



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Analýza polymorfismu genu pro CYP 2C19 u pacientů  
léčených klopidogrelem**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Soňa Mašková

**Vedoucí práce:** Mgr. Ondřej Scheinost

České Budějovice 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou/diplomovou práci s názvem *Analýza polymorfismu genu pro CYP 2C19 u pacientů léčených klopidogrelem* jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/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 bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.5.2018

.....

podpis

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce, Mgr. Ondřeji Scheinostovi, za odborné vedení práce a věnovaný čas při zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat rodičům, kteří mě podporovali v průběhu celého studia.

# **Analýza polymorfismu genu pro CYP 2C19 u pacientů léčených klopidogrelem**

## **Abstrakt**

Klopidogrel je antitrombotické (protidestičkové) léčivo ze skupiny thienopyridů, používané pro prevenci výskytu krevních trombů u pacientů s akutním koronárním syndromem, u pacientů po ischemické cévní mozkové příhodě, infarktu myokardu nebo u pacientů s prokázanou ischemickou chorobou dolních končetin.

Klopidogrel je „prodrug“, což znamená, že před svým působením musí být v organismu metabolizován na aktivní metabolit. Hlavní roli při bioaktivaci klopidogrelu hraje cytochrom P450 2C19. Jednotlivé enzymy cytochromového komplexu jsou kódovány geny, které jsou polymorfní. Z důvodu genového polymorfismu může být u jednotlivých osob funkce cytochromu P450 2C19 různá, a tudíž i bioaktivace klopidogrelu se může u jednotlivců lišit.

Existuje několik alel cytochromu P450 CYP2C19, které souvisí s odlišnou terapeutickou odpovědí na podání klopidogrelu. Jedinci s alelou CYP2C19\*17 mají zvýšenou koncentraci aktivního metabolitu a jsou vystaveni vyššímu riziku krvácivých komplikací. Nosiči alel CYP2C19\*2 a CYP2C19\*3 mají sníženou metabolizaci klopidogrelu na aktivní metabolit, čím dochází k nedostatečnému antiagregačnímu efektu a ke zvýšenému výskytu kardiovaskulárních komplikací. Alela CYP2C19\*1 je spojena s plně funkčním metabolismem.

Ve skupině 512 pacientů jsme detekovali 191 nosičů genotypu \*1/\*1, 79 nosičů genotypu \*2/\*1, 12 nosičů genotypu \*2/\*2, 1 nosiče genotypu \*3/\*1, 43 nosičů genotypu \*17/\*17, 146 nosičů genotypu \*17/\*1 a 40 nosičů genotypu \*17/\*2.

Stratifikace pacientů dle genotypu CYP2C19 má zásadní význam pro nastavení správné léčebné strategie a je prevencí výskytu cévní mozkové příhody a proti riziku krvácení.

## **Klíčová slova**

Farmakogenomika, cytochrom P450, CYP, klopidogrel, CYP2C19

# **Analysis of gene polymorphism of CYP 2C19 by the patients treated with clopidogrel**

## **Abstract**

Clopidogrel is an antithrombotic medicament from the group of thienopyrids, used for the prevention of blood clots by the patients with acute coronary syndrome, patients after an ischemic stroke, myocardial infarction or by the patients with proven lower limb ischemia.

Clopidogrel is a “prodrug”, which means that it needs to be metabolised into an active metabolite before it starts working. The cytochrome P450 2C19 plays the main role in the bioactivation of clopidogrel. Individual enzymes of cytochrome complex are coded by genes, which are polymorphic. The function of P450 2C19 can differ by individuals, from the reason of gene polymorphism, therefore the bioactivation of clopidogrel can differ as well.

There are few alleles of cytochrome P450 CYP2C19, which are connected with different therapeutic reactions on the submission of clopidogrel. Individuals with the allele CYP2C19\*17 have an increased concentration of active metabolite and are at a higher risk of bleeding complications. The carriers of CYP2C19\*2 a CYP2C19\*3 alleles have a decreased metabolism of clopidogrel into an active metabolite, which leads to insufficient antiaggregat effect and to increased appearance of cardiovascular complications. The allele CYP2C19\*1 is connected with a fully functioning metabolism.

In the group of 512 patients, we detected 191 carriers of the genotype \*1/\*1, 79 carriers of the genotype \*2/\*1, 12 carriers of the genotype \*2/\*2, 1 carrier of the genotype \*3/\*1, 43 carriers of the genotype \*17/\*17, 146 carriers of the genotype \*17/\*1 and 40 carriers of the genotype \*17/\*2.

The stratification of the patients according to genotype CYP2C19 has a significant meaning for adjusting the right treatment strategy and it is a prevention of stroke and the risk of bleeding.

## **Key words**

Pharmacogenomics, cytochrome P450, CYP, clopidogrel, CYP2C19

## Obsah

1	Teoretická část.....	8
1.1	Farmakogenomika.....	8
1.2	Eliminace xenobiotik z organismu.....	8
1.2.1	První fáze biotransformace.....	9
1.2.2	Druhá fáze biotransformace.....	9
1.3	Cytochrom P450.....	9
1.3.1	Nomenklatura P450.....	10
1.3.2	Klasifikace cytochromu P450.....	10
1.3.3	Rodina CYP1.....	10
1.3.3.1	Podrodina CYP1A.....	11
1.3.3.2	Podrodina CYP1B.....	11
1.3.4	Rodina CYP2.....	12
1.3.4.1	Podrodina CYP2A.....	12
1.3.4.2	Podrodina CYP2B.....	12
1.3.4.3	Podrodina CYP2C.....	13
1.3.4.4	Podrodina CYP2D.....	14
1.3.5	Rodina CYP3.....	14
1.3.6	Ostatní rodiny a podrodiny.....	15
1.4	Cévní mozková příhoda.....	15
1.4.1	Dělení CMP.....	16
1.4.2	Rizikové faktory.....	16
1.4.3	Ovlivnitelné rizikové faktory.....	16
1.4.3.1	Neovlivnitelné rizikové faktory.....	17
1.4.4	Diagnostika CMP.....	17
1.4.5	Léčba CMP.....	18
1.4.6	Klopidogrel.....	19
2	Cíl práce.....	22
3	Metodika.....	23
3.1	Charakteristika souboru.....	23
3.2	Principy laboratorních metod.....	23
3.2.1	Polymerázová řetězová reakce – PCR.....	23
3.2.2	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase – Real Time PCR.....	24

3.2.3	AS – PCR.....	25
3.2.4	Hybridizační metody.....	27
3.2.4.1	Reverzní hybridizace.....	27
3.2.4.2	Reverzní hybridizace na stripech .....	28
3.3	Materiál .....	29
3.4	Potřebná zařízení.....	29
3.4.1	Laboratoř pro izolaci.....	29
3.4.2	Laboratoř pro amplifikaci .....	29
3.4.3	Laboratoř pro přípravu reakčních směsí .....	30
3.4.4	Spotřební materiál.....	30
3.5	Postupy genetického vyšetření.....	30
3.5.1	Izolace DNA .....	30
3.5.1.1	Izolace genomové DNA z plné krve (QuickGene DNA whole blood kit S (DB-S)) .....	30
3.5.2	Izolace genomové DNA z plné krve (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood (Roche)) .....	31
3.5.3	Izolace genomové DNA s izolátorem MagCore® (MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit (RBCBioscience)) .....	32
3.5.4	Měření koncentrace a čistoty DNA .....	32
3.5.5	CYP 2C19 sondy – příprava master mixů .....	33
3.5.6	StripAssay .....	35
3.5.7	Hybridizace .....	37
4	Výsledky.....	39
5	Diskuze .....	44
6	závěr .....	47
7	Seznam zdrojů .....	48
8	Seznam příloh a obrázků .....	55
9	Přílohy .....	57
10	Seznam zkratk .....	64

# 1 Teoretická část

## 1.1 Farmakogenomika

Farmakogenomika je odvětví farmakologie, které se zabývá studiem účinností léku a jeho případnou toxicitou v souvislosti s genetickou variabilitou osob. (Otová, Mihalová, 2012). Obecným cílem oboru farmakogenomiky je vývoj individualizovaných léčebných postupů, především identifikace nejvhodnějšího typu a dávkování léčiv pro konkrétního pacienta (Brdička, 2014).

Studiem vztahu mezi genetickou výbavou jedince a účinku farmak se zabývají obory farmakogenetiky a farmakogenomiky. Tyto dva pojmy bývají poměrně často zaměňovány, ale rozhodně nejsou totožné. Obor farmakogenetika se zabývá vlivem jednotlivých genetických variant na účinek podané látky (léku), naopak farmakogenomika zkoumá totéž na úrovni celého genomu (Brdička, 2014).

Nejčastější příčinou genetické proměnlivosti ve farmakokinetických procesech léčiv jsou mutace lokalizované na typických místech genů enzymů, které se označují jako polymorfismy. Pojem genetický polymorfismus byl poprvé použit v roce 1940 a je definován jako existence dvou nebo více alel (variant genů) v jednom genetickém lokusu, převyšující svým výskytem 1 % výskyt v populaci. (Dostálek et al., 2006), (Wikipedia. Genetický polymorfismus, 2001).

Z celkového odhadovaného počtu 11-15 milionů genetických polymorfismů u člověka tvoří přes 90 % tzv. SNP (single-nucleotide polymorphisms = jednonukleotidový polymorfismus) (Otová, Mihalová, 2012). SNP znamená záměnu jedné báze za jinou, vyskytují se v lidském genomu přibližně jedenkrát na 1000 párů bází. Jelikož jen méně než 1,5 % DNA v lidském genomu kóduje proteiny, většina SNP se nachází mimo kódující sekvenci. A právě SNP v kódujících sekvencích jsou středem zájmu, protože s velkou pravděpodobností zaměňují biologickou funkci proteinů (Mladesoviočová, Didden, 2014).

## 1.2 Eliminace xenobiotik z organismu

Z hlediska schopnosti biotransformovat určitou látku se lidská populace rozděluje na:

- **Pomalí metabolizátoři (PM)** – u těchto jedinců jsou xenobiotika v důsledku přítomnosti mutantních (defektních) alel nemetabolizovány vůbec nebo pouze v omezené míře.



- **Střední metabolizátoři (IM)** – jedinci, kteří nesou buď jednu funkční a jednu defektní alelu, nebo nesou dvě alely s nižší metabolickou aktivitou.
- **Normální metabolizátoři (EM)** – většina jedinců, obě nesené alely jsou plně funkční a xenobiotika metabolizují normálně
- **Ultrarychlí metabolizátoři UM)** jedinci, kteří mají vyšší expresi enzymu (např. větší počet kopií pro daný enzym. Xenobiotika jsou metabolizovány intenzivněji a často vyžadují vyšší dávky (Matal, 2009).

Proces eliminace léčiv nebo jiných xenobiotik, které byly vpraveny do organismu, lze u eukaryot rozdělit do dvou základních fází (Řemínek, 2006).

### **1.2.1 První fáze biotransformace**

V průběhu první fáze biotransformace dochází zpravidla k zavedení polární funkční skupiny do základní molekuly xenobiotika. Jsou to především hydroxy  $-(-OH)$ , amino  $-(-NH_2)$ , merkapto  $-(-SH)$ , karbonylové  $(=CO)$  a karboxylové  $(-COOH)$  skupiny. (Dostálek et al., 2006). Tímto dochází nejen ke zvýšení polaritě xenobiotika a tím jsou snadněji vylučitelné močí, ale také se utváří funkční skupina schopná podstoupit reakce druhé fáze. Hlavní enzymy první fáze jsou hydrolázy (např. arylesterázy, cholinesterázy) a oxidoreduktázy (např. monooxygenázy, alkoholreduktázy, aldehydreduktázy, peroxidázy), (Řemínek, 2006).

Při oxidační přeměně xenobiotik se v první fázi biotransformace výrazně uplatňuje systém cytochromu P450 katalyzující oxidaci celého spektra endogenních i exogenních substrátů (Perlík, Slanař, 2015).

Xenobiotika obsahující již reaktivní skupiny ve své molekule nemusí podléhat první fázi biotransformace a ihned vstupují do procesu konjugační přeměny. (Řemínek, 2006).

### **1.2.2 Druhá fáze biotransformace**

Ve druhé fázi dochází ke konjugačním reakcím, např. s kyselinou glukuronovou, sírovou nebo s glycinem (Perlík, Slanař, 2015).

## **1.3 Cytochrom P450**

Cytochrom P450 patří do nadrodiny hemoproteinů. Poprvé byl objeven v roce 1958 v potkaních játrech. V roce 1963 byla objasněna funkce tohoto enzymatického systému. V dnešní době je enzymatický systém cytochromu P450 chápán jako velká skupina hemoproteiních monooxygenáz. Tento systém metabolizuje cizorodé chemické látky, se

kterými organismy přicházejí do kontaktu, nebo syntetizuje důležité látky tělu vlastní (např. steroidní hormony), (Dostálek et al., 2006).

### 1.3.1 Nomenklatura P450

Cytochrom P450 tvoří dohromady nadrodinu označovanou zkratkou CYP. Dále se člení na rodiny, které se označují arabskou číslicí ihned za zkratkou CYP. Do stejné rodiny jsou zařazeny CYP, které mají podobnost v primární struktuře alespoň 40 %. Dalším dělením je na podrodiny, které se označují velkým písmenem. Řazení do podrodin je přísnější než řazení do rodin. Do stejné podrodiny jsou zařazeny CYP, které mají podobnost v primární struktuře alespoň 60 %. Například enzym CYP2C19 je 19. členem podrodiny C patřící do rodiny 2. (Matal, 2009, Mádr, 2010).

### 1.3.2 Klasifikace cytochromu P450

**Tab. č.1.** Klasifikace lidských P450 na základě substrátové specifikace.

Steroly	Xenobiotika	Mastné kyseliny	Eikosanoidy	Vitaminy	???
1B1	1A1	2J2	4F2	24	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	26A1	2R1
7B1	2A6	4B1	4F8	26B1	2S1
8B1	2A13	4F12	5A1	27B1	2U1
11A1	2B6		8A1		2W1
11B2	2C8				3A43
17	2C9				4A22
19	2C18				4F11
21A2	2C19				4F22
27A1	2D6				4V2
39	2E1				4X1
46	2F1				4Z1
51	3A4				20
	3A5				26C1
	3A7				27C1

Převzato ze zdroje: (Dostálek et al., 2006)

### 1.3.3 Rodina CYP1

Rodina proteinu CYP1 zahrnuje tři funkční enzymy ve dvou podskupinách. Vysoce konzervované CYP1A1 a CYP1A2 se skládají ze sedmi exonů a šesti intronů a jsou lokalizovány na chromozomu 15q24.1, zatímco CYP1B1 se skládá pouze ze tří exonů lokalizovaných na chromozomu 2p22.2. (Zanger, Schwab, 2013).

### ***Role enzymů CYP1 v metabolismu léků***

Katalytické aktivity enzymů CYP1 se překrývají a zahrnují hydroxylace a další oxidační transformace mnoha polycyklických aromatických uhlovodíků a jiných aromatických látek. Zatímco CYP1A1 preferuje planární (rovinné) aromatické uhlovodíky, CYP1A2 ukazuje preferenci pro aromatické aminy a heterocyklické sloučeniny. Vzhledem ke své relativně vysoké expresi v játrech, CYP1A2 hraje významnou roli v metabolismu několika klinicky významných léků. Tyto zahrnují analgetika a antipyretika (paracetamol, fenacetin, lidokain), antipsychotika (olanzapin, clozapin), antidepresiva (duloxetin), protizánětlivé léky (nabumeton), kardiovaskulární léky (propramolol, guanabenz), inhibitor cholinesterázy takrin používaný k léčbě Alzheimerovy choroby, léčivo riluzor používaný k léčbě amyotrofické laterální sklerózy a mnoho dalších. (Zanger, Schwab, 2013).

