



FARMAKOGENETIKA II

Doc. RNDr. Ladislava Bartošová, Ph.D.
Farmakologický ústav, Lékařská fakulta MU Brno



KLINICKÉ MOŽNOSTI VYUŽITÍ FARMAKOGENETIKY

1. PERSONALIZOVANÁ MEDICÍNA

„Personalised medicine, precision medicine“

= multidisciplinární vědní obor, zabývající se optimalizací léčebných a diagnostických postupů u konkrétního pacienta s využitím moderních metod.

SPRÁVNÁ DIAGNÓZA
SPRÁVNÁ LÉČBA
PRO SPRÁVNÉHO PACIENTA
VE SPRÁVNÉM ČASE

2. INDIVIDUALIZACE FARMAKOTERAPIE

- farmakoterapie „ušitá na míru“ pro **konkrétního pacienta** tak, aby byla **NEJEFEKTIVNĚJŠÍ** a měla **NEJMÉNĚ NÚ**
- výběr vhodné kombinace při maximálním snížení rizika lékových interakcí
- úprava dávkování respektující genový polymorfismus

IDEÁLNÍ LÉČIVO:

- **Efektivní léčba nebo prevence nemoci**
- **Minimální nežádoucí účinky**

3. PREDISPOZICE K PATOLOGICKÝM STAVŮM

K čemu genotypizace?

- **Upřesnění diagnózy**
- **Predikce rozvoje choroby**

K čemu nám toto zjištění bude ?

- Vyhnout se vysoce rizikové farmakoterapii
- Úprava životního stylu



Oddálení nástupu choroby
Zmírnění projevů nemoci

4. VYUŽITÍ FARMAKOGENETIKY PŘI DESIGNU KLINICKÝCH STUDIÍ

Mít na zřeteli genetickou diverzitu subjektů klinických hodnocení

I kvalitní léčivo může být odmítnuto z důvodu **nízké účinnosti a vysokého procenta NÚ** v případě, že se ve studii náhodně sejde více jedinců určitého **variantního genotypu.**



Klinicky významné genové polymorfismy

Světové organizace zabývající se využitím farmakogenetických znalostí v klinické praxi

Pharmacogenetic and Pharmacogenomic Knowledge Base (PharmGKB)

CÍL: vytvořit dokonalý zdroj informací o interakcích mezi genetickou variabilitou a lékovou odpovědí www.pharmgkb.org

„CLINOMICS“ (Aplikovaná klinomika) studuje genomická data společně se souvisejícími daty klinickými.

Klinomika má být mostem mezi základními biologickými daty a jejich účinkem na lidské zdraví

Světové organizace zabývající se využitím farmakogenetických znalostí v klinické praxi

Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). Konsorcium pro zavádění farmakogenetických poznatků do klinické praxe. **SNAHA O INDIVIDUALIZACI TERAPIE** ⇨

CÍL: vytvořit volně dostupné, recenzně hodnocené **GUIDELINES PRO DÁVKOVÁNÍ LÉČIV** pro ty, kteří mají přístup k preventivnímu genetickému testování.

Guidelines CPIC jsou navrženy tak, aby klinickým lékařům pomohly pochopit, jak optimalizovat terapii léčivem za předpokladu, že mají k dispozici výsledky genetických testů pacienta

<https://cpicpgx.org/guidelines/>

CPIC guidelines published, in progress, or planned

Gene – Drug	Current CPIC level*	Status
<i>TPMT, NUDT15</i> – thiopurines	A	Published
<i>CYP2C19</i> – clopidogrel	A	Published ; update in progress
<i>CYP2C9, VKORC1, CYP4F2</i> – warfarin	A	Published
<i>CYP2D6</i> – codeine	A	Published ; update in progress
<i>HLA-B</i> – abacavir	A	Published
<i>SLCO1B1</i> – simvastatin (other in drug class will be evaluated when updated)	A	Published
<i>HLA-B</i> – allopurinol (<i>HLA-A</i> will be evaluated when updated)	A	Published
<i>CYP2D6, CYP2C19</i> – TCAs (<i>ABCB1</i> will be evaluated when updated)	A	Published
<i>HLA-B/HLA-A</i> – carbamazepine/oxcarbazepine	A	Published
<i>DPYD</i> – 5FU / capecitabine	A	Published
<i>IFNL3</i> – pegIntron	A	Published
<i>CFTR</i> – Ivacaftor	A	Published
<i>G6PD</i> – rasburicase	A	Published
<i>CYP2C9, HLA-B</i> – phenytoin (<i>SCN1A</i> will be evaluated when updated)	A	Published ; update in progress
<i>CYP2D6, CYP2C19</i> – SSRIs (<i>ABCB1</i> will be evaluated when updated)	A	Published
<i>CYP3A5</i> – tacrolimus	A	Published
<i>UGT1A1</i> – atazanavir	A	Published
<i>CYP2C19</i> – voriconazole	A	Published
<i>CYP2D6</i> – ondansetron/tropisetron	A	Published
<i>CYP2D6</i> – tamoxifen	A	Published

Level Definitions for CPIC Genes/Drugs

CPIC LEVEL	CLINICAL CONTEXT	LEVEL OF EVIDENCE	STRENGTH OF RECOMMENDATION
A	Genetic information should be used to change prescribing of affected drug	Preponderance of evidence is high or moderate in favor of changing prescribing	At least one moderate or strong action (change in prescribing) recommended.
B	Genetic information could be used to change prescribing of the affected drug because alternative therapies/dosing are extremely likely to be as effective and as safe as non-genetically based dosing	Preponderance of evidence is weak with little conflicting data	At least one optional action (change in prescribing) is recommended.
C	There are published studies at varying levels of evidence, some with mechanistic rationale, but no prescribing actions are recommended because (a) dosing based on genetics makes no convincing difference or (b) alternatives are unclear, possibly less effective, more toxic, or otherwise impractical or (c) few published studies or mostly weak evidence and clinical actions are unclear. Most important for genes that are subject of other CPIC guidelines or genes that are commonly included in clinical or DTC tests.	Evidence levels can vary	No prescribing actions are recommended.
D	There are few published studies, clinical actions are unclear, little mechanistic basis, mostly weak evidence, or substantial conflicting data. If the genes are not widely tested for clinically, evaluations are not needed.	Evidence levels can vary	No prescribing actions are recommended.



