

Ústav klinické farmakologie FN a LF OU, Ostrava
Ústav farmakologie Lékařské fakulty UP, Olomouc

Mgr. Jana Ďuricová

**TERAPEUTICKÉ MONITOROVÁNÍ LÉČIV V KLINICKÉ PRAXI A
VÝZKUMU.**

Disertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu,
studijní obor Lékařská farmakologie.

Ostrava 2011

Poděkování

Ráda bych poděkovala několika lidem, bez kterých by nebyla tato disertační práce napsána:

- mému školiteli doc. MUDr. Milanu Grundmannovi, CSc. za umožnění vypracování disertační práce na Ústavě klinické farmakologie
- primárce ústavu klinické farmakologie FN Ostrava MUDr. Ivaně Kacířové, Ph.D. za pomoc při sbírání dat
- Mgr. Iloně Peřinové, Ph.D. za zavedení metody a pomoc při měření hladin
- sestřám Ince Delongové a Simoně Richterové za pomoc při sbírání dat
- RNDr. Haně Brozmanové za občasnou konzultaci výsledků
- mé rodině za psychickou podporu

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité prameny.

V Ostravě 1.11.2011

Mgr. Jana Ďuricová

OBSAH

1. Úvod
2. Cíle
3. Výsledky
4. Diskuze
5. Závěry
6. Literatura
7. Souhrn
8. Publikované práce

1. ÚVOD

Cytochrom P450

Enzymový systém cytochromu P450 je nejdůležitějším systémem první fáze biotransformačních enzymů. Biotransformací většinou mění lipofilní látky na hydrofilní nebo polární, které mohou být z organismu následně vyloučeny. Enzymy cytochromu P450 tvoří superrodinu hemoproteinů. Na klasifikaci jednotlivých enzymů cytochromu P450 se využívá podobnosti aminokyselinové sekvence. V rámci této nomenklatury jsou jednotlivé enzymy sdruženy v rodinách a subrodinách označované předponou „CYP“. Enzymy se shodností v sekvenci aminokyselin 40 % a více patří do jedné rodiny (značí se arabským číslem, např. CYP3). Enzymy se shodností sekvence vyšší než 55 % patří do jedné subrodiny (značí se velkým písmenem, např. CYP3A). Enzymy, jejichž proteiny jsou kódovány jednotlivými geny (označené italkou) se značí arabským číslem za písmenem, např. CYP3A4 [1-4]. V biotransformaci léčiv jsou nejvýznamnější enzymy z rodin 1-3, jedná se o enzymy CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 a CYP3A5. Distribuce enzymů cytochromu P450 v organismu člověka je vysoká. Nejvyšší hladiny se nacházejí v játrech, významné hladiny jsou také v plicích, tenkém střevě, ledvinách, kůži, mozku a nadledvinkách. V buňce se cytochrom P450 nachází v hladkém endoplazmatickém retikulu nebo mitochondriích. Co se týče podílu jednotlivých enzymů z rodin cytochromu P450 1-3 na celkovém obsahu v játrech, má nejvyšší zastoupení CYP3A4 s 30 %. Kvantitativní zastoupení jednotlivých enzymů v játrech však nekoreluje s jejich významností pro metabolismus léčiv (Tabulka 1) [2-3].

Tab 1. Průměrný podíl jednotlivých enzymů na celkovém obsahu cytochromu P450 v játrech a na biotransformaci léčiv [3]

CYP450	Podíl na obsahu (%)	Podíl na biotransformaci (%)
1A2	12	4
2C	20	11
2D6	4	30
2E1	6	2
3A4	30	52

Aktivita metabolických enzymů může významně kolísat. Rozdíly v hladinách a aktivitách enzymů mohou vést k rozdílným plazmatickým hladinám léčiv mezi jednotlivými pacienty a tím k rozdílné odpovědi na lék (nedostatečný nebo nadměrný účinek léku). Tyto odlišnosti v metabolické aktivitě enzymů cytochromů P450 mohou být způsobeny faktory genetickými (genetický polymorfismus) a negenetickými (pohlaví, rasa, patologický stav a faktory prostředí jako kouření a expozice různým látkám).

Pro genetický polymorfismus v biotransformaci léčiv jsou podstatné genové mutace. Jejich podkladem může být záměna, chybění, vsunutí jednoho nebo více nukleotidů, duplikace nebo amplifikace genomu. Genetické rozdíly tvoří významnou příčinu variability zejména u enzymu CYP2D6, CYP2C9 a CYP2C19 [5]. Aktivita těchto enzymů je polymorficky distribuovaná v populaci a závisí na přítomnosti a počtu alelických variant. Nejčastěji se vyskytující alela pro každý enzym („wild type“) je označována *1. Alelické varianty jsou následně označovány podle jejich identifikace, např. *2, *3, atd. Současný přehled alelických variant je na webových stránkách <http://cypalleles.ki.se> [6]. Funkční význam jednotlivých alelických variant se liší, odlišná je také frekvence jejich distribuce mezi jednotlivými etnickými skupinami [7]. Enzymový defekt, projevující se změnou v metabolické aktivitě, je v populaci přenášén autozomálně recesivně, projevy jsou proto nejvýraznější u homozygotů pro defektní gen. Na základě přítomnosti alel možno rozdělit populaci do čtyř metabolických skupin: pomalí metabolizátoři (PMs), intermediární metabolizátoři (IMs), extenzivní metabolizátoři (EMs) a ultrarychlí metabolizátoři (UMs) [8, 9]. PMs jsou jedinci, kteří postrádají funkční enzym, mají tedy nejnižší metabolickou aktivitu. Jsou vystaveni vyššímu riziku toxicity následkem léčiv, nebo je u nich riziko selhání terapie v případě užívání léčiva, které vyžaduje pro svůj účinek metabolickou proměnu (proléčivo). IMs jsou nositeli jedné nefunkční variantní alely, nebo dvou variantních alel se sníženou metabolickou aktivitou. IMs mají široké spektrum aktivity, od okrajově vyšší než je u PMs až po aktivitu blízkou EMs. Většinu populace tvoří EMs, kteří mají dvě funkční (normální) alely. UMs vykazují nejvyšší metabolickou aktivitu v důsledku duplikace nebo amplifikace genu. Metabolizují léčiva rychleji než EMs a mohou vyžadovat vyšší než běžné dávky léčiva pro dosažení terapeutických plazmatických koncentrací. Při užívání proléčiva, může naopak dojít k intoxikaci pacienta.

Genetický polymorfismus však nevysvětluje všechnu variabilitu metabolického enzymu [10]. Rozdílnou biotransformaci možno pozorovat i v rámci jedné genotypové skupiny. Pěkným příkladem je práce Aklillu a kol. poukazující na vliv faktorů prostředí na změnu

aktivity enzymů CYP2D6 u populace Etiopanů žijících nějakou dobu ve Švédsku. Metabolická aktivita enzymu CYP2D6, stanovena pomocí debrisochinu jako substrátové látky, byla vyšší u Etiopanů žijících ve Švédsku ve srovnání s Etiopany žijícími v Etiopii [11]. Metabolickou aktivitu enzymů cytochromu P450 mohou ovlivnit pohlaví [12], patologický stav [13], změna fyziologického stavu (těhotenství) [14] a faktory prostředí jako kouření [15], expozice různým látkám (potrava, léčiva,..). Je známo mnoho příkladů interakcí některých potravin a léčiv s enzymy cytochromu P450, následkem kterých došlo ke klinicky významné inhibici či indukci metabolické aktivity daného enzymu [16-19]. Výsledný efekt lékové interakce pak dále závisí i na tom, zda je pacient nositelem variantní alely nebo se jedná o EM.

