

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

2020

Bc. Kristina Řežábková

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Analýza vybraných genových
polymorfismů a její význam pro
individualizovanou farmakoterapii**

Diplomová práce

Bc. Kristina Řežábková

Školitelka: Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D., GENLABS s.r.o.

České Budějovice 2020

Řežábková K., 2020: Analýza vybraných genových polymorfismů a její význam pro individualizovanou farmakoterapii [Analysis of selected gene polymorphisms and its importance for individualized pharmacotherapy, Mgr. Thesis, in Czech] – p. 97, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This thesis deals with the metabolism of xenobiotics and the fact that it may be influenced by genetic polymorphisms in pharmacogens. In the experimental part, samples of volunteers and patients were tested by several methods of molecular biology detecting these polymorphisms and the results were interpreted and compared on the basis of available studies. Furthermore, the work highlights methods that would lead to successful individualized pharmacotherapy in similar clinical trials.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Bc. Kristina Řežábková

PODĚKOVÁNÍ

Na prvním místě bych ráda poděkovala své školitelce, Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za vedení mého projektu a taky za to, že mi byla k dispozici, kdykoliv jsem si nevěděla rady. Dále mé poděkování patří všem členům mé rodiny, kteří mě podporovali po dobu mého studia, ačkoliv to se mnou mnohdy nebylo lehké.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	METABOLISMUS LÉČIV	2
2.1	FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ METABOLISMUS LÉČIV	2
2.1.1	VĚK.....	2
2.1.2	POHLAVÍ	3
2.1.3	STŘEVNÍ MIKROBIOM	3
2.1.4	ONEMOCNĚNÍ.....	4
2.1.5	GENETICKÉ FAKTORY	4
3	JEDNONUKLEOTIDOVÝ POLYMORFISMUS	6
4	BIOTRANSFORMACE LÉČIV	8
5	ENZYMY 1. FÁZE BIOTRANSFORMACE	9
5.1	CYTOCHROM P450	9
5.1.1	CYP1	10
5.1.2	CYP2	11
5.1.3	CYP3	16
5.2	VKORC1	17
5.3	POLYGENETICKÝ EFEKT CYP2C9 A VKORC1	17
6	ENZYMY 2. FÁZE BIOTRANSFORMACE	18
6.1	UDP-GLUKURONOSYLTRANSFERÁZY	18
6.2	SULFOTRANSFERÁZY	19
6.3	N-ACETYLTRANSFERÁZY	20
6.4	GLUTATHION S-TRANSFERÁZY	21
6.5	THIOPURINE S-METHYLTRANSFERÁZA	22
6.6	KATECHOL-O-METHYLTRANSFERÁZY	23
7	ZPŮSOB URČOVÁNÍ DÁVKOVÁNÍ LÉČIV	24
7.1	VOLNĚ PRODEJNÉ LÉKY	24
7.2	LÉKY NA PŘEDPIS.....	24
8	SPOTŘEBA LÉČIV V ČESKÉ REPUBLICCE	25
8.1	FARMAKOGENETICKY OVLIVNĚNÁ LÉČIVA	27
9	CÍLE PRÁCE.....	32
10	METODIKA	33

10.1	ANALÝZA DAT	34
10.1.1	PCR RFLP PRO DETEKCI VARIANT V GENECH <i>MTHFR</i> A <i>NQO1</i>	34
10.1.2	REAL-TIME PCR.....	40
10.1.3	COLOR KOMPENZACE.....	40
10.1.4	HYBRIDIZACE NA STRIPECH	44
11	VÝSLEDKY	48
11.1	ANALÝZA DAT	48
11.1.1	PROJEKT PHARMACHIP	48
11.1.2	QUINTA ANALYTICA	54
11.1.3	POPULAČNÍ STUDIE	55
12	DISKUZE	57
13	ZÁVĚR.....	61
14	INTERNETOVÉ ZDROJE.....	62
15	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:	63
16	SEZNAM PŘÍLOH.....	88
17	SEZNAM TABULEK	95
18	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	97

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

6-MP – 6-merkaptopurin

6-TG – 6-thioguanin

ATC – Anatomical Therapeutic Chemical classification

ATP – adenosintrifosfát

COMT – katechol-O-methyltransferáza

CYP – Cytochrom P450

DDD – doporučená denní dávka

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EM – extenzivní metabolizátor

GERD – gastroesophageal reflux disease

HLA – human leukocyte antigen

IL – interleukin

IM – intermediární/normální metabolizátor

MTHFR – methylenetetrahydrofolát reduktáza

NAT – N-acetyltransferáza

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NQO1 – NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1

NSAID – non-steroid anti-inflammatory drug

PAPS – 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfát

PCR – polymerase chain reaction

PharmGKB – The Pharmacogenomics Knowledgebase

PM – pomalý metabolizátor

RFLP – restriction fragment length polymorphism

rpm – revolutions per minute

rs – reference SNP

RT – room temperature

SNP – single-nucleotide polymorphism

SNRI – serotonin–norepinephrine reuptake inhibitor

SÚKL – Státní ústav pro kontrolu léčiv

SULT – sulfotransferáza

TNF – tumor necrosis factor

TPMT – thiopurin S-methyltransferáza

UDP – uridin difosfát

UDPGA – UDP glukuronová kyselina

UGT – UDP-glukuronosyltransferázy

UM – ultrarychlý metabolizátor

1 ÚVOD

Ve farmakologické praxi jsou pacientům předepisovány léky pouze na základě charakteru léčivé látky a pravděpodobnosti, že klinické výsledky budou spolehlivé a efektní, přičemž nebývá zohledněn individuální rozdíl v odpovědi na jednotlivé léky u různých pacientů.

Mezi faktory ovlivňující reakci na léčivo spadají kromě věku, pohlaví, probíhajících onemocnění také genetické faktory, a to konkrétně polymorfismy v genech kódujících enzymy, které hrají klíčovou roli v metabolismu léčiv. Tyto polymorfismy mají za následek sníženou enzymatickou aktivitu, která jde ruku v ruce s možnou toxicitou či sníženou účinností podávaného léku. Obor, který se zabývá genetickým vlivem na metabolismus léčiv, nazývaný farmakogenetika, se stává rychle rostoucí oblastí zájmu, a to zejména proto, že pouze 30-60 % běžné lékové terapie probíhá úspěšně a nežádoucí účinky léků zapříčiní zhruba 7 % všech hospitalizací. Díky možnosti předvídat reakci jedince na farmakoterapii by se zvýšil počet pozitivních respondentů na lék a eliminoval by se počet subjektů postižených nežádoucími účinky, které mají vliv nejen na míru odpovědi, ale také na celkový zdravotní stav pacienta, a to právě za využití individualizované farmakoterapie, která optimalizuje dávkovací režim pro jednotlivce.

V teoretické části této práce se věnuji metabolismu léčiv a klinicky významným genetickým polymorfismům, které se podílí na míře odpovědi na léčivo, jelikož mění hladinu enzymatické aktivity u klíčových metabolizujících enzymů detoxifikačních drah. Dále se zaměřuji na spotřebu léčiv v České republice za všechny kvartály roku 2019 a selektuji léčiva, jejichž metabolismus je uvedenými polymorfismy dle dostupných studií ovlivněn.

Cílem experimentální části bylo nejen zvádnutí správné laboratorní praxe v genetické laboratoři, ale také cílené testování farmakologicky významných genů pomocí různých molekulárně-genetických přístupů běžně používaných pro detekci jednonukleotidových polymorfismů a dále také porovnání těchto přístupů v rámci diskuze.

2 METABOLISMUS LÉČIV

Léčiva jsou obvykle malé molekuly, které jsou obecně klasifikovány jako xenobiotika, což jsou látky cizí lidskému tělu. Existuje však několik endogenních molekul, jako jsou například steroidy a hormony, které jsou také označovány jako léčiva, jelikož se využívají k léčbě chorobných stavů (Caira & Ionescu, 2006).

Termínem metabolismus se označuje proces enzymaticky katalyzované přeměny chemikálií z jedné chemické skupiny na druhou. V ideálním případě by léčivo mělo být z těla vyloučeno po dosažení jeho farmakologického cíle, tzn. pokud jeho účinek není již dále vyžadován. Některá léčiva jsou vylučována z lidského těla bez strukturálních změn, ale většina léčiv musí být chemicky modifikována na vodou-rozpustné látky, což usnadňuje jejich následné vyloučení močí nebo žlučí. V některých případech však enzymy metabolizující léčiva přeměňují látky na jejich farmakologicky aktivní formu. Například proléčiva (farmakologicky neaktivní formy léčiv) jsou syntetizována k překonání problémů s absorpcí, a jsou tak přeměněny, aby aktivovaly lék poté, co je absorbován do těla. Veškeré tyto procesy úprav se nazývají metabolismem léčiv, který má charakter detoxifikační funkce organismu (Benedetti et al., 2009).

2.1 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ METABOLISMUS LÉČIV

K dosažení účinné terapeutické hladiny léčiva v krvi a tkáních se požadované dávky a frekvence podávání liší u různých pacientů z důvodů individuálních rozdílů v distribuci léků, míře metabolismu a eliminaci léčiv. Tyto rozdíly jsou určeny jak genetickými faktory, tak i nongenetickými proměnnými, například věkem, pohlavím, charakterem střevní mikroflóry, souběžně probíhajícím onemocněním či environmentálními faktory.

2.1.1 VĚK

Věk je velmi vlivným faktorem pro metabolismus léčiv, a to zejména v extrémních životních situacích, kdy se zdá, že metabolická kapacita léčiv je podstatně nižší. U novorozenců je to kvůli nezralosti několika enzymových systémů včetně cytochromů P450 (CYP; Stevems et al., 2008; Koukouritaki et al., 2004; Kinirons et al., 2004), které se plně

vyvíjejí pouze během prvního roku života. Ve starší populaci je schopnost eliminovat léčiva také jasně snížena. To je zvláště důležité u léků s úzkým terapeutickým oknem, včetně antipsychotik a antidepresiv, antikoagulancií a betablokátorů. Clearance paracetamolu a benzodiazepinů je také nižší u starších lidí. Nezdá se však, že by to bylo důsledkem nižší exprese nebo aktivity enzymových systémů metabolizujících léky (Yang et al., 2010). Dalšími důvody omezené clearance léčiva u starších osob jsou polypragmázie, kdy dochází k inhibici enzymů v důsledku současného příjmu několika potenciálně intereagujících léčiv a také snížený průtok krve v játrech a funkce ledvin (Cotreau et al., 2005).

2.1.2 POHLAVÍ

Pohlaví ovlivňuje řadu farmakokineticky důležitých parametrů, včetně tělesné hmotnosti, distribuce tuku, krevního toku v játrech a exprese enzymů metabolizujících léčiva (Beierle et al., 1999; Gandhi et al., 2004). Exprese cytochromů P450 specifická pro pohlaví je běžná u laboratorních zvířat, včetně potkanů a myší, u kterých bylo zjištěno, že je kontrolována odlišnou sekrecí růstového hormonu u samic versus samců (Dhir & Shapiro, 2003; Waxman & Holloway, 2009). U lidí nejsou rozdíly tak dramatické, avšak nedávná profilová studie genomové exprese celého genomu u 112 mužských a 112 ženských jedinců identifikovala více než 1300 genů, jejichž exprese mRNA byla významně ovlivněna pohlavím, přičemž 75 % z nich vykazuje vyšší expresi u žen (Zhang et al., 2011). Klinické studie dále naznačují, že ženy metabolizují léky rychleji než muži, a to zejména v případě substrátů cytochromu P450, CYP3A4, který metabolizuje především léčiva jako je např. antipyrin, erytromycin, midazolam, verapamil apod. (Cotreau et al., 2005).

2.1.3 STŘEVNÍ MIKROBIOM

Je stále více jasné, že i střevní mikrobiom může významně ovlivnit reakce organismu na léky. Slouží tedy jako další relevantní zdroj terapeutických nevýhod a nepříznivých účinků lékové terapie. Bylo identifikováno více než 1 000 druhů střevních mikroorganismů, včetně anaerobních bakterií a různých kvasinek, které koexistují v dynamické a často symbiotické rovnováze. Jejich biotransformační repertoár je neoxidativní, byť vysoce všestranný, sahající od převážně redukčních a hydrolytických reakcí po dekarboxylaci, dehydroxylaci, dealkylaci, dehalogenaci a deaminaci. Příkladem takového léčiva může být

digoxin. Ten patří mezi léčiva, k jejichž metabolismu a eliminaci významně přispívá charakter mikrobiomu, který bakteriálně zprostředkovává snížení jeho dávky. Současná léčba antibiotiky, jako je erytromycin nebo tetracyklin, zvyšuje dvojnásobně hladinu digoxinu v séru a zvyšuje tak riziko kardiotoxicity (Lindenbaum et al., 1981; Wilson & Nicholson, 2017; Clayton et al., 2009).

2.1.4 ONEMOCNĚNÍ

Probíhající onemocnění mají obecně negativní vliv na schopnost metabolismu léčiv. Strukturní změna jater při jaterní cirhóze vede ke snížení krevního toku, ztrátě funkčních hepatocytů a snížení hladiny enzymů metabolizujících léčiva. To přispívá ke snížené kapacitě metabolismu léčiv a nižší syntéze sérových proteinů, což vede na jedné straně ke snížení celkové clearance, a na druhé straně ke zvýšeným hladinám nevázaného léčiva v důsledku jeho snížené vazby na plazmatické proteiny (Elbekai et al., 2004; Edginton & Willmann, 2008).

Během infekce, zánětlivých stavů a rakoviny hojně cirkulující prozánětlivé cytokiny jako interleukin (IL) -1 β , TNF a IL-6 působí jako signální molekuly k vyvolání výrazných změn v expresi genů v játrech, což vede k závažné downregulaci mnoha metabolizujících enzymů (Slaviero et al., 2003; Aitken et al., 2006). Ukázalo se, že mechanismus těchto procesů je alespoň částečně způsoben potlačením transkripce metabolicky významných genů (Jover et al., 2002; Aitken et al., 2006; Aitken & Morgan, 2007).

2.1.5 GENETICKÉ FAKTORY

Vrozené genetické varianty genů asociovaných s metabolismem léčiv jsou studovány více než 60 let a bylo objeveno mnoho zajímavých příkladů genetického vlivu na biotransformaci léčiva (Meyer, 2004). Je pozoruhodné, že ztráta funkce zapříčiněná polymorfismy v genech cytochromu P450 (CYP) je překvapivě často ovlivněna sestřihem a expresí, namísto transkripce nebo proteinové struktury (Sadec et al., 2011). Některé z genetických faktorů, které ovlivňují funkci enzymů, představují genetické polymorfismy v genech kódujících klíčové enzymy v biotransformaci léčiv. Genetický polymorfismus je definován jako výskyt variantní alely genu při populační frekvenci $\geq 1\%$, jenž má za následek změněnou expresi a/nebo funkční aktivitu genového produktu. Klinicky

relevantní polymorfismy vyskytující se u enzymů účastnících se 1. a 2. fáze biotransformace léčiv vedou ke změně účinnosti lékové terapie nebo k nežádoucím účinkům, které často vyžadují úpravu dávky, což je obzvláště důležité u léků s nízkými terapeutickými indexy (TI).

3 JEDNONUKLEOTIDOVÝ POLYMORFISMUS

Jednonukleotidový polymorfismus, častěji označován jako SNP (single-nucleotide polymorfism) je substituce jednoho nukleotidu, který se vyskytuje na specifické pozici v genomu. SNP mohou spadat do kódujících sekvencí genů, nekódujících oblastí genů nebo do intergenních oblastí (oblasti mezi geny). SNP v kódující sekvenci nutně nemění aminokyselinovou sekvenci proteinu, který je produkován, v důsledku degenerace genetického kódu. Genomická distribuce SNP není zcela homogenní a vyskytuje se častěji v nekódujících než v kódujících regionech (Barreiro et al., 2008). Výskyt jednotlivých SNP se liší i napříč různými populacemi, takže výskyt variantních alel, jež jsou běžné v jedné geografické nebo etnické skupině, mohou být v jiné mnohem vzácnější (Zhu et al., 2015).

Důležitou skupinou SNP jsou ty, které odpovídají missense mutacím způsobujícím změnu aminokyselin na úrovni proteinu. Bodová mutace může mít různý účinek na funkci proteinu (od žádného účinku po úplné narušení jeho funkce). Obvykle má změna v aminokyselinách s podobnou velikostí a fyzikálně-chemickými vlastnostmi (např. substituce leucinu za valin) mírný účinek a naopak. Podobně, pokud SNP naruší prvky sekundární struktury proteinu (např. substituce prolinem v alfa helixové oblasti), může taková mutace ovlivnit jeho funkci (Alwi, 2005).

Nomenklatura užívaná pro identifikaci SNP může být matoucí, jelikož pro označení jednotlivých polymorfismů může existovat několik variant a dosud nebylo dosaženo shody. Standardně se však jednonukleotidové polymorfismy označují takto: **rs 12169962**. Předpona „rs“ je zkratkou pro „referenční SNP“ a ta je následována jedinečným a libovolným číslem (Kitts et al., 2014).

Dalším způsobem identifikace SNP je jeho detailnější popis přesně určující kódující oblast genu (c.), následovanou číslem pro polohu nukleotidu (254) a jednopísmennou zkratkou pro nukleotid (A, C, G, T nebo U). Dále je v popisu zahrnuto znaménko ">", které je následováno zkratkou nukleotidu ((A, C, G, T nebo U), kterým je původní nukleotid nahrazen (Ogino et al., 2007). Toto označení polymorfismu pak vypadá takto: **c.254G>A**.

SNP DATABÁZE

Existuje velké množství on-line databází, díky kterým lze vyhledat informace o jednotlivých SNP. Z hlediska farmakogenetiky je významná především volně přístupná

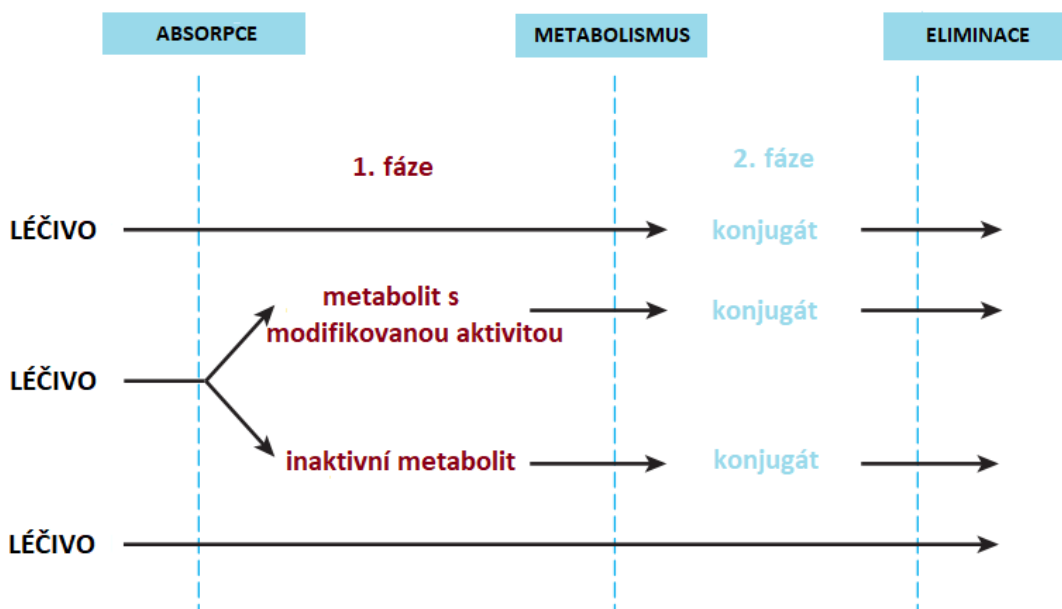
databáze The Pharmacogenomics Knowledgebase (PharmGKB), zodpovědná za integraci a šíření znalostí o existenci genetických variant zodpovědných za odlišnou reakci metabolismu na konkrétní léky. Dalším obsáhlým zdrojem informací o SNP je Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP), která vznikla pod záštitou organizace National Center for Biotechnology Information (NCBI). V této databázi je možné nalézt genetické varianty vyskytující se napříč různými živočišnými druhy. Přehled databází včetně webových stránek je uveden v tabulce I.

Tab. I: Dostupné SNP databáze a odkaz na jejich webové stránky.

Název databáze	Odkaz
PharmGKB	https://www.pharmgkb.org/
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
SNPEDIA	https://snpedia.com/
PharmVar	https://www.pharmvar.org/
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/

4 BIOTRANSFORMACE LÉČIV

Biotransformace je chemická modifikace (či soubor více modifikací) provedená organismem na chemické sloučenině. Metabolismus léčiv je příkladem biotransformace, jejímž cílem je převést chemickou sloučeninu (lék) na ve vodě rozpustný, dobře vylučitelný produkt (metabolit). Většina metabolických biotransformací se vyskytuje mezi absorpcí léčiva do oběhu a jeho renální eliminací. Obecně lze všechny tyto reakce přiřadit k jedné ze dvou hlavních fází biotransformace označovaných fáze 1 a fáze 2. V 1. fázi biotransformace je obvykle léčivo převáděno na více polární metabolit zavedením funkční skupiny. Pokud jsou metabolity 1. fáze dostatečně polární, mohou být snadno vyloučeny. Mnoho produktů 1. fáze však nemůže být rychle eliminováno a musí tak podléhat následné reakci, ve které je endogenní substrát, jako např. kyselina glukuronová, kyselina sírová, kyselina octová nebo aminokyselina, kombinována s nově začleněnou funkční skupinou, a spolu tvoří vysoce polární konjugát. Takováto konjugace je charakteristickým znakem 2. fáze biotransformace. Oběma fázemi prochází velké množství léčiv, pouze v některých případech má léčivo již začleněnou funkční skupinu, která může přímo tvořit konjugát (Bolleddula et al., 2014).



Obr. I: 1. a 2. fáze biotransformace a přímá eliminace v biodispozici léčiva.

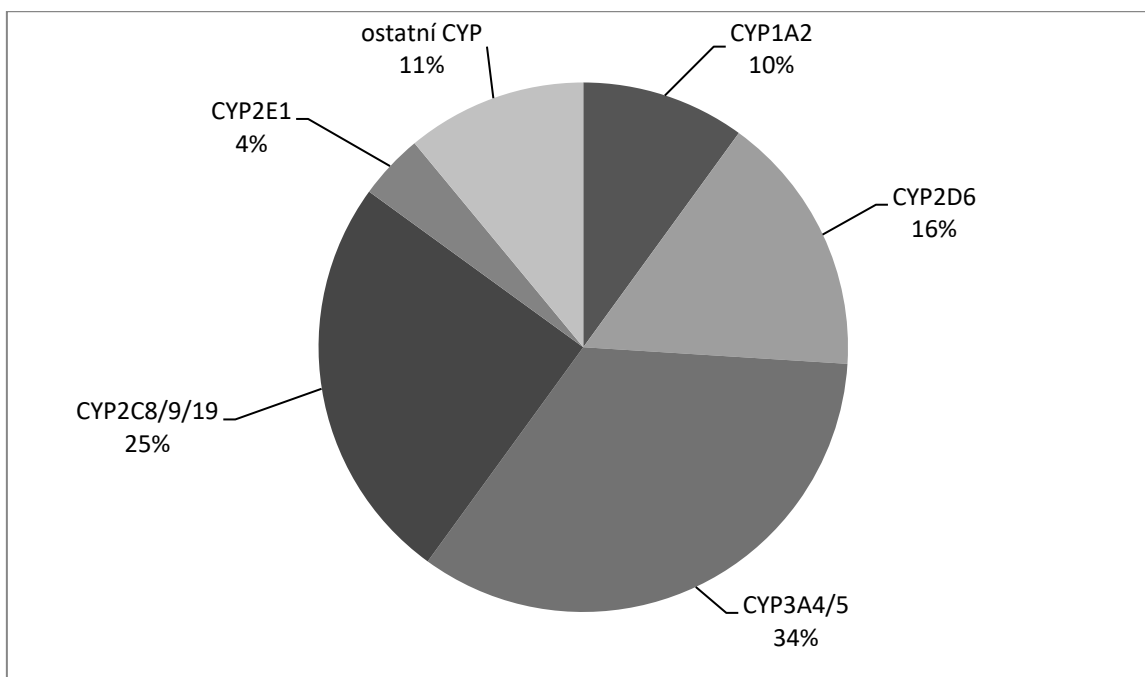
Reakce 2. fáze mohou předcházet reakce 1. fáze.

5 ENZYMY 1. FÁZE BIOTRANSFORMACE

Na 1. fázi biotransformace xenobiotik se podílí enzymy, jež zajišťují zavedení reaktivních a polárních skupin do svých substrátů. Nejčastější biotransformací 1. fáze je hydroxylace katalyzovaná cytochromovým P450 dependentním oxidázovým systémem. Tyto komplexy působí tak, že začleňují atom kyslíku do neaktivovaných uhlovodíků, což může vést buď k zavedení hydroxylových skupin nebo N-, O- a S-dealkylaci substrátů (Guengerich, 2000).

5.1 CYTOCHROM P450

Lidský cytochrom 450 (CYP) je superrodina hemoproteinových monooxygenáz, které oxidují mnoho endogenních sloučenin a xenobiotik (Singh et al., 2011). Dosud bylo identifikováno 18 lidských CYP rodin, kódovaných nejméně 57 geny a 58 pseudogeny. Oxidace a / nebo aktivace proléčiv CYP může produkovat neaktivní nebo toxické sloučeniny účastníci se nežádoucích účinků jednotlivých léků. Za oxidační katalýzu přibližně 90 % používaných léků jsou u lidí zodpovědné izoformy CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2C6, CYP2E1 a CYP3A4 (Singh et al., 2011; Fujikura et al., 2015). Genetické variace vyplývající převážně z jednonukleotidových polymorfismů vysvětlují velkou část interindividuální variability aktivity enzymů CYP (Fujikura et al., 2015). Varianty CYP se ztrátou funkce mohou vést ke snížené vnitřní clearance a ke zvýšení plazmatických koncentrací léčiva, zatímco varianty způsobující zvýšenou funkci mohou vést ke zvýšené clearance a nižším koncentracím léčiva. Polymorfismy CYP ovlivňují expresi a funkci enzymu, což vede k odlišným fenotypovým projevům. Na základě fenotypových rozdílů způsobených genetickou variabilitou rozlišujeme pomalé metabolizátory (PM) nesoucí dva nefunkční geny, intermediární metabolizátory (IM), nesoucí jeden funkční a jeden nefunkční gen, extenzivní metabolizátory (EM) nesoucí dvě kopie funkčních genů (nebo kombinace dvou funkčních genů a nefunkční alely nebo jednoho funkčního genu a dvou alel se sníženou funkcí) a ultrarychlé metabolizátory (UM) nesoucí více než dvě kopie funkčních genů (Johansson & Ingelman-Sundberg, 2011).



