



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Farmakogenetika Clopidogrelu v selektovaném souboru
pacientů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Barbora Jančálková**
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Ing. Arpád Bóday**
Termín odevzdání práce: 2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Barbora Jančálková
Název práce	Farmakogenetika Clopidogrelu v selektovaném souboru pacientů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoře AGEL a.s. Nový Jičín
Vedoucí práce	Ing. Arpád Bóday
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Clopidogrel je antitrombotický lék, který inhibuje agregaci trombocytů, čímž sníží riziko vzniku trombů a následnou ischemickou cévní mozkovou příhodou. Hlavní roli v metabolismu Clopidogrelu zaujímá enzym CYP2C19, který je produktem polymorfního genu <i>CYP2C19</i>. Standartní alela <i>CYP2C19*1</i> je charakterizována pro normální metabolizátory léčiva. Pomalí metabolizátoři jsou nositeli alely <i>CYP2C19*2</i> a <i>CYP2C19*3</i>, zatímco alelu <i>CYP2C19*17</i> mají ultrarychlí metabolizátoři. Zjištěnými genotypy lze individualizovat léčbu proléčivem. Cílem práce bylo pomocí real-time PCR analyzovat diplotypy <i>CYP2C19</i> u selektovaných pacientů po ischemické cévní mozkové příhodě a tím zjistit jejich reakci na terapii proléčivem.</p>
Klíčová slova	Clopidogrel, tromboembolická nemoc, cytochrom P450, CYP2C19, real-time PCR
Počet stran	66
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Barbora Jančálková
Title of thesis	Pharmacogenetics of Clopidogrel in a selected group of patients
Type of thesis	Master
Department	Laboratory AGEL a.s. Nový Jičín
Supervisor	Ing. Arpád Bóday
The year of presentation	2020
Abstract	<p>Clopidogrel is an antithrombotic drug that inhibits trombocyte aggregation, thereby reducing the risk of thrombus formation and subsequent ischemic stroke. The CYP2C19 enzyme, a product of the <i>CYP2C19</i> polymorphic gene, plays a major role in the metabolism of Clopidogrel. The standard <i>CYP2C19*1</i> allele is characterized for normal drug metabolizers. Slow metabolisers carry the <i>CYP2C19*2</i> and <i>CYP2C19*3</i> alleles, while the <i>CYP2C19*17</i> allele has ultra-fast metabolisers. The identified genotypes can individualize prodrug treatment. The aim of the study was to use real-time PCR to analyze <i>CYP2C19</i> diplotypes in selected patients after ischemic stroke and thus determine their response to prodrug therapy.</p>
Keywords	Clopidogrel, thromboembolic disease, cytochrome P450, CYP2C19, real-time PCR
Number of pages	66
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu práce Ing. Arpádu Bódayovi za odborné vedení, ochotu konzultovat výsledky experimentů, předání zkušeností z laboratorní praxe, za jeho vstřícnost a trpělivost při zpracování diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Tomáši Mičaníkovi za cenné rady a poskytnutí anamnéz selektovaného souboru pacientů po cévní mozkové příhodě s nastavenou léčbou Clopidogrelem. Poděkování patří všem pracovníkům z oddělení laboratoře molekulární biologie v Laboratořích AGEL a.s. v Novém Jičíně za veškeré rady a vytvoření příjemných pracovních podmínek.

OBSAH

	SEZNAM ZKRATEK	8
1	ÚVOD A CÍLE PRÁCE	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1	Tromboembolická nemoc	12
2.1.1	Ischemická cévní mozková příhoda	12
2.1.2	Trombocyty	12
2.1.3	Agregace trombocytů	13
2.1.4	Trombus	15
2.1.5	Rizikové faktory	15
2.1.6	Příznaky TEN	15
2.1.7	Diagnostika TEN	16
2.1.8	Terapie TEN	16
2.1.9	Recidiva TEN	17
2.1.10	Profylaxe TEN	17
2.1.11	Incidence TEN	17
2.2	Biotransformace xenobiotik	17
2.3	Cytochromy P450	20
2.3.1	Nomenklatura CYP	21
2.3.2	Formy lidských CYP	21
2.3.3	Rodina CYP1	23
2.3.4	Rodina CYP2	23
2.3.5	Rodina CYP3	24
2.3.6	Izoenzym CYP2C19	25
2.3.7	Incidence polymorfismu CYP2C19	27
2.3.8	Farmakogenetika	29
2.4	Clopidogrel	30
2.4.1	Metabolismus Clopidogrelu	30
2.4.2	Další genetické polymorfismy	31
2.4.3	Farmakodynamika	32
2.4.4	Rezistence	32
2.4.5	Lékové interakce Clopidogrelu	32
2.4.6	Indikace Clopidogrelu	33
2.4.7	Nežádoucí účinky Clopidogrelu	33

2.4.8	Noví antagonisté P2Y12 receptoru	34
2.4.9	Alternativní antiagregační léčba	34
2.5	Analýza genomické DNA	35
2.5.1	Izolace DNA z periferní krve	35
2.5.2	Kvantifikace DNA	36
2.5.3	Real-time PCR	36
2.5.4	Detekce DNA	37
3	PRAKTICKÁ ČÁST	39
3.1	Materiál a vybavení	39
3.1.1	Laboratorní přístroje a pomůcky	39
3.1.2	Chemikálie	39
3.1.3	Biologický materiál	39
3.2	Experimentální metody	40
3.2.1	Purifikace DNA z plné krve pomocí Gentra Puregene Blood Kit	40
3.2.2	Izolace DNA z periferní krve automatickou metodou	41
3.2.3	Kvantifikace DNA spektrofotometrem NanoDrop 2000	41
3.2.4	Analýza polymorfismu	42
3.2.5	Analýza genu <i>CYP2C19</i> pomocí real-time PCR	42
4	VÝSLEDKY	43
4.1	Případová studie	48
5	DISKUSE	53
6	ZÁVĚR	57
7	SEZNAM LITERATURY	58

SEZNAM ZKRATEK

ABCB1	ATP-vazebná kazetová podskupina B člen 1
AC	adenylylcykláza
ACS	akutní koronární syndrom
ADH	alkoholdehydrogenáza
ADP	adenosindifosfát
ALDH	aldehyddehydrogenáza
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
ASA	kyselina acetylsalicylová, acetylsalicylic acid
ATP	adenosintrifosfát
BMI	Body Mass Index
cAMP	cyklický adenosin-monofosfát
CES1	karboxylesteráza 1
COMT	katechol- <i>O</i> -methyltransferáza
CT	výpočetní tomografie, Computed Tomography
CYP, P450	cytochrom P450
DAG	diacylglycerol
dsDNA	dvouvláknová DNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPD	dihydropyrimidin dehydrogenáza
DVT	deep vein thrombosis, hluboká žilní trombóza
EtBr	ethidiumbromid
FAM	6-karboxyfluorescein
gb	generi biotech
gDNA	genomická DNA
GP	glykoprotein
GST	glutathion- <i>S</i> -transferáza
HET	heterozygotní genotyp
HEX	6-karboxy-N, N, N', N'-tetramethylrhodamin
HMT	histamin-methyltransferáza,
iCMP	ischemická cévní mozková příhoda
IP3	inositol trifosfát
LMWH	nízkomolekulární heparin

MLCK-P	fosforylace kinázy lehkého řetězce myosinu
MUT	mutovaný homozygotní genotyp
NAT	N-acetyltransferáza
NK	nukleová kyselina
NQO1	chinon-oxidoreduktáza
PE	plicní embolie
PGE ₁	prostaglandid E ₁
P-gp	P-glykoprotein
PI3K	fosfatidylinositol 3-kinát
PIP2	fosfatidylinositol bisfosfát
PKB/Akt	serin-threoninová proteinová kináza B
PKC	proteinová kináza C
PLC	fosfolipáza C
PON1	paraoxonáza-1
PPI	inhibitor protonové pumpy
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězcová reakce
RCB	red blood cell
ST	sulfotransferáza
TEN	tromboembolická nemoc
TK	krevní tlak
TPMT	thiopurin methyltransferáza
TXA ₂	tromboxan A ₂
UFH	nefrakcionovaný heparin
UGT	uridin-5'-difosfoglukuronosyltransferázou
VASP-P	fosforylace vazodilatačně stimulovaného fosfoproteinu
WT	wild type, homozygotní genotyp

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Ischemická cévní mozková příhoda (iCMP) vzniká následkem neprůchodnosti mozkové tepny, a to jejím uzávěrem nebo zúžením aterosklerotickým plátem. Následkem je přerušené zásobování mozku krví a tím dojde k cerebrální ischemii. Přerušeni je způsobeno následkem lokální tvorby krevních sraženin (trombů) nebo dojde k uvolnění krevní sraženiny na jiném místě v těle a její zachycení v tepně zásobující mozek. Tento stav je označován jako embolie. Cévní mozková příhoda se řadí mezi kardiovaskulární onemocnění (plicní embolie, infarkt myokardu). Jedná se o akutní stav s neodkladnou lékařskou pomocí a rychlostí rozpoznání příznaků k zahájení účinné léčby. Po proběhlé iCMP je nejdůležitější snížení rizika recidivy, nastavení nejvhodnější léčby, snížení krevního tlaku, léčba diabetu, úprava hladin cholesterolu. U pacientů se zjištěnou fibrilací síní je nastavená antikoagulační léčba a k sekundární prevenci iCMP jsou podáváná antiagregační léčiva.

Clopidogrel je antitrombotický lék, patří do skupiny antiagregačních léčiv a je inhibitorem pro agregaci trombocytů. Svým mechanismem účinku zabraňuje navázání látky adenosindifosfát na receptor P2Y₁₂ na povrchu membrány trombocytů. Trombocyty tak ztrácejí schopnost agregovat a tím se snižuje riziko tvorby trombů.

Na metabolismu Clopidogrelu se podílí enzymy cytochromu P450, především enzym CYP2C19, který je produktem genu *CYP2C19*. Jedná se o jaterní enzym působící zejména na antiagregační léčiva. Při metabolismu léčiv hraje důležitou roli genetický polymorfismus. Polymorfní gen *CYP2C19* má standardní alelu *CYP2C19*1* a tři významné alelické varianty. Alela *CYP2C19*2* a *CYP2C19*3* je zodpovědná za pomalý metabolismus léčiva, zatímco u rychlého metabolizátora se vyskytuje alela *CYP2C19*17*. Na základě zjištěného genotypu pak dochází k úpravám dávkování léčiva.

Cílem teoretické části práce bylo vypracovat rešerši léčby ischemické cévní mozkové příhody léčené Clopidogrelem z pohledu farmakogenetiky se zaměřením na Clopidogrel. Praktická část byla zaměřena na identifikaci vyšetřených polymorfismů v genu *CYP2C19* za pomoci real-time PCR u selektovaných pacientů z Neurologického oddělení nemocnice Vítkovice. Zjištěným genotypem lze vytipovat pacienty, kteří na léčbu Clopidogrelem nebudou reagovat dostatečně a budou vystaveni vyššímu riziku recidiv a nežádoucích účinků. Následně v selektovaném

souborů pacientů byla určena četnost jednotlivých polymorfismů a porovnána s frekvencemi uvedených v publikacích.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Tromboembolická nemoc

Tromboembolická nemoc (TEN) zahrnuje hlubokou žilní trombózu (DVT = deep vein thrombosis) a plicní embolii (PE). Po akutních koronárních syndromech a cévní mozkové příhodě (CMP) se řadí k třetím nejčastějším vaskulárním onemocněním (Spencer et. al., 2006). TEN je charakterizována vznikem krevní sraženiny (trombem), která při DVT vzniká v žilách nohou a paží, v případě PE se embolizuje a putuje do plic (Crous-Bou et. al., 2016). Jedná se o život ohrožující stav, především u hospitalizovaných pacientů po velkých operacích (Ju et. al., 2014).

2.1.1 Ischemická cévní mozková příhoda

Ischemická cévní mozková příhoda (iCMP) je následkem náhle nebo postupné okluze mozkových tepen, vzniklé na podkladě trombu nebo embolu. Ve vzniklé ischemické oblasti mozku je narušený průtok krve, vážně přisun kyslíku a glukózy do mozku, tím dochází k poškození buněk v mozku. Jedná se o náhlou neurologickou poruchu (Cheon et. al., 2018). K rizikovým faktorům vzniku iCMP se řadí hypertenze, koronární srdeční onemocnění, genetická predispozice – mutace G20210A v genu kódující protrombin, ateroskleróza velkých tepen, diabetes mellitus, porucha metabolismu lipidů a kouření (Li et. al., 2017). Mezi symptomy patří dysartrie, hemiparéza, smyslové ztráty (Topcuoglu et. al., 2017).

Léčba CMP je zahájena trombolytickou terapií, která je limitována časovým oknem s intervalem do 4,5 hodin od prvních symptomů. Dojde-li k prodlevě je provedena perkutánní intravaskulární intervence. Jsou nasazena antiagregační léčiva. Rozsah rehabilitace se posuzuje dle klinického stavu individuálně (Hao et. al., 2014).

U pacientů po iCMP je vyšší riziko vzniku infarktu myokardu a recidiv z důvodu vaskulárních rizikových faktorů a je nutná sekundární prevence (Boulanger et. al., 2018).

2.1.2 Trombocyty

Trombocyty (krevní destičky) jsou bezjaderná tělíčka a hrají důležitou roli při zástavě krvácení (hemostáze) (Koupenova et. al., 2018). Mají podíl nejen na tvorbě trombu, ale i schopnost udržet průtok krve uvnitř cév (Holinstat, 2017). Vznikají v kostní dřeni

z megakaryocytů a po dozrání se uvolňují do krevního řečiště, kde je jejich životnost 7 až 10 dnů.

Trombocyt je složen z cytoplasmy obsahující aktin, myozin, lysozomy a granule. Na jeho membráně se nacházejí receptory pro kolagen, von Willebrandův faktor (vWF) a fibrinogen (Koupenova et. al., 2018). Trombocyty protékají v blízkosti subendotelu a dojde-li k jeho porušení, svou rychlou reakcí se podílejí na tvorbě trombu, procesem adheze, aktivace a agregace (Holinstat, 2017).

Na poškozeném subendotelu se vyskytují fibrily kolagenu, na které se lepí (adherují) trombocyty pomocí glykoproteinu a vWF. Aktivuje se koagulační kaskáda, trombocyty uvolňují kyselinu arachidonovou a dochází k tvorbě tromboxan A₂ (TXA₂) a uvolňování adenosindifosfátu (ADP). Trombocyty jsou vystaveny tkáňovému faktoru a jeho přítomnost vede k tvorbě trombinu, vzniká primární hemostatická zátka, která zabrání opětovnému krvácení. Aktin a myozin se podílí na vazokonstrikci a stabilizaci trombu. Pomocí trombinu dochází k aktivaci krevních destiček a k přeměně fibrinogenu na fibrinová vlákna.

Vlivem patologických faktorů může docházet k neregulovatelnému vzniku trombů a k následné arteriální trombóze (Koupenova et. al., 2018).

2.1.3 Agregace trombocytů

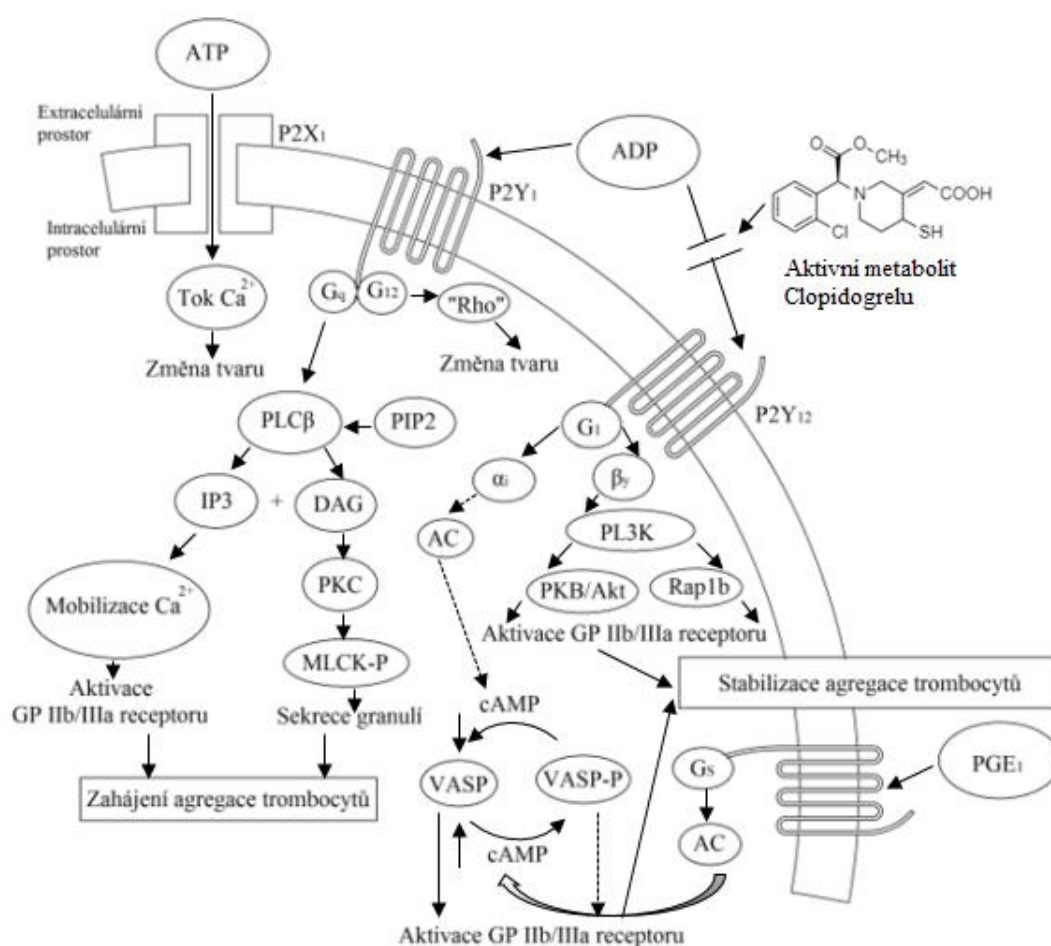
Důležitou úlohu v hemostáze a trombóze zaujímá ADP, který je po aktivaci trombocytů uvolňován z granulí. ADP následně aktivuje trombocyty, čímž se agregace trombocytů ještě zesílí. Aktivace a agregace trombocytů se účastní receptory P₂X₁, P₂Y₁ a P₂Y₁₂. Zmíněná agregace trombocytů je zobrazena na obrázku 1.