Výsledný účinek faktorů genetických i negenetických na metabolismu léčiva závisí na množství enzymů, které se na proměně léčiva podílejí. Enzymy cytochromu P450 mají obecně širokou substrátovou specifitu, to znamená, že se na metabolismu léčiva může účastnit několik enzymů cytochromů P450. V případě, že je metabolismus léčiva závislý principiálně na jedné formě, může dojít k významné změně účinku tohoto léčiva (zejména u léčiv s úzkým terapeutickým indexem). Naopak tam, kde se na metabolismu podílí několik enzymů cytochromů P450, mohou ostatní enzymy převzít roli v metabolismu daného léčiva. Alternativní metabolická cesta nemusí vždy plně nahradit původní cestu, může se měnit spektrum metabolitů [20]. Změna metabolické aktivity a tím následně změna koncentrace léčiva v séru má velký význam zejména u léčiv s úzkým terapeutickým rozmezím. U těchto léčiv i malé výkyvy v hladinách mohou vyvolat významnou změnu v účinku. Dochází buď ke ztrátě účinku nebo naopak k objevení se nežádoucích účinků [3].

Na predikci individuální biotransformační kapacity se používá metoda stanovení genotypu a fenotypu. Výsledek stanovení genotypu však není ovlivnitelný faktory prostředí. Naopak stanovení fenotypu umožňuje určit aktuální enzymatickou aktivitu in vivo, protože zohledňuje i vliv prostředí. Je založeno na podání látky, která je pro určitý enzym vysoko specifická (substrátová látka, probe drug), je teda tímto enzymem exkluzivně metabolizovaná. Výsledná metabolická aktivita se stanoví z metabolického poměru MR (mateřská látka/metabolit) v krvi či v moči a rozdělí populaci do odpovídajících skupin. PMs mají nejvyšší hodnotu MR, naopak UMs vykazují nejnižší hodnotu MR [21].

Cytochrom P450 2D6

Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6) je nejvíce studovaným enzymem z rodiny cytochromů s ohledem na genetický polymorfismus, jde o vůbec první objevený polymorfismus cytochromu P450 [22]. Dvě na sobě nezávislé studie v roce 1970 poukázaly na rozdílnou farmakologickou odpověď antihypertenziva debrisochinu a antiarytmika sparteinu mezi jednotlivci. Pozdější studie prokázaly, že obě látky jsou metabolizovány stejným enzymem, který byl pojmenován debrisochin/spartein oxidaza [23, 24]. I přesto, že je v játrech kvantitativně málo zastoupený (4%), CYP2D6 metabolizuje přibližně 25 % klinicky užívaných léčiv [3]. CYP2D6 je vysoce polymorfický, dosud bylo objeveno více než 75 variantních alel [6]. Stanovení čtyř nejčastěji se vyskytujících variantních alel (CYP2D6*3, *4, *5, *6) určí 98 % PMs v testovací skupině [25]. Gen pro tento enzym je lokalizovaný na dlouhém raménku 22. chromozomu. Zastoupení CYP2D6 metabolických skupin se liší mezi jednotlivými etnickými skupinami. V bělošské populaci je zaznamenaný nejvyšší výskyt PMs, a to 5-10 %. Nejčastěji se vyskytující alelou spojenou s PM u bělošské populace je alela CYP2D6*4 s frekvencí výskytu kolem 20 % [26, 27]. Naopak prevalence PMs je nízká u asijské populace (kolem 1 %). Nízkou frekvenci PMs u této populace možno připsat téměř ojedinělému výskytu defektních alel CYP2D6*3 a *4. Nejčastěji se vyskytující alelou u asijské populace je alela CYP2D6*10. Kolem 50 % Asijců je nositelem této alely ve srovnání jen s 1-2 % nositelů u bělošské populace. Alela CYP2D6*10 je spojována s nižší enzymatickou aktivitou a je považována za jednu z nejčastěji se vyskytujících alel na světě. Asijská populace má tak ve srovnání s bělošskou populací celkově nižší kapacitu metabolizovat CYP2D6 substráty [27, 28]. Nižší celková CYP2D6 metabolická aktivita ve srovnání s bělošskou populací se vyskytuje také i u černé africké a americké populace, je to připisováno značnému výskytu alely CYP2D6*17 [29, 30]. Prevalence UMs u bělošské populace severní Evropy je kolem 1 % [31], vyšší výskyt UMs se vyskytuje v oblasti Středozemního moře (7 %) [32]. Rozdíl ve výskytu UMs mezi obyvateli severní a jižní Evropy je vysvětlován migrací arabské populace na jih Evropy. Nejvyšší výskyt UMs je zaznamenaný u populace Etiopie (29 %) a Saudské Arábie (21 %) [33, 34].

Enzymem CYP2D6 je metabolizovaná řada běžně užívaných léčiv, u části z nich byly publikovány práce zkoumající vliv genetického polymorfizmu na farmakokinetiku i farmakodynamiku těchto léčiv. Jedná se zejména o léčiva používaná v léčbě schizofrenie,

depresivních poruch, kardiovaskulárních onemocnění, některá opioidní analgetika, atd. Tabulka č. 2 uvádí příklady substrátů enzymu CYP2D6 [35].

Tab 2. Příklady některých substrátů CYP2D6 [35]

beta-blokátory	antidepresiva
metoprolol	amitriptylin
propranolol	clomipramin
timolol	desipramin
karvedilol	fluoxetin
antiemetika	imipramin
dolasetron	maprotilin
ondasetron	mianserin
palonosetron	nortriptylin
tropisetron	paroxetin
analgetika/antitusika	venlafaxin
dextromethorphan	neuroleptika
dihydrokodein	haloperidol
ethylmorfin	perfenazin
hydrokodon	risperidon
kodein	thioridazin
tramadol	zuklopentixol
antiestrogeny	antiarytmika
tamoxifen	propafenon

Vliv CYP2D6 polymorfizmu byl popsán zejména u antidepresiv (tricyklických i novějších skupin) a antipsychotik (klasických i atypických). Byly pozorovány změny ve farmakokinetice v závislosti na počtu funkčních alel. Vysoké hladiny u PMs vedly u některých látek ke zvýšenému riziku nežádoucích účinků, u UMs bylo naopak riziko poddávkování pacienta. Vyšší výskyt extrapyramidových nežádoucích účinků neuroleptik je v některých pracích spojován s častějším výskytem genotypu PM. Vyšší riziko selhání terapeutického efektu je popisováno u PMs ve spojení s užíváním prolečiv. Příkladem jsou opioidní analgetika tramadol, kodein a antiestrogenní látka tamoxifen. Z kardiovaskulární medicíny se CYP2D6 podílí na metabolismu beta-blokátorů a antiarytmika propafenonu [35-37].

