonyltransferázy

Sulfonyltransferázy jsou enzymy konjugující endogenní i exogenní látky se sulfáty. Populační studie svědčí pro polymorfni aktivitu alespoň u dvou z pěti známých forem enzymů. Variace jsou tvořeny polymorfními úseky jak v kódujících, tak v nekódujících oblastech genů. Doposud ale není dostatečně popsána substrátová specifita jednotlivých izoform a význam alelických variant pro zhodnocení jejich významu pro farmakoterapii.

N-acetyltransferázy

Polymorfismus N-acetyltransferázy2 (NAT2) byl popsán před mnoha lety, zatímco průkaz polymorfismu N-acetyltransferázy 1 (NAT1) je podstatně novější.

Polymorfismus NAT2 se projevuje absencí aktivity enzymu přibližně u 50 % bělošské populace. V jiných populacích je relativní zastoupení pomalých acetylátorů odlišné od cca 10 % v populacích asijských až po 90%ní zastoupení v oblastech severní Afriky. Molekulární podstatou polymorfismu je přítomnost více než 15ti alelických forem, z nichž většina enzymovou aktivitu snižuje. Neschopnost acetylovat léčiva vede k nežádoucím účinkům, např. periferní neuropatii u pacientů užívajících izoniazid nebo reakci přecitlivělosti po podání sulfonamidů. Naopak rychlí acetylátoři jsou ohroženi leukopenií po podání amonafidu, proléčiva užívaného při chemoterapii.

GENETICKY PODMÍNĚNÁ VARIABILITA METABOLIZMU LÉČIV

Zvýšená aktivita polymorfního enzymu NAT1 zvyšuje riziko carcinomu tlustého střeva, ale význam z hlediska metabolismu léčiv není zatím jasný.

Gluthation S transferázy

Polymorfismus gluthation S-transferáz (GST) je velmi výrazně vyjádřený. Podle populace a konkrétního izoenzymu lze nalézt 10 % - 50 % lidí s kompletní deficiencí katalytické aktivity GST, která je způsobena delecí částí genu. Rovněž jsou popsány alelické varianty pouze snižující aktivitu enzymu. GST představují důležité detoxikační cesty, jejichž polymorfismus je studován nejvíce ve vztahu k nádorové chemoterapii. Například nositelé jedné variantní alely (*GSTP3*) jsou méně náchylní k ototoxickým projevům léčby cisplatinou než ostatní pacienti.

Metyltransferázy

Jsou skupinou enzymů katalyzujících řadu reakcí a je u nich přítomna variabilita nebo polymorfismus. Význam polymorfismu je u této skupiny léčiv stanoven jen pro thiopurin S-metyltransferázu (TPMT), u které jsou popsány 4 typy alel. 0%,3% Nedetekovanou enzymovou aktivitu má 0,3 % Evropanů a 11 % ji má signifikantně sníženou. TPMT představuje důležitou katalytickou cestu cytotoxických látek 6-merkaptopurinu, 6-thiopurinu a azathioprinu. U pacientů s deficiencí TPMT jsou opakovaně popisovány fatální myelosuprese způsobené vysokými koncentracemi léčiv. Také riziko sekundárních malignit (tumorů mozku a akutních leukémií) je zvýšeno u pacientů s některými variantami alel. Dostupnost genotypizace tohoto enzymu by alespoň v některých případech přispěla k lepším terapeutickým výsledkům, což naznačují ojedinělé případy úspěšné léčby TPMT deficitních pacientů s redukcí obvyklé terapeutické dávky cytostatik o 90 - 94%.

Metody posouzení aktivity metabolických cest

Aktivitu cytochromů P450 lze u lidí *in vivo* stanovovat genotypizací nebo fenotypizací. Genotypizace je používána pro predikci fenotypu na základě znalosti přítomnosti polymorfních alel a jejich vlivu na aktivitu exprimovaného proteinu. Většina technik používá izolaci DNA z periferních leukocytů s následnou kombinací PCR a RFLP. Výhodou genotypizace je, že není nutné podávat žádnou modelovou látku, výsledek není závislý na konkomitanti medikaci ani na vlivech jiných exogenních nebo endogenních faktorů. Nevýhodou genotypizace je relativní finanční nákladnost, možnost záměny PM za EM, pokud není známa alela modifikující aktivitu enzymu, nebo pokud se z důvodu časové a finanční náročnosti pátrá pouze po nejčastěji se vyskytujících variantních alelách. Další nevýhodou je pouhá predikce enzymové aktivity bez znalosti její skutečné aktuální hodnoty. Fenotypizace naopak umožňuje určit aktuální aktivitu enzymu i pokud je případně ovlivněna fyziologickými a patologickými stavy organismu, podávanými léky a dalšími vlivy prostředí (strava, toxiny ...). Metody fenotypizace spočívají v jednorázovém podání modelové látky (léčivo, které je dominantně metabolizováno příslušným enzymem) a následném stanovení koncentrace této látky a jejího metabolitu nebo metabolitů v biologickém vzorku (krev, sliny, moč). Přehled používaných modelových látek s jejich stručnou charakteristikou je uveden v tabulce 5. V akademických kruzích probíhá extenzivní diskuze o tom, zda je lépe využívat možnosti fenotypizace nebo genotypizace a prozatím není žádné speciální doporučení ani z hlediska používání farmakogenetických postupů např. při vývoji nových léčiv.