POLYMORFISMY OVLIVŇUJÍCÍ FARMAKOKINETIKU a FARMAKODYNAMIKU LÉČIV

ENZYMY CYTOCHROMU P 450

Ovlivňují farmakokinetické děje (metabolismus léčiv)

CYP₂D6

Představuje sice pouze 4 % aktivity všech izoenzymů, ale biotransformuje téměř 25 % klinicky používaných léčiv.

Genové polymorfismy mají významnější klinický dopad tam, kde metabolismus nemá alternativní cesty.

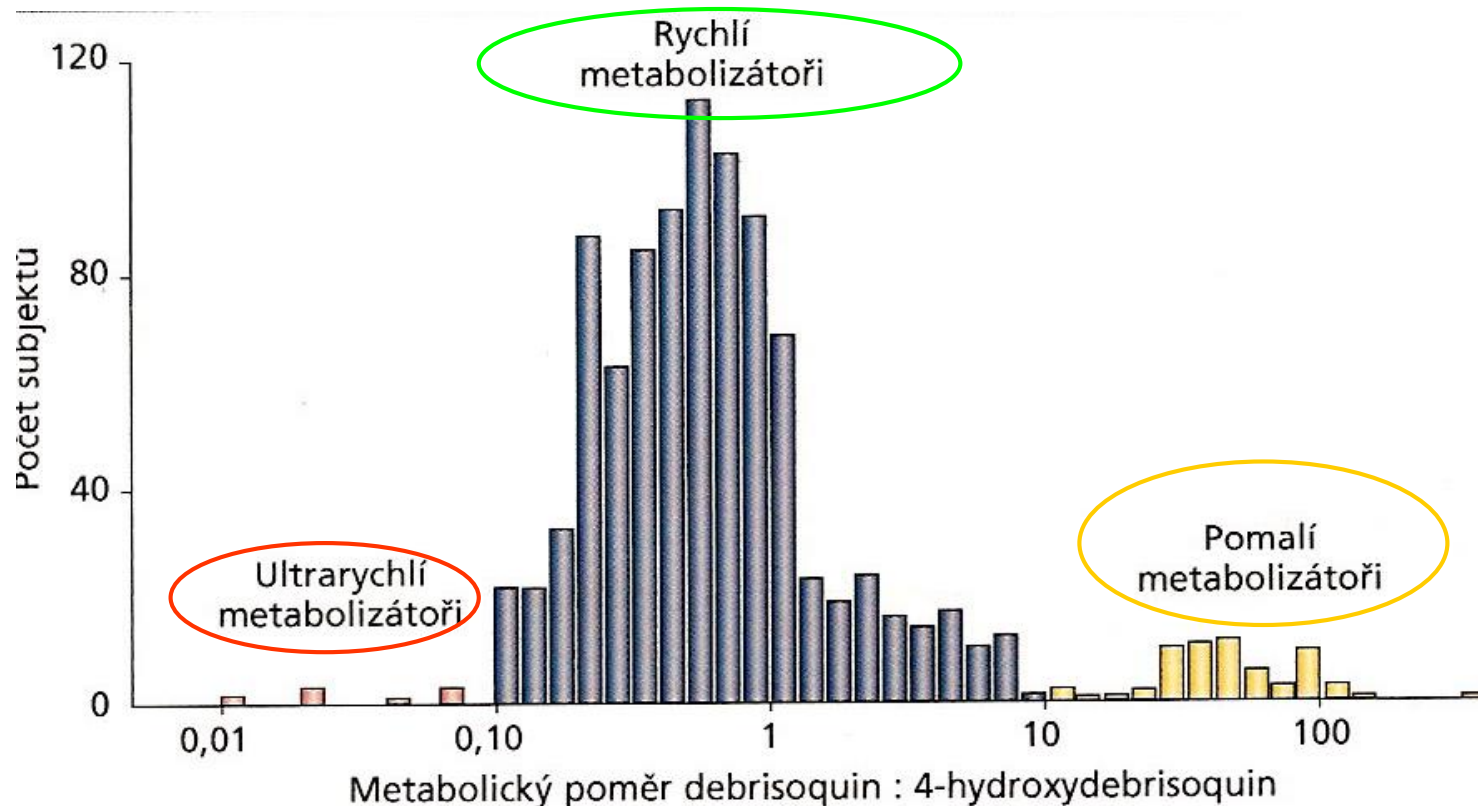
V genu pro CYP₂D6 bylo identifikováno **více jak 100 polymorfismů**, které vedou od úplné deficiencie enzymu, přes jeho sníženou aktivitu až k ultrarychlému metabolismu.

CYP2D6

Rozdělení populace podle FENOTYPU

Ultrarychlí metabolizéři (URMs)

Nositelé duplikovaných a multiduplikovaných genů



Rychlí metabolizéři (RMs)

Většinová populace, tj. nositelé standardních alel + heterozygoti pro alely snižující aktivitu

Pomalí metabolizéři (PMs)

Homozygotní nositelé variantních alel snižujících aktivitu enzymu, příp. vedoucích k inaktivaci enzymu



Standardní (wild) alely:

CYP2D6*1 a CYP2D6*2

Variantní alely:

*3, *4, *5 - kódují inaktivní enzymy

*10, *17 - kódují enzymy se sníženou aktivitou

Variantní alela CYP2D6*4 (G1934A ⇒ chybný sestřih)

V Kavkazské populaci - 12-21%, Asiaté 1%, Afroameričané 2%

Variantní alela CYP2D6*10 (substituce C188T ~ Pro34Ser)

V Kavkazské populaci - 1-2%, Asiaté až 51%, Afroameričané 6%

Duplikace až multiplikace genu CYP2D6

(může být 2,3,4,5, až 13 kopií genu za sebou).