Debrisochin, spartein, dextrometorfan a metoprolol patří mezi substrátové látky vhodné pro stanovení fenotypu enzymu CYP2D6. MR těchto látek vykazuje bimodální, případně až trimodální distribuci. Tím rozdělí populaci do dvou (tří) metabolických skupin - PMs, (IMs) a EMs [21].

Beta-blokátory - Metoprolol

Z beta-blokátorů se enzymem CYP2D6 metabolizuje metoprolol, karvedilol, nebivolol, timolol a betaxolol. Rozdílná aktivita CYP2D6 může vést k odlišnostem ve farmakokinetice těchto beta-blokátorů, která se může projevit rozdílnou odpovědí pacienta na daný lék. Podíl enzymu CYP2D6 na metabolismu jednotlivých beta-blokátorů je však různě zastoupený [38]. Nejvíce závislý na biotransformační aktivitě CYP2D6 je metoprolol. Metoprolol je beta1-selektivní lipofilní beta-blokátor, který podléhá v játrech výrazné pre-systémové eliminaci. Biotransformuje se 3 cestami, α -hydroxylací (10 %), O-demethylací (65 %) a N-dealkylací (< 10%). Alifatická hydroxylace a zčásti O-demethylace probíhají prostřednictvím CYP2D6. Metabolity mají 1/10 aktivity mateřské látky, jejich účinek na beta-blokádu je klinicky zanedbatelný [39, 40].

Studie s jednorázovým nebo opakovaným podáváním metoprololu u zdravých dobrovolníků i pacientů prokázaly vyšší plazmatické koncentrace metoprololu u pacientů se sníženou aktivitou enzymu CYP2D6. Až 6-násobný rozdíl v dostupnosti metoprololu byl pozorován mezi EMs a PMs. Eliminační poločas metoprololu byl významně prodloužen u PMs ve srovnání s EMs [41-45]. Klinicky užívaný metoprolol je ve formě racemické směsi, enantiomery mají odlišnou afinitu k beta1-receptorům, za beta1-blokádu je zodpovědný zejména S-metoprolol. Odlišnosti mezi enantiomery se nacházejí i v biotransformaci s rychlejší eliminací R-metoprololu u EMs, což má za následek vyšší plazmatické koncentrace aktivnějšího S-metoprololu [46]. S genotypem se mění i preference metabolismu enantiomerů, u PMs tak dochází ke zpomalení metabolismu a k vyrovnání koncentrací S- a R-metoprololu, naopak u EMs se podíl aktivnějšího S-metoprololu ještě zvyšuje. Jedinci s přítomností 1 nebo 2 defektních alel měli 1.3 až 6-násobně vyšší hladiny S-metoprololu ve srovnání s EMs [47, 48]. Koncentrace R-metoprololu kolísaly dokonce výrazněji, 4 až 11-násobní rozdíl byl pozorován mezi metabolickými skupinami jedinců [47]. Vzhledem k výrazným změnám v dispozici metoprololu mezi metabolickými skupinami se předpokládá i významný vliv na účinek metoprololu. Některé práce poukazují na zvýrazněnou nebo prolongovanou beta-blokádu u PMs ve srovnání s EMs. PMs měli větší pokles v srdeční frekvenci a diastolickém krevním

tlaku [49-51]. Jiné práce naopak nepozorovaly významné rozdíly v účinku metoprololu mezi genotypovými skupinami [47, 48, 52]. Obdobně nejednoznačné jsou i výsledky prací zabývající se vztahem mezi CYP2D6 genotypem a výskytem nežádoucích účinků v souvislosti užíváním metoprololu. [48, 52, 53]. Genetický polymorfismus enzymu CYP2D6 patří mezi významné faktory ovlivňující dispozici i účinek metoprololu. Nesmíme však zapomenout ani na úlohu negenetických faktorů, které mohou modifikovat aktivitu daného enzymu. Polypragmázie je poměrně častým jevem zejména u starších pacientů, ovlivnění metabolické aktivity v důsledku lékové interakce nebývá zanedbatelné. Je popisováno několikanásobné zvýšení hladiny metoprololu při kombinaci s inhibitory enzymu CYP2D6 ve srovnání s jedinci bez inhibitoru, rozdíly v koncentraci metoprololu byly obdobné jako rozdíly mezi genotypovými skupinami [47, 54, 55].

Metoprolol je také možno použít i jako substrátovou látku pro stanovení aktivity enzymu CYP2D6, tvorba metabolitu α -hydroxymetoprololu se totiž zdá být exkluzivně zprostředkovaná právě tímto enzymem [21]. Metabolický poměr (MR) metoprolol/ α -hydroxymetoprolol v séru za 3 hod po užití jednorázové dávky metoprololu se používá pro stanovení fenotypu enzymu CYP2D6 [56]. Metoprolol je široce používaný beta-blokátor, výhodné by tedy bylo i využití metabolického poměru metoprololu k jeho metabolitu pro účely CYP2D6 fenotypizace u pacientů na dlouhodobé terapii metoprololem.

Teoretická východiska práce

Trendem posledních let je individualizace terapie pro konkrétního pacienta. Jedním z nástrojů je zjišťování příčin velké variability terapie mezi pacienty, na kterých se významně podílejí změny v aktivitě metabolických enzymů dané buď genetickými nebo negenetickými vlivy. Beta-blokátory, běžně užívaná léčiva v terapii kardiovaskulárních onemocnění, podléhají významné metabolizaci v játrech. Na jejich metabolismu se v různé míře podílí metabolický enzym CYP2D6 známý svou velkou variabilitou v aktivitě. Změny v aktivitě CYP2D6 mohou vést ke změně farmakokinetických a následně farmakodynamických vlastností léčiva. Kromě beta-blokátorů hraje CYP2D6 významnou úlohu i v metabolismu dalších běžně užívaných léčiv. Výhodné by tedy bylo implementovat stanovení aktivity enzymu do terapeutického monitorování léčiv, buď ve formě genotypu nebo fenotypu. V rámci fenotypu se nabízí využití dostupného metoprololu jako substrátové látky.

Charakteristika prací

Přehledové práce

- Cílem práce „*Význam genetického polymorfizmu enzymů cytochromu P450, část I. Enzymový systém cytochromu P450 a cytochrom P450 1A2*“ bylo shrnout poznatky o enzymatickém systému cytochromu P450, popsat faktory ovlivňující aktivitu těchto enzymů.
- V práci „*CYP2D6 a jeho klinický význam*“ jsme se zaměřili na jeden z enzymů cytochromu P450. Popsali jsem genetického polymorfizmu CYP2D6 a jeho vliv u jednotlivých léčiv.
- Farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti beta-blokátorů a vliv CYP2D6 genetického polymorfizmu na tyto látky jsme shrnuli v přehledové práci „*Beta-blokátory*“.