Tabulka 5. Přehled základních modelových substrátů, používaných k fenotypizaci.

Enzym	Modelová látka	Výhody	Nevýhody
CYP1A2	coffein	Relativní bezpečnost, vhodné biol. vzorky: krev, sliny a moč. Lze fenotypovat též NAT2 a XO.	Komplexní metabolismus s podílem řady dalších enzymů. Cl_{ren} coffeinu i metabolitů závislá na průtoku.
	theophyllin	Méně složitý metabolismus.	Slabá korelace poměru v plazmě a moči.
CYP2C9	tolbutamid		Riziko hypoglykemie. Málo validizujících <i>in vivo</i> údajů.
	phenytoin	Poměr v plazmě i v moči.	Úzké terapeutické okno. Cl_{ren} závislá na průtoku.
	warfarin	S-warfarin téměř výhradně metabolizován CYP2C9.	Riziko krvácení. Málo <i>in vivo</i> dat.
	losartan	Relativně bezpečnější než jiné látky.	Pravděpodobný podíl dalších enzymů na metabolismu.
CYP2C19	mephenytoin	Dobrá detekce PM.	Riziko než. účinků. Nedetekovatelné koncentrace ve velkém množství vzorků.
	omeprazol	Méně nedekovatelných vzorků. Lepší odlišení lidí s vysokou aktivitou. Bezpečnější.	Málo publikovaných <i>in vivo</i> dat.
	proquanal	Množství <i>in vivo</i> dat podporující použití.	Neúplné odlišení PM od EM v poměru v moči.
CYP2D6	dextromethorphan	Široce dostupný. Metody v plazmě, slinách i moči.	Možné ovlivnění u lidí s postižením renálních funkcí.
	debrisoquin	Lepší rozlišení osob s vyšší aktivitou.	Riziko než. účinků-stažen z trhu.
	spartein	Lepší u lidí s postižením renálních funkcí.	Riziko než. účinků-stažen z trhu.
	metoprolol	Dostupnost.	Vysoce variabilní korelace s ostatními látkami.

GENETICKY PODMÍNĚNÁ VARIABILITA METABOLIZMU LÉČIV

CYP2E1	chloroxazon	Jediná dobře popsaná modelová látka.	Pravděpodobný vliv i ostatních enzymů.
CYP3A	cortisol	Endogenní substrát.	Možný extrahepatální metabolismus, pravděpodobně použitelný pouze k detekci indukce.
	midazolam	Není substrát pro glykoprotein P.	Možný vliv průtoku krve játry, nutné vícenásobné odběry krve.
	dapson	Lze stanovovat také aktivitu NAT2.	Možný extrahepatální metabolismus, slabá korelace s ostatními modelovými látkami.
	dextromethorphan	Lze stanovovat také aktivitu CYP2D6.	Možný metabolismus jinými enzymy, slabá korelace s ostatními modelovými látkami.
	¹⁴ C-erythromycin	Dostatek <i>in vivo</i> důkazů podporující použití.	Substrát glykoproteinu P, možnost ovlivnění vazbou na proteiny a distribučním objemem.

Cíle práce

V rámci PhD programu se výzkum zaměřil na studium vlivu farmakogenetiky na osud a působení léčiv u člověka. Cílem práce bylo posoudit:

1. vliv geneticky podmíněné variability odbourávání léčiv na jejich farmakokinetiku u lidí
2. vliv geneticky podmíněného deficitu odbourávání vybraných léčiv na jejich farmakodynamiku
3. aplikaci vybraných postupů fenotypizace/genotypizace v podmínkách klinické praxe, např. při studiu predispozice vzniku a průběhu onemocnění, a pro predikci lékové odpovědi (NÚL)

Metody

Použité metody jsou *in extenso* popsány v příložených publikacích. Dizertační práce zahrnuje mnoho analytických metod používaných ke stanovení koncentrací léčiv a modelových látek a jejich metabolitů v biologických vzorcích (GC, HPLC, UPLC MS-TOF). Ke stanovení genotypu využívá molekulárně biologické metody (PCR-RFLP, sekvenování, FRET analýza SNP).

Součástí studií byly také klinické vyšetřovací postupy zahrnující i méně často používané metody jako infračervenou pupilografii prováděnou jak komerčně dostupným pupilometrem, tak i vlastním postupem pomocí statické digitální fotografie.