Obr. II: Podíl léčiv metabolizovaných izoformami CYP450 (převzato a upraveno dle Rendic, 2002).

5.1.1 CYP1

Rodina CYP1 obsahuje tři funkční geny organizované ve dvou podrodinách. Geny *CYP1A1* a *CYP1A2* se skládají ze sedmi exonů a šesti intronů a jsou umístěny na chromozomu 15q24.1. *CYP1B1* sestává pouze ze tří exonů a vyskytuje se na chromozomu 2p22.2 a kóduje největší lidský CYP z hlediska velikosti mRNA a počtu aminokyselin (Murray et al., 2001; Nelson et al., 2004).

Katalytické aktivity enzymů CYP1 zahrnují hydroxylace a jiné oxidační transformace mnoha polycyklických aromatických uhlovodíků a jiných aromatických látek. Zatímco CYP1A1 preferuje planární aromatické uhlovodíky, CYP1A2 dává přednost aromatickým aminům a heterocyklickým sloučeninám (Sansen et al., 2007). Vzhledem k jeho relativně vysoké expresi v játrech, hraje CYP1A2 významnou roli v metabolismu několika klinicky důležitých léčiv (Gunes & Dahl, 2008; Zhou et al., 2010) jako jsou analgetika a antipyretika (acetaminofen, fenacetin, lidokain), antipsychotika (olanzapin, clozapin), antidepressiva (duloxetin; Lobo et al., 2008), protizánětlivá léčiva (nabumeton; Turpeinen et al., 2009), kardiovaskulární léky (propranolol, guanabenz, triamteren) a svalový relaxant tizanidin (Granfors et al., 2004).

CYP1A2

Web PharmVar v roce 2019 [online] uvádí pro gen *CYP1A2* 21 definovaných alel a 20 variantních haplotypů, z nichž některé jsou spojeny se změnou exprese nebo kódují proteiny se změnou enzymatickou aktivitou. Ukázalo se, že substituce Arg431Trp (*CYP1A2* * 6), která se nachází v oblasti kritické pro udržování terciární struktury proteinu, má za následek vznik nefunkčního proteinu (Zhou et al., 2004). Existuje několik studií popisujících spojitost polymorfismů v *CYP1A2* s lékovou odpovědí u psychiatrických pacientů. Například genotyp TT u SNP rs4646427 je spojen s pomalejší dobou odezvy při léčbě paroxetinem u lidí s depresivní poruchou ve srovnání s genotypy CC + CT (Lin et al., 2010). Dále je také genotyp AA u rs762551 spojen se zvýšenou clearance karbamazepinu u dětí s epilepsií ve srovnání s genotypy AC + CC (Djordjevic et al., 2016). *CYP1A2* je také hlavní izoformou CYP podílející se na metabolismu klozapinu (Sirot et al., 2009). Případové studie ukázaly, že ultrarychlí metabolizátoři klozapinu jsou rezistentní na léčbu. Příznivých terapeutických výsledků u těchto pacientů bylo dosaženo zvýšením dávek klozapinu a jeho současným podáváním s inhibítorem *CYP1A2*, fluvoxaminem (Özdemir et al., 2001; Eap et al., 2004). U pacientů se schizofrenií byly rovněž diskutovány interakce kouření a odezvy na léčivo a potenciální nebezpečí odvykání kouření (Skogh et al., 1999). *CYP1A2* také ovlivňuje antitrombotikum klopidogrel. Kouření zvyšuje klopidogrelem zprostředkovanou inhibici destiček (Bliden et al., 2008; Gremmel et al., 2009). Což je pravděpodobně způsobeno indukcí *CYP1A2*.

5.1.2 CYP2

Rodina CYP2 obsahuje 16 genů, z nichž všechny mají 9 exonů a 8 intronů. V této rodině se nachází několik nejdůležitějších metabolizujících jaterních enzymů, ale také několik extrahepatických enzymů, jejichž funkce nebyla dosud objasněna (Guengerich & Cheng, 2011). Geny kódující CYP2 jsou rozmístěny na různých chromozomech a jsou uspořádány do multi-genových shluků obsahujících jednu nebo několik podrodin (Hoffman et al., 2001; Nelson et al., 2004).

CYP2D6

Mezi nejznámější enzym, který ovlivňuje metabolismus léků, patří cytochrom P450 2D6 (*CYP2D6*), který je kódován genem *CYP2D6*. Ten je zodpovědný za metabolismus a eliminaci přibližně 25 % klinicky užívaných léků, a to přidáním nebo odstraněním některých funkčních skupin, konkrétně hydroxylací, demethylací a dealkylací (Zanger et al., 2008). Nedostatek enzymu *CYP2D6* se dědí jako autosomálně recesivní znak a na základě rozdílného genotypu způsobuje různé úrovně schopnosti metabolizovat jednotlivá léčiva. V současnosti existuje více než 100 zdokumentovaných alel *CYP2D6* s řadou variant s variabilním výskytem v různých etnikách [online]. Genetické polymorfismy *CYP2D6* obecně vedou k 4 fenotypům metabolismu s významnými klinickými projevy. Typickým případem jsou jedinci PM a UM. PM vykazují snížený metabolismus léčiv, a proto vyžadují nižší dávky, aby se zabránilo toxickým účinkům farmak. Nepříznivé účinky způsobené zvýšenou plazmatickou hladinou léčiva se objevují častěji u PM v případech, kdy je clearance léčiva závislá na *CYP2D6* (Wang et al., 1993). Na druhé straně mohou mít sníženou účinnost léků metabolizovaných na aktivní sloučeniny pomocí *CYP2D6*. Známým příkladem je kodein, což je proléčivo a musí být v rámci metabolismu přeměněn na morfin (Dean, 2017) Nedostatečná transformace u PM vede ke snížení úlevy od bolesti nebo dokonce k absolutní toleranci/závislosti. Druhým extrémem jsou UM, kteří mají více než dvě funkční alely v důsledku duplikace nebo znásobení počtu funkčních alel. UM vyžadují nižší dávky kodeinu než IM, jelikož je proléčivo rychleji transformováno. Teoreticky by tedy identifikace UM *CYP2D6* před zahájením léčby zkrátila dobu potřebnou k úpravě dávky, což by pomohlo k rychlejšímu dosažení potřebného terapeutického účinku (Black et al., 2012). Alelické zastoupení genových variant pro *CYP2D6* u jednotlivých populací je k nahlédnutí v příloze (Příloha 4).

Tab. II: Grafické znázornění potřebné hladiny léčiva odpovídající jednotlivým fenotypům *CYP2D6* a různým alelám *CYP2D6* definujícím tyto fenotypy (převzato a upraveno dle Teh & Bertilsson, 2011).

	alely CYP2D6	fenotyp
	A. nefunkční alely (*3-*8, *11-*16, *18-*21, *31, *36, *38, *40, *42, *44, *47, *51, *56, *62)	pomalý metabolizátor
	B. alely se sníženou aktivitou (*9, *10, *17, *29, *41, *49, *50, *54, *55, *59, *72)	intermediární metabolizátor
	C. alely s normální nebo zvýšenou aktivitou (*1, *2, *33, *35, *53)	extenzivní metabolizátor
	D. duplikované/multiduplikované alely s normální aktivitou (např.: *1xN, *2xN, *33xN, *35xN, *53xN)	superrychlý metabolizátor

CYP2C9

Po *CYP3A4* a *CYP2D6* je *CYP2C9* dalším významným cytochromem P450. Z hlediska počtu oxidovaných terapeutických látek, přispívá k metabolismu přibližně 15 % všech léčiv biotransformovaných pomocí CYP (Isvoran et al., 2017). *CYP2C9* je hlavním enzymem odpovědným za metabolickou clearance několika klinicky užívaných léků s úzkým terapeutickým indexem. Interindividuální variabilita exprese a aktivity proteinu *CYP2C9* tedy může ovlivnit účinnost a bezpečnost léčby (Zhang et al., 2016). Důležitými substráty z hlediska úzkého terapeutického indexu a převládajícího metabolismu *CYP2C9* jsou kumarinová antikoagulancia, zejména warfarin, a acenkumarol, většina sulfonylmočoviny a fenytoin.

Kumarinová antikoagulancia včetně warfarinu patří mezi nejčastěji předepisované léky na světě. Používají se k prevenci tromboembolismu u ohrožených jedinců. Warfarin je nejrozšířenějším členem této třídy, ale v některých zemích jsou preferovány dvě další sloučeniny s kumarinovými strukturami, acenokumarol a fenoprokumon. Všechna tři léčiva se zaměřují na enzym VKORC a vyžadují individuální dávkování, které je dosaženo optimalizací koagulační rychlosti. Důležitá role CYP2C9 pro metabolismus aktivnějšího enantiomeru warfarinu, S-warfarinu, je v literatuře velmi hojně popisována (Rettie et al., 1992). Ačkoli k metabolismu R- a S-warfarinu přispívají i další P450, údaje ze studií zabývajících se interakcemi mezi dvěma léčivy a farmakogenetikou naznačují, že CYP2C9 je jedním z klíčových určujících faktorů metabolismu tohoto léčiva *in vivo* (Jonas & McLeod, 2009). Acenokumarol je také metabolizován hlavně CYP2C9 (Thijssen et al., 2000), existují však určité rozdíly vůči warfarinu, pokud jde o rychlost metabolismu a selektivitu enantiomerů (Hermans & Thijssen, 1993). U kumarinových antikoagulancií existuje riziko vážného krvácení, pokud jsou koncentrace léčiva v plazmě příliš vysoké, například v důsledku interakce dvou léčiv nebo výskytu genetického polymorfismu. Riziko se snižuje častým měřením mezinárodního normalizovaného poměru (INR) a úpravou dávky. Místo kumarinových antikoagulancií se stále častěji používají přímo působící perorální antikoagulancia, jako je dabigatran a rivoroxaban (Dzeshka & Lip, 2015). Jedná se o zcela odlišné léky, než jsou kumarinové antikoagulanty, pokud jde o jejich mechanismus účinku, a CYP2C9 nehraje roli v jejich metabolismu.

Nesteroidní antiflogistika (NSAID) včetně diklofenaku, flurbiprofenu a ibuprofenu jsou také dobře zavedenými substráty CYP2C9. Tato skupina léčiv však podléhá metabolismu i jinými enzymy CYP, včetně CYP2C8 a CYP3A4, často na různé metabolity než metabolity tvořené CYP2C9, spolu s přímou glukuronidací (Klose et al., 1998).

V současnosti bylo definováno nejméně 57 alel *CYP2C9* [online], přesto *CYP2C9* * 2 a * 3 zůstávají nejlépe studovanými alelami a nejvíce freventovanými alelami *CYP2C9* napříč populacemi. Alelické zastoupení u jednotlivých populací je k nahlédnutí v příloze (Příloha 4).

CYP2C19

CYP2C19 je enzym podílející se na metabolismu zhruba 10 % léčiv. Protože DNA sekvence *CYP2C19* je vysoce polymorfní, je zodpovědná za velkou variabilitu

farmakokinetiky léčiv metabolizovaných CYP2C19. CYP2C19 metabolizuje řadu léčiv, včetně omeprazolu (Sugimoto et al., 2006), protidestičkového léku klopidogrelu (Saab et al., 2015), antikonvulzivního mefenytoinu (Ibeanu et al., 1999), antimalarického léku proguanilu (Satyabarayana et al., 2009), anxiolytického léku diazepamu (Inomata et al., 2005) a některých antidepresiv, jako je citalopram (Mrazek et al., 2011), imipramin (Skjelbo et al., 1991) a amitriptylin (Jiang et al., 2002). Fenotyp metabolické kapacity CYP2C19 lze opět kategorizovat na základě genotypů a zahrnuje EM, IM a PM. Nežádoucí vedlejší účinky, jako je prodloužená sedace a bezvědomí, byly pozorovány po podání diazepamu u PM CYP2C19 (Bertilsson, 1995). Kromě toho byla u CYP2C19 PM dokázána snížená odpověď na protidestičkové léčivo klopidogrel (Hulot et al., 2006; Brandt et al., 2007; Mega et al., 2009). Léčiva s inhibítorem protonové pumpy, včetně omeprazolu a lansoprazolu, vykazují vyšší míru vyléčení žaludečních vředů způsobených infekcí *Helicobacter pylori* u PM než u EM v důsledku vyšších plazmatických koncentrací původních léčiv u PM (Sohn et al., 1997; Furuta et al., 1998). Alelické zastoupení u jednotlivých populací je k nahlédnutí v příloze (Příloha 4).

CYP2E1

CYP2E1 je jediný gen podrodiny CYP2E a je umístěný na chromozomu 10. Jeho exprese je nedetekovatelná v játrech plodu, avšak během několika hodin po narození hladina proteinu a jeho enzymatická aktivita výrazně vzrostou, ale nezávisle na množství mRNA, které zůstává poměrně nízké (Vieira et al., 1996). Exprese v játrech je poměrně vysoká a variabilita hladiny proteinu CYP2E1 se jeví mezi jednotlivci jako značná a korelující s jeho katalytickou aktivitou (Ohtsuki et al., 2012; Tan et al., 2001). Studie z roku 1995 dokonce uvádí, že muži disponují o třetinu vyššími hodnotami clearance chlorzoxazonu ve srovnání se ženami (Kim & O'Shea, 1995).

CYP2E1 je indukován mnoha substráty (včetně několika hormonů) za různých patofyziologických stavů včetně diabetu, obezity a jaterních onemocnění, kde je hraje patofyziologickou roli (Caro & Cederbaum, 2004; Aubert et al., 2011; Gonzalez, 2007).

CYP2E1 vykazuje preferenci substrátů s nízkou molekulovou hmotností, včetně ethanolu, acetonu a dalších organických rozpouštědel, narkotik, jako je halothan, a některých léků včetně chlorzoxazonu a paracetamolu. Existuje také mnoho známých průmyslových chemikálií, toxických látek, jakož i prokarcinogenů, které jsou také substráty CYP2E1

(Bolt et al., 2003; Lu & Cederbaum, 2008). Ačkoliv hlavním enzymem pro oxidaci ethanolu na acetaldehyd je alkoholdehydrogenáza (ADH), CYP2E1 hraje důležitou roli při zvýšených koncentracích u chronického užívání alkoholu (Caro & Cederbaum, 2004). Řada studií se proto podílela na zkoumání CYP2E1 a jeho vlivu na onemocnění jater způsobeném alkoholem (Cederbaum, 2006; Aubert et al., 2011).

Doposud bylo rozpoznáno 7 odlišných alel *CYP2E1*, což je méně ve srovnání s jinými geny CYP2. Pro žádnou z těchto alel nebyl prokázán důležitý klinický dopad.

5.1.3 CYP3

Enzymy podrodiny CYP3A hrají hlavní roli v metabolismu ~ 30 % klinicky používaných léčiv zahrnujících téměř všechny terapeutické kategorie (Bu, 2006; Liu et al., 2007; Zanger et al., 2008).

CYP3A4

CYP3A4 je enzym, který je u většiny jedinců hojně zastoupen v játrech, ale variabilita exprese v populaci je extrémně vysoká (> 100krát), ačkoli úplná absence exprese nebyla doposud prokázána (Ohtsuki et al., 2012). CYP3A4 podstatně přispívá k metabolismu orálně podávaných léčiv díky své expresi ve střevních enterocytech (Ding & Kaminsky, 2003; von Richter et al., 2004; Daly, 2006). Aktivní místo CYP3A4 je velké a flexibilní a může se přizpůsobit a metabolizovat mnoho lipofilních sloučenin s poměrně velkými strukturami (Scott & Halpert, 2005; Hendrychová et al., 2011). Typickými substráty jsou imunosupresiva, jako je cyklosporin A a takrolimus, antibiotika, jako je erytromycin, protinádorová léčiva, antidepresiva, opioidy a mnoho dalších. Je také účinnou steroidní hydroxylázou s důležitou úlohou v katabolismu několika endogenních steroidů včetně testosteronu, progesteronu a kortizolu (Fuhr et al., 2007; Liu et al., 2007).

Přestože byl gen *CYP3A4* rozsáhle studován, u většiny haplotypů se nepochybně neprojevil vliv exprese nebo aktivity na farmakodynamiku nebo farmakokinetiku. Jeden nedávno objevený vzácný haplotyp, *CYP3A4* *20, vytváří předčasný stop kodon, jehož výsledkem je zkrácený protein s úplnou ztrátou funkce (Westlind-Johnsson et al., 2006). Alelické zastoupení u jednotlivých populací je k nahlédnutí v příloze (Příloha 4).

5.2 VKORC1

Dalším významným enzymem je VKORC1, který je klíčový pro cyklus vitamínu K, kde redukuje epoxid vitamínu K na samotný vitamín K (Owen et al., 2010). VKORC1 je 163 aminokyselinový membránový protein spojený s endoplazmatickým retikulem a jeho mRNA je široce exprimována v mnoha různých tkáních (Oldenburg et al., 2006). Dostupnost redukovaného vitamínu K má zvláštní význam pro několik proteinů koagulačního faktoru, které jej vyžadují jako kofaktor, včetně faktoru VII, faktoru IX a faktoru X (Garcia et al., 2008). Je terapeuticky zajímavý jednak pro svou roli přispívající k vysoké mezistupňové variabilitě požadavků na kumarinovou antikoagulační dávku, tak i pro jeho roli potenciálního hráče při poruchách vyvolaných nedostatkem vitamínu K (Rost et al., 2004).

5.3 POLYGENETICKÝ EFEKT CYP2C9 A VKORC1

Ve výše uvedených příkladech jsou popsány varianty uvnitř jednotlivých genových lokusů, které jsou významně spojeny se změnou odpovědi na léčivo nebo mírou jeho toxicity. Předpokládá se však, že polygenní vlivy (kombinatorické účinky) více genů na odpověď na léčivo, mohou mít za následek velké individuální rozdíly s ohledem na klinické výsledky. Nejlepším příkladem je warfarin, u kterého byly účinky dvou genů, *CYP2C9* a *VKORC1*, jasně definovány. Vysoký stupeň interindividuální variace v odpovědi na warfarin vedl k mnoha studiím, které se pokusily vysvětlit faktory, které ovlivňují warfarinovou odpověď (Yin & Miyata, 2007; Kamali, 2006). Před charakterizací *VKORC1* bylo známo, že genotyp *CYP2C9* hraje roli v metabolismu warfarinu a následné odpovědi (Margaglione et al., 2000). Bylo definováno, že zhruba 10% pozorované variability terapeutické dávky warfarinu mají za následek varianty genu *CYP2C9*. Novější studie však stále ukazují, že genotyp *VKORC1* se jeví jako další, větší, prediktor dávky warfarinu, a to zhruba s 25% pozorované variability terapeutické dávky (Carlquist et al, 2006; Yin & Miyata, 2007). V roce 2007 schválila agentura FDA farmakogenomické informace pro warfarin, které mají být uvedeny na etiketě přípravku, přičemž se uvádí, že genotypy jak *VKORC1*, tak genotypy *CYP2C9*, mohou být užitečné při stanovení optimální počáteční dávky warfarinu (Gage & Lesko, 2008). V současné době probíhá řada rozsáhlých randomizovaných klinických studií zaměřených na vývoj globálně použitelné strategie dávkování warfarinu.

6 ENZYMY 2. FÁZE BIOTRANSFORMACE

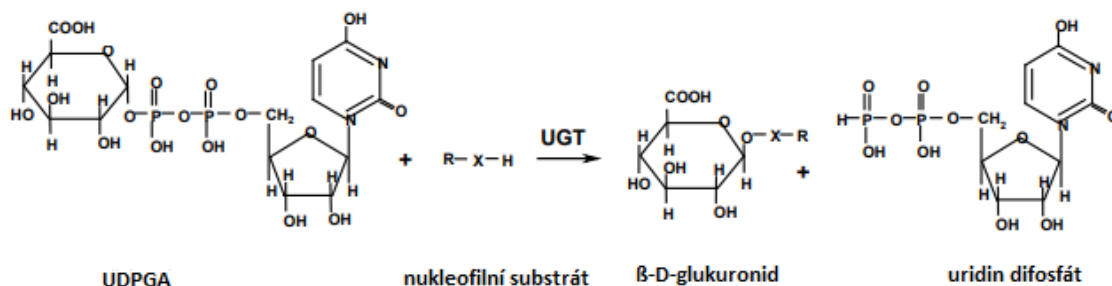
2. fáze biotransformace xenobiotik obecně slouží jako detoxikační krok v metabolismu léčiv. Metabolizující enzymy této fáze jsou většinou transferázy a zahrnují:

- UDP-glukuronosyltransferázy (UGT)
- sulfotransferázy (SULT)
- N-acetyltransferázy (NAT)
- glutathion S-transferázy (GST)
- různé methyltransferázy (hlavně thiopurin S-methyl transferáza (TPMT) a katechol O-methyltransferáza (COMT))

Enzymy 2. fáze přitahují mnohem méně pozornosti klinické farmakologie než enzymy cytochromu P450, protože lékové interakce zahrnující tyto enzymy jsou relativně vzácné. Nicméně snížená metabolická kapacita těchto enzymů může vést k manifestaci toxických účinků klinických léčiv. Ačkoli reakce 2. fáze jsou obecně detoxikační, vytvořené konjugáty mohou být také příčinou nepříznivých účinků (např. konjugáty působící jako nosiče pro potenciálně karcinogenní sloučeniny; (Glatt, 2000).

6.1 UDP-GLUKURONOSYLTRANSFERÁZA

UGT jsou klíčovými enzymy v procesu známém jako **glukoronidace**, jež je nejdůležitější detoxikační cestou 2. fáze v metabolismu léčiv u všech obratlovců. Díky formaci glukuronidových konjugátů je u lidí metabolizováno přibližně 40-70 % všech klinických léčiv. Kromě léků jsou tyto enzymy zodpovědné za metabolismus mnoha karcinogenů, látek znečišťujících životní prostředí a endobiotik (např. bilirubin, steroidní hormony, vitaminy rozpustné v tucích, atd.; Kiang et al., 2005; Cashman et al., 1996). UGT je superrodina enzymů vázajících se na membránu, kde katalyzují tvorbu chemické vazby mezi nukleofilním atomem O-, N-, S- nebo C- s kyselinou uridin5'-difosfo- α -D-glukuronovou (UDPGA). Tato reakce vede k vytvoření příslušných P-D-glukuronidů (obr. III), které jsou snadno odstranitelné močí nebo žlučí.



Obr. III: Konjugace nukleofilního substrátu s kyselinou uridin5'-difosfo- α -D-glukuronovou (UDPGA).

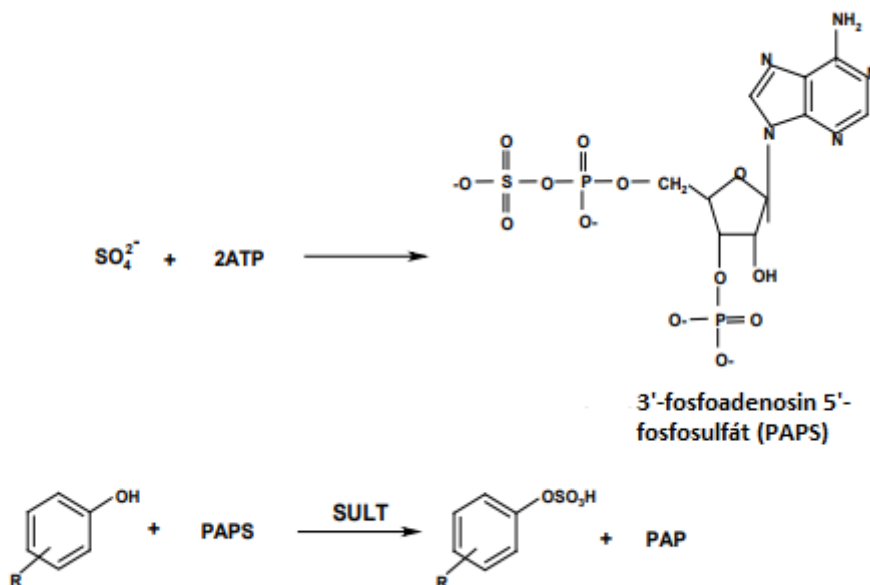
V současné době byly u lidí identifikovány 4 rodiny UGT: UGT1, UGT2, UGT3 a UGT8. První dvě rodiny, UGT1 a UGT2, používají UDPGA k glukuronidaci endo- a xenobiotik. Enzymy UGT8 hrají roli v nervovém systému, kde využívají UDP-galaktózu na galaktosidázové ceramidy, což je důležitý krok při syntéze glykosfingolipidů a cerebrosidů. Funkce rodiny UGT3 byla dlouho nejasná, ale studie z roku 2008 identifikovala gen UGT3A1 jako N-acetylglukosaminyltransferázu (Mackenzie et al., 2008).

Více než 50 mutací v genu *UGT* je příčinou Crigler-Najjarova syndromu typu I a II (Labrune et al., 1989). Dalším syndromem, který je způsoben mutací v *UGT1* je Gilbertův syndrom, což je autozomálně dominantní porucha a způsobuje benigní, mírnou, nekonjugovanou hyperbilirubinémii, která se nachází přibližně u 10% populace (Ehmer et al., 2008).

Studie v lidském *UGT* neprokázaly farmakogenetickou významnost jako například u koček, které vykazují kvůli *UGT1A6* deficitní hladiny paracetamolu (Court & Greenblatt, 1997)

6.2 SULFOTRANSFERÁZA

Sulfotransferázy (SULT) jsou enzymy supergenové rodiny, které katalyzují konjugaci 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfát (PAPS) s O-, N- nebo S- akceptorovou skupinou vhodné molekuly (obr. IV). Systém sulfotransferáz je pravděpodobně hlavním detoxikačním enzymovým systémem ve vyvíjejícím se lidském plodu, jelikož u plodu ve 20. týdnu těhotenství nebyly detekovány žádné UGT transkripty (Strassburg et al., 2002). Lidské fetální jaterní cytosolické frakce prokázaly významnou sulfotransferázovou aktivitu vůči velkému množství substrátů jako například kortizolu, dopaminu, paracetamolu, testosteronu, atd. (Ring et al., 1999).