Navázáním agonisty ADP na receptor P₂Y₁ spřaženým s G-proteinem, respektive G_q proteinem se aktivuje fosfolipáza C (PLC). PLC z fosfatidylinositol bisfosfátu (PIP₂) syntetizuje inositol trifosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG). IP₃ navozuje mobilizaci intracelulárních vápenatých iontů. DAG aktivuje proteinovou kinázu C (PKC), následuje fosforylace kinázy lehkého řetězce myosinu (MLCK-P) a sekrece granulí. Tímto procesem je iniciovaná agregace trombocytů.

Ke změně tvaru trombocytů dochází aktivací P₂Y₁ a P₂X₁ receptoru. Receptor P₂Y₁ spřažený s G₁₂ proteinem aktivuje Rho protein. Agonista adenosintrifosfát (ATP) aktivuje receptor P₂X₁ a následkem je přísun extracelulárního vápníku.

Ke stabilizaci agregace trombocytů dochází navázáním ADP na P2Y₁₂ receptor spřažený s G_i proteinem, následkem je uvolnění α_i a β_γ podjednotky. Podjednotka α_i inhibuje adenylycyklázu (AC), která vede ke snížení hladiny cyklického adenosin- monofosfátu (cAMP). Dojde ke snížení cAMP zprostředkované fosforylací vazodilatačně stimulovaného fosfoproteinu (VASP) (VASP-P). Vlivem VASP-P je modulována aktivace glykoproteinu (GP) IIb/IIIa receptoru. Podjednotka β_γ aktivuje fosfatidylinositol 3-kinázu (PI3K), která aktivuje serin-threoninovou proteinovou kinázu B (PKB/Akt) a Rap1b GTP vázající proteiny. Tím dochází k aktivaci GP IIb/IIIa receptoru.

Prostaglandid E₁ (PGE₁) aktivací AC zvyšuje hladinu cAMP a VASP-P (Angiolillo et. al., 2007).



Obr. 1: Agregace trombocytů (upraveno podle Angiolillo et. al., 2007).

2.1.4 Trombus

Příčinou vzniku trombu je intravaskulární koagulace krve v tepnách či žilách, která následně omezuje průtok krve (Kerlin et. al., 2012). Trombus se vyvíjí na rozrušených aterosklerotických placích. Na jeho tvorbě a šíření se podílí trombogenicita vaskulární stěny, změněný průtok krve a nevyvážená hemostáza krve. Trombus obsahuje především agregované krevní destičky a velké množství fibrinu (Asada et. al., 2018).

2.1.5 Rizikové faktory

Rizikové faktory TEN lze rozdělit na environmentální, mezi které patří nádorové onemocnění, chirurgický zákrok, zlomenina, imobilizace, katetrizace, těhotenství, poporodní období, cestování na velké vzdálenosti, a dále na genetické, kde spadá věk, pohlaví, rasa/etnika, Body Mass Index (BMI), obezita, hormonální terapie, kortikosteroidy, statiny, strava a sedavý způsob života (Crous-Bou et. al., 2016).

Z jiného úhlu pohledu lze rizikové faktory rozdělit na krátkodobé, které se vyskytují např. po operaci kyčle nebo dlouhodobé, objevující se např. u pacientů s metastazujícím karcinomem (Bates, et. al., 2000).

I pohlaví pacienta může ovlivnit, zda se u něho vyskytnou žilní trombotické nebo arteriální příhody, jenž mají rozdílné rizikové faktory. Žilní příhody a věk nad 65 let jsou následkem žilní trombózy, kterou trpí častěji ženy než muži, zatímco arteriálním trombózám, vyskytujících se častěji u mužů než u žen, předchází arteriální příhody a hypertenze (Griesshammer et. al., 2019).

2.1.6 Příznaky TEN

Příznaky jako jsou otoky, bolest a návaly horka se u pacientů objevují pouze zřídka, z toho důvodu lze říct, že diagnóza DVT je asymptomatická (Samama, 2001). Příčinou otoků nohou, erytému a citlivosti lýtky může být také prasklá Bakerova cysta nebo infekční celulitida, zatímco u PE se projevuje náhlým nástupem dušnosti s hemoptýzou, pleuritickou bolestí na hrudi nebo kolapsem se šokem bez přítomných dalších příčin (Turpie et. al., 2002).

2.1.7 Diagnostika TEN

Pro diagnostiku TEN se používají metody, mezi které lze zařadit ultrasonografii, kontrastní venografii, magnetickou rezonanční venografii a počítačovou tomografii (CT = Computed Tomography) (Blann a Lip, 2006). Při laboratorním vyšetření lze pozorovat zvýšený hematokrit, který je následkem erytrocytózy (Griesshammer et. al., 2019) a hladina fibrinu D-dimeru je vyšší než 500 ng/ml (Blann a Lip, 2006).

2.1.8 Terapie TEN

K léčbě TEN se dává přednost parenterálním antikoagulačním léčivům, mezi které spadá nefrakcionovaný heparin (UFH) a nízkomolekulární heparin (LMWH). Nevýhodou je jejich špatná absorpce v gastrointestinálním traktu. Obecně parenterální léky nejsou vhodné pro dlouhodobou antikoagulační terapii. Znáмым perorálním antikoagulanciem je Warfarin, což je antagonist vitamínu K. Jeho užívání vyžaduje pečlivé sledování a časté úpravy dávkování. Dávkování také závisí na aktivitě enzymu CYP2C9 každého pacienta, dalším jeho handicapem je úzký bezpečnostní rozsah a pomalá účinnost léčiva.

Náhradou Warfarinu jsou nová perorální antikoagulantia, které vznikají interferencí faktoru Xa s trombinem. Faktor Xa je nepeptidová sloučenina s nízkou molekulovou hmotností, jenž je důležitou serinovou proteázou v koagulační kaskádě. Tato nová antikoagulantia, Rivaroxaban, Edoxaban a Apixaban jsou bezpečná, méně hemoragická, mají široký terapeutický rozsah a rychlý nástup účinku, nevyžadují monitorování. Používají se k primární prevenci a léčbě TEN (Nakamura et. al., 2017).

Embolektomie se uplatňuje při léčbě masivní PE v případě, že léčba léky není dostatečná, nebo je kontraindikována (Blann a Lip, 2006).

Při akutní terapii je vhodné podávat antikoagulantia krátkodobě, aby nedošlo k embolii trombu a taky, aby se aktivované zánětlivé a koagulační procesy dostaly zpět na normální hodnotu. Antikoagulantia neléčí TEN, ale snižují riziko recidivy u pacientů, kteří byli daným onemocněním postiženi. Po přerušení užívání antikoagulancií, riziko recidivy závisí na tom, zda byla TEN účinně vyléčená a dále na vnitřních rizikových faktorech podporující recidivu, což je vrozená trombofilie a malignita (Fahrni et. al., 2015).

U pacientů s vysokým rizikem kardiovaskulárních chorob je doporučována duální antiagregační terapie Clopidogrelem s kyselinou acetylsalicylovou

(ASA = acetylsalicylic acid). Clopidogrel je inhibítozem receptoru P2Y₁₂, zatímco ASA inhibuje syntézu TXA₂ (Squizzato et. al., 2017).

2.1.9 Recidiva TEN

Se zvyšujícím se věkem roste riziko vzniku TEN o 0,1 – 0,2 % ročně a riziko recidivy je 50 krát větší u pacientů s diagnostikovanou TEN (Fahrni et. al., 2015). V závislosti na dědičnosti se odhaduje riziko vzniku TEN v rozmezí 30 – 60 %. Mezi genetické faktory se řadí Leidenská mutace (Aïssi et. al., 2014) a mutace protrombinu G20210A (Li et. al., 2017). Dalším rizikovým faktorem je chirurgický zákrok, těhotenství a nádorové onemocnění (Fahrni et. al., 2015).

2.1.10 Profylaxe TEN

U vysoce rizikových pacientů se za dostatečnou profylaxi považuje kombinace elastické punčochy a LMWH. Profylaxe za pomoci LMWH by měla být po dobu vyskytujících se rizikových faktorů, kterými jsou zánět, sepsa a imobilizace (Samama, 2001).

Při krátkodobém užívání antikoagulace je cílem sekundární profylaxe předejít recidivě TEN (Fahrni et. al., 2015).

2.1.11 Incidence TEN

V rámci evropské populace se uvádí 1 až 2 nových případů TEN na 1000 osob. Z toho 60 % je pouze DVT a 40 % PE nebo PE s DVT (Crous-Bou et. al., 2016).

Incidence TEN je zaznamenána i u dětí, přičemž nejvíce jsou zasaženi kojenci ve věku od 1 do 23 měsíců a dále dospívající dívky (Spentzouris et. al., 2012).

2.2 Biotransformace xenobiotik

Xenobiotika, pro organismus cizorodé sloučeniny (Klotz a Steinbrenner, 2017), jsou vpravovány ve formě léků, pesticidů, těžkých kovů, polysacharidových bifenylyů anebo látek znečišťujících ovzduší (Lu et. al., 2015). Léčiva podávaná orální cestou, jsou transportována zažívacím traktem. K transformaci dochází vlivem jaterních enzymů a proteinů cytochromů P450 (Das et. al., 2016). Při biotransformaci dochází

ke strukturální modifikaci chemické látky (Yousofshahi et. al., 2015) a snadnější eliminaci z organismu (Tracy et. al., 2016).

Zvýšená exkrece xenobiotik z organismu je dosažena za pomoci enzymů, které hrají důležitou roli v přeměně sloučenin na vodorozpustné a méně aktivní deriváty. Tento děj se odehrává ve dvou fázích (Hoffmann et. al., 2014).

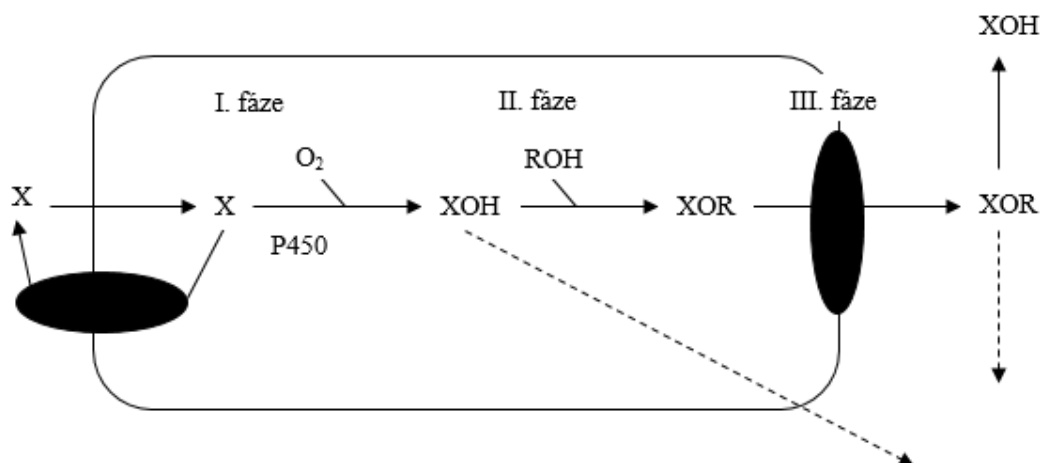
Metabolismus sloučenin I. fáze probíhá formou oxidace, redukce nebo hydrolýzy (Omiecinski et. al., 2011). Sloučeniny jsou aktivovány zavedením reaktivních a polárních funkčních skupin prostřednictvím enzymů (Yousofshahi et. al., 2015), mezi které patří např. alkoholdehydrogenáza (ADH), aldehyddehydrogenáza (ALDH), cytochrom P450 (CYP), dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD) a chinon- oxidoreduktáza (NQO1) (Evans a Relling, 1999), znázorněné na obrázku 3 vlevo.

V následující reakci aktivovaná sloučenina z I. fáze konjuguje s nabitým metabolitem (Yousofshahi et. al., 2015), za přítomnosti enzymů transferáz (Omiecinski et. al., 2011), jako jsou např. katechol-O-methyltransferáza (COMT), glutathion-S-transferáza (GST), histamin-methyltransferáza (HMT), N-acetyltransferáza (NAT), sulfotransferáza (ST), thiopurin methyltransferáza (TPMT) a glukuronosyltransferáza (UGT) (Evans a Relling, 1999), viz. obrázek 3 vpravo. V závislosti na přítomné transferáze jsou konjugační reakce pojmenované následovně: glukuronidace, sulfatace, metylace, acetylace, konjugace glutathionu a konjugace aminokyselin (Omiecinski et. al., 2011). Důsledkem reakce je zvýšení molekulové hmotnosti metabolitu, sníží se reaktivita a dojde ke zlepšení transportních vlastností (Yousofshahi et. al., 2015). Ve srovnání se sloučeninami I. fáze jsou metabolity více hydrofilní, což má za následek snazší exkreci (Omiecinski et. al., 2011).

Eliminace chemicky modifikovaných sloučenin z buňky do extracelulárního prostoru je umožněna prostřednictvím transportérů (Yousofshahi et. al., 2015). Jedná se o proteiny, které představují transmembránový kanál ohraničený hydrofilními postranními řetězci aminokyselin. Jejich funkce spočívá v migraci hydrofilních molekul, čímž je zajištěn jejich průnik přes buněčnou membránu. Na absorpci, distribuci a eliminaci léčiv se podílejí především transportéry ABC a SLC. ABC transportéry se podílejí na aktivním přenosu sloučenin z buňky do extracelulárního prostoru za spotřeby energie ATP, zatímco u SLC transportéru

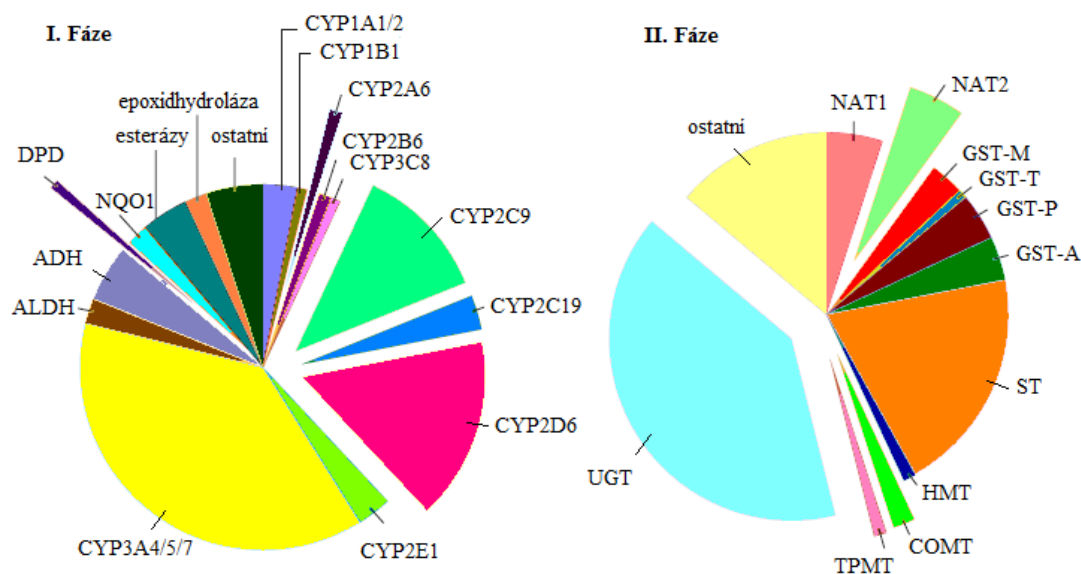
je pasivní přenos metabolitů přes buněčnou membránu řízen koncentračním gradientem, bez spotřeby energie.

V nezměněné formě jsou eliminována xenobiotika, u kterých nedošlo k metabolické degradaci (Hoffmann et. al., 2014).



Obr. 2: Grafické znázornění biotransformace a exkrece xenobiotik.

Xenobiotikum – proléčivo (X) je v I. fázi biotransformace za účasti P450 oxidováno na sloučeniny více rozpustné ve vodě (XOH). Fáze II představuje konjugační reakci mezi XOH a aktivovaným konjugačním činidlem (ROH) za vzniku konjugátu (XOR). Ve fázi III dochází k přenosu sloučenin XOH a XOR z buňky do extracelulárního prostoru prostřednictvím transportéru, následuje vyloučení sloučeniny močí nebo žlučí. Vyloučeny jsou také sloučeniny (X), u kterých nedošlo k biotransformaci (upraveno podle Martínkové et. al., 2001).



Obr. 3: Schéma jednotlivých enzymů účastnících se při biotransformační reakci xenobiotik ve fázi I. (vlevo) a II. (vpravo) (upraveno podle Evans a Relling, 1999).

2.3 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP, P450) se řadí mezi enzymy, které hrají důležitou úlohu při metabolismu xenobiotik u prokaryotických i eukaryotických organismů. Evoluční vývoj trvá více než 1,5 miliardy let, na podkladě divergentní cesty evoluce. V procesu vývoje z jediného genu se vyvinulo velké množství rozdílných genů kódující CYP (Stiborová et. al., 1999).

Odvození názvu cytochromu P450 je následující. Předpona cyto znamená vazbu na membrány uvnitř buňky, chrom a P vyjadřuje hemový pigment, který v případě působení oxidu uhelnatého absorbuje světlo při vlnové délce 450 nm (Lynch a Price, 2007). Tento objev je datován roku 1958 z odebraného jaterního mikrozomu potkana se spektrem při absorpčním maximu 450 nm (Nelson, 2013).