Výsledky a diskuze

Získané výsledky jsou *in extenso* popsány v příložených publikacích. V této kapitole jsou uvedeny jen nepublikované analýzy, shrnutí a komentář k získaným výsledkům.

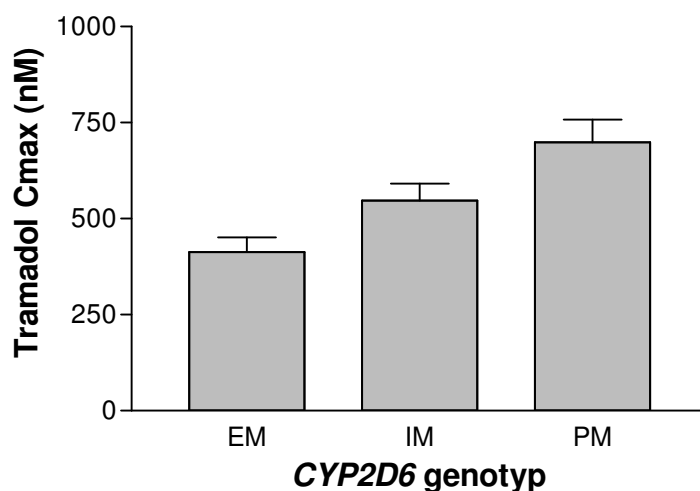
Zabývali jsme se změnami farmakokinetiky tramadolu a jeho hlavního účinného metabolitu *O*-demetyltramadolu ve skupině zdravých dobrovolníků se známým genotypem *CYP2D6*. Farmakokinetika mateřské látky i jeho hlavního metabolitu byla genotypově specifická a podle našich výsledků by bylo možné použít metabolického poměru koncentrací tramadolu/*O*-demetyltramadolu k fenotypovému odlišení PM od EM s více než 99%ní přesností. Nejnižší koncentrace *O*-demetyltramadolu, a zároveň nejvyšší koncentrace mateřské látky, jsme naměřili ve všech odběrových intervalech u PM ve srovnání s IM a EM. Doplňující analýzy získaných dat jsou uvedeny v grafech 1 - 5, které znázorňují farmakokinetické parametry C_{max} , $T_{1/2}$ a Cl_{tot} mateřské látky nebo *O*-demetyltramadol pro jednotlivé genotypové skupiny. Ve všech vypočítaných farmakokinetických parametrech se statisticky významně odlišuje skupina PM od EM. U PM jsme našli vyšší hodnoty C_{max} a $t_{1/2}$ mateřské látky a naopak nižší cl_{tot} hodnotu, pro *O*-demetyltramadol je rovněž prodloužen biologický poločas, zatímco C_{max} jsou nižší stejně jako hladiny ve všech odběrových intervalech. Grafy 6 - 7 znázorňují průměrnou hodnotu metabolického poměru tramadolu a průběh těchto hodnot v čase jednotlivých odběrových intervalů.

Dále jsme sledovali kumulativní exkrece debrisoquinu a jeho metabolitů v moči u zdravých dobrovolníků se známým genotypem. Podle očekávání je u této tradiční modelové látky používané k fenotypizaci eliminace dávky závislá také na genotypu. Tato publikace navíc popisuje nový a dosud neznámý metabolit 3,4-dehydrodebrisoquin, jehož eliminace do moči je u lidí závislá na aktivitě *CYP2D6*. Práce je zaměřena zejména na popis metabolismu debrisochinu, jehož výrazná interindividuální farmakokinetická variabilita byla popsána již v roce 1977. Tvorba 4-hydroxydebrisoquinu umožňuje použít tradiční metabolický poměr z moči vyjádřený jako procento vyloučené dávky léčiva ve formě mateřské látky/4-hydroxy metabolitu k fenotypizaci. V naší práci je poprvé prokázána genotypově specifická tvorba nového metabolitu 3,4-dehydrodebrisoquinu. Z důvodu signifikantně nižší tvorby tohoto metabolitu u PM je podle našeho názoru možné, že značná variabilita MR debrisoquinu u jedinců uvnitř jedné genotypové skupiny, která bývá popisována v literatuře prozatím bez objasnění příčiny, je způsobena právě variabilní tvorbou 3,4-dehydrodebrisoquinu. Zahrnutí