Původní práce

- V práci „*Stanovení metoprololu a jeho metabolitu / α -hydroxymetoprololu v séru metodou HPLC s fluorescenční detekcí*“ jsme popsali zavedení metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro účely stanovení metoprololu a jeho metabolitu α -hydroxymetoprololu z důvodu využití metoprololu jako substrátové látky pro fenotypizaci enzymu CYP2D6
- V následující práci „*Comparison of metoprolol/ α -hydroxymetoprolol metabolic ratio after single dose and in steady state*“ jsme porovnávali metabolickou aktivitu cytochromu P450 2D6 po prvním a opakovaném užití metoprololu
- V práci „*Cytochrome P450 2D6 phenotype and genotype in hypertensive patients on long-term therapy with metoprolol*“ jsme porovnali aktivitu metabolického enzymu CYP2D6 stanovením genotypu i fenotypu s využitím metoprololu jako substrátové látky. Dále jsem zkoumaly vliv metabolické aktivity CYP2D6 na farmakokinetiku a farmakodynamiku metoprololu u pacientů hypertoniků, kteří užívali metoprolol dlouhodobě
- V kazuistice „*Clinically important interaction between metoprolol and propafenone*“ uvádíme praktické využití TDM metoprololu včetně stanovení CYP2D6 fenotypu využitím metoprololu u pacientky na dlouhodobé terapii metoprololem.

2. CÍLE

- Zavést, optimalizovat a validovat HPLC metodu pro stanovení metoprololu a jeho metabolitu α -hydroxymetoprololu pro účely fenotypizace enzymu CYP2D6
- Stanovit význam CYP2D6 genotypu a fenotypu s využitím metoprololu jako substrátové látky u pacientů na dlouhodobé terapii metoprololem

3. VÝSLEDKY

Význam genetického polymorfizmu enzýmů cytochrómu P450, část I.

Enzymový systém cytochrómu P450 a cytochróm P450 1A2

Clinical significance of cytochrome P450 genetic polymorphism, part I.

Enzymatic system of cytochrome P450 and cytochrome P450 1A2

ŘURICOVÁ J., GRUNDMANN M.

Ústav klinické farmakologie FNO a Lékařská fakulta Ostravské univerzity, Ostrava

Súhrn

Inter-individuálna variabilita v odpovedi na liečivo je významným klinickým problémom. Významný podiel na tom majú rozdiely v metabolizme liečiv, jedná sa hlavne o enzýmy cytochrómu P450. Genetický polymorfizmus týchto enzýmů môže ovplyvniť odpoveď pacienta u bežne užívaných liečiv. Cieľom prvej časti tohoto článku je podať stručný výklad o enzymovom systéme cytochrómu P450 a zároveň popísať vplyv genetického polymorfizmu cytochrómu P450 1A2 na účinok liečiv.

Kľúčové slová cytochróm P450, genetický polymorfizmus, CYP1A2

Summary

Inter-individual variability in drug response is a major clinical problem. Much of the observed variability has been observed in drug metabolism, particularly enzymes of cytochrome P450. Genetic polymorphism in these enzymes may influence a patient's response to commonly prescribed drugs. First part of this review describes enzymatic system of cytochrome P450 and further focuses on the influence of genetic polymorphism of cytochrome P450 1A2 on drug effect.

Key words cytochrome P450, genetic polymorphism, CYP1A2

Enzýmový systém cytochrómu P450

Enzýmový systém cytochrómu P450 je univerzálnym systémom biotransformačných enzýmov nachádzajúcich sa v baktériách, rastlinách a rôznych živočíšnych druhoch. Pôvodnou funkciou cytochrómu P450 bolo zachovanie integrity bunecnej membrány metabolizmom a biosyntézou steroidov. Neskôr cytochróm P450 prevzal úlohu v zbavovaní sa organizmu cudzorodých látok ¹⁾. Enzýmy cytochrómu P450 tvoria superrodinu hemoproteínov. Pojem „cytochróm P450“ vznikol na základe absorpčného píku redukovanej formy enzýmu v komplexe s oxidom uhoľnatým pri vlnovej dĺžke 450 nm ^{2, 3)}. Enzýmy cytochrómu P450 sú podľa svojho reakčného mechanizmu často nazývané i oxidázami so zmiešanou funkciou, pretože pri ich metabolickej reakcii sa spotrebováva molekula kyslíka na oxidáciu substrátu.

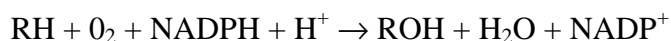
Na klasifikáciu jednotlivých enzýmov cytochrómu P450 sa využíva podobnosti aminokyselínovej sekvencie. V rámci tejto nomenklatúry sú jednotlivé enzýmy združené v rodinách a subrodinách označované predponou „CYP“. Enzýmy so zhodnosťou v sekvencii aminokyselín 40 % a viac patria do jednej rodiny (značí sa arabským číslom, napr. CYP3). Enzýmy so zhodnosťou sekvencie vyššou než 55 % patria do jednej subrodiny (značia sa veľkým písmenom, napr. CYP3A). Enzýmy, ktorých proteíny sú kódované jednotlivými génmi (označené italicou), sa označujú ako formy alebo izoformy (značia sa arabským číslom za písmenom, napr. CYP3A4). U človeka bolo doteraz popísaných 18 rodín a 44 podrodín. Spomedzi nich rodiny CYP 1, 2 a 3 tvoria 70 % celkového obsahu v pečeni a podieľajú sa v 94 % na metabolizme liečiv v pečeni ²⁻⁵⁾. Najvýznamnejších je šesť základných izoenzýmov cytochrómu P450, ide o CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 a CYP3A5.

Distribúcia enzýmov cytochrómu P450 v organizme človeka je vysoká. Najvyššie hladiny sa nachádzajú v pečeni, významné hladiny sú taktiež v pľúcach, tenkom čreve, ľadvinách, koži, mozgu a nadľadvinkách. V bunke je cytochróm P450 lokalizovaný v hladkom endoplazmatickom retikule a v mitochondriách. Čo sa týka podielu jednotlivých enzýmov z rodín cytochrómu P450 1-3 na celkovom obsahu v pečeni, má najvyššie zastúpenie CYP3A4 s 30 %. Kvantitatívne zastúpenie jednotlivých izoenzýmov v pečeni však nekoreluje s ich významnosťou pre metabolizmus liečiv. Priemerný podiel jednotlivých izoform na celkovom obsahu cytochrómu P450 v pečeni a na biotransformácii liečiv je uvedený v tabuľke č. 1.