Jsou příčinou ultrarychlého metabolismu.

Nejvyšší výskyt v populacích Středního východu a na severu Afriky.

Klinické důsledky přítomnosti variantních alel **CYP2D6**

7% populace patří mezi lidi s nízkou aktivitou, cca 1% s vysokou aktivitou enzymu CYP2D6

Klinické důsledky **snížené aktivity** CYP2D6

- Desetinásobné zvýšení plazmatické koncentrace **ATOMOXETINU** u dětí při stejné dávce ⇒ vyšší riziko NÚ (terapie ADHD – hyperaktivita s poruchou pozornosti)
- Smrt dítěte léčeného **FLUOXETINEM** (antidepresivum) přičítána předávkování v důsledku polymorfismu v genu CYP2D6)
- Nedostatečný analgetický účinku **TRAMADOLU** (analgetikum) V menší míře se tvoří metabolit, který má ještě větší analgetický účinek než samotná látka tramadol.
- Rezistence k analgetickému účinku **KODEINU** (5-10% kodeinu se přeměňuje na morfin demetylací enzymem CYP2D6). Při nedostatečné aktivitě tohoto enzymu – vzniká více glukuronid, který nemá analgetický účinek



Klinické důsledky přítomnosti variantních alel **CYP2D6**

7% populace patří mezi lidi s nízkou aktivitou, cca 1% s vysokou aktivitou enzymu CYP2D6

Klinické důsledky **zvýšené aktivity** CYP2D6

- Vyšší procento metabolizace **KODEINU** na **MORFIN** ⇒ intoxikace
- Riziko recidivy u pacientek s nádorovým onemocněním prsu léčených **TAMOXIFENEM**, který je rychle metabolizován
- CYP2D6 genové polymorfismy mohou mít vliv na **závažnost otrav amfetaminy, opioidními analgetiky a antidepresivy** (Haufroid V, Hantson P. 2015)

Taneční droga extáze je také substrát enzymu CYP2D6 !

CYP2C9

Podílí na metabolismu např. **warfarinu** (S-izoforma) nebo fenytoinu.

Standardní (wild) alely:

CYP2C9*1

Variantní alely:

***2** - redukce afinity enzymu k substrátu

Záměna Arg144Cys

Výskyt v Kavkazské populaci: 8-13%

***3** - změna substrátové specificity

Záměna Ile359Leu

Výskyt v Kavkazské populaci: 6-9%

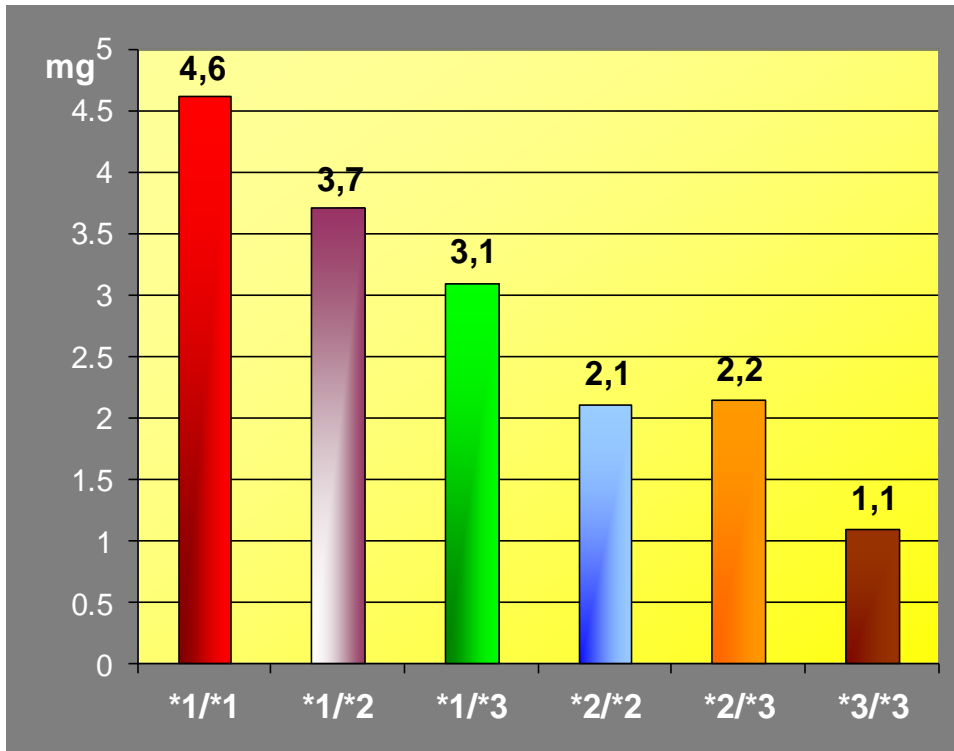
S-warfarin majoritně metabolizován CYP2C9

R-warfarin metabolizován CYP3A4 a CYP1A2

R-warfarin má pouze 30% účinnost S izomeru, ale je ho v plazmě více, což kompenzuje jeho nižší účinnost. Poměr S:R v plazmě se může měnit.



CYP2C9



Pacienti s variantními alelami v CYP2C9 genu potřebují pro udržení stejného INR 2-3 nižší dávky WARFARINU.

Iniciální dávka WARFARINU podle CYP2C9 a VKORC1 genotypů, doporučeno CPIC a upraveno z FDA materiálů

<i>VKORC1</i>	<i>CYP2C9</i>					
	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*2</i>	<i>*1/*3</i>	<i>*2/*2</i>	<i>*2/*3</i>	<i>*3/*3</i>
GG	5-7 mg	5-7 mg	3-4 mg	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg
AG	5-7 mg	3-4 mg	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg
AA	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg

Rozpětí jsou odvozena z mnoha publikovaných klinických studií



Ovlivnění účinnosti warfarinu (farmakodynamika)

VKORC1

Kóduje C1 podjednotku transmembránového proteinu „vitamin K epoxid reduktázového systému“ =VKOR.