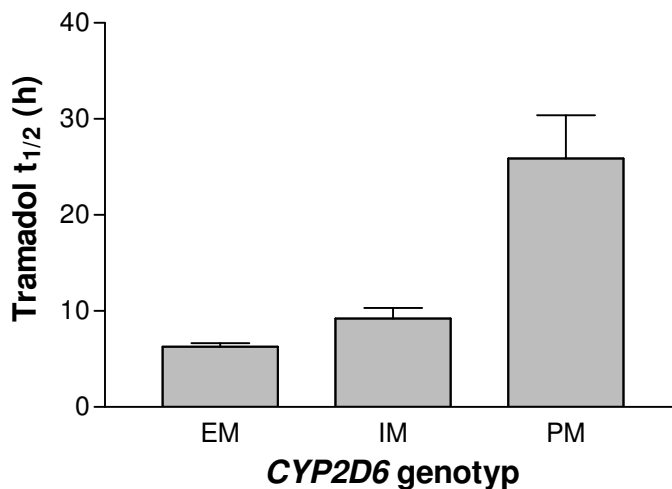
GENETICKY PODMÍNĚNÁ VARIABILITA METABOLIZMU LÉČIV

tohoto nového metabolitu do tradičního MR vykazuje odlišné výsledky, byť v našem malém souboru dobrovolníků nevedlo použití tradičního MR nebo doplněného MR k chybné klasifikaci PM. Metoda genotypizace je obecně považována za méně věrohodnou než fenotypizace, protože predikce enzymové aktivity se provádí *per exclusionem* – vyloučením přítomnosti deficitních alel v genotypu. Vzhledem k nedostatečné znalosti veškerých existujících vzácných mutací v genu je nutné vždy počítat s určitou, byť velmi málo pravděpodobnou, chybou při predikci fenotypu. K této laboratorní chybě navíc ještě přispívá ekonomická náročnost detekce všech známých alel, takže v praxi se zatím většinou detekují jen nejčastěji se vyskytující variantní alely. V naší práci popisujeme při fenotypizaci analogickou situaci jakou je přítomnost neznámých mutací v genu při genotypizaci. Růžičně po 30 letech od doby, kdy byla popsána výrazná interindividuální variabilita metabolismu závislá na CYP2D6 (což je důvodem pro používání této látky jako modelového léčiva k fenotypizaci), je popsán dosud neznámý metabolit ovlivňující tradiční metabolický poměr. Není prozatím jasné zda, případně u jakého procenta fenotypovaných subjektů, pominutí nově popsaného metabolitu vede k zařazení jedince do chybné fenotypové skupiny. Práce je současně ilustrací možností nejmodernějších analytických metod v oblasti farmakogenetiky.

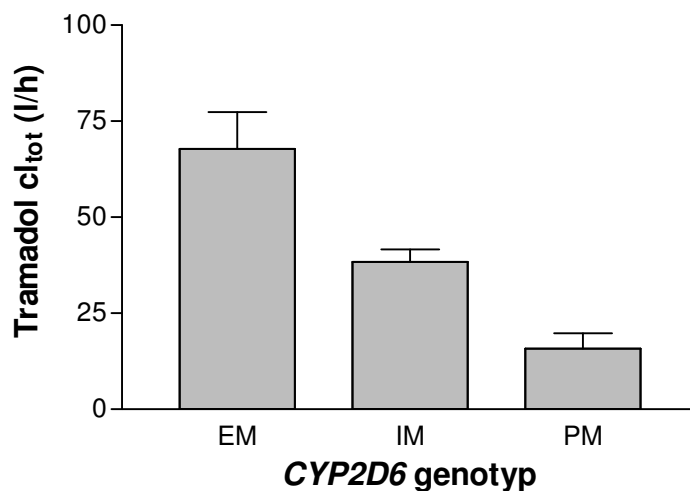
Graf 1: Průměrné hodnoty C_{max} (±SD) tramadolu v jednotlivých genotypových skupinách.



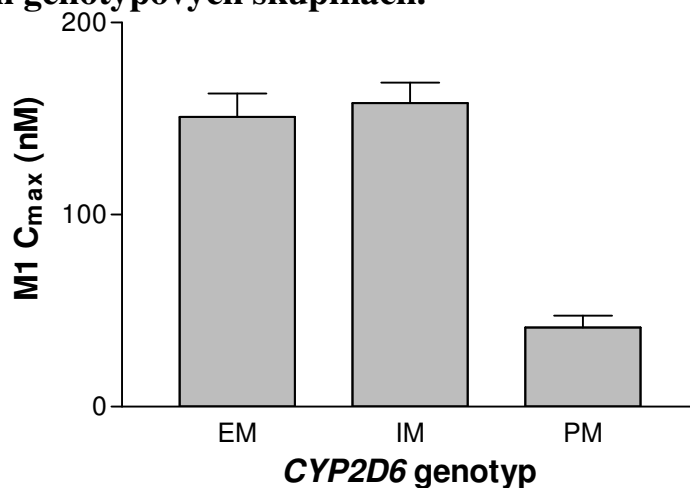
Graf 2: Průměrné hodnoty $t_{1/2}$ (\pm SD) tramadolu v jednotlivých genotypových skupinách.