Tab 1. Priemerný podiel jednotlivých izoforiem na celkovom obsahu cytochrómu P450 v pečeni a na biotransformácii liečiv⁴⁾

CYP450	Podiel na obsahu (%)	Podiel na biotransformácii (%)
1A2	12	4
2C	20	11
2D6	4	30
2E1	6	2
3A4	30	52

Enzýmový systém cytochrómu P450 je najdôležitejším systémom prvej fáze biotransformačných reakcií. Podieľa sa na metabolizme exogénnych tak i endogénnych látok (tabuľka č.2). Biotransformáciou väčšinou mení lipofilné látky na hydrofilné či polárne, ktoré môžu byť z organizmu následne vylúčené. Pri metabolizme niektorých látok však dochádza naopak k ich aktivácii. Niektoré cytochrómy P450 sú dokonca zodpovedné za iniciáciu kancerogenézie^{2, 6)}. Pre enzýmovú aktivitu je nutný nielen cytochróm P450 ale i ďalší enzým NADPH-cytochróm P450 reduktáza a fosfolipidová frakcia membrán. Uvedené tri súčasti tvoria mikrozomálny cytochrómový monooxygenázový systém. Centrálnym enzýmom monooxygenázového systému je cytochróm P450. Typickou reakciou katalyzovanou monooxygenázovým systémom je:



Aktívne miesto cytochrómu P450 obsahuje atóm železa, ktorý sa v oxidovanej forme (Fe^{3+}) viaže so substrátom. Dochádza k redukcii (Fe^{2+}) komplexu enzým-substrát prenosom elektrónu z NADPH. Tento redukovaný komplex viaže molekulárny kyslík a je následne redukovaný ďalším elektrónom. Komplex enzým-substrát-kyslík sa nakoniec štiepi na vodu, oxidovaný substrát a oxidovanú formu enzýmu. Enzýmy cytochrómu P450 katalyzujú rozmanité chemické reakcie ako N-dealkyláciu, O-dealkyláciu, S-oxidáciu, epoxidáciu a hydroxyláciu. Enzýmy cytochrómu P450 majú rozličnú ale často sa prekrývajúcu substrátovú špecificitu, vykazujú veľkú variabilitu v katalytickej účinnosti a regulácii medzi jednotlivými živočíšnymi druhmi i v rámci nich. Na metabolizme jedného liečiva sa môže podieľať i viacero enzýmov cytochrómu P450^{3-5, 7)}.

Tab 2. Endogénne substráty cytochrómu P450 ⁷⁾

<u>Substrát</u>	<u>CYP450</u>
Cholesterol a žlčové kyseliny	CYP7A1, CYP7B1, CYP8B1, CYP27A1, CYP39A1, CYP46A1, CYP51
Steroidy	CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, CYP19A1, CYP21A2
Prostaglandíny	CYP5A1, CYP8A1
Vitamíny A a D	CYP24A1, CYP26A1, CYP26B1, CYP27A1, CYP27B1
Ďalšie eikosanoidy	CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2, CYP4A11, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3 a CYP4F8

Na rozdiel od enzýmov cytochrómu P450 podieľajúcich sa na metabolizme endogénnych látok, aktivita enzýmov cytochrómu P450 metabolizujúcich látky exogénne môže významne kolísat' ⁸⁾. Rozdiely v hladinách a aktivitách týchto enzýmov môžu viesť k rozdielnym plazmatickým hladinám liečiv medzi jednotlivými pacientmi a tým k rozdielnym odpovediam na liek (nedostatočný alebo nadmerný účinok lieku). Tieto odlišnosti v metabolickej aktivite enzýmov cytochrómu P450 môžu byť spôsobené faktormi genetickými (genetický polymorfizmus) a negenetickými (pohlavie, rasa, patologický stav a faktory prostredia ako fajčenie a expozícia rôznym látkam).

Genetické faktory variability

Dnes je už známe, že veľký podiel v rozdielnej odpovedi na liek zohráva dedičnosť. Polymorfizmus v géne kódujúcom metabolické enzýmy má významnú úlohu, je obecné definovaný ako genetické rozdiely vyskytujúce sa medzi jednotlivcami v incidencii > 1% ⁹⁾. Pre genetický polymorfizmus v biotransformácii liečiv sú podstatné génové mutácie. Ich

podkladom môže byť zámena, chýbanie, vsunutie jedného alebo viacerých nukleotidov, duplikácia alebo amplifikácia genómu. Genetické rozdiely tvoria významnú príčinu variability hlavne u CYP2D6, CYP2C9 a CYP2C19. Aktivita týchto enzýmov je polymorficky distribuovaná v populácii a závisí na prítomnosti a počte alelických variant¹⁰⁻¹²⁾. CYP3A4 a CYP1A2 sa vyznačujú veľkou inter- a intraindividuálnou variabilitou, ktorá je výsledkom konštitučných a enviromentálnych faktorov¹³⁾. Najčastejšie sa vyskytujúca alela pre každý enzým („wild type“) je označovaná *1. Alelické varianty sú následne označované podľa ich identifikácie (napr. *2, *3, atď.). Súčasný prehľad alelických variant je na webových stránkach <http://cypalleles.ki.se>¹⁴⁾. Funkčný význam jednotlivých alelických variant sa líši, je taktiež odlišná ich frekvencia distribúcie medzi jednotlivými etnickými skupinami¹⁵⁾. Enzymový defekt prejavujúci sa zmenou v metabolickej aktivite je v populácii prenášaný autozomálne recesívne, prejavy sú preto najvýraznejšie u homozygotov pre defektný gén. Na základe stupňa aktivity enzýmov cytochrómu P450 možno rozdeliť populáciu do 4 metabolických skupín – pomalí metabolizátori (PM), intermediárni metabolizátori (IM), extenzívni metabolizátori (EM) a ultrarýchli metabolizátori (UM). PM sú jedinci, ktorí postrádajú funkčný enzým a majú teda najnižšiu metabolickú aktivitu. Sú vystavení vyššiemu riziku toxicity následkom vysokých hladín nezmetabolizovaného liečiva alebo je u nich naopak riziko zlyhania terapie v prípade užívania liečiv, ktoré vyžadujú pre svoj účinok metabolickú premenu. IM sú nositeľmi buď 1 nefunkčnej variantnej alely (heterozygoti) alebo nositeľmi 2 variantných alel so zníženou metabolickou aktivitou. Väčšinu populácie tvoria EM, ktorí majú 2 funkčné (normálne) alely. UM vykazujú najvyššiu metabolickú aktivitu v dôsledku duplikácie alebo amplifikácie génu. Metabolizujú liečivá rýchlejšie než EM a môžu vyžadovať vyššie než bežné dávky liečiva, aby dosiahli terapeutické plazmatické koncentrácie^{11, 16)}. Výsledný účinok polymorfizmu na metabolizme liečiva závisí na množstve enzýmov, ktoré sa na premene liečiva podieľajú. Enzýmy cytochrómu P450 majú obecnú širokú substrátovú špecificitu, čo znamená, že sa na metabolizme určitého lieku môže zúčastniť niekoľko enzýmov cytochrómu P450. V prípade, že je metabolizmus liečiva závislý principiálne na jednej izoforme, genetický polymorfizmus môže viesť k významnej zmene účinku tohto liečiva (hlavne u liečiv s úzkym terapeutickým indexom). Naopak tam, kde sa na metabolizme podieľajú viaceré formy cytochrómu P450, môžu ostatné enzýmy prevziať úlohu v metabolizme daného liečiva. Nie vždy však musí alternatívna metabolická cesta plne nahradiť tú nefunkčnú^{12, 17)}.

Negenetické faktory variability

Hoci genetický polymorfizmus enzýmov cytochrómu P450 má veľký dopad na biotransformáciu liečiv, genetika sama o sebe nevysvetľuje všetku variabilitu¹⁸⁾. Rozdielnú biotransformáciu možno pozorovať aj v rámci jednej genotypovej skupiny. Pekným príkladom je práca Aklillu a kol. poukazujúca na vplyv faktorov prostredia na zmenu aktivity enzýmu CYP2D6 u populácie Étiopčanov po presťahovaní do Švédska¹⁹⁾. Metabolickú aktivitu enzýmov cytochrómu P450 môže ovplyvniť pohlavie²⁰⁾, patologický stav²¹⁾, zmena fyziologického stavu (tehotenstvo)²²⁾ a faktory prostredia ako fajčenie²³⁾ a expozícia rôznym látkam (potrava, liečiva,...). Je známych veľa príkladov interakcií niektorých potravín^{24, 25)} a liečiv^{26, 27)} s enzýmami cytochrómu P450, následkom ktorých došlo ku klinicky významnej inhibícii či indukcii metabolickej aktivity daného enzýmu.