#### ***1.3.3.1 Podrodina CYP1A***

Do podrodiny CYP1A řadíme enzymy CYP1A1 a CYP1A2 (Zanger, Schwab, 2013).

##### ***CYP1A1***

CYP1A1 je jedním z hlavních enzymů cytochromu P450, rozsáhle zkoumaný pro svou schopnost bioaktivace prokarcinogenů a teratogenů, jako jsou arylaminy a polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs), které se váží k placentární a fetální DNA jako DNA-adykty (Androutsopoulos et al., 2009), (Pávek, Stejskalová, 2011).

##### ***CYP1A2***

Význam enzymu CYP1A2 se pro lékové interakce stále roste v posledních deseti letech vzhledem k rostoucímu počtu léků metabolizovaných tímto enzymem. Mezi substráty CYP1A2 patří např. alosetron, flovatriptan, mexiletin, ropinirol a mnoho dalších. Léky, které inhibují CYP1A2, podle očekávání zvyšují plazmatické koncentrace některých léků, v některých případech se vyskytují i negativní výsledky. Za zmínku stojí lék fluvoxamin, což je silný inhibitor CYP1A2 a také silně inhibuje další enzymy CYP450 jako CYP2C19, CYP3A4 a do jisté míry CYP2C9. (Horn, Hanstein, 2007).

#### ***1.3.3.2 Podrodina CYP1B***

Podrodina CYP1B je zodpovědná za aktivaci heterocyklických aminů, vyskytujících se např. v pokrmech připravovaných na dřevěném uhlí, stejně tak za metabolismus endogenních estrogenů (Dostálek et al., 2006).

Lze ji najít v mozku, kůži, plicích, srdci, placentě, játrech, ledvinách, slezině a v gastrointestinálním traktu. Geneticky podmíněný deficit způsobuje zvýšení koncentrace signálních molekul, které mohou způsobit až rozvoj glaukomu. Specifický substrát pro určení metabolické aktivity není dosud znám (Dostálek et al., 2006).

#### **1.3.4 Rodina CYP2**

Rodina proteinu CYP2 je nejpočetnější a nejrozmanitější rodinou enzymatického systému cytochromu P450. Tato rodina zahrnuje pestré množství podrodin, mezi nejdůležitější patří CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D a CYP2E (Dostálek et al., 2006).

Geny rodiny CYP2 jsou rozloženy na různých chromosomech a organizovány v multi – genových shlucích, které obsahují jednu nebo několik subrodin. Mezi tři největší shluky patří shluk CYP2ABFGST lokalizovaný na chromozomu 19q13.2, který obsahuje geny CYP2A6 a CYP2B6, shluk CYP2C se nachází na chromozomu 10q23.33 s geny CYP2C8, CYP2C9 a CYP2C19, dalším shlukem je CYP2D na chromozomu 22q13.1-2 s jediným funkčním genem CYP2D6. (Zanger, Schwab, 2013).

##### **1.3.4.1 Podrodina CYP2A**

Podrodina CYP2A zahrnuje tři základní formy: CYP2A6, CYP2A7 a CYP2A13. Formu CYP2A6 pozorujeme převážně v játrech a má podíl na biotransformaci velkého počtu kancerogenních substrátů, zahrnujících N-nitrosodietylamin, alfatoxin B<sub>1</sub> a NNK (specifický nitrosamin tabáku). Metabolická aktivita formy CYP2A6 je výrazně zvyšována barbituráty. K této formě můžeme mezi substráty zařadit například metoxyfluran, halotan a pilokarpin. Kvantitativně představuje jenom asi 0,2 % cytochromu P450 (Dostálek et al., 2006).

##### **1.3.4.2 Podrodina CYP2B**

Role podrodiny CYP2B v biotransformačních procesech lidského organismu je dosud neznámá, a to i přes to, že byla jednou z prvních popsanych podrodin cytochromu P450. Forma CYP2B6 má důležitou úlohu v metabolismu nejrůznějších farmaceutických substancí, její role je dokázána při biotransformaci benzodiazepinů a amfetaminu, zároveň se také podílí při bioaktivaci antineoplastik, zejména ifosfamidů a cyklofosfamidů. Tato forma je jaterní i extrahepatální, v nízkých koncentracích je popisována v ledvinách, ve vysokých koncentracích v játrech. Tato forma je také zodpovědná po podání barbiturátů za mohutnou indukci metabolické aktivity. Ukazuje

se také, že induktorem metabolické aktivity by mohl být i nikotin. (Dostálek et al., 2006).

#### ***1.3.4.3 Podrodina CYP2C***

Z podrodiny CYP2C jsou u člověka zastoupeny čtyři základní formy: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19. CYP2C8, CYP2C9 a CYP2C19 jsou obzvláště důležité v metabolických reakcích přibližně 20 % léčiv dostupných na trhu. Velký počet genových polymorfismů je příčinou individuálních rozdílů ve farmakokinetice léčiv, terapeutických účincích a v projevu nežádoucích účinků léčiv. (Hiratsuka, 2016).

Forma CYP2C8 tvoří 6 % a forma CYP2C19 dokonce 16 % z množství cytochromu P450. Na celkové biotransformaci xenobiotik se obě formy podílí přibližně z 10 % (Dostálek et al., 2006).

#### ***Izoenzym CYP2C8***

CYP2C8 představuje přibližně 7 % z celkového počtu jaterních CYP enzymů a je zodpovědný za metabolismus více než 60 druhů léčiv používaných v klinické praxi (Hiratsuka, 2016).

Mezi léčiva metabolizována CYP2C8 zahrnujeme kupříkladu léčiva používaná v onkologii při léčbě nádorových onemocnění (např. paclitaxel), antidiabetika, léčiva snižující hladinu krevního cukru (např. paglinid, pioglitazon), antimalarika a hypolipidemika (Hiratsuka, 2016).

Proteiny CYP2C8 byly detekovány v ledvinách, játrech, střevě, mozku a jsou známy pro svou schopnost přeměňovat v ledvinách kyselinu arachidonovou na aktivní metabolity, které ovlivňují transport sodíku, resorpci vody a napětí cévních stěn (Horn, Hansten, 2011).

#### ***Izoenzym CYP2C9***

Tento izoenzym je zodpovědný za biotransformaci přibližně asi 10 % léků. Zajišťuje například degradaci nesteroidních antirevmatik (např. koxibů, ibuprofenu, indometacinu), warfarinu, perorálních antidiabetik (typu derivátů sulfonylurey) nebo za transformaci antagonistů receptorů AT<sub>1</sub> – sartanů (lasartanu, irbesartanu či valsartanu). U CYP2C9 byly identifikovány 3 alely, které vedou ke snížené aktivitě systému. Zásadní význam mají zejména genotypy nesoucí například alelu CYP2C9\*2 a CYP2C9\*3, neboť mohou vést až k 27násobnému snížení clearance substrátů, zejména perorálních antidiabetik či warfarinu, v porovnání s běžnou alelou. Nahromadění

warfarinu v organismu těchto osob je doprovázeno častými krvácivými komplikacemi a koncentrace účinné látky je velmi nízká. Četnost výskytu těchto genotypů je v naší populaci poměrně častá, typ CYP2C9\*2 se vyskytuje zhruba u 10-20 % jedinců a typ CYP2C9\*3 u 6–9 % (Bultas, 2005).

### ***Izoenzym CYP2C19***

Jaterní enzym CYP2C19 přispívá k metabolismu velkého množství klinicky významných léčiv, jako jsou benzodiazepiny, antidepresiva, některé inhibitory protonové pumpy a klopidogrelu. Podrobný přehled léčiv, která jsou substráty, induktory a inhibitory je uveden v Přílohách v tabulce č. 17. Stejně jako ostatní členové subrodiny CYP450 je i gen CYP2C19 vysoce polymorfní (dnes je známo více než 25 různých variant alel), (Scott et al., 2013).

Izoenzym CYP2C19 má významný podíl na přeměně proléčiva klopidogrelu na aktivní metabolit, který inhibuje agregaci destiček. Alely označovány jako CYP2C19\*2 a CYP2C19\*3 vedou ke snížené produkci aktivního metabolitu klopidogrelu a je spojována se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních příhod u pacientů po perkutánní koronární intervenci. Variantní alela s označením CYP2C19\*17 naopak vede ke zvýšení aktivity enzymu i k tvorbě aktivního metabolitu (Perlík, Slanař, 2015).

### ***1.3.4.4 Podrodina CYP2D***

#### ***Izoenzym CYP2D6***

Izoenzym CYP2D6 je významnou součástí cytochromu P450 i přes to, že relativní množství tohoto enzymu tvoří přibližně 2 % ze všech enzymů cytochromu P450. Tento izoenzym katalyzuje oxidaci 20-30 % běžně užívaných léčiv. Gen CYP2D6 je vysoce polymorfní, dnes je známo více než 120 variantních alel, jejichž frekvence výskytu se liší u různých lidských ras. Škála jeho substrátů je velmi rozsáhlá a zahrnuje lipofilní beta blokátory, psychofarmaka, některá antirytmika a opioidy (Perlík, Slanař, 2015).

### ***1.3.5 Rodina CYP3***

Z hlediska funkce v biotransformačních procesech xenobiotik i endogenních substrátů, lze tuto rodinu považovat jako nejdůležitější z celého systému cytochromu P450. V lidském organismu jsou nejvíce zastoupeny formy CYP3A4 a CYP3A5, které lze najít zejména v gastrointestinálním traktu, játrech, plicích, ledvinách, dále pak v centrální nervové soustavě, endotelu, lymfocytech a v placentě. Na formu CYP3A4/5 připadá z celkového množství enzymatického systému cytochromu P450 30 % a toto

množství se podílí přibližně z 52 % na celkové metabolické aktivitě cytochromu P450. Rodina CYP3 se podílí na metabolismu více než 150 léčiv, například fibráty, statiny, antiarytmika, opioidy, antidepressiva, makrolidová antibiotika a řadě dalších (Dostálek et al., 2006).

### 1.3.6 *Ostatní rodiny a podrodiny*

- Rodina proteinu CYP4 a její podrodiny CYP4A až CYP4M
- Rodina proteinu CYP5
- Rodina proteinu CYP7 a její podrodiny CYP7A a CYP7B
- Rodina proteinu CYP8 a její podrodiny CYP8A a CYP8B
- Rodina proteinu CYP11 a její podrodiny CYP11A a CYP11B
- Rodiny proteinů CYP17, CYP19, CYP20, CYP21, CYP24, CYP26, CYP27, CYP39, CYP46, CYP51 (Dostálek et al., 2006).

## 1.4 *Cévní mozková příhoda*

Cévní mozková příhoda (CMP) je onemocnění cévního původu, které je charakterizováno náhle vzniklou ložiskovou či celkovou poruchou mozkové funkce trvající více než 24 hodin. Příhody s kratším trváním označujeme jako tranzitorní ischemické ataky (TIA). Jedná se o onemocnění s vyšší incidencí převážně ve vyspělých státech (100-200 příhod na 100 000 obyvatel ročně) a řadí se na třetí místo jako nejčastější příčina mortality po zhoubných nádorech a nemocech srdce (Fiksa, 2008).

Nejčastějším důvodem onemocnění nervového systému jsou cévní příčiny, a to buď následkem krvácení, nebo z nedostatečného prokrvení (Bělousovová, 2012). Mezi rizikové faktory přispívající ke vzniku cévní mozkové příhody řadíme nemoci srdce, arteriální hypertenzi, diabetes mellitus, kouření, obezitu, rizikové imunogenetické faktory (např. antifosfolipidový syndrom) i rizikovou medikaci (Bartůněk et al., 2016).

**Tab. č.2.** Nejčastější příčiny uzávěru krční a mozkové tepny.

<b>proces</b>	<b>lokalizace</b>
ateroskleróza	Krční a mozkové tepny (ACI, ACM)
Embolizace (aorta, srdce, AS pláty)	Mozkové tepny
mikroangiopatie	Drobné mozkové tepny (perforátory)

Převzato ze zdroje: (Hutyra, 2011)

**Tab. č.3.** Méně časté příčiny uzávěru krční a mozkové tepny.

Disekce krční tepny (ACI, AV): traumatická, spontánní
Trombofilní stavy
Vaskulitidy a vaskulopatie při systémových nemocech pojiva
Vazospazmy (např. při subarachnoideálním hematomu)
Arterioarteriální embolizace z vaku částečně trombotizovaného aneuryzmatu.

Převzato ze zdroje: (Hutyra, 2011)

#### **1.4.1 Dělení CMP**

Dle mechanismu svého vzniku lze rozdělit cévní mozkové příhody:

- **Hemoragické CMP** (mozková krvácení, vyskytuje se přibližně v 20 % všech CMP) – nejčastěji vznikají důsledkem ruptury mozkové tepny
- **Ischemické CMP** (mozkové infarkty, jedná se o nejčastější typ CMP, vyskytuje se v 80%) – příčinou ischemické CMP může být např. embolie, tepenná trombóza (uzávěr tepny) nebo systémová hypoperfuze. Tyto příčiny způsobují pokles zásobení mozku kyslíkem, což může vést až k odumření mozkové tkáně (Slezáková et al., 2016).

#### **1.4.2 Rizikové faktory**

Rizikové faktory u CMP lze rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné (Dufek, 2002).

#### **1.4.3 Ovlivnitelné rizikové faktory**

a) **hypertenze** – hypertenze je společně s onemocněním srdce považována za nejdůležitější rizikový faktor CMP. Doporučené hodnoty krevního tlaku jsou  $\leq 120$  torr systoly a  $\leq 80$  torr diastoly. Obecně by léčba měla zahrnovat kromě léčby farmakologické i změnu životního stylu (tělesné cvičení, omezený příjem sodíku a omezená konzumace alkoholu (Dufek, 2002).

b) **onemocnění srdce**-mezi srdeční onemocnění, která mají hlavní vliv na vznik CMP, patří:

- Kardiální dekompenzace
- Fibrilace síní
- Infarkt myokardu
- Cor pulmonale
- Mitrální vada



- Defekt septa s paradoxní embolizací z žilního systému velkého oběhu (Dufek, 2002)

c) **Diabetes mellitus** – u lidí s diabetes mellitus je riziko iktu až 6x vyšší. DM zvyšuje kardiovaskulární morbiditu, má vliv na aterosklerózu a na změny v cévním systému. Mortalita diabetiků s iktem je 3x vyšší (Bělousovová, 2012).

d) **Hyperlipoproteinémie** – Hyperlipoproteinémie je typickým rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění, u cerebrovaskulárních onemocnění je vzájemný vztah mezi zvýšenou hladinou cholesterolu a iktem malá (Dufek, 2002).

c) **kouření** – kouření je považováno za jeden z nejvýznamnějších rizikových faktorů pro onemocnění srdce a periferních tepen. Jedná se o významný faktor zejména u mladých lidí, zesílené riziko výskytu je u mladých dívek při současném užívání hormonální antikoncepce (Dufek, 2002).

#### **Další rizikové faktory**

Mezi další rizikové faktory patří například migréna, nedostatek pohybu, nemoci spánku, užívání hormonální antikoncepce, obezita, nadměrné užívání drog (Dufek, 2002).