Enzymy CYP jsou polymorfní, genová exprese CYP je regulována na genetické a epigenetické úrovni, ale svou roli zde zaujímají i negenetické faktory, mezi které patří věk, pohlaví, nutriční stav a lékové interakce (Hasi et. al., 2018). Jedná se o vnitřní proteiny vázané na membránu. Je známo 57 lidských P450, z toho 50 v endoplazmatickém retikulu a 7 v mitochondriálních membránách (Guengerich et. al., 2016). Velikost P450 se usuzuje na 40 až 50 kDa (Poulos, 2003).

Enzymy CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 a CYP3A5, podílející se na metabolismu přibližně 90 % léčiv jsou exprimované v játrech, tenkém střevě,

plicích, placentě a ledvinách (Lynch a Price, 2007). CYP metabolizuje více než jedno léčivo, taktéž léčivo je metabolizováno více CYP. Aktivita CYP je léčivy inhibována nebo indukována přímou interakcí s enzymem nebo změnou jeho exprese (Preissner et. al., 2013). Vlivem metabolické přeměny dochází ke změně chemické struktury pro léčiva na aktivní metabolit a jeho účinnosti (Hoffmann et. al., 2014).

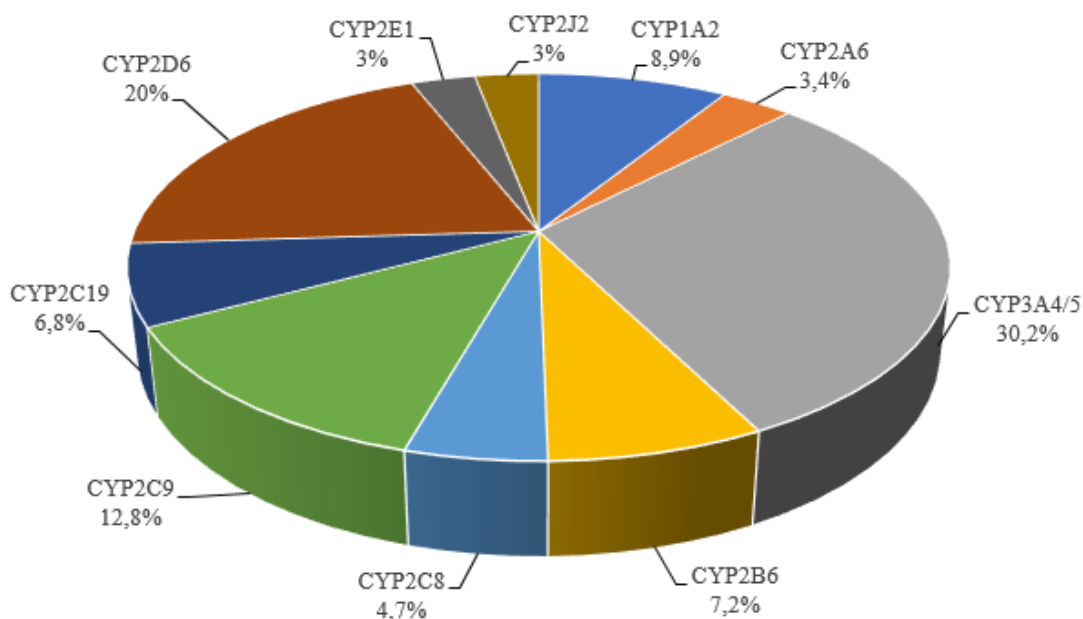
P450 se účastní mnoha chemických reakcí v metabolismu léčiv, steroidů, vitamínů rozpustných v tucích, karcinogenů (Guengerich et. al., 2016), pohlavních hormonů a žlučových kyselin (Poulos, 2003). Své uplatnění zaujímají také při tvorbě prostacyklinu a thromboxanu A₂, rovněž jsou důležité při detoxikaci exogenních látek (Lynch a Price, 2007).

2.3.1 Nomenklatura CYP

Vzhledem k velkému množství různých forem CYP, bylo nutné jejich třídění do genetických rodin a podrodin na základě míry homologie primární struktury proteinu. Do stejných rodin patří všechny enzymy, u kterých míra homologie aminokyselinové sekvence zaujímá více než 40 % a jsou značeny arabskou číslicí za zkratkou CYP. Enzymy mající shodnou aminokyselinovou sekvenci ve více než 60 % se řadí do stejné podrodiny CYP a označují se velkým písmenem. Následně za velkým písmenem je arabskou číslicí značen izoenzym. Příkladem je enzym CYP1A₂, který je členem rodiny 1, podrodiny A, enzymové rodiny 2 (Stiborová et. al., 1999).

2.3.2 Formy lidských CYP

Doposud je známo 57 lidských CYP, které jsou na základě sekvenční homologie rozděleny do 18 rodin a 43 podrodin (Preissner et. al., 2013). Na metabolismu 70 – 80 % léčiv a xenobiotik se podílí enzymy spadající do rodiny CYP1, CYP2 a CYP3 (Zanger a Schwab, 2013), jejichž formy jsou následující CYP 3A_{4/5}, 2D₆, 2C₉, 1A₂, 2B₆, 2C₁₉, 2C₈, 2A₆, 2E₁ a 2J₂, viz. obrázek 4 (Ung et. al., 2018).



Obr. 4: Grafické znázornění jednotlivých forem CYP podílející se na metabolismu léčiv, včetně jejich procentuálního výskytu (upraveno podle Zanger a Schwab, 2013).

Lidské CYP představují proteiny asociované s membránou, které jsou exprimované ve většině tkání, především v játrech (Preissner et. al., 2013). Na funkci CYP2C19, ale i CYP2D6, 2C9, 2B6, 3A4, 2A6 se výrazně podílí etnikum. V důsledku multialelických genetických polymorfismů dochází k odlišným farmakogenetickým fenotypům, které lze rozdělit na ultrarychlé, normální, střední a pomalé metabolizátory (Zanger a Schwab, 2013). CYP se podílí také na přeměně některých proléčiv na aktivní metabolity. (Mustafa et. al., 2019). Vysoce polymorfní izoformy mohou vést k toxicitě nebo nedostatečné terapeutické odpovědi léčiva (Gerth et. al., 2019). Proto je důležité upravit dávkování léčiv (Preissner et. al., 2013).

Podle sekvenční podobnosti lze P450 rozdělit do homologních rodin a superrodin. Identita sekvence proteinů pocházejících z odlišných superrodin je menší než 20 %. Struktura P450 je vysoce zachována, skládá se ze strukturně konzervovaných aminokyselin, a to kyseliny glutamové, argininu a cysteinu, které se podílejí na struktuře a funkci. Biochemické vlastnosti ovlivňuje variabilní oblast (Sirim et. al., 2010).

2.3.3 Rodina CYP1

Do rodiny CYP1 se řadí tři funkční geny *CYP1A1*, *CYP1A2* a *CYP1B1*. Geny *CYP1A1* a *CYP1A2* jsou vysoce konzervativní a skládají se ze sedmi exonů a šesti intronů, lokalizovaných na chromozomu 15q24.1. Gen *CYP1B1* je složen ze tří exonů a lokalizován na chromozomu 2p22.2. Geny *CYP1A1* a *CYP1B1* jsou exprimovány extrahepatálně, zatímco gen *CYP1A2* je vysoce exprimován pouze v játrech a vlivem této exprese se podílí na metabolismu léčiv, jako jsou např. analgetika, antipyretika, antipsychotika, antidepresiva, protizánětlivá a kardiovaskulární léky. Mezi endogenní substráty patří kyselina arachidonová, prostaglandiny, estrogeny, melatonin a kyselina retinová (Zanger a Schwab, 2013).

2.3.4 Rodina CYP2

Tato rodina obsahuje 16 genů a všechny geny mají devět exonů a osm intronů. Jsou lokalizovány na různých chromozomech a uspořádány v multigenových shlucích zahrnující jednu nebo několik podrodin. Mezi tři největší genové klastry se řadí klastr CYP2ABFGST lokalizován na chromozomu 19q13.2, s geny *CYP2A6* a *CYP2B6*, klastr CYP2C lokalizován na chromozomu 10q23.33 obsahuje gen *CYP2C8*, *CYP2C9* a *CYP2C19* a klastr CYP2D s funkčním genem *CYP2D6* na chromozomu 22q13.1-2. Většina genů rodiny CYP2 podílejících se na metabolismu léčiv je vysoce polymorfní, především *CYP2A6*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* a *CYP2D6*.

Podrodina CYP2A se skládá z genů *CYP2A6*, *CYP2A7* a *CYP2A13* a rozštěpeného pseudogenu *CYP2A18P* lokalizovaného na chromozomu 19q13.2. Funkčními geny jsou *CYP2A6* a *CYP2A13*, zatímco za nefunkční gen je považován *CYP2A7*. Gen *CYP2A6* je exprimován v játrech, kde je zastoupen ve 4 % z celkového množství CYP. Jeho endogenním substrátem je bilirubin.

Do podrodiny CYP2B patří funkční gen *CYP2B6* a nefunkční pseudogen *CYP2B7P* lokalizované v klastru genu CYP2ABFGST na 19. chromozomu v tandemovém uspořádání (Zanger a Schwab, 2013). V lidském organismu je zastoupen ve velmi malém množství, pouze v 0,2 % a svou úlohu má v metabolismu protinádorových léčiv, příkladem jsou cyklofosfamid a ifosfamid (Stiborová et. al., 1999).

Do podrodiny CYP2C spadají čtyři vysoce homologní geny (Zanger a Schwab, 2013) se 70 % sekvenční podobností (Mustafa et. al., 2019) lokalizované

na 10. chromozomu dlouhého raménka v následujícím pořadí *CYP2C18*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP2C8* od centromery po telomeru (Zanger a Schwab, 2013).

2.3.5 Rodina CYP3

Rodina CYP3 zaujímá pouze jednu podrodinu CYP3A lokalizovanou na chromozomu 7q22.1 se čtyřmi geny *3A4*, *3A5*, *3A7* a *3A43* (Zanger a Schwab, 2013). Patří mezi nejvýznamnější CYP, nejen ke svému širokému výskytu v lidských tkáních, jako jsou játra, ledviny, děloha, plod, plíce, GIT a placenta, ale také z hlediska množství substrátů, které přeměňuje (Stiborová et. al., 1999). Typickými substráty jsou imunosupresiva, makrolidová antibiotika a protinádorová léčiva (Zanger a Schwab, 2013).

Tabulka 1 zobrazuje přehled výše uvedených biotransformačních enzymů CYP s příklady jejich substrátů, inhibitorů a induktorů.

Tab. 1: Příklady lidských enzymů CYP s jejich substráty, inhibitory a induktory (Zanger a Schwab, 2013).

Enzym	Substrát	Inhibitor	Induktor
CYP1A2	Kofein	Cimetidin	Antipyrin
	Chlorpromazin	Ciprofloxacín	Bilirubin
	Clozapin	Disulfiram	Karbamazepin
	Lidokain	Perorální antikoncepce	Fenytoin
CYP2A6	Kotinin	Methofuran	Karbamazepin
	Kumarin	8-methoxypsoralen	Dexamethason
	Letrozol	Tranylcypromin	Rifampicin
CYP2B6	Benzfetamin	Klotrimazol	Karbamazepin
	Cyklofosamid	Raloxifen	17-a-ethinylestradiol
	Endosulfan	Ticlopidin	Nelfinavir
CYP2C9	Acenokumarol	Amiodaron	Aprepitant
	Candesartan	Flukonazol	Avasimibe
CYP2C19	Amitriptylin	N-3-benzyl-fenobarbital	Kyselina acetylsalicylová
	Klomipramin	Clopidogrel	Antipyrin
	Melatonin	Omeprazol	Dexamethason
	Nelfinavir	Ticlopidin	Efavirenz
CYP3A4/5	Aflatoxin B1	Klaritromycin	Aprepitant
	Aprepitant	Grepový džus	Barbituráty
	Budesonid	Irinotekan	Karbamazepin

2.3.6 Izoenzym CYP2C19

Na metabolismu Clopidogrelu, ale také antidepressiv, benzodiazepinu, mefenytoinu a inhibitorů protonových pump (PPI) se podílí enzym CYP2C19 (Scott et. al., 2013), který je na biotransformaci Clopidogrelu v prvním kroku zastoupen ze 45 % (Shalia et. al., 2013). Gen *CYP2C19*, člen nadrodiny CYP450, je vysoce polymorfní s více než 25 variantními alelami, vykazujícími různou enzymatickou aktivitu (Scott et. al., 2013) čímž dochází k individuální variabilní metabolické reakci na léčivo (Dehbozorgi et. al., 2018), CYP2c19 se podílí na metabolismu 6,8 % léčiv a léčba je ovlivněna typem zjištěného polymorfismu (Mustafa et. al., 2019). Endogenními substráty CYP2C19 je progesteron a melatonin (Zanger a Schwab, 2013).

Gen *CYP2C19* je lokalizován na chromozomu 10q23.33 (Duconge a Hernandez-Suarez, 2017), obsahuje devět exonů a osm intronů, kódující sekvence je 1473 párů bází a výsledný protein má 490 aminokyselinových zbytků. Alela *CYP2C19*2* a *CYP2C19*3* kóduje enzymy, které jsou spojovány se sníženou enzymatickou aktivitu. Alela *CYP2C19*2* vzniká záměnou guaninu za adenin v poloze 681 (NM 000769.4:c.681G>A) v exonu 5 a jejím působením dochází k aberantnímu sestřihu. Alela *CYP2C19*3* vzniká záměnou guaninu za adenin v poloze 636 (NM 000769.4:c.636G>A) v exonu 4, což vede ke vzniku předčasného stop kodónu v pozici 212 aminokyselinového řetězce a následně nefunkčního proteinu. Alela *CYP2C19*17* kóduje enzym se zvýšenou enzymatickou aktivitou, kdy dochází k záměně cytosinu za thymin v poloze -806 v 5' nepřekládané oblasti (NM 000769.4:c.-806C>T). Specifický protein se naváže na 5'-hraniční oblast, vzniklá vazba vede ke zvýšené transkripci genu, to má za následek vyšší enzymatickou aktivitu (Dehbozorgi et. al., 2018).

Normální kopii je alela *CYP2C19*1* s plnou enzymatickou aktivitou, zatímco alely *CYP2C19*2* a *CYP2C19*3* vedou ke ztrátě enzymatické aktivity a vykazují sníženou inhibici destiček indukovanou Clopidogrelem (Nassar et. al., 2014). Nižší hladina aktivního metabolitu Clopidogrelu a vyšší výskyt kardiovaskulárních příhod je také spjat s alelami *CYP2C19*4*, *CYP2C19*5*, *CYP2C19*6*, *CYP2C19*7*, *CYP2C19*8*, *CYP2C19*9*, *CYP2C19*10*, *CYP2C19*22*, *CYP2C19*24* a *CYP2C19*35* (Dávila-Fajardo et. al., 2019).

Bylo prokázáno, že u pacientů s alelou *CYP2C19*2* je vůči pacientům bez této alely trojnásobně zvýšený výskyt trombózy stentu (Duconge a Hernandez-Suarez, 2017).

Za ultrarychlé metabolizátory jsou považováni jedinci s alelou *CYP2C19*17*, která zesiluje transkripční aktivitu, což vede ke zvýšené aktivitě této alely. Bylo zjištěno, že alela způsobuje zvýšenou inhibici destiček a zvýšené riziko krvácivých komplikací (Scott et. al., 2013). U nosičů alely *CYP2C19*17* jsou cílové substráty, včetně léků, metabolizované rychleji, což vede ke snížené koncentraci některých léčiv v krvi a jejich nižší terapeutické účinnosti (Ghasemi et. al., 2016).

V tabulce 2 je uvedena doporučená antiagregační léčba pro zjištěné jednotlivé metabolizátory.

Tab. 2: Doporučení antiagregační terapie v závislosti na polymorfismu CYP2C19 (Scott, et. al., 2011).

Fenotyp - metabolizátor	Četnost v populaci [%]	Diplotyp	Důsledky pro Clopidogrel	Doporučená terapie	Klasifikace doporučení dle PharmGKB
Ultrarychlý	5 – 30	*1/*17, *17/*17	Zvýšená inhibice trombocytů, snížená reziduální agregace trombocytů	Výrobce doporučené dávkování a podávání	Silná
Normální	35 – 50	*1/*1	Normální inhibice trombocytů, normální reziduální agregace trombocytů	Výrobce doporučené dávkování a podávání	Silná
Střední	18 – 45	*1/*2, *1/*3, *2/*17	Snížená inhibice trombocytů, zvýšená agregace reziduálních trombocytů, zvýšené riziko nežádoucích kardiovaskulárních příhod	Alternativní antiagregační terapie (pokud není kontraindikace), např. Prasugrel, Ticagrelor	Mírná
Pomalý	2 -15	*2/*2, *2/*3, *3/*3	Výrazně snížená inhibice trombocytů, zvýšená agregace reziduálních trombocytů, zvýšené riziko nežádoucích kardiovaskulárních příhod	Alternativní antiagregační terapie (pokud není kontraindikace), např. Prasugrel, Ticagrelor	Silná

2.3.7 Incidence polymorfismu CYP2C19

Vzhledem k mnoha genetickým polymorfismům alely *CYP2C19* a reakci na léčiva mezi různými etnickými skupinami a geografickými regiony, je třeba brát v potaz genetickou variabilitu enzymů metabolizujících léčiva, farmakodynamiku a farmakokinetiku léčiva.

Distribuce alely *CYP2C19* v Evropě je ovlivněna migrací Indoevropské populace v historii. Frekvence alely *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* a *CYP2C19*17* v Indoevropské populaci, studované na 82 791 zdravých dobrovolníků ze 33 zemí, je zobrazena v tabulce 3. Z tabulky vyplývá mírně vyšší četnost alely *CYP2C19*2* v severozápadních státech Evropy, ve srovnání se zeměmi jihovýchodní Evropy. Nejvyšší frekvence této alely je zastoupena na Kypru a Maltě, kdežto nejnižší je v České republice. Zatímco alela *CYP2C19*17* se nejčastěji objevuje ve střední Evropě, tedy na Slovensku, Polsku a v České republice, její nejnižší výskyt je v jižní Evropě, především ve Španělsku, Řecku a na Kypru. Vzhledem k pouhým 26 analyzovaným jedincům slovenské populace, je nutné brát údaje obezřetně. Alela *CYP2C19*3* se v Indoevropské populaci u studovaných jedinců vyskytovala jen ojediněle (Petrović et. al., 2020).