Enzýmová indukcia

Niektoré liečivá i zložky potravy vyvolávajú zvýšenú enzymatickú aktivitu, indukciu. Dôsledkom enzýmovej indukcie po opakovanom podaní látky je zrýchlenie biotransformácie, zníženie plazmatických hladín a terapeutického účinku daného liečiva. K tejto situácii dochádza v prípade, pokiaľ metabolity liečiva majú malý alebo žiaden farmakologický účinok. Pokiaľ majú metabolity väčší účinok, resp. vyššiu toxicitu, môže dôjsť pri enzýmovej indukcii k prejavom intoxikácie.

Enzýmová inhibícia

Niektoré liečivá i zložky potravy naopak enzýmovú aktivitu tlmia, inhibujú. Najčastejšie sa jedná o reverzibilnú inhibíciu. Výsledkom inhibície biotransformačných procesov je väčšinou predĺženie farmakologického účinku zvýšením plazmatických hladín daného liečiva s možnými prejavmi intoxikácie. V prípade, že sa jedná o neaktívne liečivo (proliečivo), ktoré sa potrebuje transformovať na aktívnu formu, môže naopak následkom inhibície dôjsť ku zlyhaniu terapeutického účinku.

Stanovenie biotransformačnej aktivity

Na predikciu individuálnej biotransformačnej kapacity sa používa metóda genotypovania a fenotypovania. Genotyp možno určiť analýzou DNA, použitím metódy PCR (polymerázová reťazová reakcia) a RFLP (polymorfizmus dĺžky restriktčných fragmentov). Novou alternatívou genotypizácie je AmpliChip P450 test (Roche), prvý mikroanalytický

farmakogenetický test. Jedná sa o prvý systém založený na znalosti časti ľudského genómu určený pre rutinnú diagnostiku využívajúci dve moderné technológie Roche PCR a Affymetrix mikroanalytiku. Poskytuje kompletnú genotypizáciu génov CYP2C19 a CYP2D6 ²⁸⁾. Výsledok genotypovania však nie je ovplyvnený faktormi prostredia. Navyše citlivosť genotypovania v predikcii výskytu ultrarychlých metabolizátorov je stále nízka. Fenotypovanie je založené na podaní látky, ktorá je pre určitý enzým vysoko špecifická (substrátová látka, probe drug), je teda týmto enzýmom exkluzívne metabolizovaná. Výsledná metabolická aktivita sa stanoví z metabolického pomeru MR (materská látka/metabolit) v krvi či v moči a rozdelí populáciu do odpovedajúcich skupín. Pomalý metabolizátori majú najvyššiu hodnotu MR, naopak ultrarychlí metabolizátori vykazujú najnižšiu hodnotu MR. Fenotypovanie umožňuje stanovenie aktuálnej enzymatickej aktivity in vivo, pretože zohľadňuje i vplyv faktorov prostredia ¹²⁾.

Cytochróm P450 1A2

Zástupci podrodiny CYP1A, enzýmy CYP1A1 a CYP1A2, majú významnú úlohu v biotransformácii xenobiotik, vrátane xenobiotik bežne sa nachádzajúcich v potrave a škodlivinách životného prostredia. Oba enzýmy sa podieľajú na aktivácii niekoľkých prekarinogénov, ako sú polyaromatické hydrouhl'ovodíky, aromatické a heterocyklické amíny a mykotoxíny. Enzým CYP1A1 sa nachádza prevážne extrahepatálne, naopak, enzým CYP1A2 sa vyskytuje hlavne v pečeni ²⁾.

Enzým CYP1A2 vykazuje vysoký stupeň interindividuálnej variability. Jednou z príčin veľkej variability je vysoká inducibilita CYP1A2, na ktorej sa okrem xenobiotík, podieľajú i zložky potravy a fajčenie. Hľubovitá zelenina (kapusta, brokolica, karfiol a ružičkový kel,...) je známa zvýšením aktivity enzýmu CYP1A2. Aktivita enzýmu CYP1A2 je taktiež indukovaná heterocyklickými amínmi a polycyklickými aromatickými uhl'ovodíkmi, ktoré sa nachádzajú napríklad v mäse upravenom za vyšších teplôt na drevenom uhlí ²⁴⁾. Ďalším faktorom variability CYP1A2 aktivity je genetický polymorfizmus ²⁹⁾. Výskyt mnohých polymorfných aliel je zriedkavý a ich funkčný význam na aktivitu enzýmu CYP1A2 nie je známy, Tab 3. Alela CYP1A2*1F je najčastejšie sa vyskytujúcou alelou v Európskej populácii (55.9% výskyt vo Švédскеj populácii). Táto alela je u fajčiarov spojovaná s významne vyššou enzymatickou aktivitou, u nefajčiarov nemá prítomnosť tejto alely na aktivitu CYP1A2 vplyv ^{30, 31)}. Polymorfné alely CYP1A2 *1C a *1K sú spojované so zníženou aktivitou CYP1A2, prvá z aliel bola nájdená v Japonskej populácii s frekvenciou výskytu okolo 23%, druhá allelela

bola objavená v Etiopskej populácii, vo Švedskej populácii je jej výskyt vzácny ^{32, 33}). Medzi etnikami existujú významné rozdiely v aktivite CYP1A2. Švédská populácia má 1.54-krát vyššiu CYP1A2 aktivitu v porovnaní s Korejcami ³⁰). Nižšia CYP1A2 aktivita bola nájdená u Ázijskej a Africkej populácie v porovnaní s beloškou populáciou ³⁴).

Tab.3 Aktivita variantných aleliel CYP1A2 in vivo a výskyt v populácii ^{14, 30, 33, 35})

Alela	Enzymatická aktivita	Frekvencia výskytu v populácii (%)		
		belošská	ázijská	africká
CYP1A2*1A	normálna	24.4	21.7	39.9
CYP1A2*1C	znížená	< 1	23	-
CYP1A2*1F	zvýšená inducibilita	56.7	7.7	49.6
CYP1A2*1K	znížená	0.3	0	3

Teofylín

V poslednej dobe bolo publikovaných niekoľko prací, ktoré sledovali vplyv polymorfizmu CYP1A2 na hladiny a účinnosť liečiv, prípadne výskyt nežiadúcich účinkov. Uslu a kol. vo svojej práci skúmali vplyv polymorfizmu na metabolizmus teofylínu u pacientov s chronickou obštrukčnou bronchopulmonálnou chorobou. Jedinci, ktorí boli nositeľmi CYP1A2*1D a CYP1A2*1F variantných aleliel mali významne nižšie hladiny teofylínu v porovnaní s ostatnými pacientmi ³⁶). Naopak prítomnosť CYP1A2*1C variantnej alely bola spojená s nižšou clearance teofylínu u astmatických pacientov ³⁷).