#### **1.4.3.1 Neovlivnitelné rizikové faktory**

a) **věk**

b) **pohlaví** – lehce vyšší výskyt CMP je prokázáno u mužů, především v nižších věkových skupinách, ve vyšším věkových skupinách už není tento rozdíl tak patrný.

c) **genetická zátěž** – nejzávažnějšími genetickými vlivy jsou zejména typ metabolismu lipidů, sklon k diabetes mellitus, dispozice k určitému typu reakce na stres (Dufek, 2002).

#### **1.4.4 Diagnostika CMP**

Rozbor anamnézy a klinického obrazu pacienta tvoří základ diagnostiky CMP. Při vyšetření se provádí několik diagnostických úkonů různého zaměření.

- CT mozku
- EKG a rtg plic
- Biochemické vyšetření – KO, CRP a sedimentace, glykémie, urea, kreatinin, kyselina močová, renální a hepatální biochemické vyšetření
- Pulzní oxymetrie
- Ojedíněle lumbální punkce

- Duplexní a transkraniální neurosonologie
- Při podezření na epilepsii EEG
- MRI a MRA, CTA
- U některých případů MR
- U indikovaných případů transthorakální a transesofageální echokardiografie (Bělousovová, 2012)

#### ***1.4.5 Léčba CMP***

##### ***Přednemocniční péče***

Důležitou roli v přednemocniční péči hraje informovanost veřejnosti o typických příznacích a závažnosti CMP a s tím spojené včasné zkontaktování záchranné služby. Důležitým aspektem úspěšné léčby iktu je časový interval od počátku příznaků iktu do příjezdu pacienta do nemocnice. Tento interval by neměl být delší, než 90 minut což je dle statistik dosaženo pouze u malého procenta pacientů (Bauer, 2010).

##### ***Léčba ischemických CMP***

- Zajištění vitálních funkcí
- Odstranění vyvolávající příčiny
- Zajištění adekvátního průtoku mozkovým řečištěm
- Zprůchodnění uzavřené cévy – **trombolýza** (léčebná metoda vedoucí k obnovení průchodnosti tepny po jejím předchozím uzávěrem)
- Farmakologická léčba
  - a) antiagregační léčba

**Tab. č.4.** Přehled protidestičkových léků.

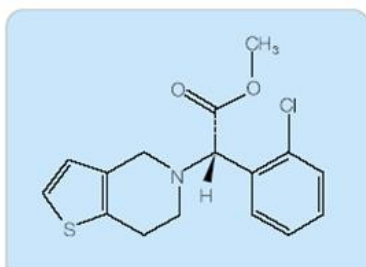
<b>Inhibitory cyklooxygenazy 1 (COX 1)</b>
• ASA
• NSADP
<b>GP IIb/III antagonisté</b>
• abciximab
• epifibatid
• tirofiban
<b>P2Y (12) receptor antagonisté</b>
• clopidogrel
• prasugrel
• cangrelor
• ticagrelor
<b>PAR antagonisté</b>
• vorapaxar
• atopaxar

Převzato ze zdroje: (Penka, 2012).

#### **1.4.6 Klopidogrel**

Klopidogrel, chemicky methyl(+)-(S)-a-(2-chlorfenyl)-6,7-dihydrothieno[3,2-C]pyridin-5(4H) acetát (obr. č. 1), společně s prasugrelem a tiklopidinem patří do skupiny thienopyridinů. Aktivní metabolit klopidogrelu selektivně inhibuje vazbu adenosindifosfátu (ADP) na jeho destičkový receptor P2Y12 a následně ADP – zprostředkovanou aktivaci glykoproteinového komplexu GPIIb/IIIa, čímž dochází k inhibici agregace trombocytů a vytvoření sítě spolu s fibrinem (Mořovská et al, 2006), (Vocilková, 2011).

Jedná se tedy o protidestičkové léčivo, které se v medicíně používá pro předcházení atherotrombotických příhod u pacientů po infarktu myokardu, u pacientů s akutním koronárním syndromem, ischemické cévní mozkové příhodě a u pacientů s prokázanou ischemickou chorobou dolních končetin (Klopidogrel, SÚKL, ©2010).



**Obr. č. 1-** chemický strukturní vzorec klopidogrelu, Převzato ze zdroje: (Mořovská et al, 2006)

### ***Farmakokinetika***

- *Vstřebávání (absorpce)*

Klopidogrel je rychle metabolizován v játrech krátce po absorpci z gastrointestinálního traktu. Na základě analýz koncentrace metabolitů v moči a ve stolici je absorpce klopidogrelu odhadována na 50 %. Účinek složení stravy na vstřebávání klopidogrelu dosud není znám (Mořovská et al, 2006)

- *Distribuce*

Hlavní metabolit klopidogrelu je v plazmě vázán na plazmatické bíkoviny z 94-98 % (Mořovská et al, 2006).

- *Metabolismus*

Metabolizace klopidogrelu probíhá v játrech, kde je hydrolyzován karboxylesterázou na hlavní cirkulující metabolit SR26334 a dále oxidován a biotransformován na další metabolity. Aby se vytvořil aktivní metabolit, musí být klopidogrel metabolizován enzymy cytochromu P450. Aktivní metabolit klopidogrelu se ireverzibilně váže na receptor pro ADP na povrchové membráně trombocytů, čímž nedochází k ADP dependentní aktivaci glykoproteinu GP IIb/IIIa a k vazbě fibrinogenu na tento receptor. Klopidogrel tímto uvedeným mechanismem brání ADP indukované agregaci krevních destiček (Janský, 2001).

- *Eliminace*

Po perorální dávce je renální exkrece neaktivního metabolitu zhruba 50 %, stolicí je vyloučeno okolo 46 % podaného množství. Jeho eliminační poločas se pohybuje mezi 7 a 8 hodinami (Mořovská et al, 2006).

### ***Farmakogenetika***

Klopidogrel je přeměňován pomocí jaterního CYP systému na aktivní látku. Některé enzymy CYP450 jsou polymorfni nebo mohou být ovlivněny jinými léčivy, čímž nedochází u všech pacientů k dostatečné inhibici agregace trombocytů. Hlavní roli hraje izoenzym CYP2C19, který se podílí na vzniku aktivního metabolitu i intermediárního metabolitu 2 – oxo – klopidogrelu. Účinek klopidogrelu je závislý na genotypu CYP2C19. Za standardní alelu je považována alela CYP2C19\*1, která je spojena s plně funkčním metabolismem, naopak alely označovány CYP2C19\*2 a CYP2C19\*3 jsou spojeny se sníženým metabolismem. Alely označené CYP2C19\*17 se vyznačují se zvýšeným metabolismem, čímž dochází u jedinců s touto alelou ke

zvýšené koncentraci aktivního metabolitu (Vocilková, 2011), (Klopidogrel, SÚKL ©2010).

b) antikoagulační léčba

- \* *Heparin*
  - \* *Warfarin*
- 
- Časná rehabilitace a fyzioterapie (Vítovec, Špinar, 2004)

### ***Léčba hemoragické CMP***

- Zajištění vitálních funkcí
- Odstranění vyvolávající příčiny
- Udržování přiměřeného nitrolebního tlaku
- Tlumení bolesti hlavy
- Operační řešení
- Farmakologická léčba
- Časná rehabilitace a fyzioterapie (Vítovec, Špinar, 2004)

### ***Následná péče***

Následná péče u pacienta, který prodělal cévní mozkovou příhodu, je odvíjena od léčebného výsledku, od stupně postižení a od sociálního zázemí nemocného člověka. Součástí péče u pacientů s následky je především rehabilitace pod dohledem odborného vedení, která je zaměřena na to, aby zdravá část mozku převzala co možná nejvíce funkci postižené tkáně (Nováková, 2012). Poměrně častým následkem cévní mozkové příhody je poškození řečových center, kdy dochází buď k postižení výslovnosti (dysartrie) nebo vyjadřování (afazie) – například postižený ví, co chce říci, ale nemůže se vyjádřit. Léčbou takových poruch se zabývají logopedi (sdružení CMP, [b. r.]).

## 2 Cíl práce

### **Cílem mé bakalářské práce bylo:**

- Seznámit se s problematikou antiagregační léčby, farmakogenetiky klopidogrelu a dalších antiagregačních léčiv a s oblastí cytochromu P450, zejména 2C19
- Praktické zvládnutí laboratorních metod – izolace DNA, Real Time PCR, provést stanovení genetického polymorfismu alel CYP2C19 \*1, \*2, \*3, \*17
- Zhodnotit přínos genetické diagnostiky pro management pacientů po iktu

## 3 Metodika

### 3.1 Charakteristika souboru

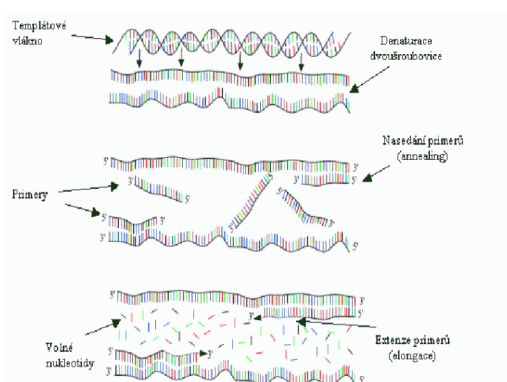
Praktickou část bakalářské práce jsem vykonala v Nemocnici České Budějovice a.s., v laboratoři molekulární biologie a genetiky pod vedením Mgr. Ondřeje Scheinosta. Veškerá vyšetření byla prováděna pod dohledem kvalifikovaného pracovníka. Soubor tvořili pacienti nejčastěji z oddělení neurologie a neurochirurgie Nemocnice České Budějovice a.s.

### 3.2 Principy laboratorních metod

#### 3.2.1 Polymerázová řetězová reakce – PCR

Důležitým krokem ve studiu molekuly DNA byl objev polymerázové řetězové reakce (PCR) v 80. letech 20. století Kary Mullisem. V roce 1993 za tento objev obdržel Nobelovu cenu za chemii (Trnčáková, 2016).

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z anglického Polymerase Chain Reaction) je základní metodou molekulární biologie, umožňující rychlé zmnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA (PCR, LabGuide, [b. r.]). Amplifikovaný úsek DNA je ohraničen tzv. primery (oligonukleotidy), což jsou fragmenty DNA o 20-25 nukleotidech, které díky své komplementaritě přisedají právě ke koncům vybraného úseku. Od přisedlých primerů probíhá syntéza DNA (PCR, LabGuide, [b. r.]). Samotnou syntézu provádí termostabilní DNA polymeráza, izolovaná nejčastěji z bakterie *Thermus aquaticus*, odtud označení Taq polymeráza. Jelikož je tento enzym termostabilní, uchovává si svou aktivitu i přes několikeré působení teploty blízké se teplotě varu. V průběhu reakce je využíváno cyklických změn teplot, které umožní rozvolnění (denaturaci) DNA, přisedání primerů a syntézu DNA (PCR, LabGuide, [b. r.]).



1. krok – denaturace

2. krok – nasednutí primerů

3. krok – syntéza DNA

**Obr. č. 2** – Průběh PCR reakce. Převzato ze zdroje: (Zorníková, 2012).

Reakce PCR se skládá z několika kroků:

1. Denaturace – DNA se po dobu 20-30 sekund zahřívá na teplotu 94-98 °C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a k rozvolnění dvoušroubovice. Vzniká tak jednovláknová DNA, na kterou mohou v dalším kroku nasedat primery (Wikipedia, Polymerázová řetězová reakce, 2001).
2. Nasednutí primerů – teplota se snižuje na 50-65 °C, což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa DNA. Na dvouvláknové úseky DNA – primer se váže DNA polymeráza (Wikipedia, Polymerázová řetězová reakce, 2001).
3. Syntéza DNA – teplota použitá v této fázi závisí na použité DNA polymeráze. Nejběžnější Taq polymeráza má optimum aktivity v praxi 72 °C, při 2 kolových PCR se teplotní optimum pohybuje okolo 60°C. V tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru od 5' konce k 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA (Wikipedia, Polymerázová řetězová reakce, 2001).

Tyto tři kroky se cyklicky opakují, pro dostatečnou amplifikaci původní molekuly DNA postačí obvykle 30-40 cyklů. Detekce amplifikovaných fragmentů DNA se provádí pomocí gelové elektroforézy (Zorníková, 2012).

### **3.2.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase – Real Time PCR**

Real Time PCR je metoda založená na principu PCR, která umožňuje přímou kvantifikaci PCR produktu v průběhu reakce. Kvantifikace množství molekul nukleových kyselin je důležitá při detailním studiu genové exprese nebo diagnostice některých patogenů (Grussmannová, 2013).

Při metodě Real Time PCR reakční směs obsahuje buď interkalační látky schopné fluorescence nebo fluorescenční sondy, které během PCR hybridizují k řetězcům vznikajících aplikonů. Mezi interkalační látky řadíme SYBR Green, Amplifluor a SYBR Gold (Beránek, 2016).

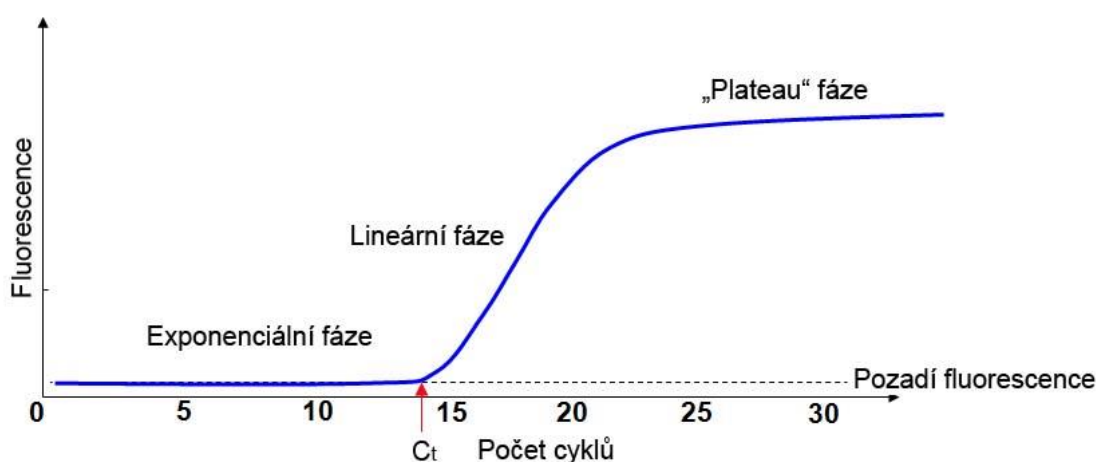
Sondy se dělí na:

- Hydrolyzační sondy (TaqMan sondy nebo Probe Library sondy)
- Hybridizační sondy (duální hybridizační sondy, Eclipse sondy, Molecular Beacons, ResonSence sondy, Hybeacons, Ying-Yang sondy, Light-up sondy a sondy Scorpions), (Beránek, 2016).



K emisi fluorescenčního záření dochází jen v tom případě, pokud je v reakční zkumavce amplifikován templát DNA. Reakce probíhá v přístroji zvaném termocykler, vybaveném zdrojem záření (LED dioda, xenonová lampa nebo laser) a příslušným typem detektoru (CCD kamera, fotonásobič), který zaznamenává fluorescenci. Chlazení se provádí nasáním vzduchu z okolního prostředí, zahřívání probíhá pomocí topné spirály nebo halogenovou lampou (Beránek, 2016).

Tvorbu produktů při reakci Real Time PCR lze na obrazovce monitoru sledovat v průběhu procesu v „reálném čase“, tím pádem se neprovádí elektroforetická detekce produktů (Beránek, 2016).