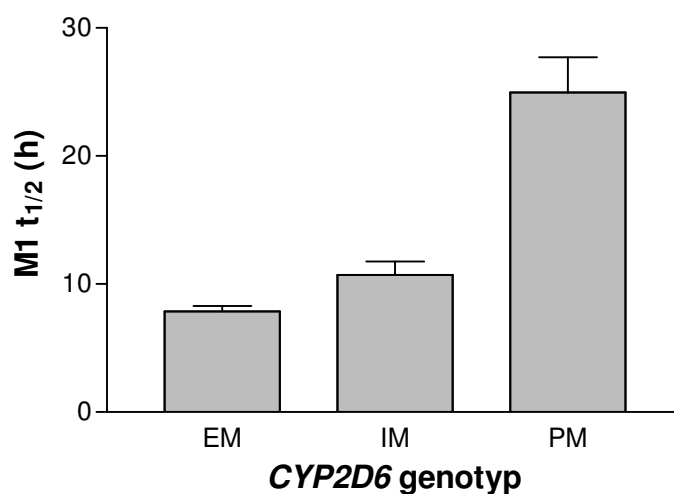
Graf 3: Průměrné hodnoty cl_{tot} (\pm SD) tramadolu v jednotlivých genotypových skupinách.



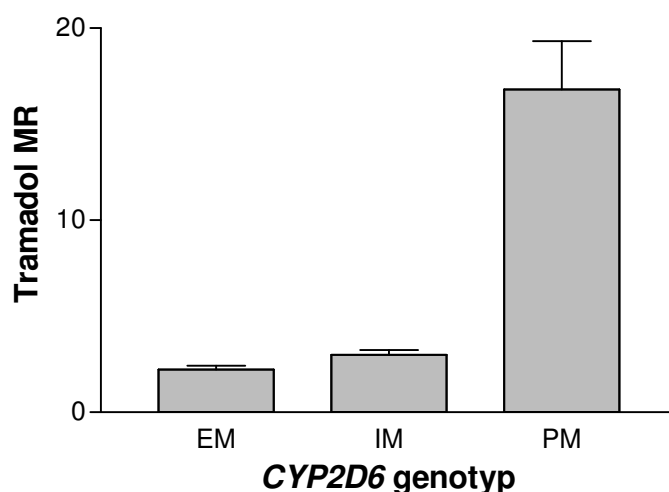
Graf 4: Průměrné hodnoty C_{max} (\pm SD) *O*-demetyltramadolu v jednotlivých genotypových skupinách.



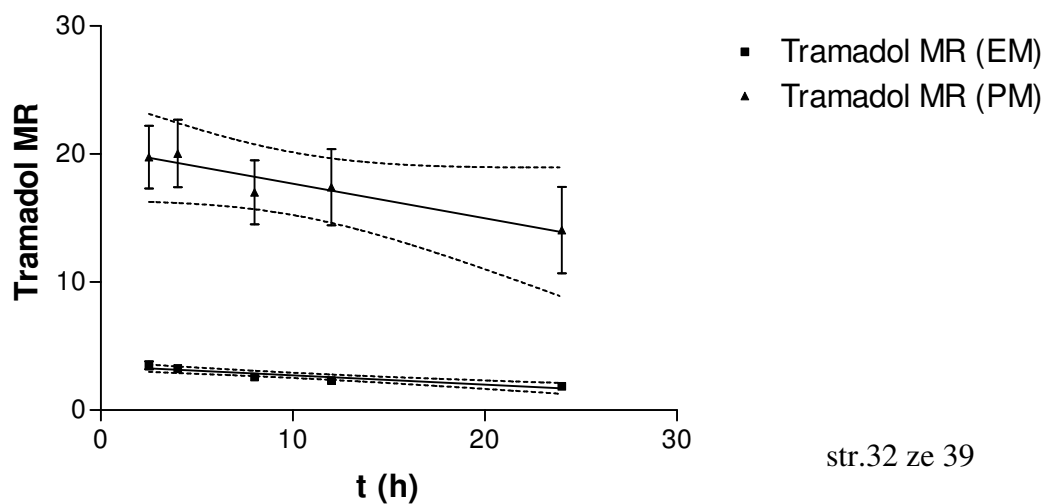
Graf 5: Průměrné hodnoty $t_{1/2}$ *O*-demetyltramadolu v jednotlivých genotypových skupinách.



Graf 6: Průměrné hodnoty MR tramadolu/*O*-demetyltramadolu (\pm SD) v jednotlivých genotypových skupinách.



Graf 7: Průběh průměrných hodnot MR tramadolu/*O*-demetyltramadolu (\pm SD) v jednotlivých genotypových skupinách v jednotlivých odběrových intervalech. Přerušované linie představují 95% CI.