Tab. 3: Prevalence polymorfismů vyskytující se v Indoevropské populaci (Petrović et. al., 2020).

Země	Počet studií	Počet jedinců	Frekvence [%]		
			CYP2C19*2	CYP2C19*3	CYP2C19*17
Belgie	1	121	9,1	-	-
Česká republika	2	42 - 265	8	1,6	29
Dánsko	3	579-634	15,8	2,2	20,1
Estonsko	1	35 506 - 44 448	13,5	1,8	26,4
Faerské ostrovy	2	309 - 311	18,8	0,2	15,4
Finsko	6	12 589 - 13 956	17,5	3,5	19,6
Francie	3	607	17,7	-	-
Chorvatsko	3	1119 - 1247	15,2	2,3	23,5
Itálie	8	914 - 917	11,8	1	22,1
Kypr	1	40	21	4	11
Litva	1	20	19	2	25
Maďarsko	4	530 - 591	13,3	1,6	23
Malta	1	41	20	0	26
Německo	8	923 - 1758	14,9	1,1	24,9
Nizozemsko	5	1114 -1158	14,1	1,5	19
Norsko	3	83 - 403	15,3	0	22
Orkneje	1	88	10,8	-	-
Polsko	5	166 - 791	16,3	1,6	29,8
Portugalsko	4	279 - 400	13,4	0,7	-
Rakousko	1	93	-	0,5	-
Rumunsko	3	426 - 562	20,8	-	-
Rusko	4	391 - 1663	13,6	1,2	15
Řecko	3	327	14,1	2,1	18,2
Sardinie	2	76	-	2,6	-
Srbsko	1	46	11	0	18
Slovensko	1	26	19	2	33
Slovinsko	3	1952 -2081	12,7	1,8	23
Španělsko	14	1215 - 2328	14	1,2	17,1
Švédsko	6	1816 - 2020	14	1,6	19,2
Turecko	6	689 - 785	11,3	0,7	24
Ukrajina	2	52 - 689	13	2	25
Velká Británie	2	91 - 168	13,4	3,3	24,2

Srovnání jednotlivých frekvencí alel v Indoevropské, Asijské a Africké populaci je zobrazeno v tabulce 4. V článku není uveden počet studovaných jedinců, ani jejich zdravotní stav (Shalia et. al., 2013).

Tab. 4: Četnost jednotlivých alel vyskytujících se ve světě (Shalia et. al., 2013).

Populace / Frekvence alely	<i>CYP2C19*2</i> [%]	<i>CYP2C19*3</i> [%]	<i>CYP2C19*17</i> [%]
Indoevropská	13 - 18	< 1	18 - 20
Asijská	30 - 50	5 - 10	2 - 4
Africká	17 - 20	< 1	18

V tabulce 5 je porovnávána frekvence alely *CYP2C19*1* a *CYP2C19*17* u Asiatů. Studována byla íránská populace a následně porovnávána s Asiáty. V íránské populaci bylo testováno 100 zdravých dobrovolníků, vybraných z různých etnických skupin, ve věkovém rozmezí 19 – 57 let. Analyzovanou skupinu tvořilo 46 % mužů a 54 % žen. Zastoupení jednotlivých diplotypů bylo následující *CYP2C19*1/*1* (58,33 %), *CYP2C19*1/*17* (29,1 %) a *CYP2C19*17/*17* (11,1 %) (Ghasemi et. al., 2016).

Tab. 5: Frekvence jednotlivých alel na Asijském kontinentě (Ghasemi et. al., 2016).

Stát / Frekvence alely	<i>CYP2C19*1</i> [%]	<i>CYP2C19*17</i> [%]
Írán	72,88	25,65
Čína	69,7	1,2
Japonsko	57,9	1,3
Saudská arábie	73,1	73,9
Jižní Korea	-	1,15

2.3.8 Farmakogenetika

Vysoce polymorfní gen *CYP2C19* vede k interindividuální variabilitě terapeutické odpovědi na léčiva. Následkem může být nežádoucí reakce nebo nedostatečná účinnost (Petrović et. al., 2020). Pojem jednonukleotidový polymorfismus (SNP) je definován jako variace v jednom nukleotidu vyskytující se v dané sekvenci deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a zároveň se musí nacházet u více než 1 % jedinců v populaci. SNPy se nacházejí jak v kódujících, tak v nekódujících oblastech genu. Jejich vznik je spojen s genetickou adaptací, rekombinací nebo mutací. SNPy hrají významnou úlohu v reakci na dané léky (Zhang M. et. al., 2017).

Reakce jedince na daný lék je ovlivněná enzymy P450, kvůli kterým je metabolismus léčiv geneticky variabilní (Lynch a Price, 2007). Uvádí se, že za pomoci enzymů P450 je enzymatickými reakcemi katalyzováno až 75 % léčiv (Foroozesh et. al., 2019).

2.4 Clopidogrel

Clopidogrel je perorální, thienopyridinové proléčivo s antiagregační aktivitou. Aplikuje se při léčbě akutních koronárních syndromů, ischemických cerebrovaskulárních chorob a periferních arteriálních onemocnění (Bravo a Di Carli, 2016). Jedná se o neaktivní proléčivo s antiagregačním účinkem, který je dosažen až po přeměně na aktivní metabolit, za pomoci enzymů cytochromů P450 přítomných v játrech (Xu et. al., 2016). Zde dochází k vazbě a ireverzibilní inhibici receptorů P2Y₁₂ na krevních destičkách (Roden a Shuldiner, 2010). Svou chemickou strukturou a funkci je podobný léčivu Ticlopidinu (Ksouda et. al., 2011).

Přestože jeho mechanismus účinku nebyl znám, byl v roce 2007 schválen jako lék (Roden a Shuldiner, 2010), a téhož roku se stal jedním z nejčastěji předepisovaných kardiovaskulárních léků na světě. Clopidogrel s komerčním názvem Plavix je generickým medikamentem od roku 2012 (Bravo a Di Carli, 2016).

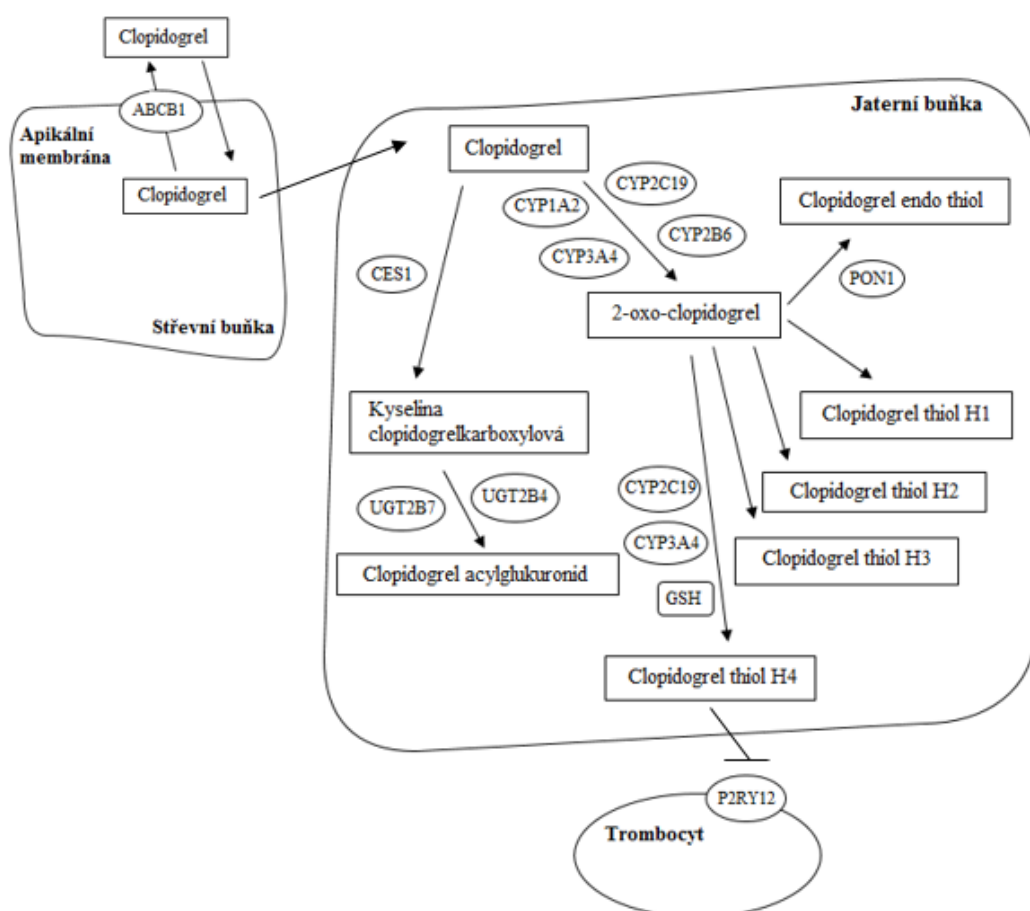
2.4.1 Metabolismus Clopidogrelu

Obrázek 5 zobrazuje metabolismus Clopidogrelu při perorálním podání, s maximální dosaženou koncentrací do 1 až 2 hodin od úvodní dávky (600 mg). Biologická dostupnost je 50 % a eliminační poločas 7 až 8 hodin. Vylučuje se močí z 50 % a stolicí ze 46 % (Amin et. al., 2017).

Ze střeva se absorbuje 50 % podaného Clopidogrelu, jehož transport je omezen P-glykoproteinem (P-gp), respektive ABCB1 transportérem. V játrech se dvoustupňovým procesem bioaktivuje zhruba 15 % absorbovaného Clopidogrelu (Jiang et. al., 2015) na aktivní thiolový metabolit přes meziprodukt 2-oxo-clopidogrel, za účasti řady enzymů P450 (Xiao et. al., 2017). Z podané dávky je necelých 90 % Clopidogrelu hydrolyzováno karboxylesterázou 1 (CES1) na kyselinu clopidogrelkarboxylovou. Tento neaktivní metabolit je enzymem

uridin- 5'- difosfoglukuronosyltransferázou (UGT) glukuronizován na clopidogrel acylglukuronid (Itkonen et. al., 2019).

Pouze 2 % Clopidogrelu jsou pomocí enzymů přeměněna na aktivní metabolit. Na tvorbě 2-oxo-clopidogrelu se účastní enzymy CYP1A2, CYP2B6 a CYP2C19, kdežto na syntéze aktivního metabolitu se z největší částí podílí enzym CYP2C19 a dále také CYP2B6, CYP2C9 a CYP3A4 (Jiang et. al., 2015). Aktivní metabolit, prostřednictvím disulfidových můstků se ireverzibilně váže na receptor P2Y₁₂ a inhibuje agregaci trombocytů, která je indukována ADP (Ray, 2014).



Obr. 5: Metabolismus Clopidogrelu (upraveno podle Sangkuhl et. al., 2010).

2.4.2 Další genetické polymorfismy

Kromě enzymu CYP2C19, účinek Clopidogrelu a inhibici destiček nepatrně ovlivňují také proteiny, jako jsou např. CYP2C9, CYP2B6, CYP3A4, CYP3A5, CES1, paraoxonáza-1 (PON1), ATP-vazebná kazetová podskupina B člen 1 (ABCB1) a receptor P2Y₁₂ (Amin et. al., 2017).

2.4.3 Farmakodynamika

Odpověď na Clopidogrel se u každého jedince liší. Snížená ex vivo inhibice agregace trombocytů se vyskytuje u 25 % pacientů léčených standardní dávkou Clopidogrelu. Pacienti, vykazující inhibici agregace trombocytů v reakci na Clopidogrel menší než 30 %, reagují na léčbu nedostatečně. U pacientů, u kterých zaujímá inhibice méně než 10 %, jsou na účinek Clopidogrelu rezistentní (Shalia et. al., 2013).

2.4.4 Rezistence

Na rezistenci Clopidogrelu může mít vliv genetická variabilita, interakce léčiv, dávkování, index tělesné hmotnosti a aktivace destiček alternativní cestou. O rezistenci na Clopidogrel vypovídá i to, že 22 % až 43 % pacientů má nízkou odpověď na tento lék a vyšší riziko časných kardiovaskulárních příhod (Zhang L. et. al., 2017).

V případě intolerance nebo rezistence na Clopidogrel je alternativním lékem ještě silnější antiagregační Ticagrelor (Wang et. al., 2018). Rezistenci na Clopidogrel lze také snížit aplikací Tongxinluo u pacientů s akutním koronárním syndromem (Chen et. al., 2017).

2.4.5 Lékové interakce Clopidogrelu

Vzhledem k nárůstu počtu předepisovaných léků, dochází k relevantním nežádoucím účinkům, a to i v případě, že je zároveň podáváno několik různých léků, jenž jsou metabolizovány stejným enzymem (Hoffmann et. al., 2014), přičemž jedno léčivo má nižší specifitu. V případě podávání více léčiv metabolizovaných daným CYP, dochází k inhibici aktivity enzymu CYP a následným lékovým interakcím (Ung et. al., 2018).

Na lékových interakcích mají značný podíl změny metabolismu P450. Se systémem P450 léky interagují různými způsoby, metabolizovány jsou jedním nebo několika enzymy P450. Na metabolických lékových interakcích P450 se účastní léky, působící jako inhibitory nebo induktory. Funkci inhibitorů je blokovat metabolickou aktivitu enzymů P450, která je závislá na jeho množství a způsobu vázat se na enzym. Zatímco při zvýšené syntéze enzymů, induktory zvyšují enzymatickou aktivitu P450. V závislosti na poločase indukujícího léčiva se indukční účinky objevují až po určité době před zvýšením enzymatické aktivity, zatímco inhibiční účinky se dostávají ihned (Lynch a Price, 2007).

Clopidogrel je užíván současně s ASA jako antiagregační proléčivo, za účelem snížení rizika infarktu myokardu a trombózy stentu u pacientů s akutními koronárními syndromy (Wang et. al., 2018). ASA v trombocytech nevratně blokuje tvorbu tromboxanu A2 a inhibicí enzymu cyklooxygenázy-1 inhibuje agregaci trombocytů (Purushothaman et. al., 2016). ASA vzhledem ke svému protizánětlivým, analgetickým, antipyretickým a antiagregačním účinkům patří k nejčastěji užívaným léčivům (Michalska-Małecka et. al., 2016). ASA inhibuje enzym COX (Miciak-Ławicka et. al., 2018), katalyzující přeměnu kyseliny arachidonové na prostanoidy, mezi které se řadí prostaglandiny, TXA2 a prostacyklin (Michalska-Małecka et. al., 2016). Účinkem ASA dojde k potlačení syntézy TXA2 a nedostatkem TXA2 dojde ke snížení agregace trombocytů a zvýší se sekrece prostacyklinů, které inhibují agregaci trombocytů (Miciak-Ławicka et. al., 2018).

Při současném užívání Clopidogrelu a Omeprazolu, je Omeprazol, středně silným inhibitorem CYP2C19, který snižuje protiaagregační účinek Clopidogrelu o 50 %. Jeho alternativou je Pantoprazol mající nižší potenciál inhibovat CYP2C19 (Urtane et. al., 2013).

Pro ochranu žaludku se současně s Clopidogrelem často podávají i PPI, které se rovněž jako Clopidogrel metabolizují pomocí CYP2C19 a tedy mohou interferovat na aktivní metabolity (Siller-Matula et. al., 2010).

2.4.6 Indikace Clopidogrelu

Z důvodu předejití kardiovaskulárních příhod se u starších pacientů předepisují antiagregační léky, které mohou být také kontraindikací k anestezii (Mattesi et. al. 2016). Clopidogrel je indikován pacientům, kteří mají vysokou reaktivitu krevních destiček (Amin et. al., 2017). Rovněž je široce používán pro sekundární prevenci u pacientů s aterosklerózou, ischemickou chorobou srdeční a mozkovou příhodou (Ksouda et. al., 2011).

2.4.7 Nežádoucí účinky Clopidogrelu

Nežádoucí účinky Clopidogrelu se vyskytují až v průběhu léčby, proto jsou tak rozšířené. Mezi nejčastěji se vyskytující nežádoucí účinky se řadí vyrážky, poruchy chuti (ageusie) a trávení, průjem (Ksouda et. al., 2011). Dalšími vedlejšími účinky jsou krvácení, ale i hepatotoxicita a trombotická trombocytopenická purpura.

Ve srovnání s Ticlopidinem má Clopidogrel minimální neutropenický vedlejší účinek (Amin et. al, 2017).

Poruchy chuti vyvolané léčivem mohou mít vliv na chuť samotného léčiva, poškozovat mitózu v replikující se receptorové buňce a blokovat apikální iontové kanály na chuťovém pohárku. Doba výskytu tohoto nežádoucího účinku se uvádí mezi dvěma dny až osmi týdny a ustoupí až několik měsíců po ukončení léčby (Ksouda et. al., 2011).

2.4.8 Noví antagonisté P2Y₁₂ receptoru

Prasugrel je proléčivo s větší a rychlejší inhibicí trombocytů než Clopidogrel. Je antagonistou P2Y₁₂ receptoru. Nepřeměňuje se na aktivní metabolit za pomoci CYP2C19, namísto toho tvoří thiolaktonový meziprodukt. U pacientů po mozkové mrtvici či po přechodném ischemickém záchvatu může způsobit fatální krvácení.

Novým antiagregačním činidlem tvořící thienolakton je Vicagrel, jež byl navržen k překonání rezistence na Clopidogrel (Xu et. al., 2016). K dalším jeho pozitivním účinkům ve srovnání s Clopidogrelem se řadí rychlá absorpce a terapie, dobrá tolerance a 10 krát menší dávkování (Li et. al., 2018).