**Obr. č.3** – Záznam fluorescence při Real Time PCR. Převzato ze zdroje: (Real Time PCR, LabGuide, [b. r.]).

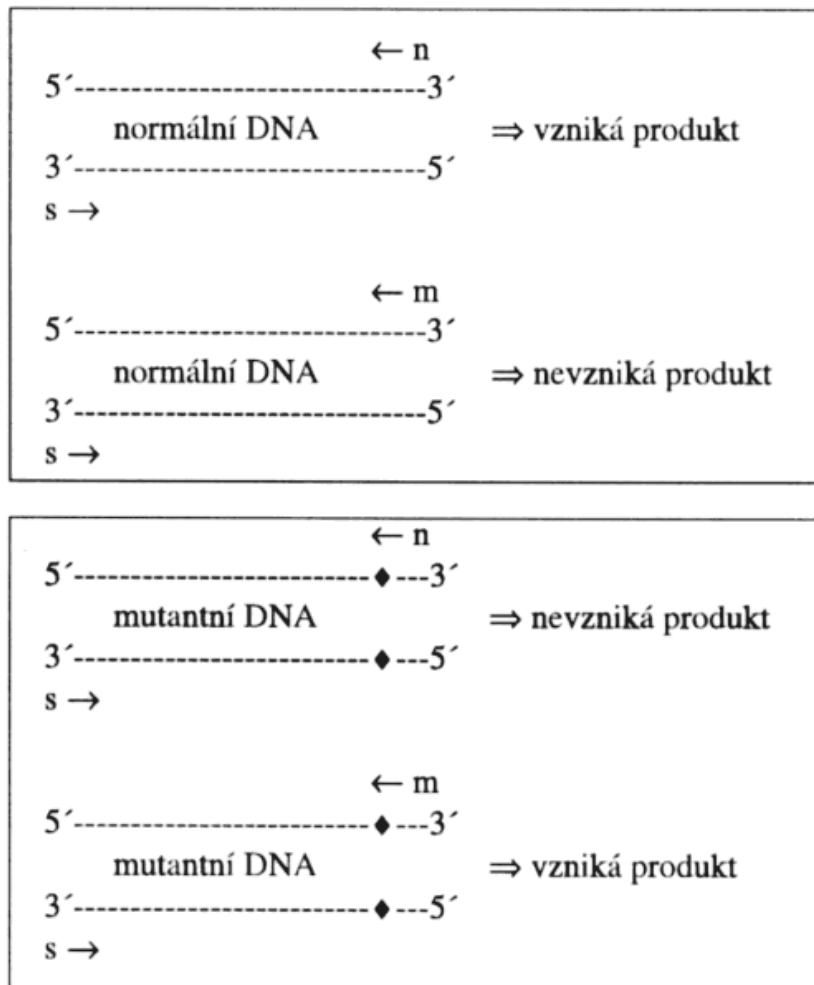
### 3.2.3 AS – PCR

AS – PCR neboli alelově specifická PCR je metoda využívaná k detekci malých delecí a bodových mutací. Principem je využití tří různých primerů, které jsou vybrány na základě sekvenční komplementarity s mutovanou, nemutovanou či variantní alelou. Tyto primery se hybridizují ke standartní nebo mutované alele, kdy jeden primer je společný pro obě alely. Nejčastěji se využívá varianta ARMS (amplification refractory mutation detection system, amplifikační refrakční mutační systém) (Zima, 2007).

#### **PCR ARMS**

Principem PCR ARMS je přesná komplementarita bázi na 3' konci primeru. Jestliže nenastane komplementarita, nedojde ke specifické amplifikaci, což je základním principem AS – PCR. K odlišení specificky chybějící amplifikace od nespecifického selhání samotné PCR je důležité použít vnitřní kontrolu reakce. Test je založen na dvou

samostatných reakcích. Jedna reakce je specifická pro mutovanou nebo variantní sekvenci DNA. Druhá reakce je specifická pro normální DNA sekvenci. Výhodou této metody je jednoduchost, spolehlivost a jasné rozlišení heterozygotů od homozygotů ve sledovaném lokusu pro jednu nebo druhou alelu (Zima, 2007).



**Obr.č.4:** Princip reakce ARMS a AS-PCR. Převzato ze zdroje: (Zima, 2007).

Pokud je jedinec nemutovaný homozygot, vytvoří se PCR produkt pouze při použití primeru pro nemutovanou formu genu a společného primeru. Jestliže se jedná i mutovaného homozygota, tak dochází k vytvoření PCR produktu v amplifikační reakci s primerem komplementárním k mutované nebo variantní alele daného genotypu a společným primerem. Jestliže dojde ke vzniku produktu v obou amplifikačních reakcích se společným a mutovaným primerem i společným a nemutovaným primerem, jedná se o heterozygota (tab. 5), (Zima, 2007).

**Tab.č.5:** Princip hodnocení ARMS a AS – PCR.

Genotyp	Oligonukleotidy	Produkt reakce
Homozygot nebo Hemizygot normální	s + n	ano
	s + m	ne
heterozygot	s + n	ano
	s + m	ano
Homozygot nebo hemizygot mutantní	s + n	ne
	s + m	ano

s – společný, n – normální, m – mutantní primer. Převzato ze zdroje: (Zima, 2007).

### ***RFLP – PCR***

RFLP – PCR (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism, polymerázová řetězová reakce – polymorfismus délky restričních fragmentů) je metodou, využívající identifikaci amplifikovaného PCR produktu pro vybrané oblasti genomové DNA. Tato metoda se skládá ze dvou hlavních kroků – v prvním kroku je pomocí PCR namnožen (amplifikován) úsek DNA, ve kterém jsou místa výskytu mutace. V následujícím kroku následuje štěpení pomocí restričních endonukleáz. Existuje velké množství těchto endonukleáz, které jsou od sebe odlišné tím, že rozpoznávají různě dlouhé sekvence nukleotidů a štěpí DNA na různě dlouhé fragmenty na základě rozpoznané sekvence a podle individuálního pořadí bází. Pro daného jedince je počet i délka fragmentů specifické (Zima, 2007), (Beránek, 2016).

#### ***3.2.4 Hybridizační metody***

Hybridizační metody patří k nejstarším molekulárně genetickým vyšetřovacím metodám, (Matějková, 2016).

##### ***3.2.4.1 Reverzní hybridizace***

Metoda reverzní hybridizace se využívá k detekci SNP polymorfismů a bodových mutací. Principem je hybridizace dvou jednovláknových molekul nukleových kyselin na základě jejich komplementarity, tzn. vznik vodíkových vazeb mezi adeninem a thyminem a mezi guaninem a cytosinem, za vzniku dvouvláknové molekuly. Jedno vlákno je referenční úsek DNA a druhé vlákno je vyšetřovaná DNA. Celý proces se skládá z 3 kroků:

1. Izolace DNA
2. Amplifikace analyzovaných genových sekvencí

### 3. Hybridizace genových sekvencí k referenčním sekvenčně specifickým sondám ukotvených na pevném podkladě, (Matějková, 2016)

Jako hybridizační sonda se využívá nukleová kyselina komplementární k sekvenci testované molekuly. Nejčastěji se jako sondy využívají dvouřetězcové molekuly DNA, jednořetězcové molekuly DNA, molekuly RNA a syntetické oligonukleotidy. Sondy bývají na jednom z konců nebo uvnitř opatřeny vhodnou radioaktivní nebo neradioaktivní značkou umožňující následnou identifikaci sondy po hybridizaci s nukleovou kyselinou. Dříve se upřednostňovalo radioaktivní značení pomocí radioizotopů ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ). Dnes se z hlediska bezpečnosti používá neradioaktivní značení využívající chemickou modifikaci sond (biotinem, digoxigeninem, sulfonovaným cytidinem, acetylaminofluorenylem). Při neradioaktivním značení jsou sondy detekovány pomocí protilátky s navázanou např. alkalickou fosfatázou (ALP), která reaguje s přidaným substrátem s výslednou kolorimetrickou či chemiluminiscenční reakcí, (Matějková, 2016), (Hybridizační metody, LabGuide, [b. r.]).

#### ***3.2.4.2 Reverzní hybridizace na stripech***

Při reverzní hybridizaci na stripech se používá jako pevný nosič např. nitrocelulosová membrána ve tvaru proužku (stripu), na kterém je komerčně zafixovaná jednořetězcová neznačená sonda. Sonda může obsahovat běžnou (wild-type, wt) sekvenci nebo sekvenci obsahující předpokládaný typ mutace. V tomto případě je značený PCR produkt, nebo obecně vyšetřovaná nukleová kyselina pomocí biotinu. Pokud nedojde k hybridizaci PCR produktu na strip, dochází k jeho odmytí. Po následném přidání alkalické fosfatázy konjugované se streptavidinem a příslušného chromogenního substrátu dojde k fialovému zbarvení nahybridizovaných PCR produktů. Výslednou reakci lze odečítat pouhým okem, (Matějková, 2016), (Beránek, 2016).

#### ***Sekvenování DNA***

Sekvenování DNA umožňuje stanovit pořadí nukleotidů v genomu. Existuje několik různých metod sekvenování, často automatizované. Jednou z nich je enzymatická Sangerova metoda. Tato metoda je založena na enzymatické terminaci syntézy vlákna DNA po zabudování dideoxyribonukleotidu, který se začleňuje do vlákna syntetizované DNA náhodně na místo nukleotidu. Následně se nemůže syntetizovaný řetězec DNA dále prodlužovat. Výsledkem je vznik různě dlouhých

fragmentů DNA, které na konci mají určitý dideoxyribonukleotid značený fluorochromy – ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP. Koncový dideoxyribonukleotid a délka fragmentu informuje o sekvenci nukleotidů ve vyšetřovaném vzorku DNA (Otová, Mihalová, 2012).

### **3.3 Materiál**

Výchozím materiálem pro PCR reakce je vyizolovaná DNA z periferní krve. Pro vyšetření je vyžadován vzorek periferní krve odebrán do sterilních zkumavek. Laboratoř preferuje primární vzorky odebrané do protisrážlivého roztoku K<sub>3</sub>EDTA.

Pro přijetí žádanky o provedení laboratorního vyšetření musí být kromě správně vyplněné žádanky i vhodně označený primární vzorek. Nesprávně nebo neúplně označené vzorky vedou k odmítnutí provedení vyšetření. Nezbytnou identifikaci biologického materiálu před přidělením laboratorního čísla tvoří čitelné příjmení pacienta a číslo pojištěnce. Materiál je po přijetí a zapsání do centrální databáze OpenLims zpracován nebo uložen v lednici. Přijaté vzorky krve se zpracovávají nejpozději do 3 dnů.

### **3.4 Potřebná zařízení**

#### **3.4.1 Laboratoř pro izolaci**

- Centrifuga
- Dry block
- Izolační box s laminárním prouděním vzduchu
- izolátor MagCore® (MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit (RBCBioscience))
- Izolátor QuickGene-Mini80
- Lednice s mrazákem
- Sada nastavitelných mikropipet
- Pikofuga
- Teploměry k lednicím a mrazákům
- Vortex

#### **3.4.2 Laboratoř pro amplifikaci**

- Light Cycler 480 Instrument II (Roche) s počítačem se softwarem pro přístroj Light cycler

### **3.4.3 Laboratoř pro přípravu reakčních směsí**

- PCR box
- Mrazák
- Pikofuga
- Sada nastavitelných mikropipet
- Teploměr k mrazáku
- Vortex

### **3.4.4 Spotřební materiál**

- Sterilní mikrozskumavky 1,5ml a 0,2ml
- Sterilní špičky k mikropipetám
- Sterilní pasteurky
- Rukavice
- Popisovače
- Stojánky (NCB\_LMBG\_SOP\_12\_012\_B).

## **3.5 Postupy genetického vyšetření**

Následující popsané genetické metody jsem si osobně vyzkoušela pod odborným dohledem v laboratoři molekulární biologie a genetiky v Nemocnici České Budějovice a.s.

### **3.5.1 Izolace DNA**

Izolace DNA je dnes rutinní technikou molekulární biologie. Jedná se o proces získání DNA ze zkoumaného vzorku, nejčastěji z lymfocytů periferní krve (Wikipedia, Izolace DNA, 2001).

#### **3.5.1.1 Izolace genomové DNA z plné krve (QuickGene DNA whole blood kit S (DB-S))**

##### Reagencie:

- 96 % ethanol
- Proteasa EDB (EDB)
- Lysis buffer (LB)
- Wash buffer (WDB)
- Elution buffer (CDB)

Před začátkem práce si pro jeden vzorek připravíme 1,5 ml mikrozkušavku na lyzi a jednu 1,5 ml mikrozkušavku na eluci. Vyhřejeme suchou lázeň na 56 °C.

#### Pracovní postup

V prvním kroku napipetujeme 30 µl EDB do označené 1,5 ml mikrozkušavky a přidáme 200 µl krve a 250 µl LDB. Následně vzorek zvortexujeme po dobu 15 sekund a krátce zcentrifugujeme. Následuje inkubace při 56 °C po dobu 10 minut. Po proběhlé inkubaci přidáme 250 µl 96 % ethanolu. Směs poté zvortexujeme po dobu 15 sekund a krátce stočíme.

Popsané kolonky, odpadní nádoby a popsané 1,5 ml mikrozkušavky na eluci umístíme do QuickGene stojánku. Následně na kolonku přeneseme lyzát. Poté přidáme cca 750 µl WDB a následně provedeme odsání. Přidáme 750 µl WDB a odsajeme. Potřetí přidáme 750 µl WDB a odsajeme. Kolonky přesuneme do připravených a řádně označených 1,5 ml mikrozkušavek, přidáme 150 µl temperovaného elučního pufru (CDB) a vzorek inkubace po dobu jedné minuty. V následujícím kroku pufr odsajeme a vzniklou DNA uložíme do lednice (- 70 °C) k pozdějšímu zpracování.

### ***3.5.2 Izolace genomové DNA z plné krve (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood (Roche))***

#### Reagencie

- Red Blood Cell Lysis Buffer
- White Blood Cell Lysis Buffer
- Protein Precipitation Solution
- Vymražený 96 % ethanol
- 96 % ethanol
- Eluční pufr

#### Pracovní postup

Do označené 50 ml zkumavky nalijeme Red Blood Cell Lysis Buffer (RBCL) v poměru 3 díly pufru/1 díl krve, přidáme krev (původní zkumavku uchováme pro případnou izolaci jinou metodou) a protřepeme na vertikální třepače po dobu 15-30 minut / 150 rpm, v případě nedostatečné lyze buněk lze dobu prodloužit. Dalším krokem je centrifugace 900 x g/10 minut. Poté vzniklý supernatant slijeme a dáme vzorek roztřepat na vortex a následně přidáme 7 ml Red Blood Cell Lysis Buffe. Opět vzorek zcentrifugujeme 900 x g/ 10 minut a slijeme vzniklý supernatant. Vzniklý sediment roztřepeme na vortexu, přidáme White Blood Cell Lysis Buffer a promícháme

převrácením zkumavky. Pokud by vzorek obsahoval heparin, následovala by inkubace 65 °C/ 10 minut. Poté přidáme Protein Precipitation Solution, vzorek důkladně zvortexujeme minimálně po dobu 30 s a dáme zcentrifugovat 12 000 x g/ 10 minut. Vzniklý supernatant přelijeme do čistých označených 50 ml zkumavek, přidáme cca 2 díly 96 % ethanolu a jemným krouživým pohybem opatrně vysrážíme DNA.

### **3.5.3 Izolace genomové DNA s izolátorem MagCore® (MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit (RBCBioscience))**

#### Reagencie a jejich skladování

- MagCore® Genomic DNA Whole Blood Kit – skladovat při pokojové teplotě
- MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction Kit – skladovat při pokojové teplotě
- Carrier RNA – před prvním použitím přidáme k lyofilizátu 1000 µl RNase free H<sub>2</sub>O (součást balení), skladujeme v alikvotech v mrazáku při – 20 °C.
- Proteináza K – před prvním použitím přidáme k lyofilizátu 1100 µl PK Storage Buffer (součást balení), skladujeme v alikvotech v mrazáku při – 20 °C.