Polymorfismus v tomto genu ovlivňuje farmakodynamiku (mechanismus účinku) warfarinu.

Nalezeny dva polymorfismy v těsné vazbě

-1639 G >A v promotorové oblasti – je významnější z klinického hlediska

C1173T v intronu

Standardní alela: **-1639 GG**

Variantní alely: **-1639 GA; -1639 AA**



Až 20 % populace patří k vysoce rizikové skupině nositelů polymorfismu **VKORC1 AA** nebo **VKORC1 GA** a současně alespoň jedné mutace **CYP2C9 (2*, 3*)**

Efekt obou těchto polymorfismů se vzájemně potencuje !
Lékové interakce a interakce s potravou obsahující vitamin K

CPIC - Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium doporučuje používat farmakogenetický algoritmus na stránkách <http://www.warfarindosing.org> - dávkovací tabulku predikující optimální dávku warfarinu i s ohledem na další faktory.



CYP2C19

Podílí se na metabolismu např. **omeprazolu** (minoritně se odbourává i CYP3A4) citalopramu (ze 60 %) a jiných antidepresiv, vorikonazolu (antimykotikum)... rovněž se podílí na konverzi proléčiva **klopidogrelu** na jeho aktivní metabolit.

Standardní (wild) alela:
CYP2C19*1

Variantní alely:

CYP2C19*2 - inaktivní enzym (aberrantní splicing)

rs4244285 Výskyt: 15 % Kavkazanů 12-23 % Asiatů

CYP2C19*3 - inaktivní enzym (* stop kodónu)

rs4986893 Výskyt: 0,4% Kavkazanů 1% Asiatů

CYP2C19*17 ultrarychlý metabolismus

rs12248560 Výskyt: až 21 % Kavkazanů, 2,7 % Asiatů

Asi 3% Evropanů má kompletní deficit CYP2C19 (*2 *2)



Léčba omeprazolem (IPP) v kombinaci s ATB při eradikaci *Helicobacter pylori*

Deficit CYP2C19 výrazně zpomaluje odbourávání omeprazolu a zvyšuje tak jeho léčebný účinek. U PMs (alely *2, *3) se zvyšuje 7-12 x AUC OMEPRAZOLU oproti RMs

	<u>Cure Rate</u>
– Rapid metabolizers	28.6%
– Intermediate metabolizers	60%
– Poor metabolizers	100%

Furuta, T. et. al. Ann Intern Med 1998;129:1027-1030

Variantní alela v CYP2C19 může tedy paradoxně vést **k lepší odpovědi pacienta na léčbu** (Furuta et al. 1998, Furuta et al. 2001, Hagymási et al. 2011)

Odezva pacienta na léčbu je nejlepší u pomalých metabolizérů.



FARMAKODYNAMIKA

Klinická a experimentální gastroenterologie: původní práce

doi: 10.14735/amgh20181

Personalizovaná terapie pacientů s gastroezofageální refluxní chorobou – metodika stanovení genového profilu *CYP2C19*

Personalized therapy in patients with gastroesophageal reflux disease – methodology of *CYP2C19* gene profile's determination

P. Bořilová Linhartová^{1,2}, L. Bartošová³, A. Křenek⁴, L. Bartoš⁵, J. Dolina⁶, F. Marek⁴, Z. Kala⁴, L. Izakovičová Holíčá²

¹ Stomatologická klinika LF MU a FN u sv. Anny v Brně

² Ústav patologické fyziologie, LF MU, Brno

³ Farmakologický ústav, LF MU, Brno

⁴ Chirurgická klinika LF MU a FN Brno

⁵ Ústav biochemie, PFF MU, Brno

⁶ Interní gastroenterologická klinika LF MU a FN Brno

Souhrn: Úvod: Konzervativní léčba refluxní choroby jícnu (GERD – gastroesophageal reflux disease) je v současnosti opřena o skupinu léků, které neúčinněji potlačují sekreci kyseliny solné v žaludku, a to tzv. inhibitory protonové pumpy (IPP). I když se nejedná o kauzální léčbu onemocnění, jsou považovány a akceptovány jako léky volby, zlatého standardu*. Cílem retrospektivní studie bylo zmapovat medikace pacientů s GERD v různých stupních onemocnění, analyzovat jejich individuální variabilitu v genu kódujícím enzym cytochrom P450 (*CYP2C19*) a navrhnout metodiku pro jednoduché stanovení genového profilu pacienta s GERD pro zefektivnění terapeutických postupů. **Metody:** Do studie bylo zařazeno celkem 276 osob s GERD po chirurgickém zákroku se známou farmakologickou anamnézou – 94 pacientů s neerozivní refluxní chorobou, 121 s refluxní ezofagitidou a 61 s Barrettovým jícnem (BE – Barrett's esophagus) nebo adenokarcinomem jícnu (EAC – esophageal adenocarcinoma). Stanovení genotypů dvou polymorfizmů genu *CYP2C19* (*17 rs12248560 a *2 rs4244285) bylo založeno na principu qPCR. **Výsledky:** Více než 90 % pacientů užívalo IPP (omeprazol/lansoprazol/pantoprazol). Ačkoliv ve sledované kohortě předepsaná dávkování IPP odpovídala doporučení pro udržovací terapii, u pacientů nebyla zohledněna míra schopnosti účinnou látku metabolizovat. Bylo zjištěno, že nositelé genotypových kombinací

vybraných položek: 1; 362 kB

Variantní alely:

CYP2C19*2 - inaktivní enzym (aberrantní splicing)

rs4244285 Výskyt: 15 % Kavkazanů 12-23 % Asiatů

CYP2C19*3 - inaktivní enzym (* stop kodónu)

rs4986893 Výskyt: 0,4% Kavkazanů 1% Asiatů

CYP2C19*17 ultrarychlý metabolismus

rs12248560 Výskyt: až 21 % Kavkazanů, 2,7 % Asiatů

21 % Kavkazanů !