Ticagrelor s chemickým názvem cyklopentyltriazolopyrimidin je perorální antiagregační činidlo, které nepodléhá biotransformaci na aktivní metabolity (Chen et. al., 2017). Oproti Clopidogrelu má rychlejší účinek, ale nižší nepříznivý klinický výsledek (Guan et. al., 2018). Dalším jeho pozitivním farmakologickým projevem je rychlá reverzibilita a permanentní inhibice funkce krevních destiček (Chen et. al., 2017).

2.4.9 Alternativní antiagregační léčba

Tongxinluo je perorální léčivo pro léčbu angíny pectoris a CMP. Působí na endoteliální buňky a tím zlepšuje jejich funkci, snižuje hladinu lipidů, má protizánětlivé účinky, působí antiapopticky a zvyšuje angiogenezi (Chen et. al., 2017).

2.5 Analýza genomické DNA

Plná krev je primárním zdrojem genomické DNA (gDNA), která se ve vysoké kvalitě a dostatečném množství uplatňuje v oborech jako je molekulární biologie, klinická genetika a genomika (Mandal et. al., 2018).

Genetický profil jedince k jeho individuální léčbě se získává ze sekvence DNA pocházející z krve, případně tkáně. Při sekvenování DNA za využití bioinformatických údajů jsou data charakterizována, analyzována a interpretována. Při interpretaci se porovnává varianta vyšetřovaného jedince s variantou uloženou v genomické databázi. V těchto databázích, což jsou elektronické katalogy, se nachází DNA kódy analyzovaných jedinců zdravých či nemocných, různého věku a etniky.

Genomická data se uplatňují při léčbě pacientů konkrétním lékem, postižených toutéž chorobou, mající shodnou sekvenci DNA. Další využití je při určení prevalence genetické varianty v dané oblasti (Middleton, 2017).

2.5.1 Izolace DNA z periferní krve

Výskyt cirkulující DNA je v periferní krvi ve formě malých fragmentů do velikosti 1 kb a pouze v nízké koncentraci (ng/ml), tudíž je izolace DNA z krve velmi obtížná. K izolaci DNA se aplikují toxické látky, mezi něž patří fenol a chloroform.

Při selektivní izolaci DNA ze séra lze uplatnit činidla, obsahující malé kationty selektivně interagující s fosfátovým řetězcem kyseliny nukleové (NK). Interakce způsobí změnu konformace NK na kompaktní formu, a ta je z roztoku vysrážená. Přínosem metody je citlivost detekce, která je zde vyšší o více než čtyři řády, dále rychlost, jednoduchost, nenákladnost a práce bez toxických látek (Vu et. al., 2012).

Lýzou leukocytů rychle klesá množství DNA uchovávané v plné krvi, přestože je DNA po odběru krve 15 dní relativně stabilní. Vlastnosti DNA ovlivňuje doba a teplota skladování po odběru krve (Huang et. al., 2017). Zabránit degradaci genetického materiálu lze za použití kapalných konzervačních pufrů, které rovněž denaturují enzymy. Genetický materiál je možno uchovávat i v plné krvi při pokojové teplotě několik dnů či týdnů za pomoci pufrů. Oportunistický, minimálně invazivní odběr krve umožňují vakuové zkumavky např. Tempus, obsahující roztok hydrochloridu guanidinu, který lýzuje krvinky, stabilizuje a inaktivuje DNA. Výhodou tohoto přímého odběru krve do stabilizačního roztoku je snížené riziko kontaminace (Ferrante et. al., 2018).

U pacientů postižených rakovinou prostaty, prsu či plic je vyšší koncentrace specifických nukleotidových sekvencí v krvi (Vu et. al., 2012).

2.5.2 Kvantifikace DNA

Pro stanovení koncentrace DNA ve stopových množstvích vzorků se uplatňují kvantifikační metody (Nakayama et. al., 2016), lišící se v kvantitativním rozsahu, citlivosti, nákladech a jednoduchosti pracovního postupu (Hussing et. al., 2018). Kvantifikace DNA může být provedena těmito metodami: UV spektroskopií, fluorescenční spektroskopií nebo kvantitativní polymerázovou řetězcovou reakcí (qPCR) (Nakayama et. al., 2016).

UV spektrometr NanoDrop ke své funkci využívá optická vlákna a přirozené povrchové napětí, čímž zachycuje a uchovává malé množství vzorků. Kratší délky dráhy umožňují velký rozsah měření koncentrace NK, čímž se vzorky nemusí ředit. Malý objem vzorku při analýze zvyšuje účinnost a činí výsledky spolehlivějšími (Desjardins a Conklin, 2010). Principem UV spektroskopie je měření maximální absorbance NK (260 nm). Metoda nerozlišuje dvouvláknovou DNA (dsDNA), jednovláknovou DNA, RNA či nukleotidy (Nakayama et. al., 2016).

Fluorimetrické měření koncentrace DNA např. pomocí fluorimetru Qubit je levná, rychlá a snadno použitelná metoda pro kvantifikaci DNA. Nerozlišuje odlišné délky DNA, proto do výsledné koncentrace DNA spadají i dimery purinů, dimery adaptérů a fragmenty bez adaptérů (Hussing et. al., 2018). Měří fluorescenci fluorescenčního barviva, které se specificky váže na nepoškozenou dsDNA a tím stanovuje její množství. Kvantita klesá se stupněm fragmentace a denaturace DNA, tím pádem je klasifikace templátové DNA spolehlivější než při použití UV spektroskopie.

Pro přesnou kvantifikaci cílové sekvence je ideální použít qPCR, která je, ale časově náročnější a dražší než předešlé metody (Nakayama et. al., 2016).

2.5.3 Real-time PCR

Real-time PCR, často nazývaná také qPCR je řazena k populárním metodám, především díky její rychlé analýze a širokému dynamickému rozsahu (Galluzzi et. al., 2018). O qPCR se hovoří tehdy, jeli do PCR směsi přidán fluorescenční marker a reakci je možné sledovat v reálném čase (Ahrberg a Neužil, 2015).

Od roku 1992 se qPCR uplatňuje v oborech jako je molekulární diagnostika, mikrobiologie a forenzní biologie pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. Také se aplikuje pro absolutní či relativní kvantifikaci a k jednoduché identifikaci amplikonu, který je v průběhu reakce zprostředkován použitím nespecifické DNA interkalačního barviva nebo sekvenčně specifických DNA sond (Conte et. al., 2018).

V průběhu amplifikace řetězce DNA lze analyzovat fluorescenční signál, který vzniká použitím interkalačních fluorescenčních barviv nebo fluorescenčních sond (Galluzzi et. al., 2018). Detekce zde probíhá přímo ve zkumavce, což vede k menší manipulovatelnosti se vzorkem a nižší pravděpodobnosti kontaminace (Ulehlova et. al., 2014). Analyzátor real-time PCR je složen z několika komponentů, jako je topné těleso, teplotní senzor, fluorescenční budící a detekční jednotka. (Ahrberg et. al., 2016).

2.5.4 Detekce DNA

Produkty real-time PCR jsou vizualizovány speciálními fluorescenčními barvivy vázající se na DNA, mezi něž patří ethidiumbromid (EtBr), SYBR Green I a dále sondami, jako jsou hydrolytické, hybridizační a molekulární majáky (Tajadini et. al., 2014). Pro nespecifická barviva je typická fluorescence při interkalaci do dsDNA, kdežto metody specifické pro amplikon jsou charakterizovány značením primerů nebo sond fluorogenními molekulami pro následnou vizualizaci specifických amplifikovaných sekvencí (Li et. al., 2013).

Barvivo EtBr bylo v PCR reakci zaregistrováno v roce 1993, kdy bylo vizualizováno videokamerou pod ultrafialovým světlem.

SYBR Green I ve vazbě na dsDNA emituje fluorescenci 1000 krát větší než je v roztoku. Tato metoda je levná, snadno proveditelná a při její optimalizaci dosahuje vysoké kvality a přesných dat jako metoda TaqMan (Tajadini et. al., 2014).

Další z možností je použití sondy 6-karboxyfluorescein (FAM), uplatňující se v TaqMan metodě. Zde je nutné, aby se sonda chemicky vážala k oligonukleotidům vedle zhášeče (Ahrberg a Neužil, 2015). Sonda FAM může v jedné zkumavce detekovat až dvě mutace, z tohoto důvodů není vhodná pro některé klinické a laboratorní vyšetření. Na fluorofory FAM a 6-karboxy-N, N, N', N'-tetramethylrhodamin (HEX) má vliv zásada, ale především teplota. Při zvýšení teploty a následné hybridizaci sondy s templátovou

DNA, fluorescence HEX zůstává stejná, z toho vyplývá, že sonda není ovlivněná teplotou. Zatímco fluorescence FAM se zvyšující se teplotou konstantně klesá (Mao et. al, 2018). Nejčastěji použitým fluoroforem v qPCR je FAM s excitační vlnovou délkou 495 nm a emisní vlnovou délkou 520 nm. Fluorofor HEX má excitační vlnovou délkou 535 nm a emisní vlnovou délkou 554 nm (Arif et. al., 2015).

Tyagi a Kramer v roce 1996 poprvé zveřejnili molekulární majáky, které se uplatňují k detekci DNA a RNA, monitorování živých systémů, výzkumu enzymatických procesů, konstrukci biosenzorů, výrobě biočipů a ke studiu interakcí protein-DNA (Wang et. al., 2009). Molekulární majáky jsou vysoce citlivé, specifické, selektivní, neradioaktivní, snadno detekovatelné sondy pro monitorování biomolekulárních interakcí v reálném čase. Další jejich výhodou je detekce hybridizace v homogenním roztoku bez separace hybridizovaných a nehybridizovaných sond (Tang et. al., 2003).

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Materiál a vybavení

3.1.1 Laboratorní přístroje a pomůcky

Bio Vortex V1 (BIOSAN, UNIMED)

Centrifuga na 96-jamkové destičky

LightCycler® 480 (ROCHE, Česká republika)

MagCore HF16Plus Automated Nucleic Acid Extractor (RBC Bioscience, Taiwan)

Minicentrifuga GmCLab GILSON (UNIMED, Praha)

NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)

3.1.2 Chemikálie

Gentra Puregene Blood Kit

Souprava generi biotech (gb) PHARM CYP2C19 obsahující následující komponenty:

Assay qPCR CYP2C19*2 (koncentrace 1,25 x)

Assay qPCR CYP2C19*3 (koncentrace 1,25 x)

Assay qPCR CYP2C19*17 (koncentrace 1,25 x)

Standard HET CYP2C19 (10^4 kopií/ μ l)

Standard MUT CYP2C19 (10^4 kopií/ μ l)

Standard WT CYP2C19 (10^4 kopií/ μ l)

Deionizovanou vodu

3.1.3 Biologický materiál

Na Neurologickém oddělení ve Vítkovické nemocnici byl selektován soubor pacientů, kterým v období 2008 až 2018 byla diagnostikována iCMP s následnou léčbou Clopidogrelem. Tento soubor tvořil 46 pacientů, z toho 30 mužského a 16 ženského pohlaví narozených v letech 1936 – 1996. Pacienti byli informováni o účelu studie, zabývající se účinkem léku Clopidogrelu. Po podepsání informovaného souhlasu jim byla odebrána periferní krev pro následnou analýzu gDNA. Vzorky krve byly uchovány v genové bance při teplotě -80 °C. Vzorky nesrážlivé krve byly izolovány v laboratořích AGEL a. s. Nový Jičín.

3.2 Experimentální metody

Ze zmrazených krevních vzorků byly při izolaci gDNA aplikovány dvě metody, podle aktuálního počtu krevních vzorků.

3.2.1 Purifikace DNA z plné krve pomocí Gentra Puregene Blood Kit

K purifikaci gDNA bylo upotřebeno 300 μ l krevního vzorku. Mikrocentrifugační zkumavka o objemu 1,5 ml byla napipetována roztokem red blood cell (RBC) o objemu 900 μ l a 300 μ l plné krve. Proběhla 10 x invertace a poté inkubace po dobu 1 minuty při pokojové teplotě. Následovala centrifugace po dobu 20 minut při 13 000 – 16 000 x g, kdy došlo k oddělení peletu s bílými krvinkami a supernatantu, jenž byl z části odpipetován. Vzorek byl vortexován, poté bylo přidáno 300 μ l roztoku pro lýzu buněk a obsah byl propipetován. Po přidání 1,5 μ l RNázy, následné invertaci v počtu 25 opakování byl vzorek inkubován po dobu 15 minut při 37 °C. Dále bylo přidáno 100 μ l roztoku na precipitaci proteinu a při vysoké rychlosti byl vzorek vortexován po dobu 20 sekund. Za použití centrifugy při 13 000 – 16 000 x g po dobu 1 minuty došlo k precipitaci proteinů, které vytvořily pevný, tmavě hnědý pelet. Supernatant bez proteinového peletu byl přenesen do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky s 300 μ l isopropanolu. Dokud DNA nebyla viditelná v podobě vlákna, byl vzorek invertován v počtu 50-ti opakování. Dalším krokem byla centrifugace po dobu 1 minuty při 13 000 – 16 000 x g, po které byl supernatant opatrně odstraněn s ponecháním peletu na dně zkumavky. K peletu bylo přidáno 300 μ l 70 % ethanolu, několikrát invertováno a poté centrifugováno po dobu 1 minuty při 13 000 – 16 000 x g. Supernatant byl opatrně odstraněn a pelet sušen na dně zkumavky na vzduchu po dobu 5 minut, dokud nebyl snadno uvolněn. Následně bylo přidáno 100 μ l DNA hydratačního roztoku a vortexováno 5 sekund při střední rychlosti. Inkubace vzorku byla při 65 °C po dobu 5 minut, až byla DNA rozpuštěna. Posledním krokem purifikace DNA byl vzorek inkubován při pokojové teplotě přes noc a za mírného třepání na třepačce.

3.2.2 Izolace DNA z periferní krve automatickou metodou

Dalším možným a rychlejším postupem byla automatická izolace DNA z periferní krve, provedena na analyzátoru MagCore HF16Plus, do kterého byly vloženy cartridge podle počtu vzorků. V laminárním boxu do odvíčkových zkumavek byla napipetována periferní krev o objemu 400 μ l a důkladně promíchána. Do patřičných pozic byl vložen daný počet špiček a označených elučních zkumavek o objemu 1,5 ml. Následně byla zahájena automatická izolace, kterou bylo vyizolováno 200 μ l DNA. Použité komponenty byly vyhozeny, analyzátor byl očištěn 70 % ethanolem a po dobu 30 min byl osvětlen UV zářením.

3.2.3 Kvantifikace DNA spektrofotometrem NanoDrop 2000

Následujícím krokem byla kvantifikace DNA za použití spektrofotometru NanoDrop 2000. Před samotným měřením koncentrace a čistoty NK byl očištěn horní a dolní optický povrch retenčního systému spektrofotometru, a to napipetováním 1 μ l deionizované vody na spodní optický povrch. Rameno páky bylo uzavřeno a horní podstavec přišel do kontaktu s vodou. Poté bylo rameno páky zvednuto a suchým čistým ubrouskem bez chloupků byly oba optické povrchy očištěny. Následně se na spodní optický povrch nanese 1 μ l pufru a bylo provedeno slepé měření blanku. Po změření vzorku blanku byly oba optické povrchy očištěny suchým, čistým laboratorním ubrouskem. V softwaru NanoDrop byla zvolena konstanta 50 pro výpočet koncentrace dsDNA. Následně byl 1 μ l vzorku NK napipetován na spodní optický podstavec a rameno páky bylo zavřeno. Software automaticky vypočítal poměr koncentrace a čistoty NK, výsledek byl znázorněn ve formě spektrálního výstupu.

Spektrofotometr NanoDrop 2000 automaticky vypočítá poměr koncentrace a čistoty NK při vlnové délce 260/280 nm, kdy čistota NK je 1,8 – 2,0. NK mohou být kontaminovány proteinem, fenolem, trizolem nebo extrakcí kolonou (Desjardins a Conklin, 2010).

3.2.4 Analýza polymorfismu

V další fázi byla provedena genotypizace DNA, při které byla použita souprava gb PHARM CYP2C19, pomocí které lze určit přítomnost polymorfismů v genu *CYP2C19* v alelách *2, *3 a *17.

Tato souprava je určena pro *in vitro* diagnostiku a její součástí jsou assaye qPCR a standardy. Assay qPCR zahrnuje směsi amplifikačních primerů, fluorescenčně značených sond specifických k normální a mutované alele, pufr, nukleotidy a polymerázu. SONDY jsou specifické pro jednotlivé varianty polymorfismů. Fluoroforem FAM je značená sonda pro variantu WT a fluorofor HEX označuje sondu MUT. K pozitivním kontrolám jsou určeny standardy.

Postup je založen na principu alelické diskriminace za využití fluorescenčně značených sond, metodou real-time PCR.

Po izolaci a kvantifikaci DNA následovala příprava vzorků, která je popsána dále v textu. Reagencie byly rozmrazeny, promíchány a krátce stočeny v centrifuze. K detekčním assayem byla přidána deionizovaná voda, a poté bylo provedeno rozpipetování po 16 µl do 96-jamkové destičky. Dále bylo rozpipetováno 4 µl gDNA o koncentraci 2 – 100 ng/µl s příslušnými standardy. Po této přípravě byla 96-jamková destička krátce stočena v centrifuze a analyzována na real-time PCR.

3.2.5 Analýza genu *CYP2C19* pomocí real-time PCR

QPCR byla provedena pro všechny assaye za stejných podmínek, které byly následující. Počáteční denaturace při 95 °C po dobu 5 minut, následovalo 50 cyklů denaturace při 95 °C po dobu 10 sekund a dále ochlazování a prodlužování při 60 °C po dobu 20 sekund. Produkty PCR byly fluorescenčně analyzovány za využití sondy s fluoroforem FAM, značící variantu homozygotní genotyp (wild type, WT) a sondy s fluoroforem HEX, která označuje variantu mutovaný homozygotní genotyp (MUT). V případě přítomnosti varianty WT nebo MUT lze pozorovat jeden signál. Jestliže se jedná o heterozygotní genotyp (HET) je registrován WT i MUT a jsou sledovány dva signály.