Přístroj MagCore je automat sloužící k automatické izolaci nukleových kyselin za pomoci kulovitých magnetických partikulí. Tato metoda se vyznačuje vysokou reprodukcibilitou, úsporou času a personálních nákladů, současně také minimalizuje riziko křížové kontaminace a eliminuje selhání lidského faktoru.

#### Pracovní postup

Před samotnou izolací DNA se nechá přístroj vysvítit UV světlem, čímž dochází ke sterilizaci. Vyndáme kovové stojánky z přístroje a vložíme do nich předplněné cartridge dle počtu izolací, zkumavky na vzorky, špičky a zkumavky na izolát. V izolačním boxu se do připravených zkumavek sterilní pipetou odebere 200 µl vzorku. Vše umístíme do přístroje a spustíme příslušný program. Po ukončení programu se vyjmou izoláty. Ty se jeden den uchovávají v lednici, po delší dobu v mrazícím boxu.

### **3.5.4 Měření koncentrace a čistoty DNA**

Koncentrace a čistota DNA byla naměřena pomocí spektrofotometru značky DeNovix DS-11

- Všechny vzorky je třeba před měřením jemně protřepat
- Jako blank se používá destilovaná laboratorní voda



Nejdříve zapneme přístroj DeNovix DS-11 Spectrophotometer a spustíme program ds DNA. Po spuštění programu nejprve změříme blank. Ručně zvedneme rameno spektrofotometru, na čočku nanese 1,5 µl destilované laboratorní vody, rameno opět sklopíme a vybereme možnost Blank. Po změření rameno zvedneme, blank dobře otřeme pomocí čtverečku buničiny. Poté můžeme začít měřit vzorky DNA. Do okna Vzorek vyplníme číslo pacienta, naneseme čistou špičkou na čočku 1,5 µl DNA a rameno opatrně sklopíme a vybereme možnost Měření. Po dokončení měření odečteme koncentraci v jednotkách ng/µl a čistotu označenou 260/280. Po dokončení měření rameno zvedneme a čočku i horní část ramena a dobře otřeme čtverečkem buničiny (NCB\_LMBG\_PP\_12\_071\_B).

### 3.5.5 CYP 2C19 sondy – příprava master mixů

K vyšetření se používají 3 sondy typu TaqMan od firmy Thermo Fisher Scientific (každá sonda rozliší jak zdravou, tak mutantní alelu).

- CYP2c19\*17: SNP Gen Assay č.C\_\_469857
- CYP2c19\*2: SNP Gen Assay č.C\_\_25986767
- CYP2c19\*3: SNP Gen Assay č.C\_\_27861809

#### Reagencie a jejich skladování (Master Mixy)

- **SuperHot Master Mix 2x 3.0 MgCl<sub>2</sub> (Bioron)** – v alikvotech skladované v mrazáku
- **Mix specifických primerů a sond** – mix sond a primerů dodané ve skleněné mikrozkušavce se neředí, jsou zamražené rozalikovované po 20 µl v označených sterilních mikrozkušavkách (\*2 modré označení, \*3 červené označení, \*17 černé označení).
- **H<sub>2</sub>O pro PCR** – skladované v mrazáku

#### Pracovní postup

- Obecná pravidla
  - Master mixy se připravují v PCR boxu v místnosti Master mixy
  - při práci je třeba dodržovat následující pravidla
    - box je nutné před prací sterilizovat zapnutím UV světla
    - po každé práci v boxu je nezbytné vysypat použité špičky a otřít pracovní plochu 70 % roztokem alkoholu a zapnout UV lampu

- v boxu je nutné používat pouze rukavice bez přídavku pudru, sterilní špičky s filtrem a sady pipet určené pouze pro práci v těchto boxech
- jiná zařízení a pomůcky (fixy, stojánky, stříčky apod.) z ostatních místností LMBG se nesmí používat z důvodu kontaminace
- do laboratoře pro přípravu master mixů platí přísný zákaz vstupu s klinickým materiálem, izoláty nukleových kyselin, PCR produkty, žádankami, použitými rukavicemi apod.
- v laboratoři pro přípravu master mixů rovněž platí speciální režim úklidových prací, který musí být dodržován (NCB\_LMBG\_PP\_12\_076\_B).

### Příprava

Reagencie pro přípravu reakčních směsí je třeba nechat zcela rozmraznout při pokojové teplotě (pufrů, DNTP's, primery...) nebo v chlazeném stojánku (značené sondy) podle typu reagencie. Reagencie se kromě amplifikačních pufrů nesmí vortexovat. Směsi se připravují pouze na chlazených stojáncích (NCB\_LMBG\_PP\_12\_076\_B).

Všechny zkumavky je potřeba řádně označit. Pokud se používá značení podle databáze OpenLims, je toto značení postačující. Kapiláry pro Light Cycler 480 je možné značit číslem počínaje 1. podle čísel v pipetovacím protokolu. Tyto kapiláry je nutné po dokončení analýzy zlikvidovat (NCB\_LMBG\_PP\_12\_076\_B).

Příprava master mixů se řídí dle tabulky č. 6. Pro stanovení mutací \*2, \*3, \*17 se pro každý vzorek připravují 3 rozdílné master mixy. Vždy je přítomná sonda pro normální alelu „wild type“ a sonda pro konkrétní mutaci (přesné značení sond popsáno v tab. č.7). Jednotlivé sondy jsou značené pomocí karboxyfluoresceinu (FAM sonda) nebo pomocí hexachloro – fluoresceinu (HEX sonda). Pro každou sérii se míchá počet vzorků + PK hetero + PK homo, NK.

**Tab. č. 6 – Příprava master mixů.**

<b>12 µl směsi + 1 µl templátové DNA (nebo PK)</b>	
H <sub>2</sub> O pro PCR	5,2 µl
SuperHot Master Mix 2x 3,0 MgCl <sub>2</sub> (Bioron)	6,25 µl
Směs primerů a sond (*2 nebo *3 nebo *17)	0,63 µl

Převzato ze zdroje: NCB\_LMBG\_PP\_15\_143\_A

Směs se připravuje na chlazeném stojánku a rozplňuje se po 12 µl do příslušného počtu sterilních mikrozkušavek 0,2 ml ve stripu. Překryjeme odpovídajícím počtem víček. Začátek stripu označíme. V izolačním boxu v místnosti Izolace HG přidáme 1 µl vyizolované DNA, případně 1 µl pozitivní kontroly. Strip se vzorky umístí do přístroje Light Cycler 480 a spustit program CYP 2C19-17 AB (platí pro \*2, \*3 i \*17), NCB\_LMBG\_PP\_15\_143\_A).

**Tab. č. 7 – Reakční schéma.**

	<b>Denaturace</b>	<b>Melting</b>		<b>Chlazení</b>
<b>Počet cyklů</b>	1	50		1
<b>Analyzační mod</b>	none	Quantification		none
<b>Teplota (°C)</b>	95	95	60	40
<b>Hold</b>	2 min	15 s	1 min 30 s	30 s
<b>Ramp (°C/sec)</b>	4,4	4,4	2,2	2,2
<b>mod</b>	none	none	single	none

Převzato ze zdroje: NCB\_LMBG\_PP\_15\_143\_A).

Detekční formát – Dual Color Hydrol. Probe

#### **Interpretace výsledků:**

Vyhodnocení výsledků – Endpoint genotyping – Scatter Plot

**Tab. č. 8 – Vyhodnocení výsledků.**

	<b>FAM (465-510 nm)</b>	<b>HEX (533-580 nm)</b>
<b>*2</b>	Wt	Mut
<b>*3</b>	Wt	Mut
<b>*17</b>	Mut	Wt

Převzato ze zdroje: NCB\_LMBG\_PP\_15\_143\_A).

#### **3.5.6 StripAssay**

Pokud je potřeba detekovat více mutací, tak laboratoř pro detekci využívá systém reverzní hybridizace od Vienna Labs.

#### Reagencie a jejich skladování:

- Lysis Solution pro PCR – skladovat v mrazáku (Master mixy)
- GENXTRACT Resin – skladovat v mrazáku (Master mixy)
- Amplification Mix – skladovat v mrazáku (Master mixy)

- Taq Dilution Buffer – skladovat v mrazáku (Master mixy). Taq polymeráza je ředěna v Taq Dilution Buffer na koncentraci 0,2 U/μl (4,8 ul Taq Dilution Buffer + 0,2 ul Taq DNA Polymerasy).
- DNAT – skladovat v lednici (PCR)
- Typing Trays – skladovat v lednici (PCR)
- Teststrips – skladovat v lednici (PCR)
- Hybridization Buffer – skladovat v lednici (PCR)
- Wash Solution A – skladovat v lednici (PCR)
- Conjugate Solution – skladovat v lednici (PCR)
- Wash Solution B – skladovat v lednici (PCR)
- Color Developer – skladovat v lednici (PCR)

Pracovní postup: Master mix, 20 μl + 5 μl DNA

**Tab. č. 9** – Tabulka Stripassay.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Taq dilution buffer</b>	4,8	9,6	14,4	19,2	24	28,8	33,6	38,4	43,2	48
<b>Polymerasa</b>	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6	1,8	2
<b>Amplifikační mix</b>	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150

Převzato ze zdroje: NCB\_LMBG\_PP\_16\_152\_A

Příprava master mixů se řídí následující tabulkou (**Tab. č. 10**):

<b>Reakční směs pro jeden vzorek</b>	
Amplification mix	15 μl
Roztok Taq polymerasy	5 μl

Převzato ze zdroje: NCB\_LMBG\_PP\_16\_152\_A

Pro každý vzorek se připraví sterilní mikrozkušavka (0,2ml) s 20 μl reakční směsí. Mikrozkušavky s reakční směsí se na chlazeném stojánku přenesou do místnosti Izolace HG, kde přidáme 5 μl vyizolované DNA, která byla naředěná na koncentraci 10–15 μg/ml. Vzorky jsou umístěny do termocycleru předehřátého na 94 °C, poté probíhá amplifikace dle následujícího teplotního profilu (NCB\_LMBG\_PP\_16\_152\_A).

**Tab. č. 11** – Program pro amplifikaci (STR-HFE, STR-CYP, STR-ApoE, STR-CUKR).

krok	Teplota (°C)	čas	Počet cyklů
denaturace	94	2 min	1
denaturace	94	15 s	35
annealing	58	30 s	
elongace	72	30 s	
extenze	72	3 min	1
chlazení	10	---	

Převzato ze zdroje: (NCB\_LMBG\_PP\_16\_152\_A).

Po skončení amplifikace jsou PCR produkty zkontrolovány na 2 % agarosovém gelu.

**Tab. č. 12.** Očekávané velikosti PCR produktů.

	Velikost fragmentu (bp)						
<b>CYP 2C19</b>	146	161	182	213	254	288	

Převzato ze zdroje: (NCB\_LMBG\_PP\_16\_152\_A).

### 3.5.7 Hybridizace

Před začátkem hybridizace je nutné nechat všechny roztoky ohřát na pokojovou teplotu, na strip sahat pouze pinzetou, vytemperovat vodní lázeň a vybrané pufrы na 45 °C a připravit stojan s vaničkami na stripy (NCB\_LMBG\_PP\_16\_152\_A).

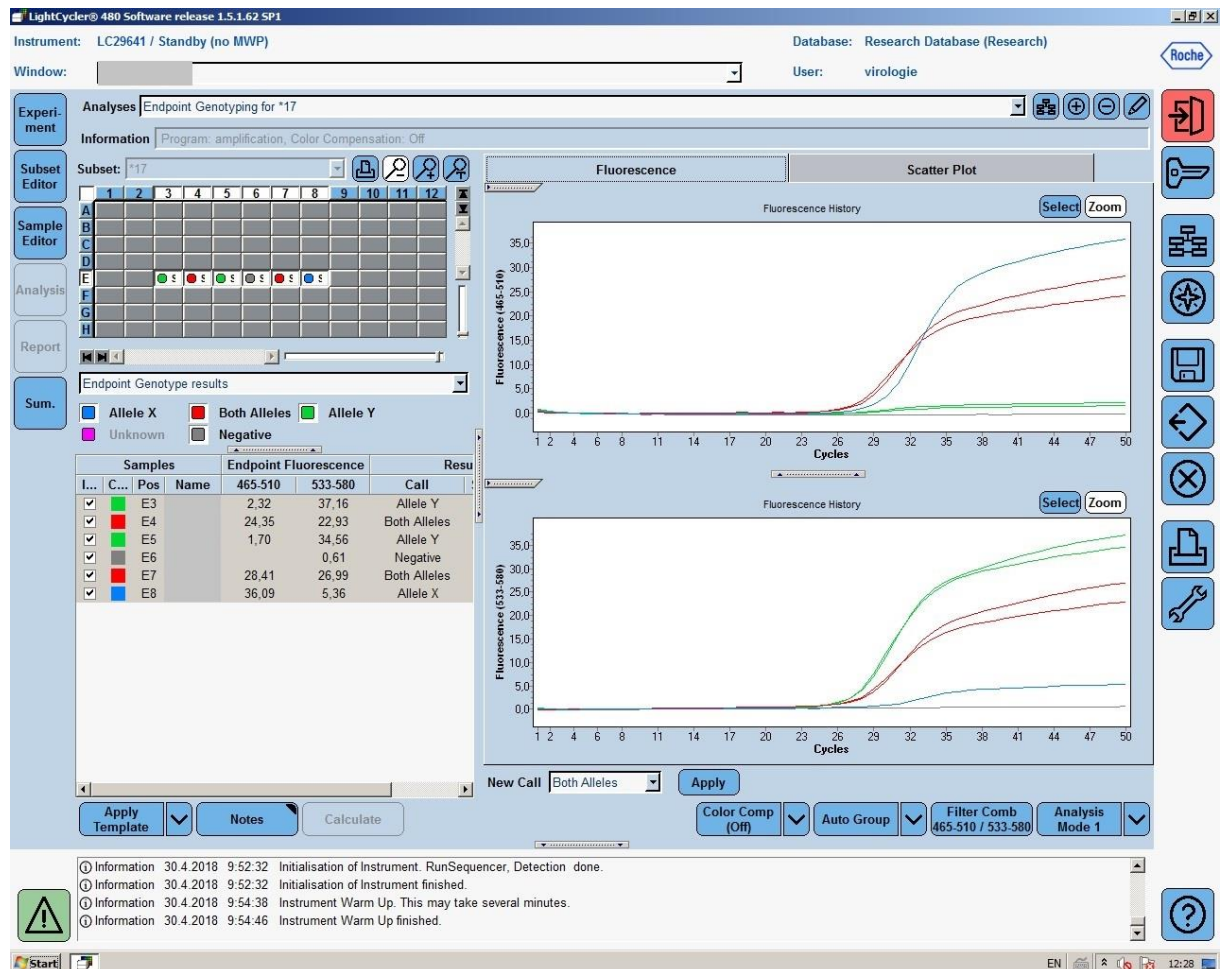
#### Postup hybridizace pro stripy Pentagen

Nejprve napipetujeme 10 µl DNAT do spodního rohu vaničky a do kapky přidáme 10 µl PCR produktu. Směs pipetováním dobře promícháme a necháme stát po dobu 5 minut v pokojové teplotě. Poté přidáme 1 ml přehřátého Hybridization Buffer a vzorek lehce zamícháme s celým stojanem. Strip následně vložíme a inkubujeme 30 minut ve 45 °C za stálého míchání. Po inkubaci dobře odsajeme hybridizační pufrы, přidat 1 ml přehřátého Wash Solution A a následně omyjeme (po dobu 10 sekund) a odsajeme. Pak přidáme 1 ml přehřátého Wash Solution A a inkubujeme při 45 °C po dobu 15 minut za stálého míchání, následně roztok odsajeme. Přidáme Conjugate Solution a inkubujeme po dobu 15 minut v pokojové teplotě za stálého míchání. Následně roztok odsajeme. V dalším kroku přidáme 1 ml Wash Solution B, krátké omyjeme (po dobu 10 sekund) a odsajeme. Přidáme 1 ml Wash Solution B a vzorek inkubujeme 5 minut při pokojové teplotě a následně roztok odsajeme. Opět přidáme Wash Solution B a inkubujeme po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Vzniklý roztok

odsajeme. Dále přidáme 1 ml Color Developer a inkubujeme 15 minut při pokojové teplotě za stálého míchání a ve tmě. Ke konci stripy několikrát omyjeme destilovanou vodou a necháme ve tmě uschnout.