Do centra pozornosti se v posledních letech dostává polymorfismus, který může vést k neúspěšnosti terapie v důsledku **rychlého odbourávání léčiva**



Reference SNP (rs) Report Download Facebook Twitter Reddit Help

[Switch to classic site](#)

rs12248560 Current Build 153
Released July 9, 2019

Organism	<i>Homo sapiens</i>	Clinical Significance	Reported in ClinVar
Position	chr10:94761900 (GRCh38.p12) ?	Gene : Consequence	CYP2C19 : 2KB Upstream Variant
Alleles	C>A / C>T	Publications	84 citations
Variation Type	SNV Single Nucleotide Variation	Genomic View	See rs on genome
Frequency	T=0.19899 (24987/125568, TOPMED) T=0.2052 (6412/31250, GnomAD) T=0.153 (767/5008, 1000G) (+ 5 more)		

Variant Details Genomic Placements ?

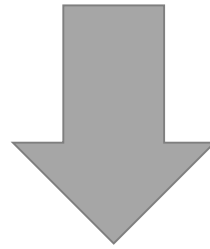
Clinical Significance	Sequence name	Change
Frequency	CYP2C19 RefSeqGene	NG_008384.3:g.4220C>A
Aliases	CYP2C19 RefSeqGene	NG_008384.3:g.4220C>T
Submissions	GRCh37.p13 chr 10	NC_000010.10:g.96521657C>A
History	GRCh37.p13 chr 10	NC_000010.10:g.96521657C>T
Publications	GRCh38.p12 chr 10	NC_000010.11:g.94761900C>A
	GRCh38.p12 chr 10	NC_000010.11:g.94761900C>T
	LOC110599570 genomic region	NG_055436.1:g.1260C>A
	LOC110599570 genomic region	NG_055436.1:g.1260C>T

Gene: [CYP2C19](#), cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19 (plus strand) : 2KB Upstream Variant



Popsány případy neúčinnosti antiagregační terapie KLOPIDOGRELU

- 1) u jedinců s **variantními alelami pro CYP2C19 gen**, ale také
- 2) při současném užívání **OMEPRAZOLU**



ZVÝŠENÉ RIZIKO KVS PŘÍHOD
z důvodu neúčinnosti
KLOPIDOGRELU (proléčivo)

V takovém případě je doporučeno nahradit omeprazol rabeprazolem (nebo lansoprazolem, pantoprazolem) nebo klopidogrel prasugrelem (nebo tikagrelorem)



N-acetyl transferáza 2 (NAT2)

V genu NAT2 popsáno 7 genových polymorfismů charakteru záměny (substituce).

- Nositelé ***4 a *12C** jsou **rychlí metabolizéři (RMs)**
- Nositelé ostatních variantních alel **pomalí metabolizéři (PMs)**

Klinický důsledek SNÍŽENÉ aktivity NAT2 ⇒ vzrůstá riziko NÚ

- IZONIAZID ⇒ periferní neuropatie
- SULFONAMIDY ⇒ hypersenzitivní reakce
- HYDRALAZINY ⇒ syndrom podobný jako lupus (SLE)

DPD (dihydropyrimidin-dehydrogenáza)-gen DPYD

Katalyzuje fluoropyrimidiny, např. kapecitabin (aktivní metabolit 5-FU)

Genové polymorfismy mají význam pro účinnost + toxicitu kombinací protinádorových léčiv obsahujících 5-FU.

Standardní (wild) alela:

***1**

Variantní alely:

***2A** - chybné rozpoznání místa sestřihu (bodová mutace) . Vzniká krátký protein ⇒ **inaktivní enzym**

***13** - záměna nukleotidu ⇒ **snížená aktivita enzymu.**

Výskyt: 1-5,8 % Kavkazanů má polymorfismus ovlivňující funkci enzymu DPD

MTHFR (methylen-tetrahydrofolát-reduktáza)

Katalyzuje konverzi 5,10 methylen-tetrahydrofolátu na 5-methyl-tetrahydrofolát.
(metabolismus kys.listové)

Nejznámější polymorfismy:

C677T

A1298C

Variantní alely vedou ke snížení aktivity enzymu ⇒ zpomalená metylace homocysteinu na methionin ⇒ **akumulace homocysteinu v plazmě** ⇒

kardiovaskulární riziko

- Zvýšená prevalence **tromboembolických poruch** u nositelů
- U homozygotních nositelek variantních alel zvýšené riziko **spontánních abortů**
- **Zvýšená toxicita** někt. cytostatik (cyklofosfamid, MTX, 5-FU)

UGT1A1 (uridin difosfát glukuronosyl transferáza)

Tento enzym **detoxifikuje rozdílné endogenní substance** včetně bilirubinu.

Genový polymorfismus na úrovni promotoru ⇒ snížená exprese ⇒

SNÍŽENÁ AKTIVITA enzymu UGT1A1

⇒ **FAMILIÁRNÍ HYPERBILIRUBINÉMIE** (cca 12% populace - PMs)

⇒ **Gilbertův syndrom** (mutace v „TATA boxu“ - ovl. transkripci)

⇒ Vysoké riziko toxicity u pacientů užívajících **IRINOTECAN***
(myelotoxicita)

⇒ Při terapii **AZATANAVIREM**** musí být u 20-60% pacientů léčba předčasně ukončena kvůli rozvoji žloutenky

* IRINOTECAN se používá v terapii nádorových onemocnění např. u kolorektálního karcinomu. ** AZATANAVIR - antivirotikum proti HIV-1 viru


TPMT (thiopurin S-methyl transferáza)

TPMT se podílí na metabolismu **thiopurinových léčiv** (AZATHIOPRIN, MERKAPTOPURIN (6-MP), THIIOGUANINY).