4 VÝSLEDKY

Na základě informovaného souhlasu bylo do souboru zahrnuto 46 selektovaných pacientů, kterým byla stanovená diagnóza iCMP s následnou léčbou Clopidogrelem. Tito pacienti byli narozeni v letech 1936 – 1996 a první příznaky se projevíly u mužů mezi 47 – 78 lety, u žen byla věková hranice 41 – 75 let a u jedné pacientky byla iCMP diagnostikována ve věku 20 let.

U těchto pacientů pomocí qPCR byly analyzovány z gDNA polymorfismy alel *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* a *CYP2C19*17*. Následovalo vyhodnocení diplotypu a přiřazení příslušného fenotypu k posouzení účinnosti terapie Clopidogrelem při léčbě iCMP. Jedná se o antiagregační léčbu, která zabraňuje shlukování trombocytů a následný vznik trombu v arteriálním a žilním řečišti.

Na metabolismus Clopidogrelu se podílí především gen *CYP2C19*, který je vysoce polymorfní s více než 25 alelami a pomocí těchto alel lze určit čtyři hlavní fenotypy, kterými jsou normální, ultrarychlý, střední a pomalý metabolizátor.

U normálního metabolizátora, charakterizovaného diplotypem *1/*1 probíhá normální inhibice trombocytů a normální reziduální agregace trombocytů. Fenotyp ultrarychlého metabolizátora s diplotypem *1/*17 nebo *17/*17 se projevuje zvýšenou inhibicí trombocytů a sníženou reziduální agregací trombocytů, což vede ke zvýšenému riziku krvácivých stavů. U středního a pomalého metabolizátora s diplotypy *1/*2, *1/*3, *2/*17 a *2/*2, *2/*3, *3/*3 dochází ke snížené a výrazně snížené inhibicí trombocytů a zvýšené agregaci reziduálních trombocytů. Následkem je zvýšené riziko nežádoucích kardiovaskulárních příhod.

Pro účinnou léčbu Clopidogrelem by se mělo jeho podávání přizpůsobit příslušnému diplotypu, vzhledem k možnému riziku krvácení. V případě zjištěného diplotypu je následná léčba přizpůsobená typem metabolizátora. U pomalých metabolizátorů se doporučuje převedení na jiné antiagregační léčivo, metabolizováno jiným enzymem než jen enzym *CYP2C19*, například Prasugrel. Přerušení nebo snížení dávky přichází v úvahu u ultrarychlých metabolizátorů.

V tabulce 6 jsou uvedeny konkrétní údaje u jednotlivých analyzovaných pacientů, s uvedenou léčbou a případnou recidivou iCMP. Z celkového počtu 46 pacientů bylo 9 léčeno pouze Clopidogrelem, a u ostatních proběhla duální antiagregační terapie Clopidogrelem s ASA. Účinná látka ASA je obsažena v léčivých přípravcích jako je Anopyrin, Aspirin, Godasal a Stacyl.

I přes antiagregační léčbu v našem souboru pacientů proběhla recidiva iCMP u sedmi pacientů s analyzovanými genotypy *1/*2, *1/*17, *17/*17 a *1/*1. V případě mutovaných alel byla recidiva způsobená na základě nesprávně zvoleného antiagregačního léčiva Clopidogrelu při dříve nezjištěném diplotypu. U normálního metabolizátora s diplotypem *1/*1 byla antiagregační odpověď ovlivněná řadou faktorů, mezi které lze zařadit nízkou a vysokou reaktivitu trombocytů při léčbě, enzymy CYP450, lékové interakce, inhibitory protonové pumpy, blokátory vápníkových kanálů, kardiovaskulární onemocnění.

Tab. 6: Soubor pacientů s příslušnými údaji.

ID pacienta	Pohlaví	Rok narození	Věk při prvním projevu TEN	Zahájení léčby	Recidiva	Léčivo	Zjištěný diplotyp	Fenotyp - metabolizátor
1	Muž	1948	69	2017	Ne	Clopidogrel, Aspirin	*1/*17	Ultrarychlý
2	Žena	1947	71	2018	Ne	Clopidogrel, Godasal	*1/*1	Normální
3	Muž	1955	56	2011	Ne	Clopidogrel, Godasal	*1/*1	Normální
4	Muž	1940	78	2018	Ne	Clopidogrel, Anopyrin	*1/*17	Ultrarychlý
5	Muž	1945	72	2017	Ne	Clopidogrel, Aspirin	*1/*2	Střední
6	Muž	1941	76	2017	Ne	Clopidogrel, Anopyrin	*2/*17	Střední
7	Muž	1940	77	2017	Ne	Clopidogrel	*1/*2	Střední
8	Žena	1936	75	2011	Ano	Clopidogrel	*1/*17	Ultrarychlý
9	Muž	1957	60	2017	Ne	Clopidogrel, Anopyrin	*1/*17	Ultrarychlý
10	Žena	1947	70	2017	Ne	Clopidogrel, Anopyrin	*1/*1	Normální
11	Muž	1955	62	2017	Ne	Clopidogrel, Godasal	*1/*1	Normální
12	Muž	1964	53	2017	Ne	Clopidogrel, Anopyrin	*1/*17	Ultrarychlý
13	Muž	1948	70	2018	Ne	Clopidogrel, Anopyrin	*1/*2	Střední
14	Žena	1949	69	2018	Ne	Clopidogrel, Stacyl	*2/*17	Střední
15	Žena	1951	67	2018	Ne	Clopidogrel, Anopyrin	*1/*1	Normální
16	Muž	1957	60	2017	Ne	Clopidogrel	*1/*1	Normální
17	Muž	1959	49	2008	Ano	Clopidogrel, Anopyrin	*1/*2	Střední
18	Muž	1951	66	2017	Ne	Clopidogrel	*1/*17	Ultrarychlý
19	Muž	1940	78	2018	Ne	Clopidogrel, Anopyrin	*1/*1	Normální
20	Žena	1948	70	2018	Ne	Clopidogrel, Anopyrin	*2/*2	Pomalý
21	Žena	1939	79	2018	Ne	Clopidogrel, Godasal	*1/*17	Ultrarychlý
22	Muž	1955	63	2018	Ne	Clopidogrel, Aspirin	*1/*1	Normální
23	Muž	1954	63	2017	Ne	Clopidogrel, Anopyrin	*1/*1	Normální

ID pacienta	Pohlaví	Rok narození	Věk při prvním projevu TEN	Zahájení léčby	Recidiva	Léčivo	Zjištěný diplotyp	Fenotyp - metabolizátor
24	Žena	1962	55	2017	Ne	Clopidogrel, Stacyl	*1/*1	Normální
25	Muž	1955	63	2018	Ne	Clopidogrel, Anopyrin	*2/*2	Pomalý
26	Žena	1948	70	2018	Ne	Clopidogrel, Anopyrin	*1/*17	Ultrarychlý
27	Muž	1954	63	2017	Ne	Clopidogrel	*1/*1	Normální
28	Muž	1971	47	2018	Ano	Clopidogrel, Anopyrin	*17/*17	Ultrarychlý
29	Žena	1956	61	2017	Ne	Clopidogrel, Anopyrin	*1/*17	Ultrarychlý
30	Muž	1951	65	2016	Ne	Clopidogrel, Stacyl	*1/*1	Normální
31	Muž	1949	65	2014	Ne	Clopidogrel	*1/*1	Normální
32	Muž	1952	54	2006	Ano	Clopidogrel, Stacyl	*1/*1	Normální
33	Muž	1970	46	2016	Ano	Clopidogrel, Aspirin	*1/*1	Normální
34	Muž	1949	66	2015	Ne	Clopidogrel, Aspirin	*1/*1	Normální
35	Žena	1965	50	2015	Ne	Clopidogrel, Aspirin	*1/*1	Normální
36	Muž	1951	64	2015	Ano	Clopidogrel	*1/*1	Normální
37	Muž	1951	64	2015	Ano	Clopidogrel, Anopyrin	*17/*17	Ultrarychlý
38	Žena	1996	20	2017	Ne	Clopidogrel, Anopyrin	*2/*17	Střední
39	Žena	1970	48	2018	Ne	Clopidogrel, Aspirin	*1/*1	Normální
40	Muž	1963	55	2018	Ne	Clopidogrel, Aspirin	*1/*1	Normální
41	Muž	1947	68	2015	Ne	Clopidogrel	*1/*1	Normální
42	Žena	1976	41	2017	Ne	Clopidogrel, Anopyrin	*1/*1	Normální
43	Muž	1961	56	2017	Ne	Clopidogrel, Aspirin	*1/*2	Střední
44	Žena	1947	70	2017	Ne	Clopidogrel, Stacyl	*1/*1	Normální
45	Muž	1958	59	2017	Ne	Clopidogrel, Aspirin	*1/*17	Ultrarychlý
46	Žena	1949	68	2017	Ne	Clopidogrel	*1/*2	Střední

Procentuální zastoupení analyzovaných alel v selektovaném souboru pacientů je zobrazen v tabulce 7, ze které vyplývá, že alely *CYP2C19*2* a *CYP2C19*17* se vyskytují ve 14,13 % a 18,48 %. Zatímco alela *CYP2C19*3* v tomto selektovaném souboru pacientů nemá žádné zastoupení. Nejčastější alelou je alela *CYP2C19*1* v 67,39 %.

Tab. 7: Procentuální zastoupení jednotlivých alel v rámci studovaných selektovaných pacientů.

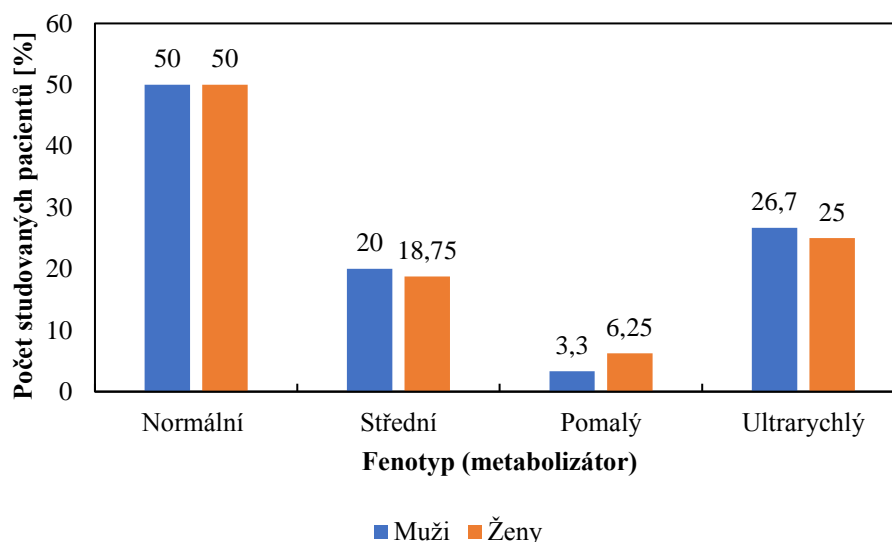
Alela	Procentuální zastoupení [%]
<i>CYP2C19*1</i>	67,39
<i>CYP2C19*2</i>	14,13
<i>CYP2C19*3</i>	0
<i>CYP2C19*17</i>	18,48

Pacienti byli rozděleni do čtyř různých fenotypů uvedených v tabulce 8. V rámci studie z celkového počtu 46 pacientů bylo 23 normálních metabolizátorů (50 %), 9 středních metabolizátorů s diplotypem **1/*2* a **2/*17* (19,56 %). Ve skupině pomalých metabolizátorů byli 2 pacienti s diplotypem **2/*2* (4,35 %). V počtu 12 pacientů bylo ultrarychlých metabolizátorů s diplotypem **1/*17* a **17/*17* (26,09 %).

Tab. 8: Rozdělení pacientů, jejich počet a procentuální zastoupení na základě diplotypů do příslušných fenotypů.

Fenotyp	Diplotyp	Počet	Procentuální zastoupení [%]
Normální	<i>*1/*1</i>	23	50
střední	<i>*1/*2</i>	6	13,04
	<i>*1/*3</i>	0	0
	<i>*2/*17</i>	3	6,52
	<i>*2/*2</i>	2	4,35
Pomalý	<i>*2/*3</i>	0	0
	<i>*3/*3</i>	0	0
	Ultrarychlý	<i>*1/*17</i>	10
	<i>*17/*17</i>	2	4,35

Na obrázku 6 je zobrazeno procentuální zastoupení jednotlivých fenotypů metabolizátorů u analyzované gDNA u mužů a analyzované gDNA u žen. Grafické znázornění vyjadřuje, poměr jednotlivých fenotypů mužů a žen v selektovaném souboru pacientů.



Obr. 6: Procentuální zastoupení jednotlivých fenotypů u mužů a žen.

4.1 Případová studie

Léčba Clopidogrelem se liší v závislosti na genotypu *CYP2C19* jedince. V této práci jsou uvedeni tři pacienti po iCMP, u kterých byly analýzou zjištěny odlišné genotypy.

Prvním pacientem je pan M.Š. narozený roku 1955, z plného zdraví ve věku 63 let proběhla iCMP. V osobní anamnéze se s ničím neléčí, léky nebere, je nekuřák, pracuje jako technik. Jeho 85 letá matka má diagnostikovanou ischemickou chorobu srdeční, je po bypassu. Otec zemřel ve věku 76 let po CMP. Bratr je zdravý.

V roce 2018 v 19:15 se objevila dysartrie, brnění pravé tváře a končetin vpravo. Ve 20:23 pan akutně přijat na iktové centrum, kde byl při vědomí, sdělil své jméno, odpovídal jedním až dvěma slovy, zuby cenil méně vpravo, levý bulbus nepřetáhl doleva. Hybnost levé horní a dolní končetiny byla aktivní, hybnost vpravo nulová. Pacient neschopný chůze, NIHSS 13. EKG monitoring se sinusovým rytmem, zjištěna hypertenze 195/100. Provedeny odběry krve, z krevních testů byla vyšetřena glykémie 5 mmol/l, c-reaktivní protein 2,7 mg/l, minerály, ledvinné funkce, cholesterol,

triglyceridy hodnoty byly v normě. V krevním obraze počet trombocytů $224 \cdot 10^9/l$, protrombinový test (INR = international normalized ratio) 1,05, aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) 21,9 s. Ve 20:37 CT mozku nativně bez čerstvých ložiskových změn, sporně setřelá inzula vlevo. Dle CT angiografie mozkových tepen okluze arterie vertebralis vpravo. Provedena trombolýza Actilysoou intra venosně s dobrým efektem. Pro zjištěnou přetrvávající hypertenzi aplikován Ebrantil 50 mg intra venosně. Pro prevenci TEN provedena bandáž dolních končetin.

Následující den NIHSS je 0. V 16:44 kontrolní CT mozku nativně s normálním nálezem, přiměřený RTG plic, hodnoty krevního tlaku (TK) v rozmezí 178/105 až 180/100. Nasazena duální antiagregace Aspirin protect 100 mg a Clopidogrel 75 mg. Ze stran hypertenze nastavena antihypertenzní medikace Prestarium neo a Apo-amlo 5 mg.

Po pěti dnech pacient propuštěn do domácí péče s odeznělou dysartrií, odeznělou paresou pohledu doprava a odeznělou centrální pravostrannou paresou VII. lícního nervu. Pacient je edukován, duální antiagregace je nastavena po dobu tří měsíců, poté monoantiagregace Aspirinem protect 100 mg. Monitoring TK a kompenzace hypertenze cestou praktického lékaře.

Po jednom měsíci duální léčby pacient nové potíže neudává, je při vědomí, spolupracuje, je bez dysartrie, bez fatické poruchy, zuby cení symetricky, jazyk pláží středem, stoj a chůze normální, bez omezení hybnosti končetin. Laboratorní hodnoty krevního obrazu, INR, aPTT v normě. TK 170/95, medikuje antihypertenziva.

Po třech měsících od CMP je u pacienta celkový stav uspokojivý, bez nových potíží, příznaky se neopakovaly, neudává poruchu řeči, zraku ani oslabení končetin. Duální léčba je změněna na monoterapii Aspirinem protect 100 mg.

Zdravotní stav po dvou letech po trombolýze a při antiagregační léčbě Aspirinem protect 100 mg je stabilizovaný.

U pána M. Š. byl zjištěný genotyp *1/*1, jedná se o normálního metabolizátora, jehož fenotyp se skládá ze dvou aktivních alel *CYP2C19*, které jsou spojeny s normální enzymatickou aktivitou.

Druhou pacientkou je paní Z. M. narozena roku 1936, v 75 letech proběhla iCMP. V osobní anamnéze má diabetes mellitus na perorálních antidiabetických od roku 2007, léčenou hypertenzi, hyperlipidemii v medikaci a obesitas. Z rodinné anamnézy otec pacientky zemřel po prodělané CMP v 81 letech, matka zemřela v 75 letech stářím.

V roce 2011 v 11:10 oslabení levostranných končetin, zhoršení řeči. Ve 12:20 příjem na iktové centrum, změřen TK 170/77, NIHSS 3, glykémie 8,5, trombocyty $185 \cdot 10^9$ l, INR 1,17, aPTT 23,9, na EKG sinusový rytmus. V 11:48 proběhlo vstupní CT mozku s přiměřeným nálezem, ischemické změny toho času jednoznačně neprokázaný. Ve 13:00 na ultrazvukové transkraniální dopplerové sonografii (UZ+TCCS) prokázány v arteria karotis aterosklerotické pláty. RTG vyšetření plic negativní. Vzhledem k vomitu podán Torecan intra venosně. Na elektrokardiografii (EKG) zachycená komorová extra systola. Ve 13:30 dochází k progresi neurologického nálezu, NIHSS 14 bodů, TK stabilní, saturace 88 % (metodou pulzní oxymetrie), indikovaná trombolýza Antilysinem, po které dochází ke zlepšení, NIHSS je 0 bodů, na EKG sinusový rytmus.

Následující den ve 14:24 na kontrolním CT mozku patrná nevelká ischemie v pravém thalamu 17 x 12 mm. Na EKG sinusový rytmus, TK stabilizovaný. Diabetes mellitus kompenzován, odeznívající lehká spastická dysartrie. Zahájení rehabilitace a artikulačního cvičení. K medikaci přidána antiagregační léčba Anopyrinem 100 mg a Clopidogrel 75 mg. Při propuštění bez fatické poruchy, schopná samostatné chůze. Pacientka edukována, nutné pravidelné kontroly lipidogramu, glykémie, krevního obrazu, koagulace, TK, EKG.