Obr. IV: Obecná reakce katalyzovaná SULT.

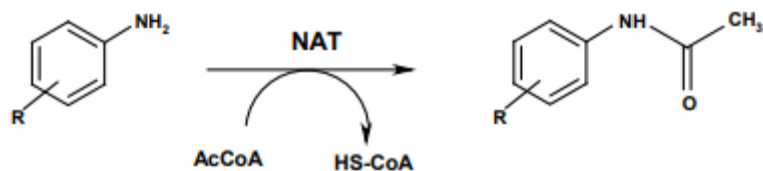
Sulfonace má významnou roli v biotransformaci řady endogenních nízkomolekulárních látek sloučenin (steroidů, catecholaminů, serotoninu, atd.; Glatt & Meinel, 2004). Navíc je to důležitá cesta při biotransformaci četných xenobiotik, jako jsou například léky (Gamage et al., 2006). Na druhou stranu, prokarcinogeny využívají sulfonace k přeměně na vysoce reaktivní meziproducty, které mohou působit jako chemické karcinogeny a mutageny navázané kovalentní vazbou na DNA (Surh, 1998).

Významným jednonukleotidovým polymorfismem vyskytujícím se v genu *SULT* v lidských játrech je *SULT1A1*, jež způsobuje změnu tepelné stability a u mutovaných homozygotů snižuje aktivitu sulfotransferázy. Tato mutace se vyskytuje v kavkazské populaci s frekvencí 25,4 - 36,5 % (Glatt & Meinel, 2004). Dále bylo prokázáno, že polymorfismus *SULT1A1* může hrát roli ve vývoji rakoviny plic (Arslan et al., 2009), uroteliálního karcinomu (Huang et al., 2009) a meningiomálních mozkových nádorů (Bardakci et al., 2008).

6.3 N-ACETYLTRANSFERÁZA

Jaterní N-acetyltransferázy (NAT) dospělých se podílejí na biotransformaci aromatických aminů a hydrazinů přenosem acetylové skupiny z acetylkoenzymu A na volnou

aminoskupinu mateřské sloučeniny (obr. V). NAT katalyzují aktivaci aromatických a heterocyklických aminů prostřednictvím **O-acetylace**, zatímco **N-acetylace** mateřských aminů je považována za detoxifikační krok (Hein et al., 2000).



Obr. V: Acetylace arylaminů N-acetyltransferázou

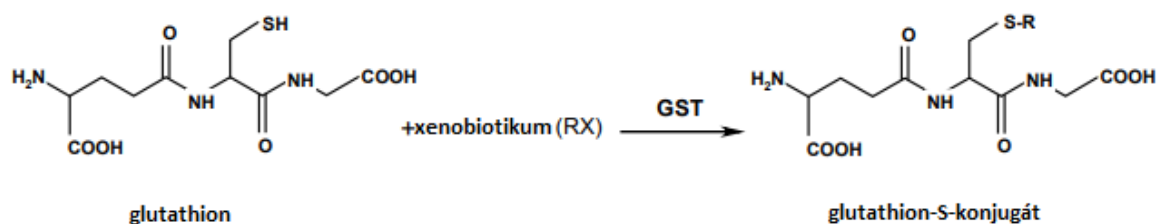
Arylamin N-acetyltransferázy jsou přítomné v eukaryotických organismech včetně lidí a jejich existence byla potvrzena také u prokaryot (Payton et al., 1999). U lidí jsou známy dvě formy, NAT1 a NAT2. Lidský NAT1 a NAT2 mají různé substrátové specifity. Typické specifické substráty pro NAT1 jsou: kyselina p-aminobenzoová (PABA), kyselina p-aminosalicylová a p-aminobenzylglutamát. NAT2 poskytuje hlavní cestu pro detoxikaci léčiv, jako je isoniazid (antituberkulotikum), hydralazin (antihypertenzivum) a sulfonamidy (antibakteriální léky; Kawamura et al., 2005)

Arylamin N-acetyltransferázy, NAT1 a NAT2 jsou enzymy kódované polymorfními geny. Genotyp pak odpovídá tzv. acetylačnímu fenotypu, kdy variantní alely kódují rozdílné metabolické kapacity enzymu. Je možné tedy diferencovat pomalé, střední a rychlé acetylační fenotypy. Rychlá a pomalá acetylace je pak predispozičním faktorem pro citlivost jednotlivců na toxicitu při vystavení velkému množství arylaminů. Frekvence konkrétní mutace v lokusech *NAT* závisí na rasovém a etnickém původu. Analýza fenotypů také odhalila souvislost mezi genotypem pomalé acetylace *NAT2* a rizikem vzniku několika forem rakoviny, jako například rakovinou plic, tlustého střeva, jater nebo močového měchýře (Agundez, 2008).

6.4 GLUTATHION S-TRANSFERÁZA

Glutathion S-transferázy (GST), jsou jedny z hlavních enzymů 2. fáze biotransformace xenobiotik a hrají důležitou roli v buněčné ochraně proti oxidačnímu stresu. GST je rodina enzymů, které katalyzují tvorbu **glutathion S- konjugátů** mezi endogenním tripeptidem glutathionem a xenobiotickými sloučeninami (Obr.VI). GST mohou katalyzovat velké množství reakcí včetně nukleofilních aromatických substitucí, izomerací a redukcí

hydroperoxidů. Dále metabolizují řadu endogenních sloučenin, jako například prostaglandiny a steroidy (van Bladeren, 2000).



Obr. VI: Tvorba glutathionového konjugátu.

Zdá se, že hlavní biologickou funkcí glutathiontransferáz je obrana proti reaktivním a toxickým elektrofilům, jako jsou reaktivní druhy kyslíku (superoxidový radikál a peroxid vodíku), které vznikají při normálních metabolických procesech. Mnoho z nich je tvořeno buňkami během oxidační reakce katalyzované cytochromem P450 a jinými oxidázami (Sheehan et al., 2001). Substráty pro GST jsou všechny sloučeniny schopné reagovat s thiolovou skupinou glutathionu. Jsou to elektrofilní sloučeniny, jako jsou epoxidy, chinony, sulfoxidy, estery, peroxidy a ozonidy (Hayes & Strange, 2000).

Ve skupinách genů *GST* bylo identifikováno několik typů variantních alel. Jedinci postrádající *GST-M1*, *GST-T1* a *GST-P1* geny mají větší incidenci výskytu rakoviny močového měchýře, prsu a plic. Dále bylo zjištěno, že ztráta těchto genů zvyšuje náchylnost k astmatu a alergiím, ateroskleróze a revmatoidní artritidě (Ruzza et al., 2009; Hayes et al., 2005; van Bladeren, 2000).

6.5 THIOPURIN S-METHYLTRANSFERÁZA

Thiopurin S-methyltransferáza (TPMT) je enzym katalyzující **S-methylaci** aromatických heterocyklických sulfhydrylových sloučenin včetně protinádorových a imunosupresivních thiopurinů, jako je 6-merkaptopurin (6-MP), 6-thioguanin (6-TG) a azathioprin. Tato léčiva se používají k léčbě akutní lymfoblastické leukémie, autoimunitních poruch, zánětlivého onemocnění střev a příjemců transplantovaných orgánů (Weinshilboum, 2001). Thiopuriny 6-MP, 6-TG a azathioprin jsou proléčiva, která je třeba aktivovat hypoxanthin-fosforibosyltransferázou. Metabolická přeměna pomocí TPMT vede k tvorbě neaktivních methylovaných metabolitů (Oselin & Anier, 2007). Zhoršená aktivita TPMT pak

způsobuje hromadění thiopurinových nukleotidů a projevuje se cytotoxicitou vedoucí ve většině případů k selhání hematopoézy.

Úroveň aktivity TPMT v lidských tkáních je regulována mnoha genetickým polymorfismy. Frekvence alel pro genetický polymorfismus jsou takové, že ~1 z 300 pacientů kavkazské populace je nositelem dvou mutovaných alel (mutovaný homozygot), jež se projevuje velmi nízkou enzymatickou aktivitou. Zhruba 11% pacientů je heterozygotních a vykazují tak střední enzymatickou aktivitu (Schaeffeler et al., 2004). V roce 2008, bylo identifikováno 23 alel, což může souviset s velkými interindividuálními rozdíly v toxicitě thiopurinového léčiva a terapeutické účinnosti (Ujii et al., 2008). Lidé s geneticky určenou nízkou nebo střední aktivitou TPMT mají vyšší riziko vedlejších účinků při léčbě standardními dávkami thiopurinů. Na druhé straně, wild-type jedinci s vysokou aktivitou TPMT mají nižší riziko toxicity, ale nelze při standardních dávkách dosáhnout optimální koncentrace léčiva v krvi. V tomto případě pak existuje zvýšené riziko relapsu leukémie (Jones et al., 2007).

6.6 KATECHOL-O-METHYLTRANSFERÁZY

Katechol-O-methyltransferáza (COMT) je zodpovědná za přenos methylové skupiny z S-adenosylmethioninu na katecholaminy. Tato O-methylace je jednou z hlavních degradačních drah katecholaminových transmiterů. COMT hraje klíčovou roli při modulaci funkcí závislých na katecholu, jako jsou například kardiovaskulární funkce a zpracování bolesti. Substráty COMT zahrnují nejen neurotransmitery jako je norepinefrin, epinefrin a dopamin, ale také léky mající katecholovou strukturu používané při léčbě hypertenze, astmatu a Parkinsonovy choroby (Shield et al., 2004). COMT je intracelulární enzym umístěný v postsynaptickém neuronu a je přítomen v savčích buňkách ve dvou formách: v cytoplazmatické rozpustné formě a ve formě vázané na membránu umístěnou na cytosolické straně hrubého endoplazmatického retikula (Ulmanen et al., 1997). Byl identifikován funkční SNP v genu pro katechol-O-methyltransferázu (val108/158met), který určuje, zda bude enzymatická aktivita nízká, střední či vysoká, přičemž může být u variantních alel snížena 3-4x více než u wild-type alely (Nackley et al., 2009). Studie tohoto polymorfismu také naznačují, jeho asociaci s pozdním nástupem (≥ 25 let) alkoholismu (Šerý et al., 2006).

7 ZPŮSOB URČOVÁNÍ DÁVKOVÁNÍ LÉČIV

7.1 VOLNĚ PRODEJNÉ LÉKY

Volně prodejné léky mají nastavené dávkování zpravidla podle věku. Například příbalová informace léku Ibalgin 400 doporučuje dávkování stejné pro dospívající od věku 12 let až do dospělosti, tzn. užití 1 potahované tablety 3x denně do ústupu obtíží. Naproti tomu v příbalovém letáku pro Paralen 500 je uvedeno dávkování na základě rozdělení pacientů do tří věkových skupin: na děti do 6 let, kterým je doporučen jiný výrobek (Paralen 125), děti ve věkovém rozmezí od 6 do 15 let, kterým se podává 0,5-1 tableta každých 6 hodin a dospělí, kteří užívají 1-2 tablety několikrát denně dle potřeby.

Tento způsob dávkování není z hlediska možné rozdílnosti tělesné váhy ideální, a tak je nedostatečné dávkování u silnějších jedinců nebo předávkování u hubenějších běžným problémem ve farmacii. Předpovídání průměrné dávky, která je účinná pro všechny jedince, je velmi náročné, vzhledem k faktu, že tělesná hmotnost zásadně ovlivňuje to, jak dávka působí v těle (Knopf et al., 2013). Problém s jednotným dávkováním dle věku může nastat například v multietnicitních zemích, jelikož je prokázána váhová diference mezi adolescenty napříč různými etniky, a to zejména u dívek (Neumark-Sztainer et al., 2002).

7.2 LÉKY NA PŘEDPIS

Dávkování léků na předpis je obvykle založeno na tělesné hmotnosti. Léky jsou vždy doprovázeny sadou pokynů od lékaře, které pacienta nasměrují ke správné frekvenci dávkování doporučené dávky v miligramech nebo mikrogramech na kilogram tělesné hmotnosti. Právě u léků, u kterých je zapotřebí více denních dávek, musí vzít lékař v úvahu informace týkající se celkového množství léku, které lze bezpečně použít za jeden den, a racionálně rozdělit celkovou denní dávku na účinné dávky užívané v intervalech vhodných pro pacienta v rámci jednoho dne. V případě jednotlivých dávkových scénářů se k určení bezpečné jednorázové dávky použije tělesná hmotnost pacienta a doporučená dávka léku v miligramech na kilogram (Pan et al., 2016).

8 SPOTŘEBA LÉČIV V ČESKÉ REPUBLICE

Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) zveřejňuje pouze souhrnné informace o dodávkách léčivých přípravků, nikoliv jejich konkrétní spotřebu. Distribuci léčiv do České republiky jsou dle zákona povinni ohlásit velkodistributoři dodávající léčiva lékárnám, osobám a institucím poskytujícím zdravotní péči nebo transfuzní služby, lékařům, veterinárním lékařům a dalším distributorům. SÚKL zveřejňuje dle § 99 odst. 1 písm. d) zákona o léčivech dodávky léčivých přípravků s rozlišením podle léčivé látky, která je v nich obsažena a podle cesty podání. Dále podle § 99 odst. 5 zákona platí, že údaje, které byly Ústavu poskytnuty distributory podle § 77 odst. 1 písm. f) zákona se poskytují tak, aby s přihlédnutím k okolnostem nebylo možné určit nebo zjistit, které osoby se tento údaj týká.

Díky těmto veřejně dostupným informacím na stránkách SÚKL bylo možné odhadnout celkovou spotřebu léčivých látek a na základě dat z jednotlivých kvartálů sestavit žebříček (tabulka III) nejužívanějších léčivých látek za rok 2019. Z dat byla viditelná změna týkající se zejména sezónních léčiv (např. xylometazolinu), kdy jejich spotřeba byla v prvním a čtvrtém kvartálu nejvyšší. I přes tyto odchylky po zprůměrování dat z jednotlivých kvartálů nebylo celkové pořadí léčivých látek zásadně pozměněno.

Tab. III: Distribuce léčiv v ČR v roce 2019 (data byla převzata a zpracována [online]).

	Název	Cesta podání	Počet balení				
			1. čtvrtletí	2. čtvrtletí	3. čtvrtletí	4. čtvrtletí	celkem
1.	IBUPROFEN	Perorální	1 964 441	1 738 650	1 878 510	2 083 415	7 665 016
2.	PARACETAMOL	Perorální	1 828 422	948 056	1 875 266	1 201 263	5 853 007
3.	PARACETAMOL, KOMBINACE KROMĚ PSYCHOLEPTIK	Perorální	1 352 430	687 822	1 087 659	1 215 365	4 343 276
4.	METFORMIN	Perorální	1 025 150	997 932	899 982	1 194 871	4 117 935
5.	XYLOMETAZOLIN	Nosní	1 044 951	612 331	1 227 312	971 205	3 855 799
6.	ATORVASTATIN	Perorální	857 178	871 805	754 987	889 682	3 373 652
7.	KYSELINA ACETYLSALICYLOVÁ	Perorální	724 923	681 942	652 721	694 984	2 754 570
8.	ALOPURINOL	Perorální	630 051	734 256	598 420	724 423	2 687 150
9.	SODNÁ SŮL LEVOTHYROXINU	Perorální	692 271	675 338	654 216	659 134	2 680 959
10.	OMEPRAZOL	Perorální	653 312	600 062	571 015	661 141	2 485 530
11.	TRAMADOL A PARACETAMOL	Perorální	546 157	563 212	595 921	622 286	2 327 576
12.	METOPROLOL	Perorální	554 847	598 123	545 060	564 451	2 262 481
13.	BISOPROLOL	Perorální	543 715	589 821	510 754	611 536	2 255 826
14.	ROSUVASTATIN	Perorální	522 854	566 712	500 897	565 830	2 156 293
15.	RAMIPRIL	Perorální	511 816	545 132	480 532	523 408	2 060 888
16.	DIKLOFENAK	Kožní	465 139	506 997	472 791	541 317	1 986 244
17.	ZOLPIDEM	Perorální	481 886	479 384	440 203	470 010	1 871 483
18.	AMBROXOL	Perorální	658 933	225 532	313 984	625 284	1 823 733
19.	FYTOFARMAKA A ŽIVOČIŠNÉ PRODUKTY (ČESKÁ ATC SKUPINA)	Perorální	534 223	349 191	356 104	519 150	1 758 668
20.	HOMEOPATIKA (ČESKÁ ATC SKUPINA)	Perorální	436 234	387 381	389 404	446 845	1 659 864
21.	ALPRAZOLAM	Perorální	443 034	386 383	389 939	424 592	1 643 948
22.	KYSELINA ACETYLSALICYLOVÁ	Perorální	429 666	235 263	283 634	694 984	1 643 547
23.	NIMESULID	Perorální	401 691	386 975	388 841	336 216	1 513 723
24.	OXYMETAZOLIN	Nosní	478 431	260 329	342 648	387 157	1 468 565
25.	KYSELINA ASKORBOVÁ (VITAMIN C)	Perorální	423 230	164 152	320 372	400 337	1 308 091
26.	ACETYLCYSTEIN	Perorální	521 529	139 308	314 806	329 097	1 304 740
27.	AMOXICILIN A INHIBITOR BETA-LAKTAMASY	Perorální	511 869	78 436	337 113	366 382	1 293 800
28.	ERDOSTEIN	Perorální	461 593	231 356	187 757	406 254	1 286 960
29.	ANTITUSIKA A EXPEKTORANCIA	Perorální	443 221	127 737	207 976	419 121	1 198 055
30.	PERINDOPRIL	Perorální	389 331	401 363	371 191	420 801	1 193 355

8.1 FARMAKOGENETICKY OVLIVNĚNÁ LÉČIVA

Dostupné studie prokazují, že ze třiceti léčiv uvedených v tabulce III je geneticky ovlivněn metabolismus devíti z nich.

Tab. IV: Vybraná léčiva z tabulky III, jejichž metabolismus je ovlivněn genetickými predispozicemi, jako jsou genetické polymorfismy v genech enzymů 1. či 2. fáze biotransformace.

1.	IBUPROFEN	7 665 016
6.	ATORVASTATIN	3 373 652
8.	ALOPURINOL	2 687 150
10.	OMEPRAZOL	2 485 530
11.	TRAMADOL A PARACETAMOL	2 327 576
12.	METOPROLOL	2 262 481
14.	ROSUVASTATIN	2 156 293
16.	DIKLOFENAK	1 986 244
27.	AMOXICILIN A INHIBITOR BETA-LAKTAMASY	1 293 800

IBUPROFEN

1. v žebříčku distribuce léčiv v ČR za rok 2019: 7 665 016 balení

Ibuprofen je nesteroidní protizánětlivé činidlo (NSAID) používané při léčbě artritidy, revmatoidy, osteoartrózy, horečky a při zmírnění středně bolestivé bolesti (Chen et al., 2008). U lidí je ibuprofen vylučován převážně hepatickou biotransformací. Je metabolizován primárně v játrech pomocí CYP2C9 (Leemann et al., 1992), přičemž může hrát roli také CYP2C8 (Martínez et al., 2005). Jednotlivci homozygotní nebo dvojitě heterozygotní pro alely *CYP2C8* * 3 a *CYP2C9* * 3 (~ 8% populace) mají extrémně nízkou míru clearance ibuprofenu (García-Martín et al., 2005; López-Rodríguez et al., 2008).

ATORVASTATIN

6. v žebříčku distribuce léčiv v ČR za rok 2019: 3 373 652 balení

Atorvastatin je indikován k léčbě několika typů dyslipidemií, včetně primární hyperlipidémie a smíšené dyslipidémie u dospělých, hypertriglyceridémie, primární dysbetalipoproteinémie, homozygotní familiární hypercholesterolémie a heterozygotní familiární hypercholesterolémie u dospívajících se selháním dietních úprav.

Dyslipidemii charakterizuje zvýšení plazmatického cholesterolu, triglyceridů nebo obou, stejně tak i přítomnost nízkých hladin lipoproteinu o vysoké hustotě. Tento stav představuje zvýšené riziko rozvoje aterosklerózy (Lee et al., 2005). Je prokázáno, že izoforma CYP3A4 je odpovědná za tvorbu hydroxylových metabolitů atorvastatinu (Park et al., 2008). Výsledky studií také naznačují, že přítomnost alely G pro polymorfismus -260A>G (alela *CYP3A4*1B*) vykazuje lepší odpověď na atorvastatin, což je také spojeno s nižší aktivitou CYP3A4 *in vivo*, a tedy zvýšenou aktivitu atorvastatinu (Rosales et al., 2012).

ALOPURINOL

8. v žebříčku distribuce léčiv v ČR za rok 2019: 2 687 150 balení

Allopurinol je inhibitor xanthinoxidázového enzymu a je považován za jedno z neúčinnějších léčiv používaných ke snižování hladin urátů a často se používá při léčbě chronické dny (Seth et al., 2014). Allopurinol je však také jednou nejčastějších příčin reakce způsobujících významné nepříznivé kožní účinky, které zahrnují přecitlivělost na léčivo, tzv. Stevensův-Johnsonův syndrom, ale také toxickou epidermální nekrolázu. Variantní alela lidského leukocytového antigenu (HLA) -B, *HLA-B*58* je signifikantně asociována s allopurinolindukovanými nepříznivými kožními účinky, kdy 100% testovaných pacientů populace chan trpících těmito kožními obtížemi mělo v genotypu variantní alelu (Hung et al., 2005). Tuto skutečnost potvrzují i další studie provedené u evropské, korejské, japonské a thajské populace, kdy se prevalence *HLA-B*58* pohybuje v rozmezí od 55-100% (Lonjou et al., 2008; Tassaneeyakul et al., 2009; Kang et al., 2011; Kaniwa et al., 2008).

OMEPRAZOL

10. v žebříčku distribuce léčiv v ČR za rok 2019: 2 485 530 balení

Omeprazol je inhibitor protonové pumpy, který se používá k léčbě poruch souvisejících s žaludeční kyselinou. Tyto poruchy mohou zahrnovat gastroezofageální refluxní chorobu (GERD), peptickou vředovou chorobu a další onemocnění charakterizovaná nadměrným vylučováním žaludeční kyseliny (Strand et al., 2017). Je metabolizován primárně prostřednictvím CYP2C19 a CYP3A4 (Shi & Klotz, 2008). Homozygotní pomalí

metabolizátoři alel *CYP2C19* * 2 a * 3 mají vyšší systémovou expozici omeprazolu ve srovnání s homozygotními extenzivními metabolizátory (Klotz, 2006; Wang et al., 2010).

TRAMADOL A PARACETAMOL

11. v žebříčku distribuce léčiv v ČR za rok 2019: 2 485 530 balení

Tramadol je centrálně působící syntetické opioidní analgetikum a inhibitor zpětného vychytávání serotoninu (SNRI), který strukturně souvisí s kodeinem a morfinem. Liší se od jiných tradičních opioidních léků v tom, že nepůsobí pouze jako opioidní agonista, ale ovlivňuje také monoaminy modulací účinků neurotransmiterů zapojených do modulace bolesti, jako je serotonin a norepinephrin, které aktivují sestupné inhibiční dráhy bolesti (Wiffen et al., 2017).

Studie prováděné u pacientů s pooperační bolestí prokázaly, že jedinci bez aktivního enzymu *CYP2D6* (pomalí metabolizátoři) potřebují přibližně o 30% vyšší dávky tramadolu než pacienti s normální aktivitou *CYP2D6* (intermediární metabolizátoři; Stamer et al., 2003). Genotypizace je také užitečná u pacientů s duplikací genu *CYP2D6* (ultrarychlí metabolizátoři), jelikož tito pacienti mají větší riziko rozvoje nežádoucích účinků užívání tramadolu (Kirchheiner et al., 2008; Stamer et al., 2008).

METOPROLOL

11. v žebříčku distribuce léčiv v ČR za rok 2019: 2 262 481 balení

Metoprolol je selektivní β -1 blokátor, který se běžně používá k léčbě stavů, jako je vysoký krevní tlak, srdeční selhání a angina pectoris. Prochází před systémovým metabolismem, který pokrývá přibližně 50% podané dávky. Signifikantní roli v metabolismu metoprololu hraje aktivita *CYP2D6* aktivita *CYP3A4* (Bahar et al., 2018).

Výskyt *CYP2D6* * 5 / * 17 je spojen se sníženým metabolismem metoprololu u zdravých jedinců v africké populaci ve srovnání s *CYP2D6* * 17 / * 17 + * 1 / * 1 (Wennerholm et al., 2002). Dále bylo zjištěno, že průměrná clearance perorálně užívaného metoprololu byla vyšší u *CYP2D6* EM ve srovnání s *CYP2D6* IM u žen mezi 22.-26. a 34.-38. týdnem těhotenství (Ryu et al., 2016). Pacienti s hypertenzí a genotypem *CYP2D6**46 jsou také postiženi sníženým metabolismem metoprololu ve srovnání s wild-type alelou *CYP2D6**1 (Zineh et al., 2004). Japonští pacienti homozygotní pro alelu *10 měli o 64% clearance

léčiva ve srovnání s pacienty homozygotními pro wild-type alelu (* 1 / * 1) nebo nesoucími * 2 alelu (Taguchi et al., 2004).

ROSUVASTATIN

14. v žebříčku distribuce léčiv v ČR za rok 2019: 2 156 293 balení

Rosuvastatin a další léky ze skupiny statinů včetně atorvastatinu, pravastatinu, simvastatinu, fluvastatinu a lovastatinu jsou považovány za první možnosti léčby dyslipidemie (Anderson et al., 2016). Předepisování statinových léků je považováno za standardní postup po prodělaných kardiovaskulárních příhodách a u lidí se středním až vysokým rizikem rozvoje kardiovaskulárních onemocnění (Grundy & Stone, 2019). Rosuvastatin je metabolizován hlavně CYP2C9. Vylučuje se především stolicí (90%) a eliminační poločas je přibližně 19 hodin.