GENETICKY PODMÍNĚNÁ VARIABILITA METABOLIZMU LÉČIV

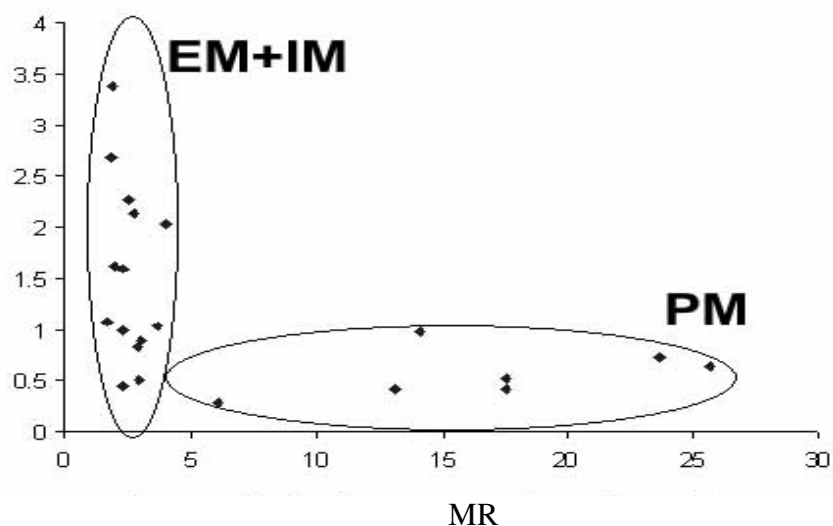
Druhý okruh sledované problematiky se týká vlivu geneticky podmíněné variability odbourávání léčiv na jejich farmakodynamiku u lidí.

Jako modelové měřítko farmakodynamického účinku tramadolu jsme zvolili opioidním mechanismem navozenou miózu. Při řešení této problematiky jsme se nejprve soustředili na zavedení a validaci metody. V práci je uvedena příprava a srovnání vlastní metodiky pomocí infračervené digitální fotografie a běžného programového vybavení s postupem používajícím speciální pupilometr Pupillscan II. Tato jednoduchá metoda se ukázala dostatečně věrohodná pro posouzení statické pupilometrie, přičemž k jejímu provádění není nutné žádné zvláštní vybavení. Hlavní nevýhodou naší metody je nemožnost sledovat dynamickou odpověď zornic na světelné nebo jiné podněty. Příložené publikace popisují výsledky pupilometrie ve skupině zdravých dobrovolníků se známým genotypem po jednorázovém podání tramadolu. Výsledky ukazují, že mióza navozená léčivem je významně ovlivněna genotypem *CYP2D6* přičemž nejmenší, ale stále pozorovatelná, je ve skupině PM. Tento nález je ve shodě s nejnižšími plazmatickými hladinami *O*-demetyltramadolu, jakožto aktivního metabolitu, kterému je přisuzována hlavní opioidní složka analgetického působení tramadolu.

V dosud nepublikovaných analýzách jsme se věnovali využití farmakodynamického účinku a infračervené pupilometrie k neinvazivní fenotypizaci *CYP2D6* po podání jedné dávky tramadolu. Pro tento účel jsme hodnotili farmakodynamické parametry AUD0-12 a E_{max} . Vztah maximální léčivem navozené miózy (E_{max}) k MR, jakožto farmakokinetickému parametru pro aktivitu *CYP2D6*, ve skupinách EM, IM a PM jsou uvedeny v grafu 8. Je patrné, že dochází k částečnému překryvu E_{max} mezi genotypovými skupinami, nicméně u žádného z PM není E_{max} vyšší než 1 mm.

Graf 8: Vztah maximální léčivem navozené miózy (E_{max}) k MR tramadolu po jednorázovém podání léčiva u jedinců genotypových skupin EM, IM, PM pro CYP2D6.

E_{max} (mm)



Třetí okruh je aplikace vybraných postupů fenotypizace/genotypizace v podmínkách klinické praxe, např. při posouzení predispozic v rámci hodnocení vzniku a průběhu onemocnění, a pro predikci lékové odpovědi (NÚL).

Zabývali jsme se fenotypizací CYP1A2 pomocí coffeinu a odpovídajícímu metabolickému poměru paraxantin/coffein ze slin. Hodnotili jsme vliv onemocnění jaterní cirhózou na tento parametr jako ukazatel metabolické funkce jater. Metabolický poměr u nemocných (MR = $0,15 \pm 0,07$) byl statisticky významně nižší než u kontrol (MR = $0,55 \pm 0,29$). Při použití čtyřbodového postupu jsme získali následující hodnoty : nemocní - CL = $2,39 \pm 2,36$ l/h ; $t_{1/2} = 90,18 \pm 168,44$ h; zdraví dobrovolníci - CL = $8,10 \pm 4,58$ l/h ; $t_{1/2} = 8,60 \pm 4,12$ h ($p < 0,05$). Prokázali jsme statisticky významnou korelaci metabolického poměru s hodnotami clearance ($r_s = 0,83$) i poločasu ($r_s = -0,72$). Obdobné výsledky jsme získali také dvoubodovou metodou výpočtu farmakokinetických parametrů.