Po třech měsících bez potíží, z medikace vysazen Clopidogrel 75 mg a ponechána monoagregační terapie Anopyrinem 100 mg.

V roce 2012 je pacientka bez potíží, bez nových příznaků iCMP, z antiagregační léčby Anopyrin 100 mg.

V roce 2017 v 16:30 při medikaci Anopyrinu 100 mg není schopná chůze, nerozumí slovům, pravý koutek povislý. Převezena na příjem iktového centra v anamnéze iCMP v roce 2011. Má amnézii na předešlou událost, koutek povislý není, oslabené končetiny nejsou, při příjmu TK 171/87, NIHSS 0 bodů, laboratoř bez patologie. V 17:35 vstupní CT mozku bez čerstvých změn, drobný postischemický okrsek v pravém thalamu. CT angiografie prokazuje aterosklerotické změny mozkových tepen.

Po sedmi dnech propuštěna na vlastní žádost, s odeznělou poruchou řeči, s lehkou pravostrannou hemiparézou na podkladě transitorní ischemické ataky (TIA) v levém karotickém povodí.

V roce 2019 v 19:30 u paní porucha řeči, mluva zmatená, špatné vyjadřování, po 20 minutách spontánní obnova mluvy, porucha vědomí a křeče neproběhly,

TK 160/90, saturace 98 %, glykémie 8,9 mmol/l. Ve 20:55 přivezena rychlou zdravotnickou pomocí na neurologické oddělení, bez poruchy řeči, bolesti hlavy nejsou, oslabení končetin není, TK 160/90. CT mozku bez čerstvých ložiskových změn, drobný defekt v pravém thalamu popisován v roce 2017. V medikaci byla provedená změna antiagregační terapie, místo Anopyrinu 100 mg byl nasazen Clopidogrel 75 mg. Po třech měsících bez příznaků TIA s celkovým uspokojivým stavem.

U paní Z. M. byl na základě farmakogenetického testování zjištěný genotyp *1/*17. Jedná se o ultrarychlého metabolizátora, jehož fenotyp se skládá z aktivní a rychlé alely *CYP2C19*, která je spojená se zvýšenou enzymatickou aktivitou. Dochází k poklesu agregace trombocytů a zvyšuje se riziko ischemických příhod. Na základě zjištěného genotypu může být u paní Z. M. na zvážení použití alternativní terapie.

Třetí pacientkou je slečna A.K. narozena v roce 1996, ve 20 letech proběhla iCMP. V osobní anamnéze je studentka, zdravá, užívá hormonální antikoncepci, kuřačka, abúzus tetrahydrocannabinol, po přeléčené tonsilitidě penicilinem, kultivačně beta-hemolytický streptokok. V rodinné anamnéze otec ve 45 letech žilní trombóza, matka a dva bratři zdraví.

V roce 2016 v pět hodin ráno po sejítí schodů náhlá porucha vědomí. Pacientka převezena RZP na anesteziologickoresuscitační oddělení, vědomí kolísavé na úrovni glasgow coma scale 10 – 12, bez lateralizace, afázie, fotofobie, cefalea, kardiopulmonálně stabilizována. Vstupní CT vyšetření s negativním nálezem. Toxikologické vyšetření negativní, vyloučená neuroinfekce vyšetřením likvoru lumbální punkcí. Provedeno CT mozku s obstrukcí arteria temporalis anterior vlevo s počínajícím edémem v temenním a spánkovém laloku vpravo. Akutní převoz na iktové centrum v 9:20, s přetrvávající poruchou řeči. Pro trombolýzu je překročeno časové okno. V 9:36 provedeno kontrolní CT, kde je ischemie v temenním a spánkovém laloku a okluze v arteria temporalis anterior vlevo. Pacientka v 10:09 předána na angio linku, kde je provedena extrakce trombu Trevo katetrem. Podán Heparin 5000 UI intra arteriálně a Actilyse 2 mg intra arteriálně. V 11:45 předána na jednotku intenzivní péče při vědomí, vyhoví jen jednoduchým výzvám, porucha řeči přetrvává.

Druhý den kontrolní CT s ischemií ve spánkovém laloku vlevo. Centrální pravostranná hemiparesa na podkladě ischemického infarktu při trombóze vlevo. Trvá afázie, EKG sinusového rytmu. Odebrán koagulační panel s negativními výsledky, genetické vyšetření na trombofilní stavy negativní bez průkazu Leidenské mutace a mutace genu pro srážlivý faktor II. Nastavena duální antiagregační léčba Anopyrinem 100 mg a Clopidogrelem 75 mg. Zaveden rehabilitační plán na trénink porozumění verbálních instrukcí, verbálně akustické paměti a grafie.

Po sedmi dnech kontrolní CT mozku prokázalo perfuzi původně ischemického ložiska ve spánkovém laloku. Pacientka spolupracuje, kardiopulmonálně stabilizována.

Po třech týdnech ukončená hospitalizace, s odeznělou centrální pravostrannou hemiparesou, senzoricou afázií a globální fatickou poruchou. Na medikaci Anopyrin 100 mg a Clopidogrel 75 mg.

Další zdravotní stav této pacientky není k dispozici.

U slečny A. K. zjištěný genotyp *2/*17 s neaktivní a rychlou alelou. Fenotypově se jedná o středního metabolizátora, kdy přítomnost alely *CYP2C19**2 zvyšuje riziko rezistence na Clopidogrel. Je snížena inhibice trombocytů, zvýšená je reziduální agregace trombocytů a následkem je zvýšené riziko nežádoucích kardiovaskulárních příhod. U slečny A. K. s tímto genotypem je dle doporučení vhodné použít alternativní antikoagulační terapii.

5 DISKUSE

Diplomová práce byla zaměřená na zhodnocení farmakogenetiky Clopidogrelu z hlediska přítomnosti polymorfismů *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* a *CYP2C19*17* v selektovaném souboru pacientů. V rámci této práce byla pro detekci uvedených sekvenčních změn použita metoda real-time PCR.

V této práci byl studován selektivní soubor 46 pacientů, u kterých byla alela *CYP2C19*2* zastoupená ve 14,13 %, alela *CYP2C19*3* se nevyskytovala vůbec a alela *CYP2C19*17* v 18,48 %. Oproti tomu se údaje, které uvádí Petrovič a kolegové (2020) pro frekvenci alel v rámci České republiky nepatrně liší. Ve studii bylo analyzováno 42 až 265 zdravých dobrovolníků, v rámci nichž, byla alela *CYP2C19*2* zastoupená v 8 %, alela *CYP2C19*3* v 1,6 % a alela *CYP2C19*17* ve 29 %. Ve srovnání s populací na Slovensku jsou hodnoty taktéž rozdílné. Alela *CYP2C19*2* se vyskytovala v 19 %, alela *CYP2C19*3* ve 2 % a alela *CYP2C19*17* ve 33 %. Zde je potřeba brát v potaz analýzu pouhých 26 zdravých dobrovolníků. V rámci sousedních států České republiky se frekvence alel selektivního souboru pacientů této práce nejvíce přibližují hodnotám četnosti alel v Německu, kde je zastoupení následující: alela *CYP2C19*2* (14,9 %), alela *CYP2C19*3* (1,1 %) a alela *CYP2C19*17* (24,9 %). Hodnoty jsou výsledkem osmi studií, do kterých bylo zapojeno 923 – 1758 zdravých dobrovolníků. Obdobná frekvence alel je u Poláku, alela *CYP2C19*2* (16,3 %), alela *CYP2C19*3* (1,6 %) a alela *CYP2C19*17* (29,8 %). Analýza probíhala na 166 až 791 zdravých dobrovolnících v pěti studiích. V rakouské populaci byla testována pouze alela *CYP2C19*3*, jejíž zastoupení bylo 0,5 %. Do studie bylo zahrnuto 93 zdravých dobrovolníků. Porovnání frekvencí daných alel není statisticky významné, vzhledem k různě početným analyzovaným souborům a zdravotním stavům jejich účastníků.

Frekvence alely *CYP2C19*2* (14,13 %), *CYP2C19*3* (0 %) a *CYP2C19*17* (18,48 %) ve studovaném selektovaném souboru pacientů jsou srovnatelné s hodnotami Shalia a kolektivem (2013), který uvádí v indoevropské populaci frekvenci alely *CYP2C19*2* (13 – 18 %) *CYP2C19*3* (< 1 %) *CYP2C19*17* (18 – 20 %). Tyto výsledky jsou rovněž analogické s hodnotami uvedenými u africké populace *CYP2C19*2* (17 – 20 %) *CYP2C19*3* (< 1 %) *CYP2C19*17* (18 %). Naproti tomu v asijské populaci je odlišná frekvence těchto zkoumaných alel *CYP2C19*2* (30 – 50 %) *CYP2C19*3* (5 – 10 %) *CYP2C19*17* (2 – 4 %), ale ve srovnání se studii

publikovanou Ghasemi a jeho kolegy (2016) jsou frekvence alely *CYP2C19*17* srovnatelné s hodnotami v Číně (1,2 %), Japonsku (1,3 %) a Jižní Koreji (1,15 %). Výrazně vyšší je četnost této alely v Saudské Arábii (73,9 %) a v Íránu (25,65). Výsledné hodnoty četnosti studovaných alel nelze považovat za relevantní, jelikož v této práci byl analyzován malý soubor selektovaných pacientů a publikace neuvádí počet ani zdravotní stav studovaných jedinců s výjimkou íránské populace, v rámci níž, bylo testováno 100 zdravých dobrovolníků.

Také je podstatné zmínit, že studovaný soubor 46 selektovaných pacientů ve věkovém rozmezí 20 až 79 let, tvořili převážně muži v 65,22 % a ženy zaujímaly 34,78 %. Analyzováno bylo 50 % normálních homozygotů (*1/*1), 21,74 % heterozygotů (*1/*17) a 4,35 % mutovaných homozygotů (*17/*17). Ve srovnání se 100 zdravými íránskými dobrovolníky, jejichž soubor byl zastoupen ze 46 % muži a 54 % ženami ve věku 19 až 57 let, se diplotypy vyskytovaly v následující frekvenci: diplotyp *CYP2C19*1/*1* se vyskytoval v 58,33 %, *CYP2C19*1/*17* v 29,1 % a *CYP2C19*17/*17* v 11,1 %. Ačkoliv se jedná o dvě odlišné populace, hodnoty frekvence uvedených diplotypů nejsou zcela rozdílné.

Teixeira a spolupracovníci (2012) studovali prevalenci alely *CYP2C19*2* u 95 portugalských pacientů s akutním koronárním syndromem (ACS), léčených Clopidogrelem. Průměrný věk pacientů byl 62 let, s převahou mužů (83,2 %). Bylo zjištěno, že v rámci selektovaného souboru pacientů byla frekvence alely *CYP2C19*2* 14,2 % a alely *CYP2C19*1* 85,8 %. Homozygoti divokého typu (*1/*1) tvořili 72,6 %, heterozygoti (*1/*2) 26,3 % a mutovaní homozygoti (*2/*2) byli zastoupení v 1,1 %. Naproti tomu testovaný soubor 46 selektovaných pacientů byl tvořen převážně mužským pohlavím (65,22 %) s průměrným věkem 62,41 let, kde byla frekvence alely *CYP2C19*2* 14,13 % a alela *CYP2C19*1* byla zastoupená v 67,39 %. Normální homozygoti (*1/*1) tvořili 50 % analyzovaných pacientů, heterozygoti (*1/*2) 13,04 % a mutovaní homozygoti (*2/*2) 4,35 %. Při porovnání těchto dvou studií s obdobným souborem pacientů jsou výsledky frekvence diplotypů odlišné.

Studiem vlivu polymorfismu genu *CYP2C19*2* a výskytu zvýšeného rizika kardiovaskulárních příhod a hemoragických komplikací při léčbě Clopidogrelem se zabýval Charfi a jeho kolegové (2018). Analyzováno bylo celkem 71 pacientů, z toho 62 mužů a 9 žen, ve věku od 30 do 85 let. Svým závěrem autoři nedošli k souvislosti mezi polymorfní alelou *CYP2C19*2* a uvedenými komplikacemi.

Vzhledem k recidivám při léčbě Clopidogrelem probíhaly studie, zabývající se rezistencí na léčivo a hledáním faktorů, které mohou tuto rezistenci ovlivnit. Nemusí se jednat pouze o genetickou predispozici, ale svou roli hrají také přidružené choroby jako je diabetes mellitus, porucha funkce ledvin, interakce léčiv nebo špatná absorpce střeva (Ray, 2014). Vzhledem k farmakogenetickým faktorům u pacientů léčených Clopidogrelem je reakce na léčbu různá, proto lze uplatnit alternativní léčbu léčivy, jejichž metabolická aktivace probíhá jinými enzymy. Můžeme zde zařadit ireverzibilní inhibitor receptoru P2Y₁₂, Prasugrel, který je metabolizován enzymem CYP3A4 a CYP2B6 (Holmberg et. al., 2015). Další možnou volbou je Tikagrelor, který je metabolizován enzymem CYP3A4 a je spojován s nežádoucími účinky, jako je dušnost a vyšší riziko krvácení než u Clopidogrelu (Wang et. al., 2019). V rámci této práce je popsána případová studie pacientky M.Z. léčené Clopidogrelem po prodělaném iCMP. U pacientky s genotypem *1/*17, u kterého není nutná změna léčby se objevily opakující se recidivy. Tyto recidivy však s velkou pravděpodobností mají jinou etiologickou příčinu než je poškození funkce enzymu CYP2C19. Jejich příčinou mohou být komorbidity pacientky, kterými jsou diabetes mellitus, hypertenze, hyperlipidemie, obesita. Na fenotypu se mohou podílet také jiné predispoziční genetické faktory, jako je např. výskyt „trombofilních“ mutací v genech pro FV Leiden nebo Protrombin.

Miciak-Ławicka a kolegové (2018) pozorovali souvislost mezi cirkadiánním rytmem, klinickými údaji včetně výsledků analýz aktivity a agregace trombocytů daného souboru pacientů. Hyperkoagulační stav ukazuje nejvyšší vrchol aktivity v ranních a večerních hodinách, zatímco v průběhu dne je aktivita agregace trombocytů snižena. Podle uvedených zjištění je vhodné pro maximální účinnost léčiva přihlížet k cirkadiánním rytmům a odpovídajícím způsobem upravit koncentraci antiagregancia a dobu podání léků. V uvedené případové studii vykazoval pacient M. Š. příznaky iCMP ve večerních hodinách a u pacientky A. K. se objevily symptomy v ranních hodinách. Oba pacienti byli doposud bez zdravotních problémů. U pacientky Z. M. byly prvotní příznaky zjištěny v dopoledních hodinách a odpoledne téhož dne došlo k progresi. I přes monoterapii sekundární prevence iCMP došlo dvakrát k recidivě, známky ataky se objevily v odpoledních a ve večerních hodinách. U pacientky Z. M. však byly zjištěny přidružené choroby, léčila se s hypertenzí, diabetes mellitus byl na PAD, hypercholesterolemii na medikaci. Jak již bylo uvedeno

zde pravděpodobně hraje roli nejen hyperkoagulační stav, ale i endogenní faktory a pravděpodobně také genetická predispozice.

Statistické analýzy genotypizace alel *CYP2C19**2, *3, *17 a jejich údaje mohou významně pomoci při terapii léčiv metabolizovaných enzymy *CYP2C19*, zabránit jejich interakci a snížit riziko vedlejších nežádoucích účinků (Dehbozorgi et. al., 2018).

6 ZÁVĚR

Hlavním cílem práce bylo zanalyzovat soubor pacientů po iCMP, určení jejich diplotypů *CYP2C19* s dopadem na účinnost léčby Clopidogrelem. Clopidogrel je antagonist P2Y₁₂ receptorů, řadí se mezi antiagregační léčiva a svým působením na trombocyty brání jejich agregaci a následnému vzniku trombu.

Genotypovým určením diplotypu lze zjistit účinnost metabolismu Clopidogrelu, jeho důsledek na léčbu, možnou recidivu a lze identifikovat ty pacienty, kteří mají vyšší riziko vedlejších účinků. Pro zlepšení kvality péče, by bylo vhodné na základě studie genotypu *CYP2C19*, individualizovat léčbu u každého pacienta. S odpovědí na léčbu Clopidogrelem souvisí nejen genetické, ale i vnější faktory, jako je diabetes mellitus 2. typu, kardiovaskulární nemoci, renální selhání a starší lidé ve věku nad 65 let.

Experimentální část byla zaměřena na genotypování polymorfních alel *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* a *CYP2C19*17* z gDNA vybraných pacientů s antiagregační léčbou Clopidogrelem po dobu tří měsíců. Metodou real-time PCR byly zjištěny diplotypy *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* a *CYP2C19*17* s následným vyhodnocením čtyř základních fenotypů metabolizátorů Clopidogrelu.

Genetické testování polymorfismů *CYP2C19* při léčbě Clopidogrelem je užitečné z pohledu identifikace pacientů, kteří jsou nositeli nefunkčních alel, pro správné nastavení antiagregačního léčiva.