Studie u velkého vzorku pacientů (n=6989) prokazují, že genotypy AG + GG u polymorfismu rs10455872 (gen LPA) jsou spojeny se sníženou odpovědí na rosuvastatin ve srovnání s genotypem AA (Chasman et al., 2012). Dále bylo prokázáno, že alela T u rs2231142 je spojena se zvýšenými plazmatickými koncentracemi rosuvastatinu ve srovnání s alelou G (DeGorter et al., 2013).

DIKLOFENAK

16. v žebříčku distribuce léčiv v ČR za rok 2019: 1 986 244 balení

Diklofenak je nesteroidní protizánětlivé léčivo (NSAID). NSAID inhibují cyklooxygenázu 1 a 2, což jsou enzymy zodpovědné za produkci prostaglandinů, které přispívají k zánětu a signalizaci bolesti. Diklofenak, stejně jako jiné NSAID, se často používá k tlumení akutní a chronické bolesti a léčbě zánětů různého původu. Metabolismus diklofenaku probíhá pomocí hydroxylace a glukuronidace. Hlavním hydroxylačním produktem je 4-hydroxydiklofenak, který je generován CYP2C9 (Boerma et al., 2014). Varianta *CYP2C9* * 1 / * 8 je spojena se sníženým metabolismem diklofenaku u zdravých jedinců ve srovnání s *CYP2C9* * 1 / * 1 (Llerena et al., 2014).

AMOXICILIN

27. v žebříčku distribuce léčiv v ČR za rok 2019: 1 293 800 balení

Amoxicilin je antibiotikum používané k léčbě mnoha bakteriálních infekcí, včetně akutních zánětů středního ucha, streptokokové faryngitidy, pneumonie, kožních infekcí, infekcí močových cest, lymfatických onemocnění a chlamydiových infekcí. Amoxicilin kompetitivně inhibuje penicilin-vázající protein 1 a další penicilin-vázající proteiny s vysokou molekulovou hmotností (Sauvage & Terrak, 2016). Bez působení proteinů vázajících penicilin bakterie upregulují autolytické enzymy a nejsou schopny vytvářet a opravovat buněčnou stěnu, což vede k bakteriocidnímu účinku (Akhavan & Vijhani, 2019).

Inkubace s lidskými jaterními mikrozomy vedla k detekci 7 metabolitů, přičemž mnoho z nich podstoupilo jinou biotransformační reakci, a to hydroxylaci, oxidační deaminaci, oxidaci alifatického řetězce, dekarboxylaci a glukuronidaci (Szultka et al., 2014).

Co se týče vlivu polymorfismů v biotransformujících enzýmech, bylo prokázáno, že *CYP2C19* *1 / *1 je spojen se sníženou odpovědí na amoxicilin a omeprazol u lidí s infekcí *Helicobacter* (Furuta et al., 1998) a gastritidou (Saito et al., 2015) ve srovnání s *CYP2C19* *1 / *2 + *1 / *3.

9 CÍLE PRÁCE

- I. Vypracovat rešerši přibližující metabolismus léčiv a s ním související klinicky významné genové polymorfismy.
- II. Shromáždit data z dostupných studií o prevalenci výskytu jednotlivých polymorfismů a jejich významnosti ve farmakoterapii.
- III. Vybrat vhodné metody molekulární biologie k detekci těchto polymorfismů a osvojit si základy správné laborní praxe.
- IV. Porovnat výsledky použitých metod.
- V. Na základě výsledků a dostupných dat vyvodit odpovídající závěry.

10 METODIKA

ODBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

Odběr genetického materiálu ve formě plné periferní krve probíhal v rámci spolupráce s odběrovými klinickými centry EUC České republiky. Odebrané vzorky byly uchovány ve zkumavce s příměsí antikoagulačního činidla EDTA. Vzorky byly buď zpracovány ihned po jejich přijetí, nebo byly uskladněny v lednici při teplotě 4°C. Z části spolupráce probíhala s laboratoří BIOCEV, která poskytla již hotové izoláty některých vzorků DNA získané klasickou nekomerční vysolovací metodou.

INFORMOVANÝ SOUHLAS

V případě zpracování klinického biologického materiálu bylo nutné od pacientů získat společně s dodaným vzorkem informovaný souhlas s laboratorním vyšetřením, který jasně informuje o důvodu vyšetření, o požadavcích na skladování vzorku pro další možné použití, popř. o likvidaci vzorku. Takto podepsaný dokument je archivován laboratoří.

IZOLACE DNA Z PERIFERNÍ KRVE

Izolace DNA z leukocytů periferní krve probíhala za použití komerčního kitu GeneAll Exgene™ Clinic SV Mini (SK168_GL_001_D, GeneAll) a bylo postupováno dle doporučení výrobce. Případné odchylky od protokolu jsou popsány níže.

Tab. V: Použité reagentie a jejich objemy pro izolace DNA z plné krve za použití kitu GeneAll Exgene™ Clinic SV Mini

REAGENCIE	OBJEM 1 IZOLACE (μl)
Proteináza K (koncentrace 20mg/ml)	40
BL pufr	200
100% ethanol	400
BW pufr	600
TW puf	700
AE pufr	50

Před samotnou izolací byly pro každý vzorek připraveny 1,5 ml zkumavky, které byly řádně označeny příslušným LIČ, jenž bylo přiděleno po přijetí vzorku se žádankou. Poté bylo nutné vytemperovat suchou lázeň (TDB-120, Dry block thermostat, bioSan) na 56°C. Dále bylo postupováno dle protokolu. Při posledním kroku se nám osvědčilo napipetovat supernatant znovu na kolonku, tu pak zcentrifugovat a nepřidávat dalších 50 µl AE pufru. Výsledná koncentrace takto získaných izolátů byla vyšší.

Měření koncentrace izolátů

Měření koncentrace vyizolovaných vzorků probíhalo na přístroji Qubit Fluorometr 2.0, (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific) za použití AccuGreen Broad Range dsDNA Quantitation Kit ve speciálních 0,5 ml mikrozkuvkách (Qubit Assay Tubes, Invitrogen), které byly před použitím řádně označeny. Před samotným měřením bylo nutné nechat vytemperovat standardy (AccuGreen™ Standard 1 o koncentraci 0 ng/ µl a AccuGreen™ Standard 2 o koncentraci 100 ng/ µl) a kvantifikační roztok (AccuGreen™ Solution) na RT. Pro kalibraci přístroje bylo použito 190 µl kvantifikačního roztoku a 10 µl jednotlivých standardů.

Po kalibraci přístroje bylo možné měřit samotné vzorky. Smícháním 195 µl kvantifikačního roztoku s 5 µl izolátu vznikla směs, která se mohla po dvouminutové inkubaci při RT vložit do přístroje. Výstupní hodnotu koncentrace DNA bylo nutné řádně zaznamenat.

10.1 ANALÝZA DAT

10.1.1 PCR RFLP PRO DETEKCI VARIANT V GENECH *MTHFR* A *NQO1*

Metoda RFLP PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism analýza) se skládá z několika kroků. Prvním krokem je amplifikace fragmentu genomu obsahujícího testovanou variantu genu pomocí PCR, kdy je úsek ohraničen specifickými primery. PCR produkt je vizualizován pomocí gelové elektroforézy. Následuje štěpení amplifikovaného fragmentu s vhodným restriktivním enzymem a detekce restriktivních fragmentů opět pomocí gelové elektroforézy. Rozdíly ve variabilitě genu jsou detekovatelné díky tvorbě různě dlouhých fragmentů.

POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Sekvence primerů použitých pro detekci polymorfismů v genech *MTHFR* A1298C, *MTHFR* C677T a *NQO1* jsou uvedeny v tabulce VI.

Tab. VI: Sekvence použitých primerů

Primer:	Sekvence:
NQO1 forward	5'-AAGCCCAGACCAACTTCT-3' (Bian et al., 2008)
NQO1 reverse	5'-GCGTTTCTCCATCCTTC-3'(Bian et al., 2008)
MTHFR A1298C forward	5'-ATGTGGGGGGAGGAGCTGAC-3' (van der Put et al., 1998)
MTHFR A1298C reverse	5'-GTCTCCCACTTACCCTTCTCCC-3' (van der Put et al., 1998)
MTHFR C677T forward	5'-TGAAGGGAGAAGGTGTCTGGGGGA-3' (Frosst et al., 1995)
MTHFR C677T reverse	5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'(Frosst et al., 1995)

Příprava všech reakčních mixů pro PCR reakce probíhala v dekontaminovaném laminárním boxu v nachlazeném adaptéru. Všechny potřebné vzorky a reagensie byly před použitím řádně zvortexovány a stočeny.

Příprava PCR reakce u *NQO1*

Do 1,5 ml zkumavky byl připraven z reagensií uvedených v tabulce VII společný master mix, jehož výsledný objem byl upraven pro daný počet vzorků, jednu pozitivní a jednu negativní kontrolu (NK). Dále byly připraveny 0,2 ml mikrozkušavky s rovným víčkem, které byly řádně označeny číslem vzorku.

Tab. VII: reakčního mixu pro detekci polymorfismu v genu *NQO1*

REAGENCIE	Pro 1 reakci	OBJEM 1 IZOLACE (μl)
H₂O – aqua injectione	34,3 μl	34,3
5x MyTaq Red Reaction Buffer	1x	10
MyTaq DNA polymeráza (5U/μl)	1U	0,2
DMSO	20%	2,5
primer NQO1 forward (20 pmol)	0,2 pmol	0,5
primer NQO1 reverse (20 pmol)	0,2 pmol	0,5
CELKEM		48 μl

Namíchaný master mix byl zvortexován, stočen a rozpipetován do připravených mikrozkušavek po 48 µl. V případě testovaných vzorků bylo dále přidáno 2 µl DNA izolátu, u pozitivní kontroly 2 µl vzorku se známou variantou genu *NQO1* a u NK byly přidány 2 µl vody. Takto připravené vzorky byly zvortexovány, stočeny a vloženy do termocyklu. Příslušný amplifikační profil je uveden v tabulce VIII.

Tab. VIII: Amplifikační profil pro detekci polymorfismu *NQO1*

	CYKLY	TEPLOTA	ČAS
POČÁTEČNÍ DENATURACE	1	95°C	5 min
DENATURACE		95°C	30 s
ANEALING	32	55°C	30 s
EXTENZE		72°C	60 s
TERMINÁLNÍ EXTENZE	1	72°C	10 min

Příprava PCR reakce u *MTHFR A1298C* a *C677T*

Nejprve byl pro každý polymorfismus (*A1298C* a *C677T*) namíchan master mix do 1,5 ml zkumavky, jehož složení pro 1 reakci je uvedeno v tabulce IX. Výsledný objem master mixu byl vždy upraven pro daný počet vzorků, dvě pozitivní kontroly (PK) a jednu NK. Dále byl připraven příslušný počet 0,2 ml mikrozkušavek s rovným víčkem, které byly řádně označeny číslem vzorku, a do kterých byl následně rozpipetován připravený master mix.

Tab. IX: Složení reakčního mixu pro vyšetření polymorfismu *MTHFR A1298C* a *C677T*

REAGENCIE	Pro 1 reakci	OBJEM 1 IZOLACE (µl)
H₂O – aqua injectione	33,3 µl	33,3
5x MyTaq Red Reaction Buffer	1x	10
MyTaq DNA polymeráza (5U/µl)	1U	0,2
DMSO	20%	2,5
primer MTHFR A1298C/C677T forward (20 pmol)	0,2 pmol	0,5
primer A1298C/C677T reverse (20 pmol)	0,2 pmol	0,5
CELKEM		48 µl

Do každé mikrozkušavky bylo napipetováno 48 μ l master mixu. U testovaných vzorků bylo dále přidáno 2 μ l DNA izolátu, u kontrol 2 μ l vzorku se známým genotypem a u NK byly přidány 2 μ l vody. Takto připravené vzorky byly zvortexovány a stočeny. Dále byly vloženy do termocykleru, kde byl nastaven reakční profil uvedený v tabulce X (pro A1298C) a XI (pro C677T).

Tab. X: Reakční profil pro detekci polymorfismu *MTHFR A1298C*

	CYKLY	TEPLOTA	ČAS
POČÁTEČNÍ DENATURACE	1	95°C	5 min
DENATURACE		95°C	30 s
ANEALING	30	55°C	30 s
EXTENZE		72°C	30 s
TERMINÁLNÍ EXTENZE	1	72°C	5 min

Tab. XI: Reakční profil pro detekci polymorfismu *MTHFR C677T*

	CYKLY	TEPLOTA	ČAS
POČÁTEČNÍ DENATURACE	1	95°C	5 min
DENATURACE		95°C	1 min
ANEALING	35	60°C	1 min
EXTENZE		72°C	1 min
TERMINÁLNÍ EXTENZE	1	72°C	5 min

GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Po proběhnutí PCR bylo nutné ověřit přítomnost PCR produktů pomocí vizualizace na 4% agarózovém gelu. 4% gel byl připraven smícháním 50 ml 1x TBE pufru (Thermo Scientific) a čtyř 0,5 g agarových tabletek (FastGene). Dále bylo přidáno 15 μ l zeleného fluorescenčního barviva (Midori Green Advanced DNA Stain).

Pro kontrolu PCR produktů bylo na gel napipetováno vždy 5 μ l hmotnostního markeru (100 bp DNA ladder, Nippon Genetics) a 5 μ l každého vzorku, PK nebo NK. NK sloužila pro ověření případné kontaminace při přípravě reakčního mixu. Principiálně slouží elektroforetická separace k rozdělení nabitých molekul v elektrickém poli, které putují díky svému negativnímu náboji směrem k anodě.

Po nanesení všech vzorků na gel byla spuštěna elektroforéza na 135 V na 10-15 minut (čas byl individuálně přizpůsoben dle viditelnosti PCR produktů). Po skončení elektroforézy byl gel jemně osušen a přenesen na UV detekční systém, díky kterému bylo možné pořídit snímek gelu a poté ho vyhodnotit. Výsledkem amplifikační reakce byl PCR produkt o definované délce uvedené v tabulce XIII.

Tab. XIII: Velikost neštěpených produktů PCR u jednotlivých testovaných genů

GEN	DÉLKA PCR PRODUKTU
NQO1	196 bp
MTHFR A1298C	241 bp
MTHFR C977T	198 bp

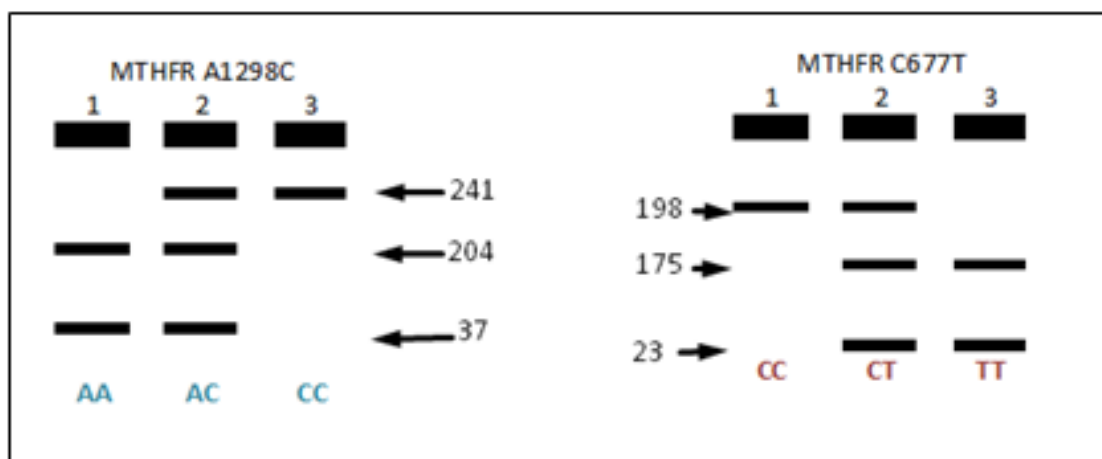
RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ

K restričnímu štěpení PCR produktu analyzovaného genu *NQO1* a *MTHFR C677T* byl použit stejný restriční enzym *Hinf I*, přičemž postup byl v obou případech následující. Nejprve byl z mrazicího boxu vyndán restriční pufr CutSmart, který se nechal vytemperovat na RT. Po rozmrznutí byl pufr řádně promíchán a stočen. Dále byl v chladicím stojánku připraven mix pro samotné restriční štěpení, a to smícháním 2,3 µl 10x CutSmart pufru (New England BioLabs) a 10 U restričního enzymu *Hinf I* (10 U/ µl) do 0,2 ml zkumavek, jejichž počet odpovídal vzorkům a kontrole. Do těchto mikrozkušavek byly přidány vzorky a kontrola a směs byla jemně propipetována. Řádně označené mikrozkušavky byly přesunuty do miniinkubátoru, kde byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu min. 60 minut. Po ukončení inkubace byla provedena kontrola restričního štěpení pomocí elektroforetické separace na agarózovém gelu.

V případě *MTHFR A1298C* byl použit restriční enzym *Mbo II*. Pro každou reakci bylo použito 10 U *Mbo II* (10 U/ µl) a 2,3 µl 10x CutSmart pufru. Tato směs byla také promíchána a stočena. Na 3,3 µl směsi byly nepipetovány vzorky a kontroly a takto připravené mikrozkušavky se nechaly inkubovat při teplotě 37 °C po dobu min. 60 minut. Po ukončení byla provedena kontrola restričního štěpení pomocí elektroforetické separace.

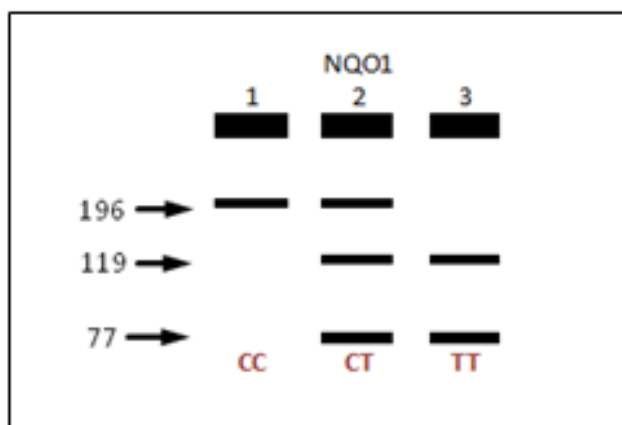
Výsledné fragmenty restričního štěpení u obou genů byly detekovány na 4% nebarveném agarózovém gelu, jehož příprava probíhala obdobně jako u nebarveného gelu s tím

rozdílem, že se fluorescenční barvička promíchala přímo se vzorkem na parafilmu a nepřidávala se do gelu. Na parafilm byla nepipetována 0,5 µl kapka barviva Midori Green Advanced DNA Stain, dále se do čisté pipety natáhlo 10 µl vzorku, který byl jemně pipetou promíchán s barvivem. Takto obarvený vzorek se nanesl na gel. Stejný proces proběhl u všech vzorků, kontroly a markeru (u markeru byl použit 1 µl barviva). Elektroforetická separace probíhala při 135 V po dobu cca 25 minut. Doba byla individuálně upravena pro co nejlepší viditelnost fragmentů o různých délkách (obrázky VII a VIII).



Obr. VII: Grafické znázornění fragmentů po restrikním štěpení pro *MTHFR A1298C* a *MTHFR C677T*.

MTHFR A1298C: První jamka zobrazuje nemutovaného homozygota (fragmenty o délce 204 a 37 bp) bez přítomnosti variantní alely C, ve druhé se nachází mutovaný heterozygot (fragmenty o délce 241, 204 a 37 bp), který nese variantní alelu C. Třetí jamka zobrazuje neštěpený fragment se dvěma variantními alelami CC (fragment o délce 241 bp). ***MTHFR C677T***: První jamka zobrazuje neštěpený fragment (198 bp) značící nemutovaného homozygota s alelami C/C, druhá jamka tři fragmenty (198, 175 a 23 bp) značící mutovaného homozygota C/T a třetí jamka zobrazuje mutovaného homozygota nesoucího dvě variantní alely T/T (fragmenty o délce 175 a 23 bp).



Obr. VIII: Grafické znázornění fragmentů po restrikním štěpení pro NQO1.

V první jamce se nachází neštěpená alela charakterizující nemutovaného homozygota C/C délkou fragmentu 196 bp. Ve druhé jamce lze vidět genotyp mutovaného heterozygota C/T obsahující jednu variantní alelu T (fragmenty o délce 196, 119 a 77 bp) a ve třetí mutovaného homozygota s dvěma variantními alelami T (fragmenty o délce 119 a 77 bp).

10.1.2 REAL-TIME PCR

Detekce polymorfismů v genech cytochromu P450 probíhala metodou Real-time PCR, jinak známou jako kvantitativní PCR (qPCR) na přístroji Light Cycler 2.0 od firmy Roche. Ta se liší od konvenční PCR tím, že monitoruje množství naamplifikovaného úseku v reálném čase díky oligonukleotidovým sondám, které jsou značeny reportérovým fluorescenčním barvivem.

Po amplifikaci dsDNA se specifickými primery jsou genotypy detekovány pomocí melting-curve analýzy. Pro správnou interpretaci výsledků je nutné mít cykler kalibrovaný jedním během color kompenzace.

10.1.3 COLOR KOMPENZACE

Protože přístroj LightCycler dokáže současně detekovat a analyzovat více než jednu barvu v každé kapiláře, je nutné kvůli překryvu emisních spekter provést před každou analýzou color kompenzaci za pomoci komerčního kitu Color Compensation Kit 530/560 (Roche) doporučeného výrobcem. Provedením této korekce se předejde zachycení signálu z jiného barevného spektra a tím i misinterpretaci získaných dat.

Pro detekci jednotlivých polymorfismů v genu CYP byly použity kity uvedené v tabulce XIII.

Tab. XIII: Použité kity pro detekci jednotlivých polymorfismů

Gen	Detekční kit
<i>CYP2C9*</i>	LightMix® Kit <i>CYP2C9*2</i> and <i>CYP2C9*3</i>
<i>CYP2D6*</i>	LightMix® Kit <i>CYP2D6*3</i> , *4 and *5/*5
<i>CYP2C19*</i>	LightMix® Kit <i>CYP2C19*2</i> and <i>CYP2C19*3</i>
<i>CYP1A2</i>	LightMix® Kit <i>CYP1A2</i>

*certifikovaný kit

Příprava reakcí pro Real-time PCR při detekci **CYP2D6*3**, *4 a *5/*5 probíhala v dekontaminovaném laminárním boxu přesně dle doporučení výrobce. Master mix byl namíchán do 1,5 ml zkumavky a byly k němu použity komponenty uvedené v tabulce XIV. Byl připraven takový objem master mixu, aby byl pokryt počet vzorků, tří PK, jedné NK a jednoho vzorku navíc při možné chybě při pipetování.

Tab. XIV: Master mix pro Real-time PCR při detekci CYP2D6*3, *4 a *5/*5

Komponenta	Objem (μl) pro 1 reakci
PCR voda	9,4
25mM roztok Mg²⁺	1,6
reagent mix (próby a primery)	2,0
Roche Master mix	2,0
Celkem	<u>15</u>

Tento master mix byl rozpipetován do speciálních skleněných očíslovaných kapilár umístěných v nachlazených kovových adaptérech. K 15 μl master mixu bylo přidáno 5 μl templátu/PK/NK. Směs v kapilárách v adaptérech byla krátce stočena. Následně byly kapiláry vyjmuty z adaptérů a vloženy do karuselu LightCycleru. Na přístroji pak byl předem nastaven příslušný PCR profil (tabulka XV).

Tab. XV: Reakční profil pro *CYP2D6*

Krok programu	Denaturace		Amplifikace			Annealing		Chlazení
Parametr								
Mód analýzy	žádný		kvantifikační			křivka tání		žádný
Počet cyklů	1		45			1		1
Cílová teplota [°C]	95	95	60	72	95	40	85	40
Trvání [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Změna teploty [°C/s]	20	20	20	20	20	20	0,2	20
Akviziční mód	žádný	žádný	jednotlivý	žádný	žádný	žádný	kontinuální	žádný

Příprava reakcí pro Real-time PCR při detekci **CYP2C9*2 a *3** probíhala dle doporučení výrobce. (tabulka XVI).

Tab. XVI: Master mix pro Real-time PCR při detekci *CYP2C9*2 a *3*

Komponenta	Objem (µl) pro 1 reakci
PCR voda	9,8
25mM roztok Mg ²⁺	1,2
reagent mix (próby a primery)	2,0
Roche Master mix	2,0
Celkem	<u>15</u>

K master mixu byl stejným způsobem napipetován objem 5 µl vzorku/PK/NK a kapiláry byly přesunuty do LightCycleru, byl použit reakční profil uvedený v tabulce XVII.

Tab. XVII: Podmínky amplifikace u metody Real-time PCR pro *CYP2C9*

Krok programu	Denaturace		Amplifikace			Annealing		Chlazení
Parametr								
Mód analýzy	žádný		kvantifikační			křivka tání		žádný
Počet cyklů	1		45			1		1
Cílová teplota [°C]	95	95	60	72	95	40	85	40
Trvání [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Změna teploty [°C/s]	20	20	20	20	20	20	0,2	20
Akviziční mód	žádný	žádný	jednotlivý	žádný	žádný	žádný	kontinuální	žádný

Příprava reakcí pro Real-time PCR při detekci **CYP2C19*2 a *3** probíhala dle doporučení výrobce.

Tab. XVIII: Master mix pro Real-time PCR při detekci CYP2C19*2 a *3

Komponenta	Objem (µl) pro 1 reakci
PCR voda	9,4
25mM roztok Mg ²⁺	1,6
reagent mix (próby a primery)	2,0
Roche Master mix	2,0
Celkem	<u>15</u>

K master mixu byl stejným způsobem napipetován objem 5 µl vzorku/PK/NK a kapiláry byly přesunuty do LightCycleru, s amplifikačním profilem v tabulce XIX.

Tab. XIX: Podmínky amplifikace u metody Real-time PCR pro CYP2C19

Krok programu	Denaturace		Amplifikace			Annealing		Chlazení
Parametr								
Mód analýzy	žádný		kvantifikační			křivka tání		žádný
Počet cyklů	1		45			1		1
Cílová teplota [°C]	95	95	60	72	95	40	85	40
Trvání [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Změna teploty [°C/s]	20	20	20	20	20	20	0,2	20
Akviziční mód	žádný	žádný	jednotlivý	žádný	žádný	žádný	kontinuální	žádný

Pro detekci variantních alel v genu CYP1A2 byl použit kit firmy TibMol Biol navržený pro detekci přímo rs a uvést číslo. Reagencie použité pro přípravu master mixu jsou uvedené v tabulce XX.