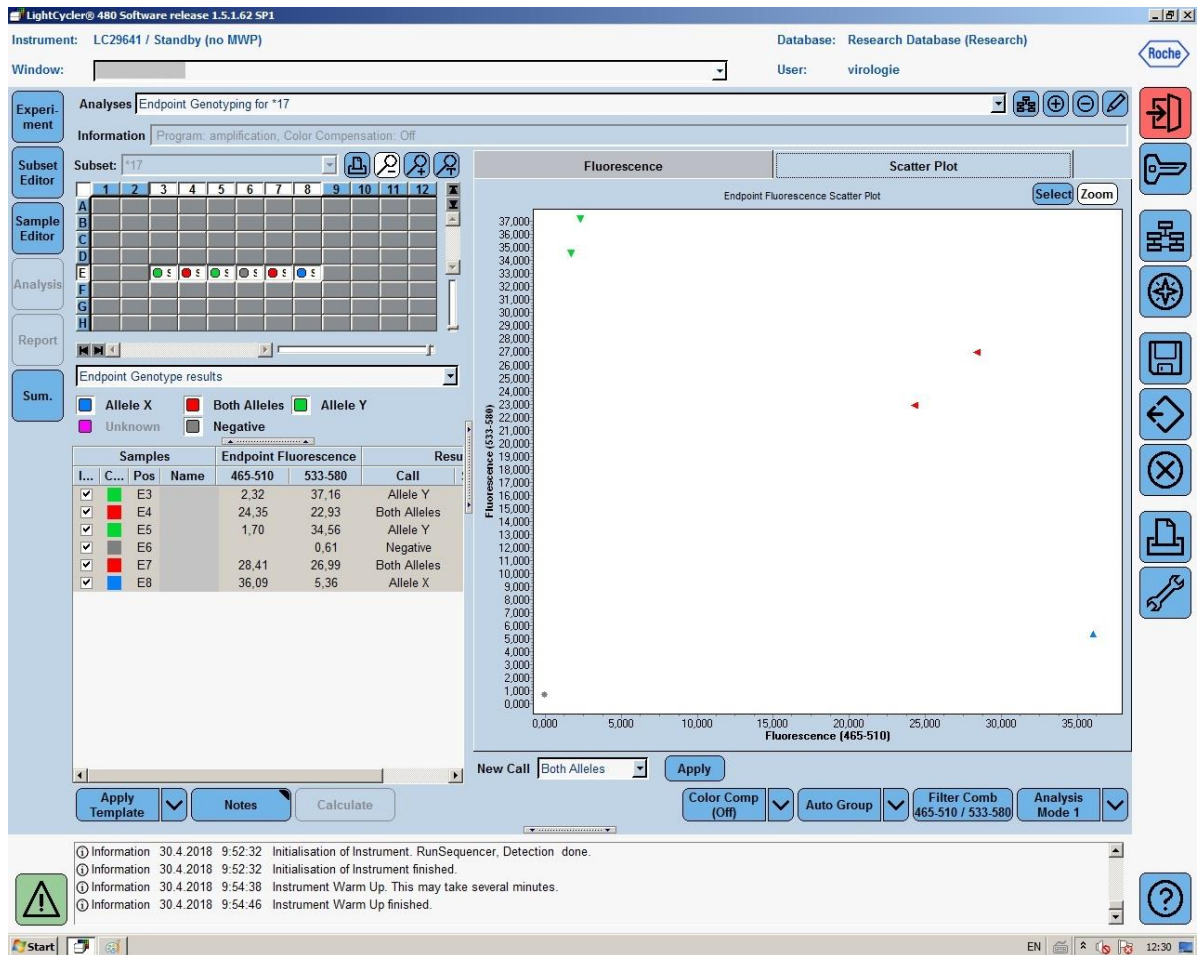
## 4 Výsledky

Do výzkumu bylo zařazeno 512 pacientů, z nichž bylo 324 mužů (63 %) a 188 žen (37 %). Průměrný věk pacienta byl 69 let. Nejmladšímu bylo v době vyšetření 18 let, nejstaršímu pacientovi 95 let. Naměřené hodnoty byly získány v období od 20.1.2014 do 3.4.2018 v laboratoři molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice. Na obr.č.5 a obr.č.6 jsou typické výsledky z běhu na přístroji Light Cycler 480 Instrument II (Roche).



Obr. č.5: Příklad genotypování \*17

- zelená (v popisu uvnitř obrázku Alela Y) - \*1/\*1
- červená (v popisu uvnitř obrázku obě alely) \*1/\*17
- modrá (v popisu uvnitř obrázku Alela X) - \*17/\*17

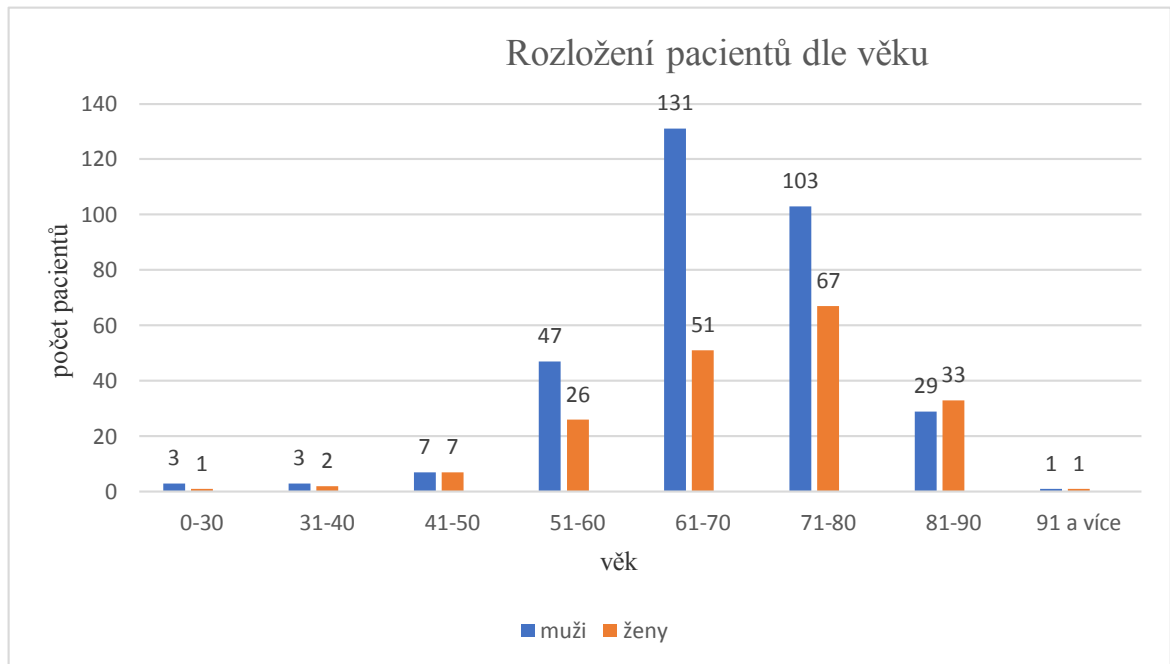


**Obř.č.6:** CYP křivka vykreslená pomocí fce Scatter plot

Ke každému vzorku jsou přiřazeny hodnoty fluorescence na konci PCR (= end point analysis), genotypy se rozdělí do tří skupin: homozygot \*1/\*1, heterozygot, homozygot \*17/\*17, kontroly se nachází na \*1/\*17 a \*17/\*17.



Následující graf č.1 ukazuje rozložení pacientů dle věku. Nejčastěji vyšetřovanými pacienty byly lidé ve věkovém rozmezí 61-80 let, což činí 69 % ze všech vyšetřených pacientů.



**Graf č.1:** Rozložení pacientů dle věku

#### Muži

Průměr = 67,9321

Směrodatná odchylka = 10,60967

Rozptyl = 112,565

#### Ženy

Průměr = 70,43085

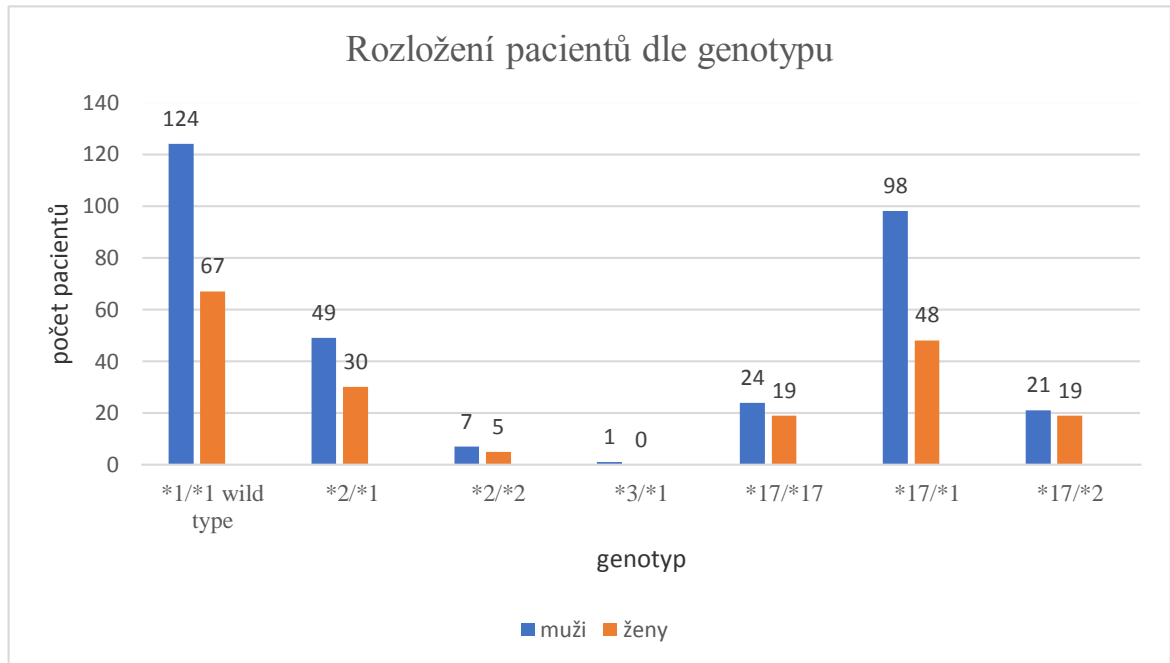
Směrodatná odchylka = 11,31231

Rozptyl = 127,9685

P test = 0,012495

Protože je tato pravděpodobnost  $p > 0,01$ , znamená to, že rozdíl mezi testovanými středními hodnotami není statisticky významný

Na grafu č.2 lze vidět rozložení pacientů dle jejich genotypu. U mužů byl nejčastěji detekován genotyp \*1/\*1 (124 pacientů), u žen byl také nejčastěji detekován genotyp \*1/\*1 (67 pacientů). U 191 pacientů (37 %) z celkových 512 byl detekován genotyp \*1/\*1, tito pacienti jsou standardní metabolizátoři klopidoogrelu.

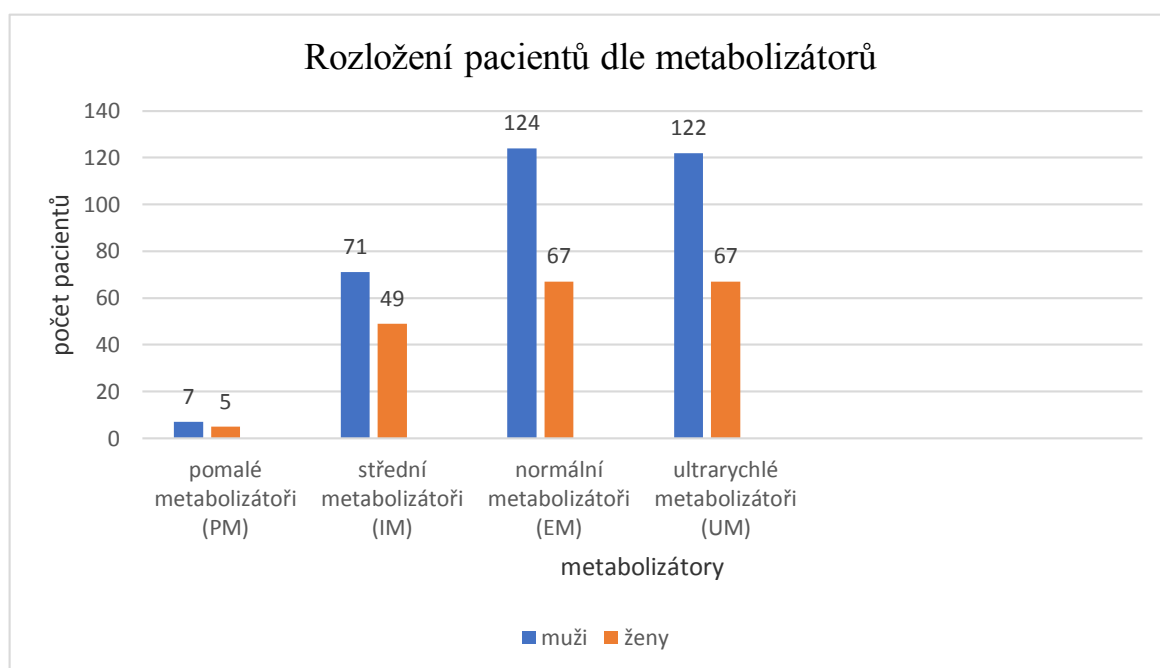


**Graf č.2:** Rozložení pacientů dle genotypu.

Graf č.3 znázorňuje rozložení pacientů dle metabolizátorů. Jednotlivé vyšetřené genotypy jsou seřazeny v grafu dle tabulky č.13.

**Tab.č.13:** Rozdělení genotypu dle rychlosti metabolismu klopido grelu.

Druh metabolizátorů	genotyp
EM (normální metabolizátoři)	*1/*1
UM (ultrarychlé metabolizátoři)	*1/*17, *17/*17
IM (střední metabolizátoři)	*1/*2, *2/*17, *1/*3
PM (pomalí metabolizátoři)	*2/*2, *2/*3, *3/*3



**Graf č.3:** Rozložení pacientů dle metabolizátorů

## 5 Diskuze

Cílem mé práce byla analýza polymorfismu genu pro CYP2C19 u pacientů léčených klopidogrelem. Výsledky pro zpracování bakalářské práce jsem získala z databáze laboratoře molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice a.s. U vyšetření několika pacientů jsem byla přítomna a osobně jsem si je pod odborným dohledem provedla.