Antipsychotiká

Rezistencia na terapiu klozapínom bola popísaná u schizofrénnych pacientov fajčiarov, ktorí boli nositeľmi variantnej alely CYP1A2*1F. Tento polymorfizmus v kombinácii s fajčením viedol k ultrarýchlemu metabolizmu a nízkym hladinám klozapínu s následným zlyhaním účinku antipsychotika. Po zvýšení dávky klozapínu alebo nasadení inhibítora CYP1A2 (fluvoxamín) došlo ku zlepšeniu klinického stavu pacientov ^{38, 39}). Výskyt nežiadúcich účinkov z dôvodu zvýšenia hladiny klozapínu bol popísaný u pacientov, ktorí prestali fajčiť. Pacienti boli nositeľmi variantnej alely CYP1A2 *1F a tým, že prestali fajčiť došlo u nich k spomaleniu aktivity metabolického enzýmu ⁴⁰). V inej práci naopak nebol potvrdený vzťah medzi CYP1A2*1F polymorfizmom, aktivitou enzýmu a hladinou klozapínu v skupine

fajčiarov ^{41, 42}). Vplyv CYP1A2 genotypu je popísaný i u ďalšieho antipsychotika olanzapínu ⁴³). Clearance olanzapínu korelovala s aktivitou enzýmu CYP1A2 stanovenou pomocou kofeínu ako substrátovej látky u zdravých dobrovoľníkov ⁴⁴).

Ostatné látky

U pacientov užívajúcich antireumatikum leflunomid s genotypom CYP1A2*1F CC bolo pozorované 9.7-násobne vyššie riziko toxicity v porovnaní s pacientmi s CYP1A2*1F A alelou ⁴⁵).

Enzým CYP1A2 je hlavným enzýmom v metabolizme kofeínu, ktorý je zároveň využívaný ako substrátová látka pre stanovenie fenotypu CYP1A2 ⁴⁶). Pomalí metabolizátori mali vyššie riziko výskytu hypertenzie v spojení s pitím kávy ⁴⁷) a dokonca vyššie riziko nefatálneho infarktu myokardu ⁴⁸).

Tab 4. Príklady substrátov, inhibítorov a induktorov enzýmu CYP1A2

Substrát CYP1A2	Inhibítor	Induktor
fluvoxamín	cimetidín	fajčenie
imipramín	ciprofloxacín	hlúbovitá zelenina
klomipramín	fluvoxamín	mäso grilované na drevenom uhlí
klozapín	ofloxacín	omeprazol
kofeín	tiklopidín	
olanzapín		
teofylín		

Záver

Enzýmy cytochrómu P450 sú dôležitým systémom prvej fáze biotransformácie exogénnych látok. Aktivitu biotransformačných enzýmov môže ovplyvniť celá škála faktorov, významnú úlohu zohráva genetický polymorfizmus. Enzým CYP1A2 sa zúčastňuje na biotransformácii niekoľkých bežne užívaných liečiv. Aktivita tohto enzýmu je vysoko variabilná. Zdá sa však, že samotný polymorfizmus nevysvetľuje dostatočne významné rozdiely medzi jednotlivcami, významný podiel na aktivite tak budú zohrávať faktory prostredia.

Zoznam literatúry

1. **Gonzalez F.J., Gelboin H.V.:** Human Cytochrome P450: Evolution and cDNA-directed expression. *Environ. Health Perspect.* 1992; 98, 81-85.
2. **Omiecinski C.J., Remmel R.P., Hosagrahara V.P.:** Concise review of the cytochrome P450s and their roles in toxicology. *Toxicol. Sci.* 1999; 48, 151-156.
3. **Chang G.W., Kam P.C.:** The physiological and pharmacological roles of cytochrome P450 isoenzymes. *Anaesthesia.* 1999; 54, 42-50.
4. **Anzenbacher P, Anzenbacherová E.:** Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2001; 58, 737-747.
5. **Guengerich F.P.:** Cytochrome P450: What have we learned and what are the future issues? *Drug. Metab. Rev.* 2004; 36, 159-197.
6. **Soucek P., Gut I.:** Co je to cytochrom P 450? Enzymatické formy cytochromu P450 – dosažený stupeň znalostí. *Cas. Lek. Cesk.* 1993; 12, 353-358.
7. **Guengerich F.P.:** Cytochromes P450, drugs and diseases. *Mol. Interv.* 2003; 3, 194-204.
8. **Guengerich F.P.:** Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *The APPS J.* 2006; 8, E101-110.
9. **Guengerich F.P.:** Update information on human P450s. *Drug. Metab. Rev.* 2002; 34, 7-15.
10. **Güzey C., Spigset O.:** Genotyping as a tool to predict adverse drug reactions. *Curr. TP. Med. Chem.* 2004; 4, 1411-1421.
11. **Rogers J.F., Nafzinger A.N., Bertino J.S.:** Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450 – metabolized drugs. *Am. J. Med.* 2002; 113, 746-750.
12. **Buzková H., Pechandová K., Slanar O., Perlík F.:** Genetic polymorphism of cytochrome P450 and methods for its determination. *Prague. Med. Rep.* 2006; 107: 383-393.
13. **Dahl M.L.:** Cytochrome P450 phenotyping/genotyping in patients receiving antipsychotics. *Useful aid to Prescribing? Clin. Pharmacokinet.* 2002; 41, 453-470.
14. Home page of the human cytochrome P450 (CYP 2D6) allele nomenclature [updated 2010 July 20]. Available from: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>

15. **Bertilsson L.:** Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin. Pharmacokinet.* 1995; 29, 192-209.
16. **Ingelman-Sundberg M.:** Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends. Pharmacol. Sci.* 2004; 25, 193-200.
17. **Pirmohamed M., Park B.K.:** Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions. *Toxicology* 2003; 192, 23-32.
18. **Steiner E., Iselius L., Alván G., Lindsten J., Sjöqvist F.:** A family study of genetic and environmental factors determining polymorphic hydroxylation of debrisoquin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1985; 38, 394-401.
19. **Akllilu E., Herrlin K., Gustafsson L.L., Bertilsson L., Ingelman-Sundberg M.:** Evidence for environmental influence on CYP2D6-catalysed debrisoquine hydroxylation as demonstrated by phenotyping and genotyping of Ethiopians living or in Sweden. *Pharmacogenetics* 2002; 12, 375-383.
20. **Wolbold R., Klein K., Burk O., Nüssler A.K., Neuhaus P., Eichelbaum M., Schwab M., Zanger U.M.:** Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology* 2003; 38, 978-988.
21. **Villeneuve J.P., Pichette V.:** Cytochrome P450 and liver diseases. *Curr. Drug. Metab.* 2004; 5, 273-282.
22. **Tracy T.S., Venkataramanan R., Glover D., Caritis S.N.:** Temporal changes in drug metabolism (CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 activity) during pregnancy. *Am J Obstet. Gynecol.* 2005; 192, 633-639.
23. **Schaffer S.D., Yoon S., Zadezensky I.:** A review of smoking cessation: potentially risky effects on prescribed medications. *J. Clin. Nurs.* 2009; 18, 1533-1540.
24. **Nekvidová J., Anzenbacher P.:** Interactions of food and dietary supplements with drug metabolising cytochrome P450 enzymes. *Ceska Slov. Farm.* 2007; 56, 165-173.
25. **Guengerich F.P.:** Influence of nutrients and other dietary materials on cytochrome P-450 enzymes. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995; 61, 651-658.
26. **Tanaka E., Hisawa S.:** Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with psychoactive drugs: antidepressants and antipsychotics and the cytochrome P450 system. *J. Clin. Pharm. Ther.* 1999; 24, 7-16.