Tab. XX: Master mix pro Real-time PCR při detekci CYP2C19*2 a *3

Komponenta	Objem (µl) pro 1 reakci
PCR voda	9,4
25mM roztok Mg ²⁺	1,6
reagent mix (próby a primery)	2,0
Roche Master mix	2,0
Celkem	<u>15</u>

Tab. XXI: Podmínky amplifikace u metody Real-time PCR pro *CYP1A2*

<i>Krok programu</i>	<i>Denaturace</i>		<i>Amplifikace</i>			<i>Annealing</i>		<i>Chlazení</i>
<i>Parametr</i>								
<i>Mód analýzy</i>	žádný		kvantifikační			křivka tání		žádný
<i>Počet cyklů</i>	1		45			1		1
<i>Cílová teplota [°C]</i>	95	95	60	72	95	40	85	40
<i>Trvání [hh:mm:ss]</i>	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
<i>Změna teploty [°C/s]</i>	20	20	20	20	20	20	0,2	20
<i>Akviziční mód</i>	žádný	žádný	jednotlivý	žádný	žádný	žádný	kontinuální	žádný

Příprava master mixu probíhala dle doporučení výrobce. V rámci kitu nebyly dodány kontroly, takže kromě vzorků byla použita pouze NK.

10.1.4 HYBRIDIZACE NA STRIPECH

Další detekční metodou, která byla použita, je reverzní hybridizace na stripech za použití komerčního kitu PGX-CYP2D6 XL StripAssay®. Funguje na principu assaye sloužící k identifikaci více genových polymorfismů během jednoho experimentu, a je založena na kombinaci polymerázové řetězové reakce (PCR) a reverzní hybridizace. Proces zahrnuje izolaci DNA, PCR amplifikaci za užití biotinylovaných primerů, a hybridizaci amplifikovaných produktů na testovací proužky (stripy), obsahující imobilizované, alelově specifické oligonukleotidové próby. Tyto próby jsou fixovány na stripech v podobě prostorově definovaných paralelních pruhů. Vizualizace hybridizační reakce probíhá díky reakci streptavidin-alkalinových fosfatáz a barevných substrátů. Výhodou této metody je, že lze vzorek otestovat na přítomnost mnoha polymorfismů v rámci jednoho experimentu za použití dvou multiplexových PCR reakcí.

Po izolaci DNA bylo nutné naředit *Taq* polymerázu na koncentraci 0,2 U/μl smícháním 9,6 μl HS *Taq* DNA Polymerase a 0,4 μl *Taq* Dilution Buffer pro jednu reakci. Takto naředěná polymeráza byla použita k přípravě dvou master mixů (A a B). Každému vzorku byly přiděleny dvě řádně označené 0,2 ml mikrozkušavky. Do každé z těchto zkumavek bylo napipetováno 20 μl příslušného master mixu a 5 μl templátu. Templát byl kvůli vysoké koncentraci naředěn v poměru 1:4 PCR vodou. Tyto zkumavky byly dále zvortexovány, stočeny a přesunuty do thermocykleru, kde proběhla za programu definovaného v tabulce XXIII.

Tab. XXII: Použité reagenzie a jejich objemy PCR pro hybridizaci na stripu

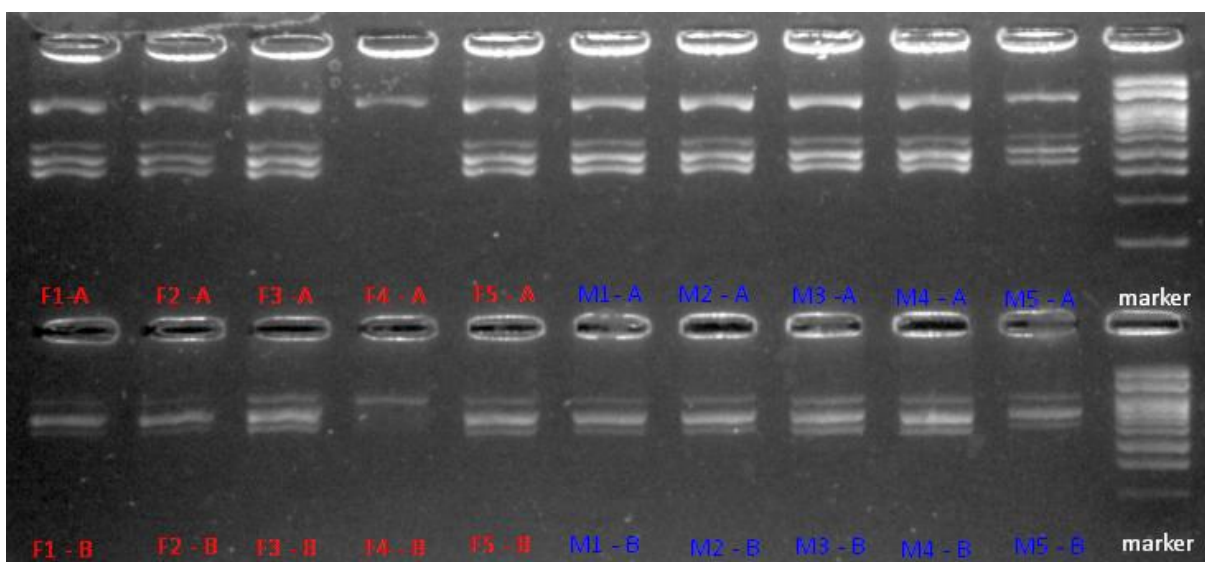
Reagenzie pro mix A (1 rce)	Objem (μl)	Reagenzie pro mix B (1 rce)	Objem (μl)
Amplifikační mix A	15	Amplifikační mix A	15
HS Taq DNA polymeráza	5	HS Taq DNA polymeráza	5
DNA templát	5	DNA templát	5

Tab. XXIII: Amplifikační profil pro reverzní hybridizaci na stripu pro detekci polymorfismů v genu CYP2D6

	Počáteční denaturace	Denaturace	Annealing	Extenze	Terminální extenze
Počet cyklů	1		36		1
Trvání	240 s	25 s	45 s	60 s	180 s
Teplota	95°C	95°C	60°C	72°C	72°C

KONTROLA PCR PRODUKTŮ

Kontrola PCR produktů probíhala vizualizací pomocí gelové elektroforézy podobným způsobem jako u PCR-RFLP. Na 3% barvený gel bylo nanášeno 5 μ l PCR produktu mixu A ve stejném množství i PCR produkty mixu B. Do poslední jamky bylo napipetováno 5 μ l hmotnostního markeru. Produkty byly separovány při 135 V po dobu 20 minut. Po separaci fragmentů DNA byl gel osušen a vyfocen (obr. IX).



Obr. IX: Výsledek amplifikační reakce pro vzorky F1-F5 a M1-M5 a reakčního mixu A a B. Jako marker byl použit 100 bp DNA ladder.

Jak je z výsledku gelové elektroforézy patrné, amplifikace se u vzorku F4 z neznámého důvodu nezdařila, ačkoliv čistota a koncentrace izolátu byla v pořádku. Délky amplifikačních fragmentů pro mix A byly 425+480+565+1129 bp a pro mix B 603+713+912 bp.

Tab. XXIV: Reagencie a jejich objemy použité pro hybridizaci na stripech

Reagencie	Objem (μ l) pro 1 reakci
Hybridizační pufr	1 000 μ l
DNAT	40 μ l
Proplachovací roztok A	3 000 μ l
Konjugační činidlo	1 000 μ l
Proplachovací roztok B	3 000 μ l
Vyvíječ barvy	1 000 μ l

Samotný postup hybridizace odpovídal doporučení výrobce. Design pořadí natištěných sond, dle kterého je možné identifikovat výsledný genotyp, je k nalezení v přílohách (příloha 3).

11 VÝSLEDKY

11.1 ANALÝZA DAT

V rámci experimentální části této diplomové práce byly testovány dva soubory vzorků při účasti na projektech *Pharmacip* a *Quinta Analytica*.

11.1.1 PROJEKT PHARMACHIP

Pod záštitou projektu Pharmacip, který se zabývá vývojem farmakogenomického čipu pro účinnou preskripci léčiv, bylo analyzováno 6 polymorfismů v 5 genech u 10 jedinců. Jednalo se o geny *CYP2D6* (rs12169962), *CYP2C19* (rs4244285), *CYP2C9* (rs1057910), *MTHFR* (rs1801133 a rs1801131) a *NQO1*(rs1800566). K experimentu byly použity izoláty 10 vzorků DNA, jejichž izolace probíhala v laboratoři BIOCEV. Koncentrace DNA izolátů jsou uvedeny v tabulce XXV.

Tab. XXV: Koncentrace jednotlivých izolátů DNA

Vzorek	Koncentrace [ng/ µl]	Vzorek	Koncentrace [ng/ µl]
M1	438,2	F1	225,2
M2	665,6	F2	284,7
M3	717,5	F3	831,4
M4	515,6	F4	337,5
M5	918,0	F5	216,4

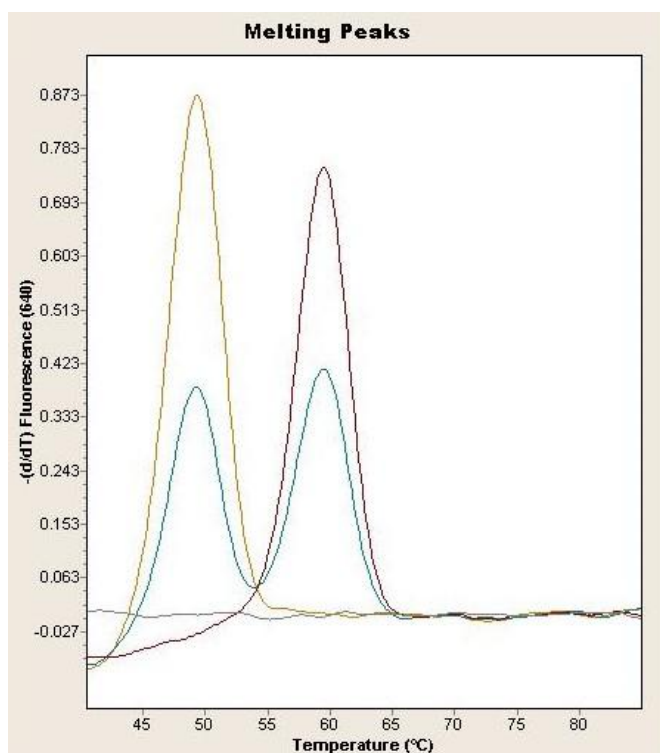
Vzorky M1-M5 jsou muži a vzorky F1-F2 jsou ženy.

VÝSLEDKY REAL-TIME PCR

Tab. XXVI: Výsledky Real-time PCR, analýza genových variant *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* a *CYP1A2*

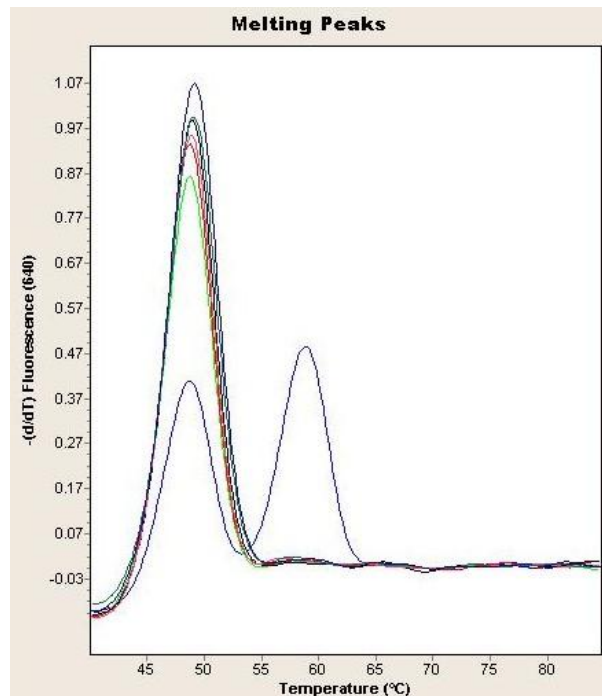
GEN	rs kód	M1	M2	M3	M4	M5	F1	F2	F3	F4	F5
CYP2C9	rs1057910	*1/*3	*1/*1	*1/*1	*2/*2	*1/*1	*3/*3	*1/*1	*2/*3	*1/*1	*1/*1
CYP2C19	rs4244285	*1/*2	*1/*1	*1/*2	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1
CYP2D6	rs12169962	*1/*4	*1/*1	*4/*4	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*1	*1/*4	*5/*5	*1/*1
CYP1A2 C/T	rs4646425	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC

*Alela pro wild type je označena vždy jako *1.*



Obr. X: Příklad grafického znázornění real-time analýzy genu *CYP2C9* (kanál 530, LightCycler 2.0 Instrument, Roche)

*Jedná se o výstupy pro kontrolní vzorky: červeně wild-type genotyp $CYP2C9^{*1/*1}$, modře heterozygotní genotyp $CYP2C9^{*1/*2}$ a fialově mutovaný homozygot $CYP2C9^{*2/*2}$, šedá negativní kontrola; teplotní profily pro jednotlivé alely: Wild-type alela = 53,4°C; mutovaná alela = 60,8°C; heterozygot = 53,4°C a 60,8°C; negativní kontrola*

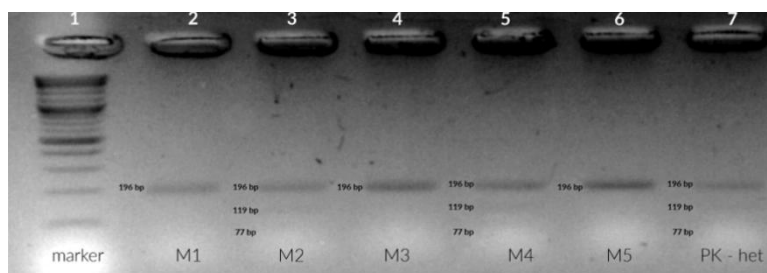


Obr. XI: Grafické znázornění výsledků analýzy *CYP2C9* pro vzorky M1, M2, M3, M4, M5 (kanál 530, LightCycler 2.0 Instrument, Roche)

Výsledky PCR-RFLP

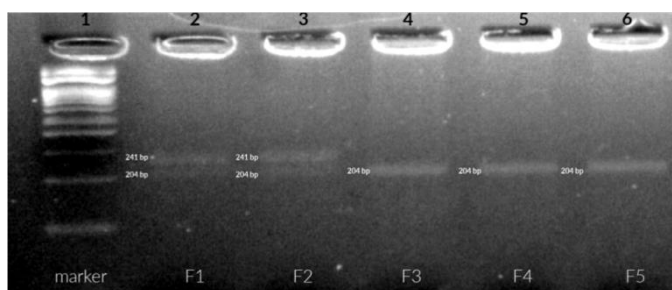
Tab. XXVII: Výsledky získané analýzou PCR-RFLP, detekce variantních alel v genech *NQO1 C609T* a *MTHFR C677T* a *A1298C*

GEN	rs kód	M1	M2	M3	M4	M5	F1	F2	F3	F4	F5
NQO1 C609T	rs1800566	CC	CT	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC
MTHFR677	rs1801133	CT	CC	CC	CC	CT	CT	CC	TT	TT	TT
MTHFR1298	rs1801131	AA	AC	AC	AC	AA	AC	AC	AA	AA	AA



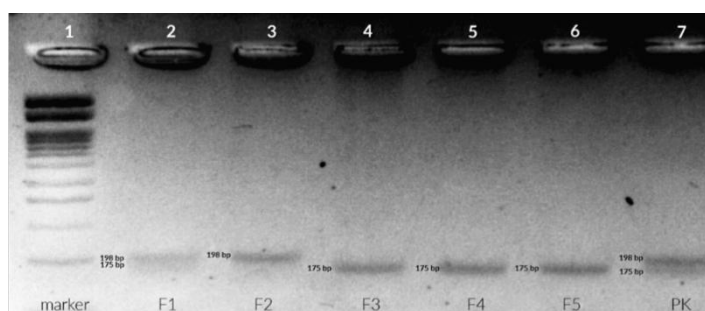
Obr. XII: Výsledné rozdělení restričních fragmentů pro *NQO1*.

1. jamka - hmotnostní marker 100 bp DNA LADDER H3RTU.. Druhá jamka: M1 – wild type CC; třetí jamka: M2 – heterozygot CT; čtvrtá jamka: M3 – wild type CC; pátá jamka: M4 – heterozygot CT; šestá jamka: M5 – wild type CC, šestá jamka: PK – heterozygot CT



Obr. XIII: Výsledné rozdělení restričních fragmentů pro MTHFR A1298C

1. jamka - hmotnostní marker. Druhá jamka: F1 – heterozygot AC; třetí jamka: F2 – heterozygot AC; čtvrtá jamka: F3 – wild type AA; pátá jamka: F4 – wild type AA; šestá jamka: F5 – wild type AA, pozn. krátký fragment o velikosti 37 bp není na gelu viditelný.



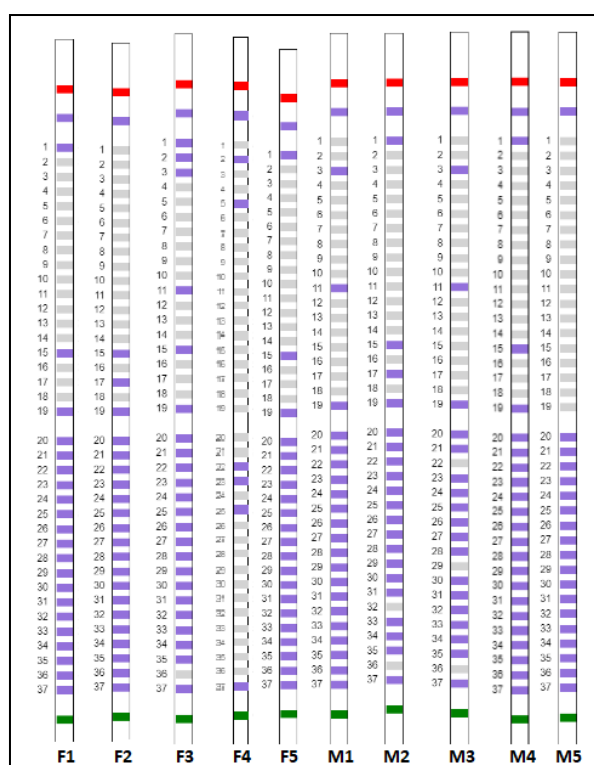
Obr. XIV: Výsledné rozdělení restričních fragmentů pro MTHFR C677T

1. jamka – hmotnostní marker. Druhá jamka: F1 – heterozygot CT; třetí jamka: F2 – wild type CC; čtvrtá jamka: F3 – homozygot TT; pátá jamka: F4 – homozygot TT; šestá jamka:

F5 – homozygot T; sedmá jamka: pozitivní kontrola – heterozygot CT, pozn. krátký fragment o velikosti 23 bp není vzhledem ke své délce viditelný.

REVERZNÍ HYBRIDIZACE NA STRIPU

Dále bylo 10 vzorků otestováno pomocí reverzní hybridizace na stripu. Díky této metodě bylo možné blíže specifikovat polymorfismy v genu *CYP2D6* a porovnat tak metodu Real-time PCR za použití detekčního kitu LightMix® Kit *CYP2D6**3, *4 and *5/*5 s metodou reverzní hybridizace na stripu za použití kitu PGX-CYP2D6 XL StripAssay®. Výsledky hybridizace jsou dokumentovány na obrázku XV. Výsledné genotypy byly vyhodnoceny na základě přesné znalosti pořadí jednotlivých sond na stripu (Příloha 3) a odpovídajících pozitivních nebo negativních hybridizací a vyhodnoceny pomocí online programu StripAssay® Online Calculator [online].



Obr. XV: Výsledky reverzní hybridizace na stripu pro jednotlivé vzorky, jejich interpretace je uvedena v tabulce XXVIII. Pro hybridizaci byl použit kit PGX-CYP2D6 XL StripAssay®.

Tab. XXVIII: Interpretace výsledků reverzní hybridizace pro jednotlivé vzorky.

GEN	M1	M2	M3	M4	M5	F1	F2	F3	F4	F5
CYP2D6	*1/*4A-H,K,L	*2A/*41	*4A-H,K,L/*4A-H,K,L nebo *4A-H,K,L/*5	*1/*2A	*1/*1 nebo *1/*5	*1/*2A	*1/*41	*4A-H,K,L/*35	x	*1/*2A

U výsledků vzorků M1-M5 a F1, F2, F3 a F5 lze pozorovat variabilitu ve výsledném genotypu, kdy metoda reverzní hybridizace na stripu je schopna detekovat i jednotlivé alelické subtypy. Reverzní hybridizace však neproběhla u vzorku F4, jelikož z neznámého důvodu nebyl neamplifikován při elektroforetické kontrole PCR.

SROVNÁNÍ METOD REAL-TIME PCR A REVERZNÍ HYBRIDIZACE NA STRIPU

Díky provedení dvou metod na sadě vzorků M1-M5 a F1-F5 je možné tyto dvě metody porovnat. K oběma metodám byly použity komerčně dostupné kity. Srovnání výsledných genotypů je uvedeno v tabulce XXIX.

Tab. XXIX: Porovnání výsledků u vzorků M1-M5 a F1-F5 za použití dvou různých metod, a to Real-time PCR (LightMix® Kit CYP2D6*3, *4 and *5/*5) a reverzní hybridizace na stripu (PGX-CYP2D6 XL StripAssay®)

Vzorek	LightMix® Kit CYP2D6*3, *4 and *5/*5	PGX-CYP2D6 XL StripAssay®
M1	*1/*4	*1/*4A-H,K,L
M2	*1/*1	*2A/*41
M3	*4/*4	*4A-H,K,L/*4A-H,K,L v *4A-H,K,L/*5
M4	*1/*1	*1/*2A
M5	*1/*1	*1/*1 v *1/*5
F1	*1/*1	*1/*2A
F2	*1/*1	*1/*41
F3	*1/*4	*4A-H,K,L/*35
F4	*5/*5	X
F5	*1/*1	*1/*2A

Z výsledků je patrné, že detekce kitem PGX-CYP2D6 XL StripAssay® je citlivější a je možné detekovat alely včetně jejich subtypů. Oproti tomu kit LightMix® Kit CYP2D6*3, *4 and *5/*5 je specifický pouze pro alely *1, *3, *4 a *5, což znamená, že při výskytu jiných než těchto předdefinovaných alel, je výsledný genotyp definován jako *1/*1. Této skutečnosti se budu věnovat dále v diskuzi.

11.1.2 QUINTA ANALYTICA

Druhý testovaný soubor se skládal z 56 jedinců. Izolace vzorků periferní krve proběhla v laboratoři GENLABS za použití komerčního kitu LightMix® Kit CYP2D6*3, *4 and *5/*5. Izoláty byly dále analyzovány pomocí metody Real-time PCR. Výsledné detekované genotypy jsou uvedené v tabulce XXX a podrobnější rozpis genotypů a jim odpovídajícím fenotypům je možné nalézt v příloze (Příloha 2).

Tab. XXX: Výsledky real-time PCR, analýza genu CYP2D6 pomocí kitu LightMix® Kit CYP2D6*3, *4 and *5/*5 určeného pro detekci alel *1, *3, *4 a *5.

Genotyp	Počet jedinců	%
*1/*1 nebo *1/*5	39	69,7
*1/*4	15	26,8
*4/*4 nebo *4/*5	2	3,5

11.1.3 POPULAČNÍ STUDIE

FREKVENČNÍ ZASTOUPENÍ ALEL *1, *3, *4 A *5 U CYP2D6

Díky vzorkům od dobrovolníků testovaných kitem LightMix® Kit CYP2D6*3, *4 and *5/*5 v laboratoři GENLABS s.r.o. (n=28) a výsledkům z projektu Quinta Analytica testovaných pomocí stejného kitu (n=56), bylo možné stanovit frekvenční zastoupení alel *1, *3, *4 a *5 u těchto vzorků a porovnat s frekvencemi z jiných dostupných studií.

Tab. XXXI: Procentuální zastoupení jednotlivých genotypů v souboru vzorků testovaných kitem LightMix® Kit CYP2D6*3, *4 and *5/*5 v laboratoři GENLABS.

Genotyp	% (n=84)
*1/*1	69,05
*1/*4	26,19
*3/*4	1,19
*4/*4 v *4/*5	3,57

Z tabulky XXXI bylo pak možné definovat zastoupení jednotlivých alel a porovnat je s daty z jiných populačních studií a meta-analýz (tabulka XXXII).

Tab. XXXII: Frekvence alel u souboru vzorků laboratoře GENLABS v porovnání s frekvencemi ze studií české a evropské populace.

alela CYP2D6	% GENLABS s.r.o. (n=84)	% česká populace (n=265) (Gaedigk et al., 2017)	% evropská populace (n=?) (Zhou et al., 2017)
*1 v *2	85,0	?	67,4
*3	1,0	1,6	4,1
*4	29,0	21,6	15,5
*5	0	3,1	3

*Z tabulky je zjevné, že alelické frekvence z jednotlivých studií jsou podobné, ačkoliv Gaedigk (2017) neuvádí zasoupení aktivních alel *1 a *2. Porovnání těchto studií se budu dále věnovat v diskuzi.*

12 DISKUZE

Reakce na léčivo se u jednotlivců liší v důsledku faktorů prostředí a genetických faktorů. Genetické faktory mohou ovlivnit jak farmakokinetiku, tak i farmakodynamiku léčiva, což může vést ke změnám ve funkci cílového léčiva a ke změně odpovědi na léčivo.

V praktické části této diplomové práce jsem se zabývala testováním deseti vzorků od dobrovolníků, pomocí metody Real-time PCR pro detekci polymorfismů v genech cytochromu P450, a to konkrétně *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* a *CYP1A2*. Využívala jsem komerčních kitů designovaných na detekci nejčastějších variantních alel a bylo zajímavé pozorovat, že i v takto malé kohortě (10 jedinců, 5 žen a 5 mužů), je vidět poměrně výrazná genová variabilita.