7 SEZNAM LITERATURY

Články

- Ahrberg C. D., Neužil P. (2015) Doubling Throughput of a Real-Time PCR. *Scientific reports* **5**.
- Ahrberg C. D., Ilic B. R., Manz A., et. al. (2016) Handheld real-time PCR device. *Lab on a chip* **16** (3), 586-592.
- Aïssi D., Dennis J., Ladouceur M., et. al. (2014) Genome-wide investigation of DNA methylation marks associated with FV Leiden mutation. *PloS one* **9** (9).
- Amin A. M., Sheau Chin L., Azri Mohamed Noor D., et. al. (2017) The Personalization of Clopidogrel Antiplatelet Therapy: The Role of Integrative Pharmacogenetics and Pharmacometabolomics. *Cardiology research and practice*, 2017.
- Angiolillo D. J., Fernandez-Ortiz A., Bernardo E., et. al. (2007) Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *Journal of the American College of Cardiology* **49** (14), 1505-1516.
- Arif M., Opit G., Mendoza-Yerbafría A., et. al. (2015) Array of Synthetic Oligonucleotides to Generate Unique Multi-Target Artificial Positive Controls and Molecular Probe-Based Discrimination of Liposcelis Species. *PloS one* **10** (6).
- Asada Y., Yamashita A., Sato Y., et. al. (2018) Thrombus Formation and Propagation in the Onset of Cardiovascular Events. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **25** (8), 653-664.
- Bates S. M., Ginsberg J. S., Straus S. E., et. al. (2000) Criteria for evaluating evidence that laboratory abnormalities are associated with the development of venous thromboembolism. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **163** (8), 1016-1021.
- Blann A. D., Lip G. Y. (2006) Venous thromboembolism. *BMJ Clinical research ed.* **332** (7535), 215-219.
- Boulanger M., Béjot Y., Rothwell P. M., et. al. (2018) Long-Term Risk of Myocardial Infarction Compared to Recurrent Stroke After Transient Ischemic Attack and Ischemic Stroke: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Heart Association* **7** (2).

- Bravo P. E., Di Carli M. F. (2016) Does clopidogrel affect the efficacy of myocardial perfusion imaging? *Journal of nuclear cardiology: official publication of the American Society of Nuclear Cardiology* **23** (4), 780-782.
- Conte J., Potoczniak M. J., Tobe S. S. (2018) Using synthetic oligonucleotides as standards in probe-based qPCR. *Bio Techniques* **64** (4), 177-179.
- Crous-Bou M., Harrington L. B., Kabrhel C. (2016) Environmental and Genetic Risk Factors Associated with Venous Thromboembolism. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **42** (8), 808-820.
- Das A., Srinivasan M., Ghosh T. S., et. al. (2016) Xenobiotic Metabolism and Gut Microbiomes. *PloS one* **11** (10).
- Dávila-Fajardo C. L., Díaz-Villamarín X., Antúnez-Rodríguez A., et. al. (2019) Pharmacogenetics in the Treatment of Cardiovascular Diseases and Its Current Progress Regarding Implementation in the Clinical Routine. *Genes* **10** (4), 261.
- Dehbozorgi M., Kamalidehghan B., Hosseini I., et. al. (2018) Prevalence of the CYP2C19*2 (681 G>A), *3 (636 G>A) and *17 (-806 C>T) alleles among an Iranian population of different ethnicities. *Molecular medicine reports* **17** (3), 4195-4202.
- Desjardins P, Conklin D. (2010) NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of visualized experiments: JoE* (45), 2565.
- Duconge J., Hernandez-Suarez D. F. (2017) Potential Usefulness of Clopidogrel Pharmacogenetics in Cerebral Endovascular Procedures and Carotid Artery Stenting. *Current clinical pharmacology* **12** (1), 11-17.
- Evans W. E., Relling M. V. (1999) Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *Science* **286** (5439), 487-491.
- Fahrni J., Husmann M., Gretener S. B., et. al. (2015) Assessing the risk of recurrent venous thromboembolism--a practical approach. *Vascular health and risk management* **11**, 451-459.
- Ferrante J. A., Giles M. R., Benzie E., et. al. (2018) A novel technique for isolating DNA from TempusTM blood RNA tubes after RNA isolation. *BMC research notes* **11** (1), 563.
- Foroozesh M., Sridhar J., Goyal N., et. al. (2019) Coumarins and P450s, Studies Reported to-Date. *Molecules (Basel, Switzerland)* **24** (8), 1620.
- Galluzzi L., Ceccarelli M., Diotallevi A., et. al. (2018) Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites & vectors* **11** (1), 273.

- Gerth K., Kodidela S., Mahon M., et. al. (2019) Circulating Extracellular Vesicles Containing Xenobiotic Metabolizing CYP Enzymes and Their Potential Roles in Extrahepatic Cells Via Cell-Cell Interactions. *International journal of molecular sciences* **20** (24), 6178.
- Ghasemi Z., Hashemi M., Ejabati M. et. al. (2016) Development of a High-Resolution Melting Analysis Method for CYP2C19*17 Genotyping in Healthy Volunteers. *Avicenna journal of medical biotechnology* **8** (4), 193-199.
- Griesshammer M., Kiladjian J. J., Besses C. (2019) Thromboembolic events in polycythemia vera. *Annals of hematology* **98** (5), 1071-1082.
- Guan W., Lu H., Yang K. (2018) Choosing between ticagrelor and clopidogrel following percutaneous coronary intervention: A systematic review and Meta-Analysis (2007-2017). *Medicine* **97** (43).
- Guengerich F. P., Waterman M. R., Egli M. (2016) Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. *Trends in pharmacological sciences* **37** (8), 625-640.
- Hao L., Zou Z., Tian H., et. al. (2014) Stem cell-based therapies for ischemic stroke. *Biomed research international*, 2014.
- Hasi S., Yao J., Yu S., et. al. (2018) Diversity and distribution of CYP gene family in Bactrian camel. *Functional & integrative genomics* **18** (1), 23-29.
- Hoffmann M. F., Preissner S. C., Nickel J., et. al. (2014) The Transformer database: biotransformation of xenobiotics. *Nucleic acids research* **42**, 1113-1117.
- Holinstat M. (2017) Normal platelet function. *Cancer metastasis reviews* **36** (2), 195-198.
- Holmberg M. T., Tornio A., Hyvärinen H., et. al. (2015) Effect of grapefruit juice on the bioactivation of prasugrel. *British journal of clinical pharmacology* **80** (1), 139-145.
- Huang L. H., Lin P. H., Tsai K. W., et. al. (2017) The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. *PloS one* **12** (9).
- Hussing C., Kampmann M. L., Mogensen H. S. (2018) Quantification of massively parallel sequencing libraries – a comparative study of eight methods. *Scientific reports* **8** (1), 1110.
- Charfi R., Mzoughi K., Boughalleb M., et. al. (2018) Response to clopidogrel and of the cytochrome CYP2C19 gene polymorphism. *La Tunisie medicale* **96** (3), 209-218.

- Chen S., Zhang Y., Wang L., et. al. (2017) Effects of Dual-Dose Clopidogrel, Clopidogrel Combined with Tongxinluo Capsule, and Ticagrelor on Patients with Coronary Heart Disease and CYP2C19*2 Gene Mutation After Percutaneous Coronary Interventions (PCI). *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* **23**, 3824-3830.
- Cheon S. Y., Kim E. J., Kim J. M., et. al. (2018) Cell Type-Specific Mechanisms in the Pathogenesis of Ischemic Stroke: The Role of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.
- Itkonen M. K., Tornio A., Lapatto-Reiniluoto O., et al. (2019) Clopidogrel Increases Dasabuvir Exposure With or Without Ritonavir, and Ritonavir Inhibits the Bioactivation of Clopidogrel. *Clin Pharmacol Ther* **105** (1), 219-228.
- Jiang X. L., Samant S., Lesko L. J., et. al. (2015) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel. *Clinical pharmacokinetics* **54** (2), 147-166.
- Ju M. H., Chung J. W., Kinnier C. V., et. al. (2014) Association between hospital imaging use and venous thromboembolism events rates based on clinical data. *Annals of surgery* **260** (3), 558-566.
- Kerlin B. A., Ayoob R., Smoyer W. E. (2012) Epidemiology and pathophysiology of nephrotic syndrome-associated thromboembolic disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* **7** (3), 513-520.
- Klotz L. O., Steinbrenner H. (2017) Cellular adaptation to xenobiotics: Interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. *Redox biology* **13**, 646-654.
- Ksouda K., Affes H., Hammami B., et al. (2011) Ageusia as a side effect of clopidogrel treatment. *Indian journal of pharmacology* **43** (3), 350-351.
- Koupenova M., Clancy L., Corkrey H. A., et. al. (2018) Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circulation research* **122** (2), 337-351.
- Li F., Yang L. Yang R., et. al. (2017) Ischemic Stroke in Young Adults of Northern China: Characteristics and Risk Factors for Recurrence. *European neurology* **77** (3-4) 115-122.
- Li M., Inada M., Watanabe H., et. al. (2013) Simultaneous detection and quantification of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*, and distribution analyses in strawberry greenhouses by duplex real-time PCR. *Microbes and environments* **28** (2), 195-203.

- Li X., Liu C., Zhu X., et. al. (2018) Evaluation of Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Vicagrel, a Novel P2Y₁₂ Antagonist, in Healthy Chinese Volunteers. *Frontiers in pharmacology* **9**, 643.
- Lu K., Mahbub R., Fox J. G. (2015) Xenobiotics: Interaction with the Intestinal Microflora. *ILAR journal* **56** (2), 218-227.
- Lynch T., Price A. (2007) The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effect. *American family physician* **76** (3), 391-396.
- Mandal G., Das S., Padmanabhan S. (2018) Development of a Membrane-Based Method for Isolation of Genomic DNA from Human Blood. *Journal of biomolecular techniques: JTB* **29** (2), 46-53.
- Mao H., Luo G., Zhang J., et. al. (2018) Detection of simultaneous multi-mutations using base-quenched probe. *Analytical biochemistry* **543**, 79-81.
- Mattesi L., Noailles T., Rosencher N., et. al. (2016) Discontinuation of Plavix[®] (clopidogrel) for hip fracture surgery. A systematic review of the literature. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research* **102** (8), 1097-1101.
- Miciak-Ławicka E., Begier-Krasińska B., Tykarski A., et. al. (2018) Does the timing of aspirin administration influence its antiplatelet effect – review of literature on chronotherapy. *Kardiochirurgia i torakochirurgia polska = Polish journal of cardio-thoracic surgery* **15** (2), 125-129.
- Middleton A. (2017) Your DNA, Your Say. *The New bioethics: a multidisciplinary journal of biotechnology and the body* **23** (1), 74-80.
- Michalska-Małęcka K., Regucka A., Śpiewak D., et. al. (2016) Does the use of acetylsalicylic acid have an influence on our vision? *Clinical interventions in aging* **11**, 1567-1574.
- Mustafa G., Nandekar P. P., Bruce N. J., et. al. (2019) Differing Membrane Interactions of Two Highly Similar Drug-Metabolizing Cytochrome P450 Isoforms: CYP 2C9 and CYP 2C19. *International journal of molecular sciences* **20** (18), 4328.
- Nakamura M., Yamada N., Ito M. (2017) Direct Oral Anticoagulants for the Treatment of Venous Thromboembolism in Japan. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **24** (6), 560-565.
- Nakayama Y., Yamaguchi H., Einaga N., et. al. (2016) Pitfalls of DNA Quantification Using DNA-Binding Fluorescent Dyes and Suggested Solutions. *PloS One* **11** (3).

- Nassar S., Amro O., Abu-Rmaileh H., et. al. (2014) ABCB1 C3435T and CYP2C19*2 polymorphisms in a Palestinian and Turkish population: A pharmacogenetic perspective to clopidogrel. *Meta Gene* **2**, 314-319.
- Nelson D. R. (2013) A world of cytochrome P450s. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **368** (1612).
- Omiecinski C. J., Vanden Heuvel J. P., Perdew G. H., et. al. (2011) Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* **120** (1), 49-75.
- Petrović J., Pešić V., Lauschke V. M. (2020) Frequencies of clinically important CYP2C19 and CYP2D6 alleles are graded across Europe. *European journal of human genetics: EJHG* **28** (1), 88-94.
- Poulos T. L. (2003) Cytochrome P450 flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100** (23), 13121-13122.
- Preissner S. C., Hoffmann M. F., Preissner R., et. al. (2013) Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy. *PloS one* **8** (12).
- Purushothaman B., Webb M., Weusten A., et. al. (2016) Decision making on timing of surgery for hip fracture patients on clopidogrel. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* **98** (2), 91-95.
- Ray S. (2014) Clopidogrel resistance: the way forward. *Indian heart journal* **66** (5), 530-534.
- Roden D. M., Shuldiner A. R. (2010) Responding to the clopidogrel warning by the US food and drug administration: real life is complicated. *Circulation* **122** (5), 445-448.
- Samama C. M. (2001) Venous thromboembolism deserves your attention. *Critical care* **5** (6), 277-279.
- Sanguhl K., Klein T. E., Altman R. B. (2010) Clopidogrel pathway. *Pharmacogenetics and genomics* **20** (7), 463-465.
- Scott S. A., Sanguhl K., Gardner E. E., et. al. (2011) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450-2C19 (CYP2C19) genotype and clopidogrel therapy. *Clinical pharmacology and therapeutics* **90** (2), 328-332.

- Scott S. A., Sangkuhl K., Stein C. M., et. al. (2013) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clinical pharmacology and therapeutics* **94** (3), 317-323.
- Shalia K. K., Shah V. K., Pawar P., et. al. (2013) Polymorphisms of MDR1, CYP2C19 and P2Y12 genes in Indian population: effects on clopidogrel response. *Indian heart journal* **65** (2), 158-167.
- Siller-Matula J. M., Jilma B., Schrör K. et. al. (2010) Effect of proton pump inhibitors on clinical outcome in patients treated with clopidogrel: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **8**, 2624-2641.
- Sirim D., Widmann M., Wagner F., et. al. (2010) Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases. *BMC structural biology* **10**, (34).
- Spencer F. A., Emery C., Lessard D., et al. (2006) The Worcester Venous Thromboembolism study: a populatino-based study of the clinical epidemiology of venous thromboembolism. *Journal of general internal medicine* **21** (7), 722-727.
- Spentzouris G., Scriven R. J., Lee T. K., et. al. (2012) Pediatric venous thromboembolism in relation to adults. *Journal of Vascular Surgery* **55** (6), 1785-1793.
- Squizzato A., Bellesini M., Takeda A., et. al. (2017) Clopidogrel plus aspirin versus aspirin alone for preventing cardiovascular events. *The Cochrane database of systematic reviews* **12** (12).
- Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., et. al. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy* **93**, 229-237.
- Tajadini M., Panjehpour M., Javanmard S. H. (2014) Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Advanced biomedical research* **3** (85).
- Tang Z., Wang K., Tan W., et. al. (2003) Real-time monitoring of nucleic acid ligation in homogenous solutions using molecular beacons. *Nucleic acids research* **31** (23), 148.
- Teixeira R., Monteiro P., Marques G., et. al. (2012) CYP2C19*2 and prognosis after an acute coronary syndrome: Insights from a Portuguese center. *Revista portuguesa de cardiologia: orgao oficial da Sociedade Portuguesa de Cardiologia = Portuguese journal of cardiology: an official journal of the Portuguese Society of Cardiology* **31** (4), 265-273.

- Topcuoglu M. A., Saka E., Silverman S. B., et. al. (2017) Recrudescence of Deficits After Stroke: Clinical and Imaging Phenotype, Triggers, and Risk Factors. *JAMA neurology* **74** (9), 1048-1055.
- Tracy T. S., Chaudhry A. S., Prasad B., et. al. (2016) Interindividual Variability in Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **44** (3), 343-351.
- Turpie A. G., Chin B. S., Lip G. Y. (2002) Venous thromboembolism: pathophysiology, clinical features, and prevention. *BMJ (Clinical research ed.)* **325** (7369), 887-890.
- Ulehlova J., Slavik L., Kucerova J., et. al. (2014) Genetic polymorphisms of platelet receptors in patients with acute myocardial infarction and resistance to antiplatelet therapy. *Genetic testing and molecular biomarkers* **18** (9), 599-604.
- Ung Y. T., Ong C. E., Pan Y. (2018) Current High-Throughput Approaches of Screening Modulatory Effects of Xenobiotics on Cytochrome P450 (CYP) Enzymes. *High Throughput* **7** (4), 29.
- Urtane I., Aitullina A., Pukite K. (2013) Clopidogrel and the possibility of drug-drug interaction in primary health care. *Journal of young pharmacists* **5** (1), 18-21.
- Vu B. V., Anthony K. L., Strych U., et. al. (2012) Recovery of small DNA fragments from serum using compaction precipitation. *PloS one* **7** (12).
- Wang D., Yang X. H., Zhang J. D., et al. (2018) Compared efficacy of clopidogrel and ticagrelor in treating acute coronary syndrome: a meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord* **18** (1), 217.
- Wang K., Tang Z., Yang C. J., et. al. (2009) Molecular engineering of DNA: molecular beacons. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **48** (5), 856-870.
- Wang Y., Chen W., Lin Y., et. al. (2019) Ticagrelor plus aspirin versus clopidogrel plus aspirin for platelet reactivity in patients with minor stroke or transient ischaemic attack: open label, blinded endpoint, randomised controlled phase II trial. *BMJ (Clinical research ed.)* **365**.
- Xiao F. Y., Luo J. Q., Liu M., et al. (2017) Effect of carboxylesterase 1 S75N on clopidogrel therapy among acute coronary syndrome patients. *Scientific reports* **7** (1) 7244.
- Xu X., Zhao X., Yang Z., et. al. (2016) Significant Improvement of Metabolic Characteristics and Bioactivities of Clopidogrel and Analogs by Selective Deuteration. *Molecules* **21** (6), 704.

- Yousofshahi M., Manteiga S., Wu C., et. al. (2015) PROXIMAL: a method for Prediction of Xenobiotic Metabolism. *BMC systems biology* **9** (94).
- Zanger U. M., Schwab M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* **138** (1), 103-141.
- Zhang L., Ma X., You G., et al. (2017) A Novel Multiplex HRM Assay to Detect Clopidogrel Resistance. *Scientific reports* **7** (1), 16021.
- Zhang M., Xu J., Bao X., et. al. (2017) Association between Genetic Polymorphisms in Interleukin Genes and Recurrent Pregnancy Loss – A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one* **12** (1).

Knižní publikace

MARTÍNKOVÁ Jiřina, Jaroslav CHLÁDEK, Stanislav MIČUDA, Jolana CERMANOVÁ, Jiří GRIM. *Obecná farmakologie*. Hradec Králové: © Olga Čermáková 1. vydání, 2001. 26s. ISBN 80-902883-4-0.