Také jsme srovnávali fenotyp CYP2D6 u pacientů s familiální adenomatózní polypózou s hodnotami u zdravých dobrovolníků. Cílem práce bylo posoudit, zda je aktivita CYP2D6 predisponujícím faktorem pro vznik nebo progresi onemocnění prostřednictvím alterace metabolismu karcinogenně působících chemických sloučenin z prostředí, obdobně jako vysoká aktivita CYP1A2 nebo nízká aktivita NAT1. Frekvence PM se ve skupině pacientů signifikantně nelišila od zdravých kontrol, ale velikost souboru 30 pacientů není pro tento účel dostačující. Nalezli jsme vyšší metabolický poměr u pacientů s prokázanými maligními změnami v polypech ve srovnání s pacienty bez přítomnosti maligních změn. Tato tendence může naznačovat podíl CYP2D6 na progresi onemocnění.

V práci je dále uveden popis kasuistiky dvou pacientek, jedné z ČR a jedné z USA. Práce ilustruje zásadní význam fenotypu PM pro výskyt závažné myelotoxicity vyskytující se i u velmi nízkých dávek azathioprinu. Pacientce českého původu s roztroušenou sklerózou byl v souladu s běžným léčebným postupem nasazen azathioprin v nízké denní dávce 50 mg/den. I takto nízká dávka nicméně vedla k závažné myelosupresi, způsobené retrospektivně potvrzeným kompletním deficitem aktivity TPMT způsobeným homozygotním genotypem pro deficitní alelu *TPMT*3A*.

Závěr

Předložená práce se zabývá vlivem geneticky podmíněné interindividuální variability enzymů odbourávajících léčiva na jejich farmakokinetiku a farmakodynamické účinky. Soustřeďuje se zároveň na klinické využití vyšetřování přítomnosti genetických polymorfizmů.

Výsledky práce lze shrnout následovně:

- farmakokinetika některých léčiv v organismu a jejich farmakodynamické účinky jsou významně závislé na genotypu enzymatických cest jejich biotransformace
- fenotypizace může být zatížena potenciální chybou vyplývající také z přítomnosti neznámých metabolitů
- validovaná metoda fenotypizace umožňuje posoudit aktuální stav metabolismu, např. pro posouzení progresu jaterních onemocnění
- geneticky podmíněný deficit odbourávání léčiva může být příčinou závažných nežádoucích účinků
- znalost aktivity biotransformačních procesů před zahájením léčby a odpovídající individualizace dávkování může přispět k racionalizaci farmakoterapie

Použitá literatura

- Adcock DM, Koftan C, Crisan D, Kiechle FL. Effect of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 gene on warfarin anticoagulation. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:1360-3.
- Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999;353:717-9.
- Andersson T, Flockhart DA, Goldstein DB, Huang SM, Kroetz DL, Milos PM, Ratain MJ, Thummel K. Drug-metabolizing enzymes: evidence for clinical utility of pharmacogenomic tests. *Clin Pharmacol Ther* 2005;78:559-81.
- Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:737-47.
- Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* 2002;3:229-43.
- Cascorbi I. Pharmacogenetics of cytochrome p4502D6: genetic background and clinical implication. *Eur J Clin Invest* 2003;33 Suppl 2:17-22.
- Dahl ML. Cytochrome p450 phenotyping/genotyping in patients receiving antipsychotics: useful aid to prescribing? *Clin Pharmacokinet* 2002;41:453-70.
- de Leon J, Armstrong SC, Cozza KL. Clinical guidelines for psychiatrists for the use of pharmacogenetic testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19. *Psychosomatics* 2006;47:75-85.
- Flores CM, Mogil JS. The pharmacogenetics of analgesia: toward a genetically-based approach to pain management. *Pharmacogenomics* 2001;2:177-94.
- Furuta T, Shirai N, Ohashi K, Ishizaki T. Therapeutic impact of CYP2C19 pharmacogenetics on proton pump inhibitor-based eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2003;25:131-43.
- Furuta T, Shirai N, Sugimoto M, Ohashi K, Ishizaki T. Pharmacogenomics of proton pump inhibitors. *Pharmacogenomics* 2004;5:181-202.
- Furuya H, Fernandez-Salguero P, Gregory W, Taber H, Steward A, Gonzalez FJ, Idle JR. Genetic polymorphism of CYP2C9 and its effect on warfarin maintenance dose requirement in patients undergoing anticoagulation therapy. *Pharmacogenetics* 1995;5:389-92.
- Gaedigk A. Interethnic differences of drug-metabolizing enzymes. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000;38:61-8.
- Gage BF, Eby CS. Pharmacogenetics and anticoagulant therapy. *J Thromb Thrombolysis* 2003;16:73-8.
- Gan GG, Phipps ME, Ku CS, Teh A, Sangkar V. Genetic polymorphism of the CYP2C9 subfamily of 3 different races in warfarin maintenance dose. *Int J Hematol* 2004;80:295-6.
- Gonzalez FJ, Jaiswal AK, Nebert DW. P450 genes: evolution, regulation, and relationship to human cancer and pharmacogenetics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 2:879-90.
- Gonzalez FJ, Meyer UA. Molecular genetics of the debrisoquin-sparteine polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 1991;50:233-8.
- Guengerich FP. Cytochrome P450: what have we learned and what are the future issues? *Drug Metab Rev* 2004;36:159-97.