V případě genu *CYP2D6* (rs12169962) byl ve studované kohortě nejvíce zastoupen genotyp *1/*1, který značí nemutovaného homozygota, fenotypově odpovídající extenzivnímu metabolizátorovi. Dále byl u dvou vzorků detekován genotyp *1/*4, jenž vypovídá o mírně snížené enzymatické aktivitě (intermediární metabolizátor), jelikož *4 alela se prokazuje defektem ve splicingu (Zanger & Schwab, 2013). U dvou jedinců byl detekován genotyp *4/*4 a *5/*5, který kvůli defektním alelám definuje jedince jako pomalé metabolizátory pro substráty *CYP2D6*.

Stejný soubor vzorků jsem otestovala jinou, komplexnější metodou detekující polymorfismy v *CYP2D6*, a to reverzní hybridizací na stripu. Při porovnání výsledků obou metod vyšlo najevo, že u některých vzorků výsledky nekorelují. U metody Real-time PCR, při které byl použit komerční kit designovaný pouze na detekci alel *1, *3, *4 a *5, se ukázalo, že jedinec s jinými než testovanými alelami, je automaticky definován jako genotyp *1/*1. To by mohlo vést k misinterpretaci výsledného genotypu a následného určení fenotypu metabolizátora, avšak v našem případě to na konečné výsledky ve fenotypu nemělo vliv. Například genotyp *1/*2 byl určen jako *1/*1, ale oba tyto genotypy značí extenzivního metabolizátora.

Analýza genu *CYP2C9* (rs1057910) odhalila 6 jedinců s fenotypem extenzivního metabolizátora (*1/*1), 1 jedince s intermediárním metabolismem (*1/*3) a 3 jedinci byli označeni jako pomalí metabolizátoři (*2/*3 a *3/*3). Výsledky se opět jeví jako zajímavé z hlediska genetické variability. V tomto případě 4 z 10 jedinců jsou například dle studie Bourgeois (2016) spojeny se zvýšeným rizikem nadměrné antikoagulace při léčbě warfarinem nebo dle García-Martín (2004) mají sníženou clearance ibuprofenu až o 75 %.

Výsledky detekce variantních alel u *CYP2C19* (rs4244285) nevykazují významnou variabilitu, jelikož 8 jedinců bylo EM a tedy bez mutace (genotyp *CYP2C19* *1/*1) a pouze dva jedinci z kohorty vykazovali genotyp *1/*2 a tedy charakter intermediárního metabolizátora. Alela *2, je typická svou sníženou enzymatickou aktivitou. Psychiatričtí pacienti s genotypem *CYP2C19* *1/*2, mají zvýšenou plasmatickou koncentraci escitalopramu ve srovnání s jedinci *CYP2C19* *1/*1 (Rudberg et al., 2008). Při detekci genu *CYP1A2* (rs4646425) se nám ve sledované kohortě nepodařilo zachytit žádnou variantní alelu.

Dalším testovaným souborem (n=56), ve kterém byl sledován výskyt variantních alel *CYP2D6* (rs12169962) byl soubor vzorků z projektu Quinta Analytica. Tito dobrovolníci byli opět otestováni na přítomnost alel *1, *3, *4 a *5 stejně jako předešlý soubor 10 vzorků. Výstupy této analýzy jsem poté sloučila s dalšími výsledky získanými stejnou metodou (real-time PCR) v laboratoři GENLABS s.r.o. Celkem bylo analyzováno 84 vzorků. Usoudila jsem, že je to dostatečně velký vzorek pro porovnání frekvence variantních alel s jinými studii. Při srovnání % zastoupení jednotlivých alel v české (Gaedigk et al., 2017) a evropské (Zhou et al., 2017) populaci se naše kohorta jeví jako podobná. Porovnání těchto alel však není ideální, a to vzhledem k faktu, že použitý kit je schopen detekovat pouze 4 alely, ačkoliv u *CYP2D6* bylo detekováno již přes 100 variantních alel.

Využití farmakogenetiky v praxi je možné pozorovat u zajímavého případu paní H.R., jejíž kazuistiku jsem podrobně zpracovala v příloze (Příloha 1). Paní H.R. řešila zejména extrémní vedlejší účinky léčiv, která užívala a také upozornila na fakt, že jí stačí pouze zlomek dávky pro dosažení dostatečného léčebného účinku. Z tohoto důvodu ošetřující lékař navrhl provedení genetických testů genů souvisejících s metabolismem uvedených léků. Takto se dostal genetický materiál pacientky H.R. do laboratoře GENLABS s.r.o., kde byl následně otestován na geny. Výsledky ukázaly, že metabolismus 4 z 10 užívaných léků je velmi pravděpodobně ovlivněn geneticky.

Vedle testování jednotlivých farmakogenů a jejich polymorfismů, existuje možnost celogenomového nebo alespoň komplexnějšího testování více genů/genových polymorfismů v rámci jednoho experimentu. Využívání lidských genomických dat se rychle rozšiřuje a existuje mnoho metod, které jsou běžně využívány nejen ve výzkumu, ale i v klinické praxi. Vhodnou detekční metodou jen například metoda microarray (DNA čipy).. Dříve komerčně dostupný AmpliChip CYP450 test, vyráběný firmou Roche, se

zaměřil na analýzu polymorfismů v genech cytochromu P450. Další metodou vhodnou pro celogenomové studie je metoda Next-Generation Sequencing (NGS). Tato metoda umožňuje citlivou a přesnou analýzu tisíců SNP během několika hodin. Při porovnání NGS a microarray je klíčovým rozdílem schopnost objevování. Zatímco obě nabízejí vysoce citlivou a spolehlivou detekci variant, microarray dokáže detekovat pouze známé sekvence.

Plošné genomové sekvenování v zájmu individualizované farmakoterapie má nesporně mnoho výhod, ale i nevýhod. Mezi výhody patří rozhodně rychlý, a hlavně celoživotně uplatnitelný přístup k datům získaných těmito metodami, což může být dle poměrně obsáhlé studie Winaera a kolektivu (2015) výhodné nejen pro zdraví pacientů, ale i z ekonomického hlediska. Jeho studie totiž prokázala, že u psychiatrických pacientů, kteří dostávali léčivo na základě farmakogenomických dat, bylo ušetřeno více než 1 000 \$ na nákladech za léky ročně a zároveň se zlepšila míra dodržování užívání léků. Další výhodou je také snížení počtu hospitalizovaných pacientů. Studie Brixnera a kolektivu (2016) tvrdí, že kohorta testovaných pacientů nad 65 let na výskyt polymorfismů ve farmakogenech měla nižší počet hospitalizovaných případů (9,8 %), ve srovnání s netestovanou skupinou pacientů, ve které bylo hospitalizováno z důvodu nevhodné farmakoterapie 16,1 % případů. Tato data úzce korelují se studií Kucha a kolektivu (2016) prokazující fakt, že 39,1 % pacientů nad 65 let alespoň jednou užije lék metabolizovaný CYP2D6, CYP2C19 a/nebo CYP2C9.

Mezi nevýhody celogenomového vyšetření patří implementační bariéry a etické hledisko celé problematiky, kdy není jasné, jak by bylo s tak citlivými daty, jako je analýza lidského genomu každého jedince, naloženo. Obsah databází by musel být pečlivě ošetřen příslušnou legislativou a musel by mít jasnou kvalitu a validitu a je tedy extrémně důležité, aby s těmito metodami bylo zacházeno velice opatrně. Co se týče implementačních bariér, je nutné zvážit množství dat, jejichž interpretaci by musela předejít rozsáhlá analýza dostupných poznatků o roli každého farmakogenu zvlášť a následně také v různých kombinovaných genotypch. Zpočátku také odhaduji, že by se jednalo o velice nákladné opatření, ale zároveň si myslím, že při plošném testování by náklady na celogenomovou sekvenaci výrazně klesly.

Ráda bych také zmínila, že téma farmakogenetiky je velice obsáhlým tématem a je možné dohledat tisíce článků, které dokazují jeho významnost. Dostatek vědecky i prakticky ověřitelných informací je velice důležitou podmínkou pro zájem o dané téma a jeho využití v klinické praxi. V případě farmakogenetiky je často obtížné se zorientovat v množství

publikovaných informací. Mnohé studie např. neuvádějí klinickou významnost svých výstupů. Pro tyto účely jsem shledala jako velice užitečné veřejně dostupné databáze typu PharmGKB, ClinVar a SNPEDIA, které nejen že shrnují zásadní informace o klinicky významných variantách, ale také lze pomocí filtru ověřit významnost získaných dat, což bývá v jednotlivých publikacích velmi zdlouhavé a matoucí. Tyto databáze jsou navíc pravidelně aktualizovány a procházejí validací.

Při vypracování rešerše na toto téma jsem si také všimla několika zajímavostí. Jednou z nich je, že není napříč studii stanoven pevný indikátor vedoucí k jednotnému určení fenotypů diferencujících úrovně enzymatické aktivity. Tyto fenotypy jsou obecně nazývány jako metabolizátoři. Některé studie (např. Sachse et al., 1997) definují pouze extenzivní, intermediární a pomalé metabolizátory. Naopak jiné studie definují ještě ultrarychlé metabolizátory (de Leon, 2007). Bohužel se mi nepodařilo dohledat žádné vysvětlení, dostatečně objasňující tuto problematiku. Dále jsem přišla na fakt, že neexistuje databáze ani žádný jiný ucelený soubor léčiv a fenotypů, který by přesněji určoval časové rozdíly v biotransformaci u jednotlivých typů metabolizátorů.

Hlavní výzvou, jíž čelí vědci pracující v oblasti personalizované medicíny, je její aplikace do klinické praxe. V následujících několika desetiletích lze očekávat podstatné zlepšení díky prudkému vývoji technologií, jejich dostupnosti pro klinickou praxi a snížení nákladů na genetické testování. To vše jistě umožní efektivní screening farmakogenů, které významně ovlivňují metabolismus léčiv.

13 ZÁVĚR

V diplomové práci jsem se zabývala asociací genetických polymorfismů s metabolismem hojně užívaných léčiv. Farmakogeneticky založené téma jsem si vybrala z důvodu jeho aktuálnosti a faktu, že poměrně významné procento farmakoterapie, ať už při užívání léků na předpis, tak i volně prodejných léčiv, je neúspěšné a často končí hospitalizací pacientů. Dále je také zřejmé, že nastavený způsob dávkování léčiv není ideální vzhledem k parametrům, které zahrnují pouze věk či hmotnost pacienta. V běžné praxi není zohledněna genetická vybavenost pacientů, což může mít v některých případech fatální následky, např. z důvodu rozdílných plazmatických hladin účinných látek, které se u jednotlivých genotypů mohou lišit až o dva řády.

Cíle, které jsem si stanovila na začátku, jsem úspěšně splnila. Vypracovala jsem rešerši na dané téma, ve které jsem zmínila všechny důležité faktory ovlivňující metabolismus léčiv. V experimentální části jsem otestovala několik souborů vzorků různými metodami molekulární biologie. V diskuzi jsem jednotlivé přístupy porovnávala, ať už z hlediska finančního či hlediska jejich možného efektivního uvedení do klinické praxe. Nad rámec cílů jsem zpracovala data o spotřebě léčiv v ČR za rok 2019 a selektovala léčiva, jejichž užívání je ovlivněno farmakogeneticky.

Úplným závěrem bych chtěla podotknout, že celé téma propojující genetiku s farmakologií je velice zajímavé a teoreticky hodně obsáhlé, avšak v inroutinové klinické praxi nezavedené. Pevně věřím, že praktikování individuální farmakoterapie v České republice je jen otázkou času.

14 INTERNETOVÉ ZDROJE

1. *CYP1A2 gene*. In: <https://www.pharmvar.org/> [online]. [cit. 26.11.2019]. Dostupné z: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP1A2>.
2. *CYP2D6 gene*. In: <https://www.pharmvar.org/> [online]. [cit. 14.2.2020]. Dostupné z: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>.
3. *CYP2C9 gene*. In: <https://www.pharmvar.org/> [online]. [cit. 11.12.2019]. Dostupné z: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C9>
4. *Distribuce léčiv v ČR v roce 2019*. In: <http://www.sukl.cz/> [online]. [cit. 12.3.2020]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/dodavky-leciv-se-zamerenim-na-lecive-pripravky>
5. *StripAssay[®] Online Calculator*. In: <https://viennialab.sci-design.com/onlinecalculator/> [online]. [použito 25.4.2020]. Dostupné z: https://viennialab.sci-design.com/onlinecalculator/evaluate.php?assay=4-770_20190123

15 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

1. Agundez, J. A. (2008). Polymorphisms of human N-acetyltransferases and cancer risk. *Current drug metabolism*, 9(6), 520-531.
2. Aitken, A. E., & Morgan, E. T. (2007). Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, 35(9), 1687-1693.
3. Aitken, A. E., Richardson, T. A., & Morgan, E. T. (2006). Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 46, 123-149.
4. Akhavan, B. J., & Vijhani, P. (2019). Amoxicillin. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
5. Alwi, Z. B. (2005). The use of SNPs in pharmacogenomics studies. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 12(2), 4.
6. Anderson, T. J., Grégoire, J., Pearson, G. J., Barry, A. R., Couture, P., Dawes, M., ... & Hegele, R. A. (2016). 2016 Canadian Cardiovascular Society guidelines for the management of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult. *Canadian Journal of Cardiology*, 32(11), 1263-1282.
7. Ando, T., Ishikawa, T., Kokura, S., Naito, Y., Yoshida, N., & Yoshikawa, T. (2008). Endoscopic analysis of gastric ulcer after one week's treatment with omeprazole and rabeprazole in relation to CYP2C19 genotype. *Digestive diseases and sciences*, 53(4), 933-937.
8. Arslan, S., Silig, Y., & Pinarbasi, H. (2009). An investigation of the relationship between SULT1A1 Arg213His polymorphism and lung cancer susceptibility in a Turkish population. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 27(4), 211-215.

9. Aubert, J., Begriche, K., Knockaert, L., Robin, M. A., & Fromenty, B. (2011). Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 35(10), 630-637.
10. Bae, J. W., Choi, C. I., Lee, H. I., Lee, Y. J., Jang, C. G., & Lee, S. Y. (2012). Effects of CYP2C9* 1/* 3 and* 1/* 13 on the pharmacokinetics of losartan and its active metabolite E-3174. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 50(9), 683-689.
11. Bahar, M. A., Kamp, J., Borgsteede, S. D., Hak, E., & Wilffert, B. (2018). The impact of CYP2D6 mediated drug–drug interaction: a systematic review on a combination of metoprolol and paroxetine/fluoxetine. *British journal of clinical pharmacology*, 84(12), 2704-2715.
12. Bardakci, F., Arslan, S. E. R. D. A. L., Bardakci, S., Binatli, A. O., & Budak, M. A. H. İ. R. (2008). Sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) polymorphism and susceptibility to primary brain tumors. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 134(1), 109-114.
13. Barreiro, L. B., Laval, G., Quach, H., Patin, E., & Quintana-Murci, L. (2008). Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nature genetics*, 40(3), 340.
14. Beierle, I., Meibohm, B., & Derendorf, H. (1999). Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 37(11), 529-547.
15. Benedetti, M. S., Whomsley, R., Poggesi, I., Cawello, W., Mathy, F. X., Delporte, M. L., ... & Watelet, J. B. (2009). Drug metabolism and pharmacokinetics. *Drug metabolism reviews*, 41(3), 344-390.
16. Bertilsson, L. (1995). Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. *Clinical pharmacokinetics*, 29(3), 192-209.
17. Bian, J.-T., Zhao, H.-L., Zhang, Z.-X., BI, X.-H., Zhang, J.-W., 2008. Association of NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1 Polymorphism and

Alzheimer's Disease in Chinese. *Journal of Molecular Neuroscience*. 34(3), 235-240, doi: 10.1007/s12031-008-9036-z.

18. Black, J. L., Walker, D. L., O'Kane, D. J., & Harmandayan, M. (2012). Frequency of undetected CYP2D6 hybrid genes in clinical samples: impact on phenotype prediction. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(1), 111-119.
19. Bliden, K. P., DiChiara, J., Lawal, L., Singla, A., Antonino, M. J., Baker, B. A., ... & Gurbel, P. A. (2008). The association of cigarette smoking with enhanced platelet inhibition by clopidogrel. *Journal of the American College of Cardiology*, 52(7), 531-533.
20. Boerma, J. S., Vermeulen, N. P., & Commandeur, J. N. (2014). One-electron oxidation of diclofenac by human cytochrome P450s as a potential bioactivation mechanism for formation of 2'-(glutathion-S-yl)-deschloro-diclofenac. *Chemico-biological interactions*, 207, 32-40.
21. Bolleddula, J., DeMent, K., Driscoll, J. P., Worboys, P., Brassil, P. J., & Bourdet, D. L. (2014). Biotransformation and bioactivation reactions of alicyclic amines in drug molecules. *Drug metabolism reviews*, 46(3), 379-419.
22. Bolt, H. M., Roos, P. H., & Thier, R. (2003). The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine. *International archives of occupational and environmental health*, 76(3), 174-185.
23. Bourgeois, S., Jorgensen, A., Zhang, E. J., Hanson, A., Gillman, M. S., Bumpstead, S., ... & Deloukas, P. (2016). A multi-factorial analysis of response to warfarin in a UK prospective cohort. *Genome medicine*, 8(1), 2.
24. Brandt, J. T., Close, S. L., Iturria, S. J., Payne, C. D., Farid, N. A., Ernest, C. S., ... & Winters, K. J. (2007). Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(12), 2429-2436.
25. Brixner, D., Biltaji, E., Bress, A., Unni, S., Ye, X., Mamiya, T., ... & Biskupiak, J. (2016). The effect of pharmacogenetic profiling with a clinical decision

- support tool on healthcare resource utilization and estimated costs in the elderly exposed to polypharmacy. *Journal of medical economics*, 19(3), 213-228.
26. Bu, H. Z. (2006). A literature review of enzyme kinetic parameters for CYP3A4-mediated metabolic reactions of 113 drugs in human liver microsomes: structure-kinetics relationship assessment. *Current drug metabolism*, 7(3), 231-249.
27. Caira, M. R., & Ionescu, C. (Eds.). (2006). *Drug metabolism: current concepts* (Vol. 7). Springer Science & Business Media.
28. Carlquist, J. F., Horne, B. D., Muhlestein, J. B., Lappé, D. L., Whiting, B. M., Kolek, M. J., ... & Anderson, J. L. (2006). Genotypes of the cytochrome p450 isoform, CYP2C9, and the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 conjointly determine stable warfarin dose: a prospective study. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 22(3), 191-197.
29. Caro, A. A., & Cederbaum, A. I. (2004). Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44, 27-42.
30. Cashman, J. R., Perotti, B. Y., Berkman, C. E., & Lin, J. (1996). Pharmacokinetics and molecular detoxication. *Environmental health perspectives*, 104(suppl 1), 23-40.
31. Cederbaum, A. I. (2006). CYP2E1--biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury. *Liver Diseases (2 Vols.): Biochemical Mechanisms and New Therapeutic Insights*, 27.
32. Clayton, T. A., Baker, D., Lindon, J. C., Everett, J. R., & Nicholson, J. K. (2009). Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), 14728-14733.
33. Cotreau, M. M., von Moltke, L. L., & Greenblatt, D. J. (2005). The influence of age and sex on the clearance of cytochrome P450 3A substrates. *Clinical pharmacokinetics*, 44(1), 33-60.

34. Court, M. H., & Greenblatt, D. J. (1997). Biochemical basis for deficient paracetamol glucuronidation in cats: an interspecies comparison of enzyme constraint in liver microsomes. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 49(4), 446-449.
35. Daly, A. K. (2006). Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clinical pharmacokinetics*, 45(1), 13-31.
36. de Leon, J. (2007). The crucial role of the therapeutic window in understanding the clinical relevance of the poor versus the ultrarapid metabolizer phenotypes in subjects taking drugs metabolized by CYP2D6 or CYP2C19. *Journal of clinical psychopharmacology*, 27(3), 241-245.
37. Dean, L. (2017). Codeine therapy and CYP2D6 genotype. In Medical Genetics Summaries [Internet]. National Center for Biotechnology Information (US).
38. DeGorter, M. K., Tirona, R. G., Schwarz, U. I., Choi, Y. H., Dresser, G. K., Suskin, N., ... & Wilke, R. A. (2013). Clinical and pharmacogenetic predictors of circulating atorvastatin and rosuvastatin concentrations in routine clinical care. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 6(4), 400-408.
39. Dhir, R. N., & Shapiro, B. H. (2003). Interpulse growth hormone secretion in the episodic plasma profile causes the sex reversal of cytochrome P450s in senescent male rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 15224-15228.
40. Ding, X., & Kaminsky, L. S. (2003). Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 43(1), 149-17
41. Djordjevic, N., Milovanovic, D. D., Radovanovic, M., Radosavljevic, I., Obradovic, S., Jakovljevic, M., ... & Jankovic, S. (2016). CYP1A2 genotype affects carbamazepine pharmacokinetics in children with epilepsy. *European journal of clinical pharmacology*, 72(4), 439-445.

42. Dzeshka, M. S., & Lip, G. Y. (2015). Non-vitamin K oral anticoagulants in atrial fibrillation: Where are we now?. *Trends in cardiovascular medicine*, 25(4), 315-336.
43. Eap, C. B., Bender, S., Sirot, E. J., Cucchia, G., Jonzier-Perey, M., Baumann, P., ... & Broly, F. (2004). Nonresponse to clozapine and ultrarapid CYP1A2 activity: clinical data and analysis of CYP1A2 gene. *Journal of clinical psychopharmacology*, 24(2), 214-219.
44. Edginton, A. N., & Willmann, S. (2008). Physiology-based simulations of a pathological condition. *Clinical pharmacokinetics*, 47(11), 743-752.
45. Ehmer, U., Lankisch, T. O., Erichsen, T. J., Kalthoff, S., Freiberg, N., Wehmeier, M., ... & Strassburg, C. P. (2008). Rapid allelic discrimination by TaqMan PCR for the detection of the Gilbert's syndrome marker UGT1A1*28. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 10(6), 549-552.
46. Elbekai, R. H., Korashy, H. M., & El-Kadi, A. O. (2004). The effect of liver cirrhosis on the regulation and expression of drug metabolizing enzymes. *Current drug metabolism*, 5(2), 157-167.
47. Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., Matthews, R. G., ... Rozen, R. (1995): A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, *National Genetics*, 10(1), 111–113.
48. Fuhr, U., Jetter, A., & Kirchheiner, J. (2007). Appropriate phenotyping procedures for drug metabolizing enzymes and transporters in humans and their simultaneous use in the “cocktail” approach. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 81(2), 270-283.
49. Fujikura K, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. (2015) Genetic variation in the human cytochrome P450 supergene family. *Pharmacogenetics and genomics*. , 25(12):584-94.
50. Furuta, T., Ohashi, K., Kamata, T., Takashima, M., Kosuge, K., Kawasaki, T., ... & Kaneko, E. (1998). Effect of genetic differences in omeprazole

metabolism on cure rates for *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer. *Annals of internal medicine*, 129(12), 1027-1030.

51. Gaedigk, A., Sangkuhl, K., Whirl-Carrillo, M., Klein, T., & Leeder, J. S. (2017). Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genetics in Medicine*, 19(1), 69-76.
52. Gage, B. F., & Lesko, L. J. (2008). Pharmacogenetics of warfarin: regulatory, scientific, and clinical issues. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 25(1), 45-51.
53. Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R. G., Windmill, K. F., Martin, J. L., & McManus, M. E. (2006). Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicological sciences*, 90(1), 5-22.
54. Gandhi, M., Aweeka, F., Greenblatt, R. M., & Blaschke, T. F. (2004). Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44, 499-523.
55. Garcia, Andrea A.; Reitsma, Pieter H. VKORC1 and the vitamin K cycle. *Vitamins & Hormones*, 2008, 78: 23-33.
56. García-Martín, E., Martínez, C., Tabarés, B., Frías, J., & Agúndez, J. A. (2004). Interindividual variability in ibuprofen pharmacokinetics is related to interaction of cytochrome P450 2C8 and 2C9 amino acid polymorphisms. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 76(2), 119-127.
57. Glatt, H. (2000). Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chemico-biological interactions*, 129(1-2), 141-170.
58. Glatt, H., & Meinl, W. (2004). Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs). *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 369(1), 55-68.
59. Gonzalez, F. J. (2007). cyp2e1. *Drug metabolism and disposition*, 35(1), 1-8.
60. Granfors, M. T., Backman, J. T., Laitila, J., & Neuvonen, P. J. (2004). Tizanidine is mainly metabolized by cytochrome p450 1A2 in vitro. *British journal of clinical pharmacology*, 57(3), 349-353.

61. Gremmel, T., Steiner, S., Seidinger, D., Koppensteiner, R., Panzer, S., & Kopp, C. W. (2009). Smoking promotes clopidogrel-mediated platelet inhibition in patients receiving dual antiplatelet therapy. *Thrombosis research*, *124*(5), 588-591.
62. Grundy, S. M., & Stone, N. J. (2019). 2018 American Heart Association/American College of Cardiology/Multisociety Guideline on the Management of Blood Cholesterol—Secondary Prevention. *JAMA cardiology*, *4*(6), 589-591.
63. Guengerich, F. P., & Cheng, Q. (2011). Orphans in the human cytochrome P450 superfamily: approaches to discovering functions and relevance in pharmacology. *Pharmacological reviews*, *63*(3), 684-699.
64. Gunes, A., & Dahl, M. L. (2008). Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms.
65. Hanioka, N., Tsuneto, Y., Saito, Y., Maekawa, K., Sawada, J. I., & Narimatsu, S. (2008). Influence of CYP2C19* 18 and CYP2C19* 19 Alleles on Omeprazole 5-Hydroxylation: In vitro Functional Analysis of Recombinant Enzymes Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, *102*(4), 388-393.
66. Hayes, J. D., & Strange, R. C. (2000). Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, *61*(3), 154-166.
67. Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, *45*, 51-88.
68. Hein, D. W., McQueen, C. A., Grant, D. M., Goodfellow, G. H., Kadlubar, F. F., & Weber, W. W. (2000). Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases: A symposium in honor of Wendell W. Weber. *Drug metabolism and disposition*, *28*(12), 1425-1432.
69. Hendrychová, T., Anzenbacherová, E., Hudeček, J., Skopalík, J., Lange, R., Hildebrandt, P., ... & Anzenbacher, P. (2011). Flexibility of human cytochrome

P450 enzymes: molecular dynamics and spectroscopy reveal important function-related variations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1814(1), 58-68.