Ve vyšetřovaném souboru jsme testovali rozdílný věk u mužů a žen. Na první pohled se nám zdálo rozložení hodnot vyšetřovaného souboru rozdílné, ale statisticky jsme tuto hypotézu vyvrátili.

Počátky rozvoje farmakogenetiky jsou datovány do druhé poloviny 20. století, kdy byly dány do souvislosti první příklady odlišné lékové odpovědi u pacientů s vrozenými defekty metabolizujících enzymů. Farmakogenetika je farmakologický obor, který se prostřednictvím studia geneticky podmíněných změn lékové odpovědi v populaci podílí na optimalizaci terapie konkrétních pacientů a na vývoji nových léčiv (Slanař, 2002).

Vyšetřování genetických polymorfismů v genu CYP2C19 je v dnešní době velikým přínosem pro upřesnění dávek podávaného léčiva. Cílem je přítomnost léčiva v cílových tkáních v takových koncentracích, jež vedou k žádanému terapeutickému efektu a zároveň nepřekročí hranici, za níž se projeví jeho toxické účinky (Scheinostová, 2014).

Existuje několik způsobů označení rozdílů v aktivitě pacientů s rozdílnou aktivitou enzymu CYP 2C19. Buď na základě rozdělení druhů metabolizátorů (EM, UM, IM, PM), na základě přítomnosti alely se změněnou aktivitou (značení pomocí hvězdiček \*). U tohoto značení často nerozeznáme homozygota od heterozygota. Dalším způsobem je vypsání celého (kompletního) genotypu-uvádění obou alel. Nejlepším způsobem se jeví vypsání celého genotypu, ale různé vědecké studie jsou v přiřazování určitých genotypů k jiným metabolizátorům velice nejednotné. Řešením je vzdělávání a spolupráce laboratoře s klinickým pracovištěm.

Genetické polymorfismy se vyskytují s různou frekvencí mezi příslušníky různých etnických skupin. CYP2C19\*1 představuje standartní (nemutovanou) alely. U pomalých metabolizátorů jsou nejčastěji detekovány alely \*2 a \*3. Alela \*2 se nejčastěji vyskytuje u bělochů, naopak alela \*3 se vyskytuje u Asiatů. Tito pomalí metabolizátoři představují 2-6 % jedinců evropského původu, 15-20 % Japonců a 10-20 % Afričanů. Důležitou vyšetřovanou alelou je alela CYP2C19\*17, která způsobuje ultra rychlý metabolismus (Červená, 2015). Četnost ultrarychlé alely CYP2C19\*17 je u kavkazské

populace 22 %, u Afroameričanů 21 %, naopak u asijské populace je výskyt ultrarychlé alely poměrně nižší (Japonci 1,3 %) (Scheinostová, 2014). Obecně by bylo vhodné vyšetřovat spektrum variant genu typické pro dané etnikum, tato informace by tudíž měla být k dispozici na žádance již při odběru. Otázkou je, jak v praxi zajistit uvádění takovýchto citlivých informací – prozatím to není standardem.

Bylo mimo jiné prokázáno, že osoby s mutací CYP2C19\*2 léčené klopidogrelem, mají vyšší riziko kardiovaskulární i celkové mortality. Byla provedena metaanalýza (Medicína, 2001) 23 studií, ve kterých bylo testováno více než 11000 osob. U 28 % osob z celkového množství testovaných lidí, byl nalezen polymorfismus v alele CYP2C19\*2, který vedl k 30 % zvýšení rizika vzniku trombotizace stentu, kardiovaskulárních komplikací či mortality, oproti osob bez tohoto polymorfismu. Riziko nebylo přitom závislé na ostatních rizikových faktorech a ani nezáviselo na tom, zda – li je pacient heterozygot či homozygot. V jiné provedené 12 – leté studii (Medicína, 2001) bylo zjištěno, že osoby s alelou CYP2C19\*2 mají vyšší riziko kardiovaskulárních komplikací a tato mutace se vyskytuje častěji u osob s anamnézou akutního koronárního syndromu. Další studie (Medicína, 2001) prokázala, že tito jedinci mají vyšší riziko vzniku STEMI (infarkt myokardu s ST elevacemi) po PTCA (perkutánní transluminální koronární angioplastika). Naopak jedinci s alelou CYP2C19\*17 mají vyšší riziko krvácení a zvýšenou reakci na podání klopidogrelu než jedinci bez přítomnosti této alely (Cytochrom 2C19, b.r.)

V dnešní době jen málokterý pacient vystačí pouze s jedním lékem. Tzv. polyterapie zvyšuje výskyt nežádoucích účinků. Odhaduje se, že u pacientů užívající 2 léky, se riziko nežádoucích účinků léků (NÚL) zvyšuje na 13 %, při 4 lécích na 38 % a při 7 a více lécích dokonce na 82 %. V roce 1998 provedená metaanalýza (Medicína, 2001) 39 velkých amerických studií došla k závěru, že u 6,7 % pacientů dochází k závažným NÚL v průběhu nemocničního ošetřování a jejich celková incidence je v USA 0,3 %. Což znamená, že NÚL s téměř 100 tisíci úmrtími ročně patří mezi prvních šest nejčastějších příčin smrti v USA. Jiná americká studie (Medicína, 2001) došla k závěru, že chyby v medikaci jsou nejčastějšími chybami, kterých se lékaři dopouští. V Norsku byla provedena studie (Medicína, 2001) s cílem objasnit hlavní příčinu NÚL v běžné nemocnici. Celkem byla analyzována dokumentace 732 pacientů. Výsledkem bylo zjištění, že 133 (18 %) případů úmrtí souviselo s medikací. Téměř polovina úmrtí (66 ze 133) byla způsobena nevhodným podáním léků, v důsledku

špatného zhodnocení pacientova stavu a 36,4 % úmrtí bylo zaviněno předávkováním (Medicína, 2001).

Farmakogenetika je dnes velmi dynamicky se rozvíjející se obor klinické farmakologie se slibnými možnostmi pro budoucnost nejen při individualizaci a optimalizaci léčby (Slanař, 2002).

## 6 závěr

Cílem mé bakalářské práce byla analýza polymorfismu genu pro CYP2C19 u pacientů po CMP léčených klopidogrelem. V první části jsem se zabývala izoenzymem CYP2C19, dále jsem popsala izoenzymy CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6. Ve druhé části jsem se věnovala popisem diagnostiky a léčby cévní mozkové příhody.

V experimentální části bylo mým úkolem praktické zvládnutí molekulárně biologických metod v genetické laboratoři jako izolace DNA z periferní krve, příprava a provedení polymerázové řetězové reakce v reálném čase – Real Time PCR (RT – PCR) a následná reverzní hybridizace.

V bakalářské práci jsem prokázala význam diagnostiky polymorfismu genu pro CYP 2C19 u pacientů po CMP léčených klopidogrelem.

Při psaní bakalářské práce jsem nejvíce využila knihu Dostálka et al., Farmakokinetika a knihu Otové a Mihalové, Základy biologie a genetiky člověka, v neposlední řadě jsem také čerpala z dokumentace Laboratoře genetiky a molekulární biologie Nemocnice České Budějovice a.s.

## 7 Seznam zdrojů

- 1) ANDROUTSOPOULOS, Vasilis P, Aristidis M TSATSAKIS a Demetrios A SPANDIDOS, 2009. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer* [online]. **9**(1), - [cit. 2017-03-13]. DOI: 10.1186/1471-2407-9-187. ISSN 14712407. Dostupné z: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-9-187>
- 2) BARTŮNĚK, Petr, Dana JURÁSKOVÁ, Jana HECZKOVÁ a Daniel NALOS, ed., 2016. *Vybrané kapitoly z intenzivní péče*. Praha: Grada Publishing. Sestra (Grada). ISBN 9788024743431
- 3) BAUER, Jiří, 2010. Léčba ischemické cévní mozkové příhody. *Interní medicína pro praxi*. **12**(9), 442-444
- 4) BĚLOUSOVOVÁ, Anna, 2012. *Léčebně rehabilitační plán a postup po cévní mozkové příhodě*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Lékařská fakulta.
- 5) BERÁNEK, Martin, 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3224-7.
- 6) BRDIČKA, Radim, 2014. *Genetika v klinické praxi*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-106-3.
- 7) BULTAS, Jan, 2005. Farmakogenetika, účinek léku a lékové interakce. *Remedia*. **15**(2), 115-119
- 8) Cytochrom P450, 2001-. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2017-07-24]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Cytochrom\\_P450](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Cytochrom_P450)



- 9) ČERVENÁ, Martina, 2015. *Polymorfismus u vybraných biotransformačních enzymů*. Hradec Králové. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd.
- 10) DOSTÁLEK, Miroslav a kolektiv, 2006. *Farmakokinetika*. Praha: Grada. ISBN 80-247-1464-7.
- 11) DUFEK, Michal, 2002. Cévní mozkové příhody, obecný úvod a klasifikace. *Interní medicína pro praxi*, 6, 5-10
- 12) Fatální následky medikace: paradox současné medicíny, 2001. *Medicína*. 8(12), 1-2.
- 13) FIKSA, Jan, 2008. Cévní mozková příhoda: diagnostika a léčba. *Lékařské listy* [online]. (18) [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/cevni-mozkova-prihoda-diagnostika-a-lecba-387150>
- 14) Genetický polymorfismus, 2001-. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2017-07-22]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Genetick%C3%BD\\_polymorfismus](https://cs.wikipedia.org/wiki/Genetick%C3%BD_polymorfismus)
- 15) GRUSSMANNOVÁ, Alena, 2013. *Detekce patogenních mikroorganismů v kravském mléce pomocí real - time PCR*. Brno. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat. Vedoucí práce Ing. Libor Stehlík, PhD.
- 16) HIRATSUKA, Masahiro, 2016. Genetic Polymorphisms and *in Vitro* Functional Characterization of CYP2C8, CYP2C9, and CYP2C19 Allelic Variants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* [online]. 11(39), 1748-1759 [cit. 2017-03-09]. Dostupné z: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/39/11/39\\_b16-00605/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/39/11/39_b16-00605/article)
- 17) HORN, John R. a Philip D. HANSTEN, 2007. Get to Know an Enzyme: CYP1A2. In: *Pharmacy Times* [online]. New Jersey [cit. 2017-03-09]. Dostupné

z: <http://www.pharmacytimes.com/publications/issue/2007/2007-11/2007-11-8279>

- 18) HORN, John R. a Philip D. HANSTEN, 2011. Get to Know an Enzyme: CYP2C8. In: *Pharmacy Times* [online]. New Jersey [cit. 2017-03-09]. Dostupné z: <http://www.pharmacytimes.com/publications/issue/2011/december2011/get-to-know-an-enzyme-cyp2c8->
- 19) HUTYRA, Martin, 2011. *Kardioembolizační ischemické cévní mozkové příhody: diagnostika, léčba, prevence*. Praha: Grada. ISBN 9788024738161
- 20) Izolace DNA, 2001-. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2017-07-28]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Izolace\\_DNA](https://cs.wikipedia.org/wiki/Izolace_DNA)
- 21) JANSKÝ, Petr, 2001. Přípravek Plavix (clopidogrel) - farmakologický profil a klinické zkušenosti. *Interní medicína pro praxi*. **3**(11), 538-540.
- 22) Klopidoogrel – možná interakce s inhibitory protonové pumpy, *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2017-07-02]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/klopidoogrel-mozna-interakce-s-inhibitory-protonove-pumpy>
- 23) MATAL, Jaroslav, 2009. *POROVNÁNÍ LIDSKÝCH A PRASEČÍCH BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ SE ZŘETEM NA CYTOCHROMY P450 1A2, 2A19 A UDP - GLUKURONOSYLTRANSFERASU 1A6*. Olomouc. Disertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, Ústav farmakologie. Vedoucí práce Prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.
- 24) MATĚJKOVÁ, Markéta, 2016. *Využití metody RFLP PCR, PCR ARMS a reverzní hybridizace pro detekci nejčastějších trombofilních mutací v české populaci*. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta. Vedoucí práce Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D.

- 25) MÁDR, Aleš, 2010. *Studium metabolismu léčiv cytochromy P450 pomocí kapilární elektroforézy*. Brno. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav biochemie. Vedoucí práce Prof. RNDr. Zdeněk Glatz, CSc.
- 26) MLADOSIEVIČOVÁ, Beata a William DIDDEN, 2014. *Kardioonkologie: 2., přepracované a doplněné vydání*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4838-2
- 27) MOŤOVSKÁ, Zuzana, Petr WIDIMSKÝ a Zdeněk KUČERA, 2006. Clopidogrelum. *Remedia*. **16**(3), 221-229.
- 28) NOVÁKOVÁ, Iva, 2012. *Zdravotní nauka: učebnice pro obor sociální činnost*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3709-6
- 29) OTOVÁ, Berta a Romana MIHALOVÁ, 2012. *Základy biologie a genetiky člověka*. V Praze: Karolinum. ISBN 978-80-246-2109-8.
- 30) PENKA, Miroslav, 2012. Antiagregační a antikoagulační léčba – základní principy. *Kardiol Rev Int Med*. **14**(2), 63-67.
- 31) PERLÍK, František a Ondřej SLANAŘ, 2015. Farmakogenetika metabolismu léčiv-z výzkumu do klinické praxe. *Remedia*. 25(3), 226-230
- 32) Polymerázová řetězová reakce, 2001. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2017-07-20]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Polymer%C3%A1zov%C3%A1\\_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1\\_reakce#cite\\_ref-Kary\\_Mullis\\_Nobel\\_Lecture\\_4-0](https://cs.wikipedia.org/wiki/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce#cite_ref-Kary_Mullis_Nobel_Lecture_4-0)
- 33) Průvodce CMP, *Sdružení CMP* [online]. [cit. 2017-07-02]. Dostupné z: <http://www.sdruzenicmp.cz/informace/pruvodce-cmp>
- 34) ŘEMÍNEK, Roman, 2006. *Cytochromy P450*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.

- 35) Řízená dokumentace Laboratoře molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice a.s., NCB\_LMBG\_SOP\_12\_012\_B, *Detekce polymorfizmů v cytochromu P450 CYP2C19 pomocí real time PCR.*
- 36) Řízená dokumentace Laboratoře molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice a.s., NCB\_LMBG\_PP\_12\_076\_B, *Příprava master mixů.*
- 37) Řízená dokumentace Laboratoře molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice a.s., NCB\_LMBG\_PP\_15\_143\_A, *CYP 2C19 AB sondy.*
- 38) Řízená dokumentace Laboratoře molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice a.s., NCB\_LMBG\_PP\_16\_152\_A, *Stripassay I*
- 39) Řízená dokumentace Laboratoře molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice a.s., NCB\_LMBG\_PP\_12\_071\_B, *Měření koncentrace a čistoty DNA.*
- 40) SCHEINOSTOVÁ, Jitka, 2014. Vliv polymorfismu genu CYP2C19 na léčbu klopidogrelem. *Synlabianer.* **9**(4), 6-7.
- 41) Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, et al. 2013. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy: Update. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 2013;94(3):317-323. doi:10.1038/clpt.2013.105.
- 42) SLANAŘ, Ondřej, 2002. Genetický polymorfismus metabolismu léčiv. *Postgraduální medicína* [online]. [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/geneticky-polymorfismus-metabolismu-leciv-144088>
- 43) SLEZÁKOVÁ, Lenka, Markéta HRUŠKOVÁ, Petra KADUCHOVÁ, Irena PŘIVŘELOVÁ, Eva STAROŠTÍKOVÁ a Eva VŠETIČKOVÁ, 2016.

*Stomatologie I: pro SZŠ a VOŠ*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-5826-8.