Standardní (wild) alely:
TPMT*₁

Variantní alely jsou SNP

TPMT* ₂	G238C
TPMT* _{3B}	G460A
TPMT* _{3C}	A719G
TPMT* _{3A}	kombinace G460A + A719G



léčba akutní lymfoblastické leukemie, imunosupresivum, léčba IBD... např. Crohnova choroba.

Významná populační variabilita

TPMT

VÝSKYT VARIANTNÍCH ALEL V POPULACÍCH

Kavkazská - TPMT*_{3A}, TPMT*_{3C}, TPMT*₂

Africká - TPMT*_{3C}

Afro-americká - TPMT*_{3C}, TPMT*₂

Asijská - TPMT*_{3C}

11 % Evropanů má **sníženou**
katalytickou aktivitu TPMT
0,3 % Evropanů má **kompletní**
deficit tohoto enzymu

TPMT

Přítomnost variantních alel ⇒ snížení aktivity enzymu TPMT



těžké, život ohrožující toxicity při užívání thiopurinů



Dávkování azathioprinu

zvl. pro KREVNÍ KMENOVÉ BUŇKY

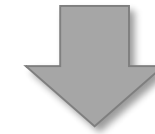
Standardní (wild) alela TPMT:

Terapeutická dávka dle SPC

Variantní alely TPMT :

Heterozygoté: 65 % standardní terapeutické dávky

Homozygoté: 6-10 % standardní terapeutické dávky



MYELOSUPRESE



FATÁLNÍ LEUKOPENIE

Genetické testování TPMT je dnes v klinické praxi rutinní a nejčastěji prováděné

Na metabolismu thiopurinových léčiv (merkaptopurin) se podílí i další enzymy, např.

NUDT15

Nudix hydroláza 15

Standardní alela *1

Variantní alela *3

I genotypy tohoto genu jsou řešeny v CPIC guidelinech

NUDT15*1/*1 normální metabolizátoři

NUDT15*1/*3 intermediární metabolizátoři

NUDT15*3/*3 pomalí (poor) metabolizátoři



Zvýšené riziko thiopuriny indukované leukopenie, neutropenie a myelosuprese

TRANSPORTÉRY

- **ABC transportéry** proteinové a P-glykoproteinové povahy (MDR, MRP, BCRP, P-gp, LRP)
- **SLC transportéry** (SLC2A1, SLCO,... OAT, OATP, OCT, OCTN) (aniontové, kationtové a polypeptidové transportéry)

Pro farmakokinetiku léčiv jsou nejvýznamnější genové polymorfismy v ABC transportérech.

Přítomnost polymorfismů v genech kódujících transportéry ovlivňují efflux léčiva z buňky (nádorové buňky)

NÍZKÁ HLADINA
cytostatika v nádorové
buňce

RELAPS



VYSOKÁ HLADINA
cytostatika v
nádorové buňce

RIZIKO ZÁVAŽNÝCH NÚ

MDR1 (ABCB1)

kóduje ATP-dependentní effluxovou P-glykoproteinovou pumpu.
Chrání buňky proti xenobiotikům.

Velkým problémem je zvýšená exprese v nádorových buňkách ⇒ **multidrug rezistence**

Nejvíce studované polymorfismy v tomto genu:

- **3435C>T** - mění expresi proteinu v duodenu, ovlivňuje absorpci digoxinu
- **2677G>T/A**
- **1236C>T**

Studovány jsou obvykle společně.

Ovlivňují biologickou dostupnost cytostatik, kinetiku takrolimu, ondansetronu, popsáno vyšší riziko CML a neefektivita terapie, náchylnost k UC, vznik kortikorezistence.....

DALŠÍ PŘÍKLADY transportérů...

BCRP (ABCG₂)

Breast **C**ancer **R**esistance **P**rotein.

Funguje jako effluxová pumpa téměř ve všech tkáních

Zjištěna pozitivní korelace mezi vysokou expresí BCRP a špatnou odezvou pacientů na terapii u AML.

Rovněž pacienti s CML léčení TKI (inhibitory tyrozinkinázy) např. **imatinib** jsou na léčbu rezistentní

SLCO1B1 (OATP1B1)

Organic **A**nion **T**ransporting **P**olypeptide

Transportér je na bazolaterální membráně hepatocytů a podílí se na příjmu např. bilirubinu, **statinů, metotrexátu**

Haplotyp s variant. alelami *15, *16 a *17 ⇒ **VYŠŠÍ RIZIKO SIMVASTATINEM
INDUKOVANÁ MYOPATIE až rhabdomyolýza**



POLYMORFISMY OVLIVŇUJÍCÍ CÍLOVÉ STRUKTURY léčiv

ALOX-5 (arachidonát 5 lipoxygenáza) - polymorfní úseky v promotor. oblasti

Polymorfismus v tomto enzymu se vyskytuje u pacientů s bronchiálním astmatem.

Redukce terapeutické odpovědi na **zileuton** - inhibitor ALOX-5.

ACE (angiotenzin konvertující enzym) - Inzerčně/deleční polymorfismus v intronu 16

Jedinci se dvěma delečními alelami (genotyp DD) mají 2x vyšší hladinu ACE v plazmě → predispozice k hypertenzi a ICHS. špatná prognóza v případě srdečního selhání a slabá terapeutická odpověď na **ACE inhibitory**.

Účinnost farmakoterapie může být komplikovaná i v případech

FAMILIÁRNÍ HYPERCHOLESTEROLÉMIE

- V genu pro LDL receptor bylo popsáno víc než 680 mutací po celém genu. Vedou ke zkrácení receptorového proteinu nebo jeho úplnému chybění
- SNP v genu kódujícím **cholesterol-7- α -hydroxylázu** \Rightarrow odchylky LDL částic.