70. Hermans, J. J. R., & Thijssen, H. H. W. (1993). Human liver microsomal metabolism of the enantiomers of warfarin and acenocoumarol: P450 isozyme diversity determines the differences in their pharmacokinetics. *British journal of pharmacology*, 110(1), 482-490.
71. Hoffman, S. M., Nelson, D. R., & Keeney, D. S. (2001). Organization, structure and evolution of the CYP2 gene cluster on human chromosome 19. *Pharmacogenetics and Genomics*, 11(8), 687-698.
72. Huang, S. K., Chiu, A. W. H., Pu, Y. S., Huang, Y. K., Chung, C. J., Tsai, H. J., ... & Hsueh, Y. M. (2009). Arsenic methylation capability, myeloperoxidase and sulfotransferase genetic polymorphisms, and the stage and grade of urothelial carcinoma. *Urologia internationalis*, 82(2), 227-234.
73. Hulot, J. S., Bura, A., Villard, E., Azizi, M., Remones, V., Goyenvalle, C., ... & Gaussem, P. (2006). Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood*, 108(7), 2244-2247.
74. Hung, S. I., Chung, W. H., Liou, L. B., Chu, C. C., Lin, M., Huang, H. P., ... & Chen, M. J. (2005). HLA-B* 5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(11), 4134-4139.
75. Chasman, D. I., Giulianini, F., MacFadyen, J., Barratt, B. J., Nyberg, F., & Ridker, P. M. (2012). Genetic determinants of statin-induced low-density lipoprotein cholesterol reduction: the Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) trial. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 5(2), 257-264.
76. Chen, Y. F., Jobanputra, P., Barton, P., Bryan, S., Fry-Smith, A., Harris, G., & Taylor, R. S. (2008). Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (etodolac, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib,

valdecoxib and lumiracoxib) for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a systematic review and economic evaluation. In *NIHR Health Technology Assessment programme: Executive Summaries*. NIHR Journals Library.

77. Ibeanu, G. C., Blaisdell, J., Ferguson, R. J., Ghanayem, B. I., Brøsen, K., Benhamou, S., ... & Goldstein, J. A. (1999). A Novel Transversion in the Intron 5 Donor Splice Junction of CYP2C19 and a Sequence Polymorphism in Exon 3 Contribute to the Poor Metabolizer Phenotype for the Anticonvulsant Drug S-Mephenytoin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290(2), 635-640.
78. Inomata, S., Nagashima, A., Itagaki, F., Homma, M., Nishimura, M., Osaka, Y., ... & Naito, S. (2005). CYP2C19 genotype affects diazepam pharmacokinetics and emergence from general anesthesia. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 78(6), 647-655.
79. Isvoran, A., Louet, M., Vladoiu, D. L., Craciun, D., Lorient, M. A., Villoutreix, B. O., & Miteva, M. A. (2017). Pharmacogenomics of the cytochrome P450 2C family: impacts of amino acid variations on drug metabolism. *Drug Discovery Today*, 22(2), 366-376.
80. Jiang, Z. P., Shu, Y., Chen, X. P., Huang, S. L., Zhu, R. H., Wang, W., ... & Zhou, H. H. (2002). The role of CYP2C19 in amitriptyline N-demethylation in Chinese subjects. *European journal of clinical pharmacology*, 58(2), 109-113.
81. Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism and toxicology— with emphasis on cytochrome p450. *Toxicological sciences*. 2011 Mar 1;120(1):1-3.
82. Jonas, D. E., & McLeod, H. L. (2009). Genetic and clinical factors relating to warfarin dosing. *Trends in pharmacological sciences*, 30(7), 375-386.
83. Jones, T. S., Yang, W., Evans, W. E., & Relling, M. V. (2007). Using HapMap tools in pharmacogenomic discovery: the thiopurine methyltransferase polymorphism. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 81(5), 729-734.

84. Jover, R., Bort, R., Gómez-Lechón, M. J., & Castell, J. V. (2002). Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved. *The FASEB Journal*, *16*(13), 1799-1801.
85. Kamali, F. (2006). Genetic influences on the response to warfarin. *Current opinion in hematology*, *13*(5), 357-361.
86. Kang, H. R., Jee, Y. K., Kim, Y. S., Lee, C. H., Jung, J. W., Kim, S. H., ... & Min, K. U. (2011). Positive and negative associations of HLA class I alleles with allopurinol-induced SCARs in Koreans. *Pharmacogenetics and genomics*, *21*(5), 303-307.
87. Kang, P., Dalvie, D., Smith, E., Zhou, S., Deese, A., & Nieman, J. A. (2008). Bioactivation of flutamide metabolites by human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition*, *36*(7), 1425-1437.
88. Kaniwa, N., Saito, Y., Aihara, M., Matsunaga, K., Tohkin, M., Kurose, K., ... & Kinoshita, S. (2008). HLA-B locus in Japanese patients with anti-epileptics and allopurinol-related Stevens–Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis., 1617-1622
89. Kawamura, A., Graham, J., Mushtaq, A., Tsiftoglou, S. A., Vath, G. M., Hanna, P. E., ... & Sim, E. (2005). Eukaryotic arylamine N-acetyltransferase: investigation of substrate specificity by high-throughput screening. *Biochemical pharmacology*, *69*(2), 347-359.
90. Kiang, T. K., Ensom, M. H., & Chang, T. K. (2005). UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacology & therapeutics*, *106*(1), 97-132.
91. Kim, R. B., O'Shea, D., & Wilkinson, G. R. (1995). Interindividual variability of chlorzoxazone 6-hydroxylation in men and women and its relationship to CYP2E1 genetic polymorphisms. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *57*(6), 645-655.

92. Kinirons, M. T., & O'Mahony, M. S. (2004). Drug metabolism and ageing. *British journal of clinical pharmacology*, 57(5), 540-544.
93. Kirchheiner, J., Keulen, J. T. H., Bauer, S., Roots, I., & Brockmöller, J. (2008). Effects of the CYP2D6 gene duplication on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tramadol. *Journal of clinical psychopharmacology*, 28(1), 78-83.
94. Kitts, A., Phan, L., Ward, M., & Holmes, J. B. (2014). The database of short genetic variation (dbSNP). In *The NCBI Handbook [Internet]. 2nd edition*. National Center for Biotechnology Information (US).
95. Klose, T. S., Ibeanu, G. C., Ghanayem, B. I., Pedersen, L. G., Li, L., Hall, S. D., & Goldstein, J. A. (1998). Identification of residues 286 and 289 as critical for conferring substrate specificity of human CYP2C9 for diclofenac and ibuprofen. *Archives of biochemistry and biophysics*, 357(2), 240-248.
96. Klotz, U. (2006). Clinical impact of CYP2C19 polymorphism on the action of proton pump inhibitors: a review of a special problem. *International Journal of Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 44(7).
97. Knopf, H., Wolf, I. K., Sarganas, G., Zhuang, W., Rascher, W., & Neubert, A. (2013). Off-label medicine use in children and adolescents: results of a population-based study in Germany. *BMC public health*, 13(1), 631.
98. Koukouritaki, S. B., Manro, J. R., Marsh, S. A., Stevens, J. C., Rettie, A. E., McCarver, D. G., & Hines, R. N. (2004). Developmental expression of human hepatic CYP2C9 and CYP2C19. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(3), 965-974.
99. Kuch, W., Rinner, C., Gall, W., & Samwald, M. (2016, May). How Many Patients Could Benefit From Pre-emptive Pharmacogenomic Testing and Decision Support? A Retrospective Study Based on Nationwide Austrian Claims Data. In *eHealth* (pp. 253-258).

100. Labrune, P., Myara, A., Hennion, C., Gout, J. P., Trivin, F., & Odievre, M. (1989). Crigler-Najjar type II disease inheritance: A family study. *Journal of inherited metabolic disease*, 12(3), 302-306.
101. Lee, E., Ryan, S., Birmingham, B., Zalikowski, J., March, R., Ambrose, H., ... & Schneck, D. (2005). Rosuvastatin pharmacokinetics and pharmacogenetics in white and Asian subjects residing in the same environment. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 78(4), 330-341.
102. Leemann, T., Kondo, M., Zhao, J., Transon, C., Bonnabry, P., & Dayer, P. (1992). The biotransformation of NSAIDs: a common elimination site and drug interactions. *Schweizerische medizinische Wochenschrift*, 122(49), 1897-1899.
103. Lin, K. M., Tsou, H. H., Tsai, I. J., Hsiao, M. C., Hsiao, C. F., Liu, C. Y., ... & Lu, S. C. (2010). CYP1A2 genetic polymorphisms are associated with treatment response to the antidepressant paroxetine. *Pharmacogenomics*, 11(11), 1535-1543.
104. Lind, A. B., Reis, M., Bengtsson, F., Jonzier-Perey, M., Golay, K. P., Ahlner, J., ... & Dahl, M. L. (2009). Steady-state concentrations of mirtazapine, N-desmethyilmirtazapine, 8-hydroxymirtazapine and their enantiomers in relation to cytochrome P450 2D6 genotype, age and smoking behaviour. *Clinical pharmacokinetics*, 48(1), 63-70.
105. Lindenbaum, J., Rund, D. G., Butler Jr, V. P., Tse-Eng, D., & Saha, J. R. (1981). Inactivation of digoxin by the gut flora: reversal by antibiotic therapy. *New England Journal of Medicine*, 305(14), 789-794.
106. Liu, Y. T., Hao, H. P., Liu, C. X., Wang, G. J., & Xie, H. G. (2007). Drugs as CYP3A probes, inducers, and inhibitors. *Drug metabolism reviews*, 39(4), 699-721.
107. Llerena, A., Alvarez, M., Dorado, P., Gonzalez, I., Peñas-Lledó, E., Pérez, B., ... & Calzadilla, L. R. (2014). Interethnic differences in the relevance of CYP2C9 genotype and environmental factors for diclofenac metabolism in Hispanics from Cuba and Spain. *The pharmacogenomics journal*, 14(3), 229-234.

108. Lobo, E. D., Bergstrom, R. F., Reddy, S., Quinlan, T., Chappell, J., Hong, Q., ... & Knadler, M. P. (2008). In vitro and in vivo evaluations of cytochrome P450 1A2 interactions with duloxetine. *Clinical pharmacokinetics*, 47(3), 191-202.
109. Lonjou, C., Borot, N., Sekula, P., Ledger, N., Thomas, L., Halevy, S., ... & Schumacher, M. (2008). A European study of HLA-B in Stevens–Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis related to five high-risk drugs. *Pharmacogenetics and genomics*, 18(2), 99-107.
110. López-Rodríguez, R., Novalbos, J., Gallego-Sandín, S., Román-Martínez, M., Torrado, J., Gisbert, J. P., & Abad-Santos, F. (2008). Influence of CYP2C8 and CYP2C9 polymorphisms on pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of racemic and enantiomeric forms of ibuprofen in healthy volunteers. *Pharmacological research*, 58(1), 77-84.
111. Lu, Y., & Cederbaum, A. I. (2008). CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(5), 723-738.
112. Mackenzie, P. I., Rogers, A., Treloar, J., Jorgensen, B. R., Miners, J. O., & Meech, R. (2008). Identification of UDP glycosyltransferase 3A1 as a UDP N-acetylglucosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 36205-36210.
113. Margaglione, M., Colaizzo, D., D'Andrea, G., Brancaccio, V., Ciampa, A., Grandone, E., & Di Minno, G. (2000). Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thrombosis and haemostasis*, 84(11), 775-778.
114. Martínez, C., García-Martín, E., Blanco, G., Gamito, F. J., Ladero, J. M., & Agúndez, J. A. (2005). The effect of the cytochrome P450 CYP2C8 polymorphism on the disposition of (R)-ibuprofen enantiomer in healthy subjects. *British journal of clinical pharmacology*, 59(1), 62-68.
115. Mega, J. L., Close, S. L., Wiviott, S. D., Shen, L., Hockett, R. D., Brandt, J. T., ... & Sabatine, M. S. (2009). Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *New England Journal of Medicine*, 360(4), 354-362.

116. Meyer, U. A. (2004). Pharmacogenetics—five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 5(9), 669-676.
117. Mrazek, D. A., Biernacka, J. M., O'Kane, D. J., Black, J. L., Cunningham, J. M., Drews, M. S., ... & Weinshilboum, R. M. (2011). CYP2C19 variation and citalopram response. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(1), 1.
118. Murray, G. I., Melvin, W. T., Greenlee, W. F., & Burke, M. D. (2001). Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41(1), 297-316.
119. Nackley, A. G., Shabalina, S. A., Lambert, J. E., Conrad, M. S., Gibson, D. G., Spiridonov, A. N., ... & Diatchenko, L. (2009). Low enzymatic activity haplotypes of the human catechol-O-methyltransferase gene: enrichment for marker SNPs. *PloS one*, 4(4).
120. Nelson, D. R., Zeldin, D. C., Hoffman, S. M., Maltais, L. J., Wain, H. M., & Nebert, D. W. (2004). Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics and Genomics*, 14(1), 1-18.
121. Nelson, D. R., Zeldin, D. C., Hoffman, S. M., Maltais, L. J., Wain, H. M., & Nebert, D. W. (2004). Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics and Genomics*, 14(1), 1-18.
122. Neumark-Sztainer, D., Croll, J., Story, M., Hannan, P. J., French, S. A., & Perry, C. (2002). Ethnic/racial differences in weight-related concerns and behaviors among adolescent girls and boys: findings from Project EAT. *Journal of psychosomatic research*, 53(5), 963-974.
123. Ogino, S., Gulley, M. L., Den Dunnen, J. T., Wilson, R. B., & Association for Molecular Pathology Training and Education Committee. (2007). Standard mutation nomenclature in molecular diagnostics: practical and educational challenges. *The Journal of molecular diagnostics*, 9(1), 1-6.

124. Ohtsuki, S., Schaefer, O., Kawakami, H., Inoue, T., Liehner, S., Saito, A., ... & Terasaki, T. (2012). Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug metabolism and Disposition*, 40(1), 83-92.
125. Oldenburg, J., Bevans, C. G., Müller, C. R., & Watzka, M. (2006). Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1): the key protein of the vitamin K cycle. *Antioxidants & redox signaling*, 8(3-4), 347-353.
126. Oselin, K., & Anier, K. (2007). Inhibition of human thiopurine S-methyltransferase by various nonsteroidal anti-inflammatory drugs in vitro: a mechanism for possible drug interactions. *Drug metabolism and disposition*, 35(9), 1452-1454.
127. Owen, Ryan P., et al. VKORC1 pharmacogenomics summary. *Pharmacogenetics and genomics*, 2010, 20.10: 642.
128. Özdemir, V., Kalow, W., Okey, A. B., Lam, M. S., Albers, L. J., Reist, C., ... & Roy, R. (2001). Treatment-resistance to clozapine in association with ultrarapid CYP1A2 activity and the C→ A polymorphism in intron 1 of the CYP1A2 gene: effect of grapefruit juice and low-dose fluvoxamine. *Journal of clinical psychopharmacology*, 21(6), 603-607.
129. Pan, S. D., Zhu, L. L., Chen, M., Xia, P., & Zhou, Q. (2016). Weight-based dosing in medication use: what should we know?. *Patient preference and adherence*, 10, 549.
130. Park, J. E., Kim, K. B., Bae, S. K., Moon, B. S., Liu, K. H., & Shin, J. G. (2008). Contribution of cytochrome P450 3A4 and 3A5 to the metabolism of atorvastatin. *Xenobiotica*, 38(9), 1240-1251.
131. Payton, M., Auty, R., Delgoda, R., Everett, M., & Sim, E. (1999). Cloning and characterization of arylamine N-acetyltransferase genes from *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*: increased expression results in isoniazid resistance. *Journal of bacteriology*, 181(4), 1343-1347.

132. Rendic, S. (2002). Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug metabolism reviews*, 34(1-2), 83-448.
133. Rettie, A. E., Korzekwa, K. R., Kunze, K. L., Lawrence, R. F., Eddy, A. C., Aoyama, T., ... & Trager, W. F. (1992). Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-4502C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions. *Chemical research in toxicology*, 5(1), 54-59.
134. Ring, J. A., Ghabrial, H., Ching, M. S., Smallwood, R. A., & Morgan, D. J. (1999). Fetal hepatic drug elimination. *Pharmacology & therapeutics*, 84(3), 429-445.
135. Rosales, A., Alvear, M., Cuevas, A., Saavedra, N., Zambrano, T., & Salazar, L. A. (2012). Identification of pharmacogenetic predictors of lipid-lowering response to atorvastatin in Chilean subjects with hypercholesterolemia. *Clinica chimica acta*, 413(3-4), 495-501.
136. Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V., Conzelmann, E., Hörtnagel, K., Pelz, H. J., ... & Müller, C. R. (2004). Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*, 427(6974), 537-541.
137. Rudberg, I., Mohebi, B., Hermann, M., Refsum, H., & Molden, E. (2008). Impact of the ultrarapid CYP2C19* 17 allele on serum concentration of escitalopram in psychiatric patients. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 83(2), 322-327.
138. Ruzza, P., Rosato, A., Rossi, C. R., Floreani, M., & Quintieri, L. (2009). Glutathione transferases as targets for cancer therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 9(7), 763-777.
139. Ryu, R. J., Eyal, S., Easterling, T. R., Caritis, S. N., Venkataraman, R., Hankins, G., ... & Phillips, B. (2016). Pharmacokinetics of metoprolol during pregnancy and lactation. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 56(5), 581-589.

140. Saab, Y. B., Zeenny, R., & Ramadan, W. H. (2015). Optimizing clopidogrel dose response: a new clinical algorithm comprising CYP2C19 pharmacogenetics and drug interactions. *Therapeutics and clinical risk management*, *11*, 1421.
141. Sadee, W., Wang, D., Papp, A. C., Pinsonneault, J. K., Smith, R. M., Moyer, R. A., & Johnson, A. D. (2011). Pharmacogenomics of the RNA world: structural RNA polymorphisms in drug therapy. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *89*(3), 355-365.
142. Sachse, C., Brockmöller, J., Bauer, S., & Roots, I. (1997). Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *American journal of human genetics*, *60*(2), 284.
143. Saito, Y., Serizawa, H., Kato, Y., Nakano, M., Nakamura, M., Saito, H., ... & Kanai, T. (2015). First-line eradication for Helicobacter pylori-positive gastritis by esomeprazole-based triple therapy is influenced by CYP2C19 genotype. *World journal of gastroenterology*, *21*(48), 13548.
144. Sansen, S., Yano, J. K., Reynald, R. L., Schoch, G. A., Griffin, K. J., Stout, C. D., & Johnson, E. F. (2007). Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(19), 14348-14355.
145. Satyanarayana, Chakradhara Rao Uppugunduri, Anichavezhi Devendran, Muthukumaran Jayaraman, Jayakanthan Mannu, Premendu P. Mathur, Shewade Deepak Gopal, Krishnamoorthy Rajagopal, and Adithan Chandrasekaran. "Influence of the genetic polymorphisms in the 5' flanking and exonic regions of CYP2C19 on proguanil oxidation." *Drug metabolism and pharmacokinetics* 24, no. 6 (2009): 537-548.
146. Sauvage, E., & Terrak, M. (2016). Glycosyltransferases and transpeptidases/penicillin-binding proteins: valuable targets for new antibacterials. *Antibiotics*, *5*(1), 12.
147. Scott, E. E., & Halpert, J. R. (2005). Structures of cytochrome P450 3A4. *Trends in biochemical sciences*, *30*(1), 5-7.

148. Seth, R., Kydd, A. S., Buchbinder, R., Bombardier, C., & Edwards, C. J. (2014). Allopurinol for chronic gout. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (10).
149. Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical journal*, 360(1), 1-16.
150. Shen, M., Shi, Y., & Xiang, P. (2013). CYP3A4 and CYP2C19 genetic polymorphisms and zolpidem metabolism in the Chinese Han population: a pilot study. *Forensic science international*, 227(1-3), 77-81.
151. Shi, S., & Klotz, U. (2008). Proton pump inhibitors: an update of their clinical use and pharmacokinetics. *European journal of clinical pharmacology*, 64(10), 935-951.
152. Shield, A. J., Thomae, B. A., Eckloff, B. W., Wieben, E. D., & Weinshilboum, R. M. (2004). Human catechol O-methyltransferase genetic variation: gene resequencing and functional characterization of variant allozymes. *Molecular psychiatry*, 9(2), 151-160.
153. Schaeffeler, E., Fischer, C., Brockmeier, D., Wernet, D., Moerike, K., Eichelbaum, M., ... & Schwab, M. (2004). Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype–genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics and Genomics*, 14(7), 407-417.
154. Singh D, Kashyap A, Pandey RV, Saini KS. (2011) Novel advances in cytochrome P450 research. *Drug discovery today*, 16(17-18):793-9.
155. Sirot, E. J., Knezevic, B., Morena, G. P., Harenberg, S., Oneda, B., Crettol, S., ... & Eap, C. B. (2009). ABCB1 and cytochrome P450 polymorphisms: clinical pharmacogenetics of clozapine. *Journal of clinical psychopharmacology*, 29(4), 319-326.

156. Skjelbo, E., Brøsen, K., Hallas, J., & Gram, L. F. (1991). The mephenytoin oxidation polymorphism is partially responsible for the N-demethylation of imipramine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 49(1), 18-23.
157. Skogh, E., Bengtsson, F., & Nordin, C. (1999). Could discontinuing smoking be hazardous for patients administered clozapine medication? A case report. *Therapeutic drug monitoring*, 21(5), 580.
158. Slaviero, K. A., Clarke, S. J., & Rivory, L. P. (2003). Inflammatory response: an unrecognised source of variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cancer chemotherapy. *The lancet oncology*, 4(4), 224-232.
159. Sohn, D. R., Kwon, J. T., Kim, H. K., & Ishizaki, T. (1997). Metabolic disposition of lansoprazole in relation to the S-mephenytoin 4'-hydroxylation phenotype status. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 61(5), 574-582.
160. Stamer, U. M., Lehnen, K., Höthker, F., Bayerer, B., Wolf, S., Hoeft, A., & Stuber, F. (2003). Impact of CYP2D6 genotype on postoperative tramadol analgesia. *Pain*, 105(1-2), 231-238.
161. Stamer, U. M., Stüber, F., Muders, T., & Musshoff, F. (2008). Respiratory depression with tramadol in a patient with renal impairment and CYP2D6 gene duplication. *Anesthesia & Analgesia*, 107(3), 926-929.
162. Strand, D. S., Kim, D., & Peura, D. A. (2017). 25 years of proton pump inhibitors: a comprehensive review. *Gut and liver*, 11(1), 27.
163. Strassburg, C. P., Strassburg, A., Kneip, S., Barut, A., Tukey, R. H., Rodeck, B., & Manns, M. P. (2002). Developmental aspects of human hepatic drug glucuronidation in young children and adults. *Gut*, 50(2), 259-265.
164. Sugimoto, M., Furuta, T., Shirai, N., Ikuma, M., Hishida, A., & Ishizaki, T. (2006). Initial 48-hour acid inhibition by intravenous infusion of omeprazole, famotidine, or both in relation to cytochrome P450 2C19 genotype status. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 80(5), 539-548.

165. Surh, Y. J. (1998). Bioactivation of benzylic and allylic alcohols via sulfo-conjugation. *Chemico-biological interactions*, 109(1-3), 221-235.
166. Szultka, M., Krzeminski, R., Jackowski, M., & Buszewski, B. (2014). Identification of in vitro metabolites of amoxicillin in human liver microsomes by LC–ESI/MS. *Chromatographia*, 77(15-16), 1027-1035.
167. Šerý, O., Didden, W., Mikeš, V., Pitelová, R., Znojil, V., & Zvolský, P. (2006). The association between high-activity COMT allele and alcoholism. *Neuroendocrinology Letters*, 27(1-2).
168. Taguchi, M., Nozawa, T., Mizumaki, K., Inoue, H., Tahara, K., Takesono, C., & Hashimoto, Y. (2004). Nonlinear mixed effects model analysis of the pharmacokinetics of metoprolol in routinely treated Japanese patients. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(10), 1642-1648.
169. Tan, W., Wu, J., Tang, H., & Lin, D. (2001). Expression of cytochrome P4502E1 in human liver: relationship between genotype and phenotype in Chinese. *Science in China Series C: Life Sciences*, 44(4), 356-364.
170. Tang, H. L., Li, Y., Hu, Y. F., Xie, H. G., & Zhai, S. D. (2013). Effects of CYP2C19 loss-of-function variants on the eradication of *H. pylori* infection in patients treated with proton pump inhibitor-based triple therapy regimens: a meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS one*, 8(4), e62162.
171. Tassaneeyakul, W., Jantararungtong, T., Chen, P., Lin, P. Y., Tiamkao, S., Khunarkornsiri, U., ... & Pisuttimarn, P. (2009). Strong association between HLA-B* 5801 and allopurinol-induced Stevens–Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in a Thai population. *Pharmacogenetics and genomics*, 19(9), 704-709.
172. Teh, L. K., & Bertilsson, L. (2011). Pharmacogenomics of CYP2D6: molecular genetics, interethnic differences and clinical importance. Drug metabolism and pharmacokinetics, 1112190300-1112190300.
173. Thijssen, H. H., Flinois, J. P., & Beaune, P. H. (2000). Cytochrome P4502C9 is the principal catalyst of racemic acenocoumarol hydroxylation

reactions in human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition*, 28(11), 1284-1290.