- 44) STEJSKALOVÁ, Lucie a Petr PÁVEK, 2011. The function of cytochrome P450 1A1 enzyme (CYP1A1) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the placenta. *Curr Pharm Biotechnol.*, **12**(5), 715-730.
- 45) TRNČÁKOVÁ, Veronika, 2016. *Vznik, vývoj a perspektivy PCR*. Hradec Králové. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra sociální a klinické farmacie. Vedoucí práce Doc. PhDr. František Dohnal, CSc.
- 46) VÍTOVEC, Jiří a Jindřich ŠPINAR, 2004. *Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění*. Vyd. 2., přeprac. a dopl. Praha: Grada. ISBN 80-247-0866-3.
- 47) VOCILKOVÁ, Lenka, 2011. *Dostupnost enterálně podaných léků u kriticky nemocných*. Brno. Disertační práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Doc. MUDr. Vladimíru Šrámkovi, Ph.D.
- 48) ZANGER, Ulrich M. a Matthias SCHWAB, 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. **138**(1), 103-141 [cit. 2017-03-13]. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007. ISSN 01637258. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725813000065>
- 49) ZIMA, Tomáš, 2007. *Laboratorní diagnostika*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-372-3.
- 50) ZORNÍKOVÁ, Gabriela, 2012. Využití polymerázové řetězové reakce (PCR) pro detekci probiotických mikroorganismů. In: *ChemPoint* [online]. Brno: Vysoké učení technické v Brně [cit. 2017-07-20]. Dostupné z:

<http://www.chempoint.cz/vyuziti-polymerazove-retezove-reakce-pcr-pro-detekci-probiotickych-mikroorganismu>

51) <http://labguide.cz/metody/pcr/>

52) <http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>

53) <https://laborator.nemsne.cz/metody/laboratorni-metody/soubory/cytochrom2c19.pd>

54) <http://labguide.cz/metody/hybridizacni-metody/>

## 8 Seznam příloh a obrázků

### Tabulky

**Tab. č.1** - Klasifikace lidských P450 na základě substrátové specifikace

**Tab. č.2** – Nejčastější příčiny uzávěru krční a mozkové tepny

**Tab. č.3** – Méně časté příčiny uzávěru krční a mozkové tepny

**Tab. č.4** – Přehled protidestičkových léků

**Tab. č. 5** – Princip hodnocení ARMS a AS - PCR

**Tab. č.6** – Příprava master mixů

**Tab. č.7** – Reakční schéma

**Tab. č.8** – Vyhodnocení výsledků

**Tab. č.9** – tabulka Stripassay

**Tab. č.10** – Příprava master mixů

**Tab. č.11** – Program pro amplifikaci

**Tab. č.12** – Očekávané velikosti PCR produktů

**Tab. č.13** – Rozdělení genotypu dle rychlosti metabolismu klopidogrelu

**Tab. č.14** - Podrodina CYP1A – léčiva, která jsou jejími substráty, její induktory a inhibitory

**Tab. č.15** - Forma CYP2B6 – léčiva, která jsou jejími substráty, její induktory a inhibitory

**Tab. č.16** – Forma CYP2C9 – léčiva, která jsou jejími substráty, její induktory a inhibitory

**Tab. č.17** – Forma CYP2C19 – léčiva, která jsou jejími substráty, její induktory a inhibitory.

**Tab. č.18** - Forma CYP2D6 – léčiva, která jsou jejími substráty, její induktory a inhibitory

**Tab. č. 19** – Forma CYP3A4 – léčiva, která jsou jejími substráty

**Tab. č.20** – Forma CYP3A4 – léčiva, která jsou induktory, případně inhibitory formy CYP3A4

### Obrázky

**Obr. č.1** – chemický strukturní vzorec klopidogrelu

**Obr. č.2** – Průběh PCR reakce

**Obr. č.3** – Záznam fluorescence při Real Time PCR

**Obr. č. 4** – Princip reakce ARMS a AS – PCR

**Obr. č.5** – Příklad genotypování \*17

**Obr.č.6** – CYP křivka vykreslená pomocí fce Scatter plot

### **Grafy**

**Graf č. 1** – Rozložení pacientů dle věku

**Graf č.2** – Rozložení pacientů dle genotypu

**Graf č. 3** - Rozložení pacientů dle metabolizátorů



## 9 Přílohy

**Tab. č.14.** Podrodina CYP1A – léčiva, která jsou jejími substráty, její induktory a inhibitory.

Substráty CYP1A	Inhibitory CYP1A	Induktory CYP1A
<b>Antidepresiva</b>	<b>antidepresiva</b>	<b>léčiva</b>
amitriptylin	fluvoxamin	griseofulvin
fluvoxamin		kofein
imipramin	<b>chemoterapeutika</b>	karbamazepin
kломipramin	ciprofloxacin	lansoprazol
mirtazapin	enoxacin	omeprazol
	grepafloxacin	rifampicin
<b>antipsychotika</b>	norfloxacin	
haloperidol	ofloxacin	<b>jídlo</b>
klozapin	sparfloxacin	brokolice
olanzapin		Hlávkové zelí
	<b>Ostatní látky</b>	Kapusta růžičková
<b>Ostatní látky</b>	anastozol	květák
kofein	cimetidin	
dakarbazin	flutamid	<b>Ostatní látky</b>
fenacetin	Grapefruitová šťáva	Cigaretový kouř
flutamid	lidokain	
grepafloxacin	mexiletin	
mexiletin	propafenon	
ondansetran	ranitidin	
pentoxyfyllin	rifampicin	
propranolol	takrin	
takrin	tokainid	
teofylin	zafirlukast	
toremifen		
verapamil		
R - warfarin		

Převzato ze zdroje: (Dostálek et al., 2006)

**Tab. č.15.** Forma CYP2B6 – léčiva, která jsou jejími substráty, její induktory a inhibitory.

<b>Substráty CYP2B6</b>	<b>Inhibitory CYP2B6</b>	<b>Induktory CYP2B6</b>
antipyrin	2 - fenylimidazol	fenobarbital
bupropion	orfenadrin	nikotin
cyklofosfamid	thiotepa	rifampicin
DDT	tiklopidin	
efavirenz		
fenytoin		
fenylbutazon		
chloramfenikol		
ifosfamid		
kokain		
metadon		

Převzato ze zdroje: (Dostálek et al., 2006)

**Tab. č.16.** Forma CYP2C9 - léčiva, která jsou jejími substráty, její induktory a inhibitory.

Substráty CYP2C9	Inhibitory CYP2C9	Induktory CYP2C9
<b>Blokátory ATII</b>	<b>SSRI</b>	barbituráty
losartan	fluoxetin	cyklofosfamid
valsartan	fluvoxamin	fenytoin
	paroxetin	ifosfamid
<b>hypoglykemika</b>	sertralin	Kyselina valproová
glipizid		rifabutin
gliburid	<b>Ostatní látky</b>	rifampicin
rosiglitazon	amiodaron	rifapentin
tolbutamid	anastrozol	
	cimetidin	
<b>NSPZL</b>	delavirdin	
celecoxib	fenylbutazon	
diklofenak	flukonazol	
ibuprofen	izoniazid	
indometacin	klopidogrel	
naproxen	ranitidin	
piroxikam	ritonavir	
suprofen	sulfafenazol	
	sulfinpyrazon	
<b>Ostatní látky</b>	zafirlukast	
fenytoin		
karmustin		
paklitaxel		
tamoxifen		
THC		
Tricyklická kyselina		
S - warfarin		
zafirlukast		

Převzato ze zdroje: (Dostálek et al., 2006)

**Tab. č.17.** Forma CYP2C19 – léčiva, která jsou jejími substráty, její induktory a inhibitory.

<b>Substráty CYP2C19</b>	<b>Inhibitory CYP2C19</b>	<b>Induktory CYP2C19</b>
<b>antidepresiva</b>	<b>SSRI</b>	fenobarbital
amitriptylin	fluoxetin	fenytoin
citalopran	fluvoxamin	karbamazepin
fluoxetin	paroxetin	Kyselina valproová
imipramin		prednizolon
klomipramin	<b>Ostatní látky</b>	rifabutin
moklobemid	delavirdin	rifampicin
sertralin	felbamát	rifapentin
trimipramin	ketokonazol	
venlafaxin	lansoprazol	
	modafinil	
<b>barbituráty</b>	omeprazol	
hexobarbital	ranitidin	
mefobarbital	ritonavir	
	tiklopidin	
<b>Inhibitory protonové pumpy</b>		
esomeprazol		
lansoprazol		
omeprazol		
pantoprazol		
rabeprazol		
<b>Ostatní léčiva</b>		
alprazolam		
cyklofosfamid		
diazepam		
fenytoin		
flunitrazepam		
ifosfamid		
indometacin		
mefenytoin		
nelfinavir		
propranolol		
tenipozid		
tolbutamid		

Převzato ze zdroje: (Dostálek et al., 2006)

**Tab. č.18.** Forma CYP2D6 – léčiva, která jsou jejími substráty, její induktory a inhibitory.

Substráty CYP2D6	Substráty CYP2D6	Inhibitory CYP2D6
<b>antidepressiva</b> <i>Bicyklická antidepressiva</i> amitriptylin klomipramin desipramin imipramin nortriptylin  <b>Ostatní antidepressiva</b> fluoxetin maprotilin mirtazapin paroxetin sertralin trazodon venlafaxin  <b>antipsychotika</b> haloperidol klozapin perfenazin quetiapin risperidon thioridazon	<b>analgetika</b> kodein hydrokodon metadon oxykodon tramadol  <b>Kardiovaskulární látky</b> diltiazem enkainid flekainid mexiletin nifedipin nisolpidin propafenon propranolol  <b>Ostatní látky</b> delavirdin dextrometorfan donepezil ondansetron takrin tamoxifen	<b>antidepressiva</b> fluoxetin fluvoxamin norfluoxetin paroxetin sertralin  <b>antipsychotika</b> flufenazin haloperidol parfenazin thioridazin  <b>Ostatní látky</b> cimetidin chinidin Kyselina valproová lansoprazol Lopinavir/ritonavir terbinafir johimbin

Převzato ze zdroje: (Dostálek et al., 2006)

**Tab. č.19.** Forma CYP3A4 – léčiva, která jsou jejími substráty.

Substráty CYP3A4	Substráty CYP3A4	Substráty CYP3A4
<p><b>analgetika</b> alfentanil fentanyl kodein metadon sufentanil tramadol</p> <p><b>antiarytmika</b> amiodaron chinidin lidokain propafenon</p> <p><b>antibiotika</b> azitromycin diritromycin erytromycin klaritromycin rokitamycin troleandomycin</p> <p><b>antidepresiva</b> amitriptylin citalopran fluoxetin klomipramin mirtazapin naftazon paroxetin reboxetin setralin trazodon venlafaxin</p> <p><b>antiepileptika</b> karbamazepin Kyselina valproová tiagabin</p> <p><b>antihistaminika</b> astemizol ebastin loratadin terfenadin</p> <p><b>antimalarika</b> hylofantrin chlorochin primachin</p>	<p><b>antineoplastika</b> busulfan cyklofosfamid daunorubicin docetaxel doxorubicin etopozid ifosfamid paklitaxel tamoxifen tenipozid toremifen trofosfamid vinblastin vinkristin vinorelbin</p> <p><b>antiparkinsonika</b> bromokriptin pergolid ropinirol</p> <p><b>antipsychotika</b> haloperidol klozapin pimozid quetiapin</p> <p><b>Blokátory Ca kanálů</b> amlodipin diltiazem felodipin nikardipin nifedipin nimodipin nitredipin verapamil</p> <p><b>chemoterapeutika</b> ciprofloxacin rifabutin rifampicin sparfloxacin</p> <p><b>imunosupresiva</b> cyklosporin rapamycin takrolimus</p>	<p><b>Inhibitory proteáz</b> amprenavir indinavir lopinavir nelfinavir ritonavir saquinavir</p> <p><b>Inhibitory protonové pumpy</b> lansoprazol omeprazol pantoprazol rabeprazol</p> <p><b>Inhibitory reverzní transkriptázy</b> delavirdin efavirenz navirapin</p> <p><b>Sedativa- hypnotika</b> alprazolam diazepam estazolam midazolam nitrazepam triazolam zalepen zolpidem</p> <p><b>steroidy</b> dexametazon ethinylestradiol kortizol prednizol progesteron testosteron</p> <p><b>Ostatní látky</b> cisaprid karvedilol ketokonazol metoprolol ondansetron paracetamol sibutramin sildenafil</p>

Převzato ze zdroje: (Dostálek et al., 2006)

**Tab. č.20.** Forma CYP3A4 – léčiva, která jsou induktory, případně inhibitory formy CYP3A4.

Inhibitory CYP3A4	Inhibitory CYP3A4	Induktory CYP3A4
<b>antidepresiva</b> <i>SSRI</i> citalopram fluoxetin norfluoxetin paroxetin setralin  <i>ostatní</i> naftazon  <b>antibiotika</b> erytromycin klaritromycin  <b>antimykotika</b> <i>Azoly</i> flukonazol itraconazol ketokonazol mikonazol  <b>chemoterapeutika</b> ciprofloxacin norfloxacin sparfloxacin	<b>Inhibitory proteáz</b> indinavir lopinavir/ritonavir ritonavir  <b>Inhibitory reverzní transkriptázy</b> delavirdin efavirenz  <b>Ostatní látky</b> bromokriptin cimetidin cisaprid cyklosporin diltiazem Grapefruitová šťáva chlorochin Kyselina valproová metadon metylprednizol mibefladil nifedipin primachin tamoxifen verapamil zafirlukast	<b>antiepileptika</b> fenobarbital fenytoin karbamazepin primidon  <b>Ostatní látky</b> cisplatina cyklofosfamid dexametazon ifosfamid metylprednizol nevirapin prednizol rifampicin rifapentin ritonavir troglitazon Třezalka tečkovaná

Převzato ze zdroje: (Dostálek et al., 2006)

## 10 Seznam zkratek

SNP	Jednonukleotidový polymorfismus
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
CYP	Cytochrom P450
NNK	Specifický nitrosamin tabáku
CMP	Cévní mozková příhoda
TIA	Tranzitorní ischemická ataka
ACI	Arteria carotis interna
ACM	Arteria cerebri media
AV	Arteria vertebralis
AS	Aterosklerotické
CT	Počítačová tomografie
EKG	elektrokardiogram
KO	Krevní obraz
CRP	C-reaktivní protein
EEG	elektroencefalografie
MRI, MR	Magnetická rezonance
MRA	MR angiografie
CTA	CT angiografie
P2Y	Blokátory ADP receptorů
PAR	Destičkový trombinový receptor
GP IIb/III	Povrchové destičkové glykoproteiny
COX	Enzym cyklooxygenáza
ASA, KAS	Kyselina acetylsalicylová
cca	Zhruba, asi, přibližně
tzv.	Tak zvaný
např.	Například
DM	Diabetes mellitus
PPIs	Proton Pump Inhibitors
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PCR RFLP	Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism
PCR ARMS	Amplification refractory mutation detection system



ALP	Alkalická fosfatáza
AS PCR	alelově specifická PCR
PM	poor metabolizer
IM	intermediate metabolizer
EM	extensive metabolizer
UM	ultrarapid metabolizer
ADP	Adenosindifosfát
RNA	Ribonukleová kyselina
PK	Pozitivní kontrola
NK	Negativní kontrola
FAM	Karboxyfluorescein
HEX	hexachloro – fluorescein
STEMI	ST segment elevated myocardial infarction (infarkt myokardu s elevací ST segmentu)
PTCA	angioplastika věnčitých (koronárních) tepen