FAMILIÁRNÍ HYPERINZULINÉMIE

Nalezeny mutace v ATP-draslíkovém kanále, který je součástí receptoru pro **sulfonylureu (SUR)** – delece, substituce, alternativní sestřih – vznikají nefunkční formy receptoru

POLYMORFISMY ASOCIOVANÉ S RIZIKEM VÝSKYTU PATOLOGÍÍ

Deficit glukózo-6-fosfát dehydrogenázy (deficit G6PD)

„fabismus či favismus“ patří celosvětově mezi nejčastější enzymatické defekty

Glukóza - 6 - fosfát dehydrogenáza katalyzuje redukci NADP^+ na NADPH \Rightarrow ochrana buněk před oxidačním stresem, zvl. u erytrocytů. **Pokud chybí, hrozí hemolýza erytrocytů.**

V genu G6PD (na chromozomu X) bylo identifikováno více než 180 variantních alel (90 % SNPs). Výskyt variantních alel zvl. v oblastech s výskytem malárie.

U jedinců s mutací (hemizygotní chlapci, homozygotní dívky) je **zvýšené riziko akutní hemolýzy 24-72 hodin po podání léčiv: acetylsalicylová kys. (ASA), nitrofurantoin, sulfametoxazol, chloramfenikol, ciprofloxacin,....**

Polymorfismy ovlivňující funkci imunitního systému

Mutace v **genu NOD2 /CARD15** predisponují svého nositele k nespecifickým střevním zánětům = IBD, zvl. CROHNOVA CHOROBA nebo také sarkoidóza.

Tento gen kóduje intracelulární molekulu regulující apoptózu a aktivaci jaderného faktoru NF- κ B.

V genu byly popsány např. substituční polymorfismy **Arg702Trp** (rs2066844) a **Gly908Arg** (rs2066845) a posunová mutace **Leu1007fs insC** (rs2066847) vede k narušení čtecího rámce při translaci a k tvorbě inaktivního proteinu.

Přítomnost obou variantních alel genu **ICAM-1 (CD54)** zvyšuje u svého nositele pravděpodobnost vzniku zánětlivých onemocnění (často autoimunitní etiologie). Gen kóduje intracelulární adhezní molekulu, která hraje významnou roli v procesu zánětu a regulaci vaskulární permeability

Např. SNP **Lys469Glu** (rs5498) vede ke změně funkce proteinu, který je důležitý pro adhezi B-buněk a dendritických buněk ⇒ alterace imunitního systému ⇒ predispozice k autoimunitním onemocněním

Určitá kombinace alel genů kódujících HLA molekuly predisponuje své nositele k výskytu **CELIAKIE (HLA-DQ2, HLA-DQ8, DRB1)**.

Jedinec může mít rizikový genotyp a po celý život neonemocnět. Je však prakticky vyloučeno, aby jedinec s celiakií neměl rizikový genotyp

Některé HLA haplotypy asociovány s:

- kožní hypersenzitivitou nebo
- s poškozením jater vyvolaných někt. léčivy: **allopurinol, karbamazepin, abakavir**

Genetické vyšetření predispozice celiakie

Celiakie je celoživotní geneticky podmíněné autoimunitní onemocnění, které se manifestuje po různé dlouhé době konzumace obilovin s obsahem lepku (glutenu). Vyskytuje se pouze u pacientů s genetickou predispozicí, která je silně asociovaná s HLA-DQA1*05-DQB1*02 (HLA-DQ2) a HLA-DQA1*03-DQB1*0302 (HLA-DQ8). Test na přítomnost či nepřítomnost alel HLA sérotypů DQ2 a DQ8 je používán jako jeden z markerů potvrzujících diagnózu (pozitivní nález), nebo jako marker pro vyloučení podezřelé diagnózy (negativní nález).

Indikace k vyšetření na celiakii

- gastrointestinální symptomy (chronický nebo intermitentní průjem, bolesti břicha)
- pozitivní rodinná anamnéza (příbuzní prvního řádu – rodiče, sourozenci)
- deficiencie IgA
- neprospívající děti s růstovou retardací, opožděnou pubertou
- jiná autoimunitní onemocnění (diabetes mellitus I. typu, hepatitida, thyreoiditida)
- infertilita, opakované potraty
- exantém – dermatitis herpetiformis
- osteoporóza nepřiměřená věku
- anémie, především sideropenická
- neuropsychiatrické abnormality (polyneuropatie, ataxie, epilepsie, úzkosti/deprese)
- Downův, Turnerův, Williamsův syndrom

Výhody genetického vyšetření predispozice celiakie

- vyšetření se provádí jednou za život
- odběr biologického materiálu nezatěžuje pacienta
- výsledek vyšetření neovlivňuje bezlepková dieta
- méně falešně negativních výsledků v porovnání s imunologickými testy
- negativita HLA-DQ2, HLA-DQ8 s celiakií spojených haplotypů umožňuje vyloučit onemocnění celiakii bez bioptického vyšetření
- dle doporučení Evropské společnosti pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu (ESPGHAN) z roku 2012 u pacientů s přesvědčivou klinikou a vysokou pozitivitou protilátek (TG 2 IgA > 10x nad normu) pozitivita HLA-DQ2 nebo DQ8 umožňuje stanovit diagnózu celiakie bez bioptického vyšetření

Predispozice k maligní hypertermii (MHS)

Je to autozomálně dědičné onemocnění = porušení vápníkového metabolismu ve svalové buňce. Spouštěčem může být kombinace inhalačního anestetika a sukcinylcholinu.

PROJEVY: uvolnění velkého množství Ca iontů, nekontrolovatelná svalová kontrakce \Rightarrow hypermetabolismus \Rightarrow uvolnění tepla \Rightarrow zvýšení produkce CO₂, laktátu

Gen RYR1 kódující ryanodinový receptor na membráně ER

Gen CACNA 1S kódující podjednotku alfa 1S napětově řízeného vápníkového kanálu

Polymorfismy ovlivňující hemostázu „TROMBOFILNÍ“ GENY

Jsou to geny, jejichž variantní alely predisponují své nositele k hluboké žilní tromboze (HŽT), tromboembóliím a jiným poruchám rovnováhy mezi prokoagulačními a antikoagulačními faktory.