174. Turpeinen, M., Hofmann, U., Klein, K., Mürdter, T., Schwab, M., & Zanger, U. M. (2009). A predominate role of CYP1A2 for the metabolism of nabumetone to the active metabolite, 6-methoxy-2-naphthylacetic acid, in human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition*, 37(5), 1017-1024.
175. Ujiie, S., Sasaki, T., Mizugaki, M., Ishikawa, M., & Hiratsuka, M. (2008). Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT* 2-* 24). *Pharmacogenetics and genomics*, 18(10), 887-893.
176. Ulmanen, I., Peränen, J., Tenhunen, J., Tilgmann, C., Karhunen, T., Panula, P., ... & Lundström, K. (1997). Expression and intracellular localization of catechol O-methyltransferase in transfected mammalian cells. *European journal of biochemistry*, 243(1-2), 452-459.
177. van Bladeren, P. J. (2000). Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chemico-biological interactions*, 129(1-2), 61-76.
178. van der Put, N. M., Gabreels, F., Stevens, E. M., Smeitink, J. A., Trijbels, F. J., Eskes, T. K., ... Blom, H. J. (1998): A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *American Journal of Human Genetics*, 62(5), 1044–1051. <https://doi.org/10.1086/301825>.
179. Vieira, I., Sonnier, M., & Cresteil, T. (1996). Developmental expression of CYP2E1 in the human liver: hypermethylation control of gene expression during the neonatal period. *European Journal of Biochemistry*, 238(2), 476-483.
180. von Richter, O., Burk, O., Fromm, M. F., Thon, K. P., Eichelbaum, M., & Kivistö, K. T. (2004). Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens. *Clinical pharmacology & therapeutics*, 75(3), 172-183.
181. Wang, S. L., Huang, J. D., Lai, M. D., Liu, B. H., & Lai, M. L. (1993). Molecular basis of genetic variation in debrisoquin hydroxylation in Chinese

subjects: polymorphism in RFLP and DNA sequence of CYP2D6. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 53(4), 410-418.

182. Wang, Y., Zhang, H., Meng, L., Wang, M., Yuan, H., Ou, N., ... & Shi, R. (2010). Influence of CYP2C19 on the relationship between pharmacokinetics and intragastric pH of omeprazole administered by successive intravenous infusions in Chinese healthy volunteers. *European journal of clinical pharmacology*, 66(6), 563-569.
183. Waxman, D. J., & Holloway, M. G. (2009). Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Molecular pharmacology*, 76(2), 215-228.
184. Weinshilboum, R. (2001). Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug Metabolism and Disposition*, 29(4), 601-605.
185. Wennerholm, A., Dandara, C., Sayi, J., Svensson, J. O., Abdi, Y. A., Ingelman-Sundberg, M., ... & Gustafsson, L. L. (2002). The African-specific CYP2D6* 17 allele encodes an enzyme with changed substrate specificity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 71(1), 77-88.
186. Westlind-Johnsson, A., Hermann, R., Huennemeyer, A., Hauns, B., Lahu, G., Nassr, N., ... & von Richter, O. (2006). Identification and characterization of CYP3A4* 20, a novel rare CYP3A4 allele without functional activity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 79(4), 339-349.
187. Wiffen, P. J., Derry, S., & Moore, R. A. (2017). Tramadol with or without paracetamol (acetaminophen) for cancer pain. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (5).
188. Wilson, I. D., & Nicholson, J. K. (2017). Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Translational Research*, 179, 204-222.
189. Winner, J. G., Carhart, J. M., Altar, C. A., Goldfarb, S., Allen, J. D., Lavezzari, G., ... & Dechairo, B. M. (2015). Combinatorial pharmacogenomic guidance for psychiatric medications reduces overall pharmacy costs in a 1 year prospective evaluation. *Current medical research and opinion*, 31(9), 1633-1643.
190. Yang, X., Zhang, B., Molony, C., Chudin, E., Hao, K., Zhu, J., ... & Guengerich, F. P. (2010). Systematic genetic and genomic analysis of cytochrome P450 enzyme activities in human liver. *Genome research*, 20(8), 1020-1036.

191. Yin, T., & Miyata, T. (2007). Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1—rationale and perspectives. *Thrombosis research*, 120(1), 1-10.
192. Yin, T., Maekawa, K., Kamide, K., Saito, Y., Hanada, H., Miyashita, K., ... & Otsuki, T. (2008). Genetic variations of CYP2C9 in 724 Japanese individuals and their impact on the antihypertensive effects of losartan. *Hypertension research*, 31(8), 1549-1557.
193. 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.
194. Zanger, U. M., Turpeinen, M., Klein, K., & Schwab, M. (2008). Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 392(6), 1093-1108.
195. Zhang, H. F., Wang, H. H., Gao, N., Wei, J. Y., Tian, X., Zhao, Y., ... & Zhang, Y. J. (2016). Physiological content and intrinsic activities of 10 cytochrome P450 isoforms in human normal liver microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 358(1), 83-93.
196. Zhang, Y., Klein, K., Sugathan, A., Nassery, N., Dombkowski, A., Zanger, U. M., & Waxman, D. J. (2011). Transcriptional profiling of human liver identifies sex-biased genes associated with polygenic dyslipidemia and coronary artery disease. *PLoS One*, 6(8).
197. Zhou, H., Josephy, P. D., Kim, D., & Guengerich, F. P. (2004). Functional characterization of four allelic variants of human cytochrome P450 1A2. *Archives of biochemistry and biophysics*, 422(1), 23-30.
198. Zhou, S. F., Wang, B., Yang, L. P., & Liu, J. P. (2010). Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. *Drug metabolism reviews*, 42(2), 268-354.
199. Zhou, Y., Ingelman-Sundberg, M., & Lauschke, V. M. (2017). Worldwide distribution of cytochrome P450 alleles: a meta-analysis of population-scale sequencing projects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 102(4), 688-700.
200. Zhu, Z., Yuan, D., Luo, D., Lu, X., & Huang, S. (2015). Enrichment of minor alleles of common SNPs and improved risk prediction for Parkinson's disease. *PloS one*, 10(7).

201. Zineh, I., Beitelshees, A. L., Gaedigk, A., Walker, J. R., Pauly, D. F., Eberst, K., ... & Johnson, J. A. (2004). Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse events or efficacy in hypertension. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 76(6), 536-544.

16 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: KAZUISTIKA PACIENTKY H.R.

Pacientka H.R. (ročník 1956) trpící špatnou snášenlivostí léků si stěžuje na výskyt četných výrazných nežádoucích účinků u mnoha léčiv. Trpí chronickou gastritidou a ví o špatné reakci na acylpyrin, paracetamol a ATB kromě penicilinu. Na úpravu zažívání užívala od roku 1996 lék **Cerucal**, po kterém trpěla depresemi a byla léčena na psychiatrii. Dále jí byl v roce 2008 předepsán lék **Norethisteron** na myomy dělohy a endometriózu, **Euthyrox** na hypofunkci štítné žlázy a **Lorista 25 mg** na zvýšený tlak. Dále jí byl z neznámých důvodů předepsán **Detralex**, **Indap**, **Omeprazol** a **Stilnox**. V roce 2008 také podstoupila hysterektomii, po které trpěla plynatostí a křečemi v břiše. Na tyto zažívací obtíže dostala **Prosulpin 50 mg**, po kterém přibrala 19 kg, zaznamenala bolest na hrudi a samovolné vylučování mléka z prsní žlázy. Z těchto důvodů lék přestala užívat. Jednorázově, neznámo kdy, pacientka užívala na dlouhodobou nespavost **Mirtazapin 15 mg**, kdy po jedné tabletě (ačkoliv je doporučena denní dávka až tři tablety) nebyla druhý den ráno schopna řídit auto. Po snížení dávky prý lék fungoval, jak měl.

Pacientka se se svými problémy svěřila svému ošetřujícímu lékaři, jelikož chtěla objektivně zjistit, jestli se nemůže v jejím případě jednat o geneticky podmíněnou reakci na léčivo. Okolí jí prý její potíže nevěří, a to je pro ni značně frustrující.

Vzorek této pacientky byl otestován v laboratoři GENLABS s.r.o. za použití různých metod, díky kterým bylo možné detekovat přítomnost polymorfismů u některých genů kódujících enzymy, které metabolizují léky.

Tab. XXXIII: Výsledky analýzy vzorku paní H.R. při detekci polymorfismů v genech metabolizujících léky

GEN	rs kód	VÝSLEDNÝ GENOTYP
<i>CYP2C9</i>	rs 1057910	*1/*1
<i>CYP2C19</i>	rs 4244285	*1/*1
<i>CYP2D6</i>	rs 12169962	*1/*3
<i>CYP2D6</i>	reversní hybridizace	*1/*3
<i>NQO1 C609t</i>	rs 1800566	CC
<i>MTHFR1298</i>	rs 1801131	AC
<i>CYP1A2 C/T</i>	rs 4646425	CC

Tab. XXXIV: Výpis léčiv užívaných paní H.R. a jejich případná asociace s geny metabolizující léčivé látky přítomné v těchto léčích

LÉK	ASOCIACE	GEN	LITERATURA
<i>Cerucal</i>	ne	-	-
<i>Norethisteron</i>	ne	-	-
<i>Euthyrox</i>	ne	-	-
<i>Lorista 25 mg</i>	ano	<i>CYP2C9</i>	Bae et al., 2017; Yin et al., 2008
<i>Detralex</i>	ne	-	-
<i>Indap</i>	ne	-	-
<i>Omeprazol</i>	ano	<i>CYP2C19</i>	Tang et al., 2013; Ando et al., 2008; Hanioka et al., 2008
<i>Stilnox</i>	ano	<i>CYP2D6</i> , <i>CYP2C19</i> , <i>CYP3A4</i>	Shen et al., 2013
<i>Prosulpin 50 mg</i>	ne	-	-
<i>Mirtazapin 15 mg</i>	ano	<i>CYP2D6</i>	Lind et al., 2009

Lék **Cerucal** obsahující účinnou látku metoclopramid má jako jeden z častých nežádoucích účinků (může postihnout až 1 z 10 pacientů) deprese a pocit neklidu, kterými paní H.R. trpěla.

Lék **Lorista 25 mg** s léčivou látkou losartan, je metabolizován enzymem CYP2C9. Na stanovení genotypu u tohoto genu byl použit komerční kit detekující pouze alely *1, *2 a *3, takže nelze s jistotou tvrdit, že pacientka nedisponuje variantní alelou, která má za následek odlišnou reakci na lék. *CYP2C9* * 1 / * 13 je totiž spojen se sníženým metabolismem losartanu u zdravých jedinců ve srovnání s *CYP2C9* * 1 / * 1 (Bae et al., 2017) a *CYP2C9* * 1 / * 33 je u lidí s hypertenzí spojen se zvýšenou odpovědí na losartan (Yin et al., 2008).

Omeprazol, který pacientka také užívala je metabolizován pomocí enzymu CYP2C19. Dle studií je genotyp *CYP2C19* * 1 / * 1 spojen se sníženou odpovědí na esomeprazol, lansoprazol, omeprazol a rabeprazol u lidí s infekcemi *Helicobacter* (Tang et al, 2013) či vředy (Ando et al., 2008) ve srovnání s *CYP2C19* * 2 / * 2 + * 2 / * 3 + * 3 / * 3. Vzhledem k přetrvávajícím problémům se zažíváním nelze ani jednu z těchto dvou diagnóz

vyloučit. Výsledky naší analýzy, na základě které jsme určili genotyp *CYP2C19* pacientky však mohou být zkreslené kvůli faktu, že byl použit kit pro detekci alel *1, *2, *3 a jejich kombinaci. Je tedy možné, že pokud by vzorek byl otestován pomocí komplexnější metody (reverzní hybridizace na stripu) byl by odhalen jiný signifikantní polymorfismus. Například genotyp *CYP2C19* * 19 je spojen se zvýšenou aktivitou *CYP2C19* při expozici omeprazolu ve srovnání s *CYP2C19* * 1 (Hanioka et al., 2008).

Zolpidem, který je součástí léku **Stilnox**, je jedním z nejpředepisovanějších léků na spaní v USA. Neexistuje mnoho studií, které by dokazovaly spojitost mezi variantní alelou a sníženou efektivitou léku. Avšak u pacientů čínské populace užívajících více léků, které jsou značně metabolizovány, může být u pomalých metabolizátorů spolu s inhibičními metabolickými interakcemi dvou léků zvýšené riziko závažných vedlejších účinků zolpidemu. Zejména pacienti užívající zolpidem s antidepresivem SSRI / SNRI mohou mít sníženou metabolickou clearance (Shen et al., 2013).

Lék **Mirtazapin 15 mg**, který pacientka užívala na nespavost, byl zkoumán v mnoha studiích, načež bylo prokázáno, že intermediární metabolizátoři (například genotyp *1/*3) mají vyšší plasmatickou koncentraci léku nežli superychlí metabolizátoři, a to až o 107 % (Lind et al., 2009). Tato skutečnost tedy vysvětluje, proč pacientka cítila sedativní účinky i druhý den ráno i po požití třetinové dávky.

Prosulpin 50 mg, který byl pacientce předepsán na zažívací obtíže, je přípravek určen na léčbu psychosomatických poruch, projevujících se trávicími potížemi. Má velice nepříznivé vedlejší účinky, mezi které patří bolest na hrudi, samovolné vylučování mléka z prsní žlázy a zvýšení tělesné hmotnosti.

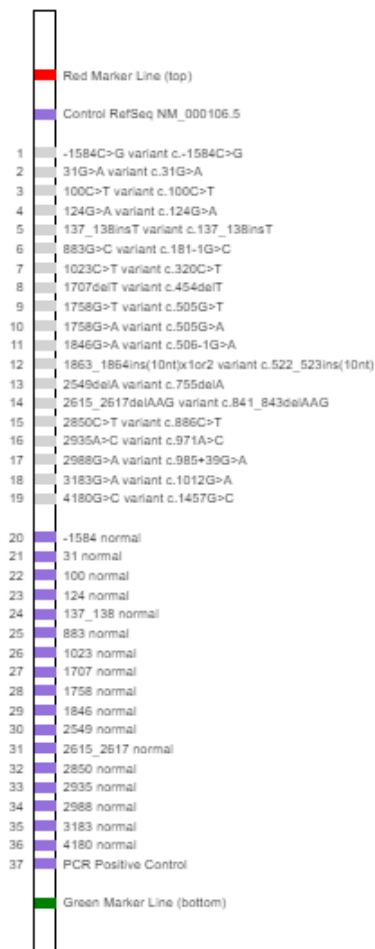
Pacientka trpěla u mnoha léků, které užívala, častými nežádoucími účinky, které se projevují u 1 z 10 pacientů. Výsledky analýzy vzorku dokazují i existující asociaci genotypu s odpovědí na lékovou terapii. Na druhou stranu, u pacientky nelze zcela vyloučit i určité psychické potíže a určitý strach z nové diagnózy a jakékoliv nově nasazené léčby.

Příloha 2: Výsledné genotypy a fenotypy pro vzorky z projektu Quinta Analytica.

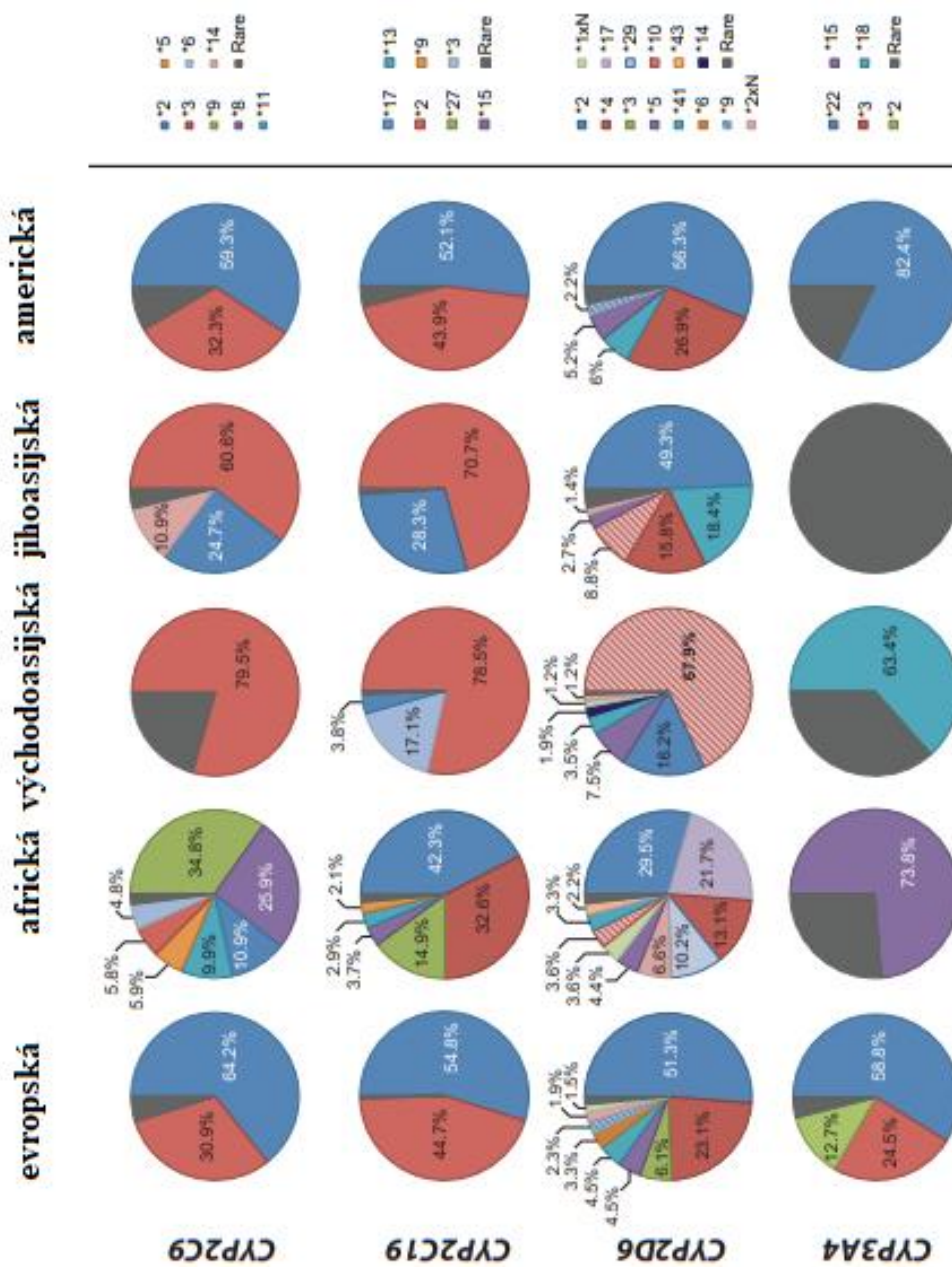
Vzorek	Pohlaví	Věk	Genotyp	Metabolizátor
1	M	27	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
2	M	29	*1/*4	STŘEDNÍ
3	M	20	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
4	M	34	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
5	Ž	42	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
6	M	43	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
7	Ž	48	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
8	M	44	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
9	Ž	35	*1/*4	STŘEDNÍ
10	M	35	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
11	M	28	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
12	Ž	33	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
13	Ž	40	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
14	Ž	47	*1/*4	STŘEDNÍ
15	Ž	26	*1/*4	STŘEDNÍ
16	M	38	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
17	M	24	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
18	M	39	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
19	Ž	47	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
20	Ž	45	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
21	M	27	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
22	Ž	22	*1/*4	STŘEDNÍ
23	Ž	44	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
24	Ž	49	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
25	Ž	39	*1/*4	STŘEDNÍ
26	Ž	38	*1/*4	STŘEDNÍ
27	M	31	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
28	M	25	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
29	Ž	53	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
30	M	24	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
31	Ž	41	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
32	Ž	50	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
33	M	36	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
34	Ž	54	*4/*4 nebo *4/*5	POMALÝ
35	Ž	38	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
36	M	36	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
37	Ž	47	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
38	Ž	47	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
39	M	38	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)

40	Ž	48	*4/*4 nebo *4/*5	POMALÝ
41	Ž	47	*1/*4	STŘEDNÍ
42	Ž	47	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
43	Ž	39	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
44	Ž	51	*1/*4	STŘEDNÍ
45	Ž	46	*1/*4	STŘEDNÍ
46	Ž	51	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
47	Ž	52	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
48	M	32	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
49	M	45	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
50	Ž	36	*1/*4	STŘEDNÍ
51	Ž	21	*1/*4	STŘEDNÍ
52	Ž	38	*1/*4	STŘEDNÍ
53	M	28	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)
54	Ž	30	*1/*4	STŘEDNÍ
55	Ž	45	*1/*4	STŘEDNÍ
56	Ž	41	*1/*1 (wild type) nebo *1/*5 (delece)	NORMÁLNÍ (nebo STŘEDNÍ)

Příloha 3: Design stripu použitého pro reverzní hybridizaci, PGX-CYP2D6 XL StripAssay®



Příloha 4: Zastoupení variantních alel u *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* a *CYP3A4* (převzato a upraveno dle Zhou et al., 2017).



17 SEZNAM TABULEK

Tab. I: Dostupné SNP databáze a odkaz na jejich webové stránky.....	7
Tab. II: Grafické znázornění potřebné hladiny léčiva odpovídající jednotlivým fenotypům CYP2D6 a různým alelám CYP2D6 definujícím tyto fenotypy (převzato a upraveno dle Teh & Bertilsson, 2011).	13
Tab. III: Distribuce léčiv v ČR v roce 2019 [online].....	26
Tab. IV: Vybraná léčiva z tabulky III, jejichž metabolismus je ovlivněn genetickými predispozicemi, jako jsou genetické polymorfismy v genech enzymů 1. či 2. fáze biotransformace.	27
Tab. V: Použité reagenty a jejich objemy pro izolaci DNA z plné krve za použití kitu GeneAll Exgene™ Clinic SV Mini	33
Tab. VI: Sekvence použitých primerů	35
Tab. VII: reakčního mixu pro detekci polymorfismu v genu <i>NQO1</i>	35
Tab. VIII: Amplifikační profil pro detekci polymorfismu <i>NQO1</i>	36
Tab. IX: Složení reakčního mixu pro vyšetření polymorfismu <i>MTHFR A1298C</i> a <i>C677T</i>	36
Tab. X: Reakční profil pro detekci polymorfismu <i>MTHFR A1298C</i>	37
Tab. XI: Reakční profil pro detekci polymorfismu <i>MTHFR C677T</i>	37
Tab. XIII: Velikost neštěpených produktů PCR u jednotlivých testovaných genů.....	38
Tab. XIII: Použité kity pro detekci jednotlivých polymorfismů	41
Tab. XIV: Master mix pro Real-time PCR při detekci CYP2D6*3, *4 a *5/*5	41
Tab. XV: Reakční profil pro CYP2D6	42
Tab. XVI: Master mix pro Real-time PCR při detekci CYP2C9*2 a *3	42
Tab. XVII: Podmínky amplifikace u metody Real-time PCR pro CYP2C9.....	42
Tab. XVIII: Master mix pro Real-time PCR při detekci CYP2C19*2 a *3.....	43
Tab. XIX: Podmínky amplifikace u metody Real-time PCR pro CYP2C19	43
Tab. XX: Master mix pro Real-time PCR při detekci CYP2C19*2 a *3.....	43
Tab. XXI: Podmínky amplifikace u metody Real-time PCR pro CYP1A2	44
Tab. XXII: Použité reagenty a jejich objemy PCR pro hybridizaci na stripu.....	45
Tab. XXIII: Amplifikační profil pro reverzní hybridizaci na stripu pro detekci polymorfismů v genu CYP2D6	45
Tab. XXIV: Reagenty a jejich objemy použité pro hybridizaci na stripech	46
Tab. XXV: Koncentrace jednotlivých izolátů DNA	48
Tab. XXVI: Výsledky Real-time PCR, analýza genových variant CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP1A2	49
Tab. XXVII: Výsledky získané analýzou PCR-RFLP, detekce variantních alel v genech <i>NQO1 C609T</i> a <i>MTHFR C677T</i> a <i>A1298C</i>	50
Tab. XXVIII: Interpretace výsledků reverzní hybridizace pro jednotlivé vzorky.	53
Tab. XXIX: Porovnání výsledků u vzorků M1-M5 a F1-F5 za použití dvou různých metod, a to Real-time PCR (LightMix® Kit CYP2D6*3, *4 and *5/*5) a reverzní hybridizace na stripu (PGX-CYP2D6 XL StripAssay®)	54
Tab. XXX: Výsledky real-time PCR, analýza genu CYP2D6 pomocí kitu LightMix® Kit CYP2D6*3, *4 and *5/*5 určeného pro detekci alel *1, *3, *4 a *5.	55

Tab. XXXI: Procentuální zastoupení jednotlivých genotypů v souboru vzorků testovaných kitem LightMix® Kit CYP2D6*3, *4 and *5/*5 v laboratoři GENLABS.	55
Tab. XXXII: Frekvence alel u souboru vzorků laboratoře GENLABS v porovnání s frekvencemi ze studií české a evropské populace.	56
Tab. XXXIII: Výsledky analýzy vzorku paní H.R. při detekci polymorfismů v genech metabolizujících léky.....	88
Tab. XXXIV: Výpis léčiv užívaných paní H.R. a jejich případná asociace s geny metabolizující léčivé látky přítomné v těchto léčích.....	89

18 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. I: 1. a 2. fáze biotransformace přímá eliminace v biodispozici léčiva.	8
Obr. II: Podíl léčiv metabolizovaných izoformami CYP450 (převzato a upraveno dle Rendic, 2002).	10
Obr. III: Konjugace nukleofilního substrátu s kyselinou uridin5'-difosfo- α -D-glukuronovou (UDPGA).	19
Obr. IV: Obecná reakce katalyzovaná SULT.	20
Obr. V: Acetylace arylaminů N-acetyltransferázou	21
Obr. VI: Tvorba glutathionového konjugátu.	22
Obr. VII: Grafické znázornění fragmentů po restričním štěpení pro <i>MTHFR A1298C</i> a <i>MTHFR C677T</i>	39
Obr. VIII: Grafické znázornění fragmentů po restričním štěpení pro <i>NQO1</i>	40
Obr. IX: Výsledek amplifikační reakce pro vzorky F1-F5 a M1-M5 a reakčního mixu A a B. Jako marker byl použit 100 bp DNA ladder.	46
Obr. X: Příklad grafického znázornění real-time analýzy genu <i>CYP2C9</i> (kanál 530, LightCycler 2.0 Instrument, Roche)	49
Obr. XI: Grafické znázornění výsledků analýzy <i>CYP2C9</i> pro vzorky M1, M2, M3, M4, M5 (kanál 530, LightCycler 2.0 Instrument, Roche)	50
Obr. XII: Výsledné rozdělení restričních fragmentů pro <i>NQO1</i>	51
Obr. XIII: Výsledné rozdělení restričních fragmentů pro <i>MTHFR A1298C</i>	51
Obr. XIV: Výsledné rozdělení restričních fragmentů pro <i>MTHFR C677T</i>	51
Obr. XV: Výsledky reverzní hybridizace na stripu pro jednotlivé vzorky, jejich interpretace je uvedena v tabulce XXVIII. Pro hybridizaci byl použit kit PGX-CYP2D6 XL StripAssay®.	52