- Guzey C, Spigset O. Genotyping as a tool to predict adverse drug reactions. *Curr Top Med Chem* 2004;4:1411-21.
- Ingelman-Sundberg M, Rodriguez-Antona C. Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005;360:1563-70.
- Kirchheiner J, Brockmoller J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 2005;77:1-16.
- Kirchheiner J, Brosen K, Dahl ML, Gram LF, Kasper S, Roots I, Sjoqvist F, Spina E, Brockmoller J. CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages. *Acta Psychiatr Scand* 2001;104:173-92.
- Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, Wong ML, Licinio J, Roots I, Brockmoller J. Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry* 2004;9:442-73.
- Lamba JK, Lin YS, Thummel K, Daly A, Watkins PB, Strom S, Zhang J, Schuetz EG. Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations. *Pharmacogenetics* 2002;12:121-32.
- Musana AK, Wilke RA. Gene-based drug prescribing: clinical implications of the cytochrome P450 genes. *Wmj* 2005;104:61-6.
- Mushiroda T, Ohnishi Y, Saito S, Takahashi A, Kikuchi Y, Saito S, Shimomura H, Wanibuchi Y, Suzuki T, Kamatani N, Nakamura Y. Association of VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms with warfarin dose requirements in Japanese patients. *J Hum Genet* 2006;51:249-53.
- Nebert DW, Vesell ES. Advances in pharmacogenomics and individualized drug therapy: exciting challenges that lie ahead. *Eur J Pharmacol* 2004;500:267-80.
- Nebert DW, Jorge-Nebert L, Vesell ES. Pharmacogenomics and "individualized drug therapy": high expectations and disappointing achievements. *Am J Pharmacogenomics* 2003;3:361-70.
- Paar WD, Poche S, Gerloff J, Dengler HJ. Polymorphic CYP2D6 mediates O-demethylation of the opioid analgesic tramadol. *Eur J Clin Pharmacol* 1997;53:235-9.
- Pirmohamed M, Kitteringham NR, Quest LJ, Allott RL, Green VJ, Gilmore IT, Park BK. Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 and risk of alcoholic liver disease in Caucasians. *Pharmacogenetics* 1995;5:351-7.
- Pirmohamed M, Park BK. Genetic susceptibility to adverse drug reactions. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:298-305.
- Poulsen L, Arendt-Nielsen L, Brosen K, Sindrup SH. The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther* 1996;60:636-44.
- Redman AR, Dickmann LJ, Kidd RS, Goldstein JA, Ritchie DM, Hon YY. CYP2C9 genetic polymorphisms and warfarin. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004;10:149-54.
- Rioux PP. Clinical trials in pharmacogenetics and pharmacogenomics: methods and applications. *Am J Health Syst Pharm* 2000;57:887-98; quiz 899-901.
- Roberts RL, Begg EJ, Joyce PR, Kennedy MA. How the pharmacogenetics of cytochrome P450 enzymes may affect prescribing. *N Z Med J* 2002;115:137-40.
- Roden DM. Principles in pharmacogenetics. *Epilepsia* 2001;42 Suppl 5:44-8.
- Roots I, Gerloff T, Meisel C, Kirchheiner J, Goldammer M, Kaiser R, Laschinski G, Brockmoller J, Cascorbi I, Kleeberg U, Hildebrandt AG. Pharmacogenetics-based new therapeutic concepts. *Drug Metab Rev* 2004;36:617-38.

- Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 1997;60:284-95.
- Sapone A, Vaira D, Trespidi S, Perna F, Gatta L, Tampieri A, Ricci C, Cantelli-Forti G, Miglioli M, Biagi GL, Paolini M. The clinical role of cytochrome p450 genotypes in Helicobacter pylori management. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1010-5.
- Schalekamp T, Brasse BP, Roijers JF, Chahid Y, van Geest-Daalderop JH, de Vries-Goldschmeding H, van Wijk EM, Egberts AC, de Boer A. VKORC1 and CYP2C9 genotypes and acenocoumarol anticoagulation status: interaction between both genotypes affects overanticoagulation. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80:13-22.
- Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, Wood P, Kesteven P, Daly AK, Kamali F. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 2005;106:2329-33.
- Streetman DS, Bertino JS, Jr., Nafziger AN. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics* 2000;10:187-216.
- Subrahmanyam V, Renwick AB, Walters DG, Young PJ, Price RJ, Tonelli AP, Lake BG. Identification of cytochrome P-450 isoforms responsible for cis-tramadol metabolism in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2001;29:1146-55.
- Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med* 2003;348:529-37.
- Wu WN, McKown LA, Liao S. Metabolism of the analgesic drug ULTRAM (tramadol hydrochloride) in humans: API-MS and MS/MS characterization of metabolites. *Xenobiotica* 2002;32:411-25.