Faktor V

Faktor II (protrombin)

Faktor XIII

Protein C (PROC) = přirozený antikoagulační faktor. APC rezistence.

MTHFR

Studovány z hlediska trombofilií jsou také polymorfismy v dalších genech: **gen pro PAI-1, receptor PROC, gen pro TNF- α**

FAKTOR V

Leidenská mutace v genu pro faktor V

Podstatou je **bodová mutace G1691A** → záměna AK

Faktor V je pak odolný proti štěpení aktivovaným proteinem C (APC), protože vazebná (štěpná místa), kde se APC váže na FV jsou změněná.

Změna tohoto štěpného místa ⇒ snížení degradace faktoru V a VIII.

VÝSKYT

5% Evropanů. Nevyskytuje se mimo Evropu!

4-8x (jiné zdroje: 5-10x) zvýšené riziko vývoje žilní trombózy u heterozygotů

50-80x (jiné zdroje: 80-100x) vyšší riziko u homozygotů.

V kombinaci s užíváním hormonální antikoncepce riziko ještě mnohem vyšší.

Mutace je asociována s rekurentními časnými potraty (Recurrent Pregnancy Loss – RPL)

Další nalezené variantní faktory V:

Cambridge, Hong Kong, Liverpool. Mutace Liverpool (Ile 359Thr) je pravděpodobně rovněž asociována se zvýšeným rizikem trombotických onemocnění.

FAKTOR II- PROTROMBIN

Substituční mutace **G20210A**. Přítomnost zvyšuje riziko rozvoje žilní trombózy

VÝSKYT: 2% v Kavkazské populaci

Někdy stanovován haplotyp s označením **FV R2 haplotype (H1299R)** = kombinace 4 mutací (3 mutace v genu pro FV, včetně Leidenské + 1 mutace v protrombinu). Bylo zjištěno, že produkty genů v tomto haplotypu ovlivňují protrombinázový komplex.

FAKTOR XIII

Polymorfismus **Val34Leu** nalezen v kódujícím úseku genu pro podjednotku A faktoru XIII. Variantní alele připisován **protektivní efekt** proti HŽT. FXIII kódovaný variantní alelou je aktivován trombinem rychleji než standardní varianta

PROTEIN C

Systém proteinu C (PROC) a proteinu S (PROS) je jeden z nejdůležitějších mechanismů kontroly procesu krevního srážení. PROC se váže na komplex trombin-trombomodulin \Rightarrow *APC.

APC + PROS \rightarrow proteolýza Va a VIIa.

Deficit PROC je rizikovým faktorem pro tromboflebitidu, hlubokou žilní trombózu a plicní tromboembolismus.

V současnosti studovány tři polymorfismy v promotoru genu pro protein C

-1654 C/T, -1641 A/G and -1476 A/T

u nichž byla nalezena korelace s plazmatickou hladinou PROC \Rightarrow riziko rozvoje HŽT.

Všechny tři polymorfismy se dědí společně v haplotypu.

Některé z haplotypů jsou protektivní, jiné trombofilní.

Je nezbytné studovat jednotlivé kombinace, nikoliv polymorfismy zvlášť

Polymorfismy byly nalezeny i v transmembránovém **RECEPTORU PRO PROTEIN C**

Blokáda **EPROCR** může **akcelarovat vývoj trombu *in vivo***.

V genu pro tento receptor bylo nalezeno několik mutací – nejčastěji je studován SNP **A6936G**.

Nalezené výsledky ukazují, že EPROCR může hrát významnou roli v náchylnosti a rozvoji HŽT.

Příloha č. 3 LP

IFCOR
KLINICKÉ LABORATOŘE

Seznam vyšetření

Pracoviště Brno Viniční Laboratoř molekulární diagnostiky

Detekce mutací a polymorfismů trombofilních faktorů

Faktor II – stanovení mutace G20210A metodou real-time PCR

Faktor V (Leiden) – stanovení mutace Arg506Gln (G1691A) metodou real-time PCR

MTHFR (C677T) – stanovení mutace C677T (Ala222Val) metodou real-time PCR

MTHFR (A1298C) – stanovení mutace A1298C (Glu429Ala) metodou real-time PCR

Faktor XIII – stanovení mutace Val34Leu metodou real-time PCR

Faktor PAI-1 – stanovení polymorfismu 4G/5G metodou real-time PCR

Vyšetřovaný materiál: nesrážlivá krev (EDTA)

Stabilita vzorku: 2-8°C měsíc

-20°C po delší dobu

Doba odezvy: 1-10 dní

Druh veličiny: přítomnost/nepřítomnost mutace

Hodnocení: wild type = negativní = nemutovaný homozygot

homozygot – mutovaný homozygot

heterozygot – heterozygot

**Genetické predispozice nelze ani
přeceňovat ani podceňovat !**

INDIVIDUÁLNÍ RIZIKO KLINICKÝCH KOMPLIKACÍ

je výsledkem vzájemných interakcí mezi
VNĚJŠÍMI FAKTORY + GENETICKÝMI FAKTORY

GENETICKÉ FAKTORY

Vytvoří podmínky

- **GENOTYP:** *geny kódující receptory , iontové kanály, metabolické enzymy , transportéry..... a další*

NEGENETICKÉ FAKTORY

Jsou spouštěčem patogeneze

Faktory vnějšího prostředí

- **NUTRIČNÍ FAKTORY**, *životní styl (kouření, konzumace alkoholu, sportovní aktivity) pozitivní myšlení...*
- **DRUG-DRUG INTERAKCE** *(souběžně podaná léčiva)*

Negenetické změny DNA, RNA, proteinů

- **EPIGENETICKÉ ZMĚNY V DNA** *(metylace, acetylace)*
- **ROZDÍLNÁ INAKTIVACE CHR. X**
- **POSTTRANSLAČNÍ MODIFIKACE** *proteinů (alternativní sestřih)*

Děkuji Vám za pozornost