27. **Perucca E.:** Clinically relevant drug interactions with antiepileptic drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2005; 61, 246-255.
28. **Jain K.K.:** Applications of AmpliChip CYP450. *Mol. Diagn.* 2005; 9, 119-127.
29. **Pucci L., Geppetti A., Maggini V., Lucchesi D., Maria Rossi A., Longo V.:** CYP1A2 F21L and F186L polymorphisms in an Italian population sample. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2007; 22, 220-222.
30. **Ghotbi R., Christensen M., Roh H., Ingelman-Sundberg M., Aklillu E., Bertilsson L.:** Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2007; 63, 537-546.
31. **Sachse C., Brockmöller J., Bauer S., Roots I.:** Functional significance of a C→A polymorphism in intron I of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1999; 47, 445-449.
32. **Nakajima M., Yokoi T., Mizutani M., Kinoshita M., Funayama M., Kamataki T.:** Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *J. Biochem.* 1999;125, 803-808.
33. **Aklillu E., Carrillo J.A., Makonnen E., Hellman K., Pitarque M., Bertilsson L., Ingelman-Sundberg M.:** Genetic polymorphism of CYP1A2 in Ethiopians affecting induction and expression: characterization of novel haplotypes with single-nucleotide polymorphisms in intron 1. *Mol. Pharmacol.* 2003; 64, 659-69.
34. **Relling M.V., Lin J.S., Ayers G.D., Evans W.E.:** Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A activities. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1992; 52, 643-658.
35. **Zhou S.F., Yang L.P., Zhou Z.W., Liu Y.H., Chan E.:** Insights into the substrate specificity, inhibitors, regulation, and polymorphisms and the clinical impact of human cytochrome P450 1A2. *AAPS J.* 2009;11: 481-494.
36. **Uslu A., Ogus C., Ozdemir T., Bilgen T., Tosun O., Keser I.:** The effect of CYP1A2 gene polymorphism on Theophylline metabolism and chronic obstructive pulmonary disease in Turkish patients. *BMB Rep.* 2010; 43, 530-534.
37. **Obase Y, Shimoda T, Kawano T, Saeki S., Tomari S.Y., Mitsuta-Izaki K., Matsuse H., Kinoshita M., Kohno S.:** Polymorphisms in the CYP1A2 gene and theophylline metabolism in patients with asthma. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2003; 73, 468-474.

38. **Eap C.B., Bender S, Jaquenoud Sirot E, Cucchia G., Jonzier-Perey M., Baumann P., Allorge D., Broly F.:** Nonresponse to clozapine and ultrarapid CYP1A2 activity: Clinical data and analysis of CYP1A2 gene. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2004; 24, 214-219.
39. **Ozdemir V, Kalow W, Okey AB, Lam M.S., Albers L.J., Reist C., Fourie J., Posner P., Collins E.J., Roy R.:** Treatment-resistance to clozapine in association with ultrarapid CYP1A2 activity and the C→A polymorphism in intron 1 of the CYP1A2 gene: effect of grapefruit juice and low-dose fluvoxamine. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2001; 21, 603-606.
40. **Bondolfi G., Morel F., Crettol S., Rachid F., Baumann P., Eap C.B.:** Increased clozapine plasma concentrations and side effects induced by smoking cessation in 2 CYP1A2 genotyped patients. *Ther. Drug. Monit.* 2005; 27, 539-543.
41. **Jaquenoud Sirot E, Knezevic B, Morena GP, Harenberg S., Oneda B., Crettol S., Ansermot N., Baumann P., Eap C.B.:** ABCB1 and cytochrome P450 polymorphisms: clinical pharmacogenetics of clozapine. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2009; 29, 319-326.
42. **Kootstra-Ros J.E., Smallegoor W., van der Weide J.:** The cytochrome P450 CYP1A2 genetic polymorphisms *1F and *1D do not affect clozapine clearance in a group of schizophrenic patients. *Ann. Clin. Biochem.* 2005; 42, 216-219.
43. **Laika B., Leucht S., Heres S., Schneider H., Steimer W.:** Pharmacogenetics and olanzapine treatment: CYP1A2*1F and serotonergic polymorphisms influence therapeutic outcome. *Pharmacogenomics J.* 2010; 10, 20-29.
44. **Shirley K.L., Hon Y.Y., Penzak S.R., Lam Y.W., Spratlin V., Jann M.W.:** Correlation of cytochrome P450 (CYP) 1A2 activity using caffeine phenotyping and olanzapine disposition in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28, 961-966
45. **Bohanec Grabar P., Rozman B., Tomsic M., Suput D., Logar D., Dolzan V.:** Genetic polymorphism of CYP1A2 and the toxicity of leflunomide treatment in rheumatoid arthritis patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2008; 64, 871-876.
46. **Fuhr U., Rost K.L.:** Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. *Pharmacogenetics* 1994; 4, 109-116.

47. **Palatini P, Ceolotto G, Ragazzo F, Dorigatti F, Saladini F, Papparella I, Mos L, Zanata G, Santonastaso M:** CYP1A2 genotype modifies the association between coffee intake and the risk of hypertension. *J. Hypertens.* 2009; 27, 1594-1601.
48. **Cornelis M.C., El-Sohemy A., Kabagambe E.K., Campos H:** Coffee, CYP1A2 genotype, and risk of myocardial infarction. *Jama* 2006; 295, 1135-1141.

CYP2D6 A JEHO KLINICKÝ VÝZNAM

Jana Ďuricová, Milan Grundmann

Ústav klinické farmakologie FN a Zdravotně-sociální fakulty Ostravské univerzity, Ostrava

Enzymy cytochrómu P450 sú hlavnými enzýmami podieľajúcimi sa na metabolizme liečiv. CYP2D6 je vysoko polymorfický enzým, ktorý vykazuje vysoký stupeň interindividuálnej variability. CYP2D6 metabolizuje približne 25 % všetkých liečiv. Mnohé štúdie poukazujú na významný vplyv CYP2D6 polymorfizmu na farmakokinetiku a farmakodynamiku liečiv.

Kľúčové slová: CYP2D6, polymorfizmus, fenotyp.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF CYTOCHROME P4502D6

The enzymes of the cytochrome P450 are the major enzymes responsible for metabolizing of drugs. The CYP2D6 is highly polymorphic enzyme and shows a very high degree of interindividual variability. The CYP2D6 metabolizes approximately 25 % of all medications. Many studies point out the significant influence of CYP2D6 on pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs.

Key words: CYP2D6, polymorphism, phenotype.

Klin Farmakol Farm 2007; 21(3–4): 133–136

Úvod

Je známe, že väčšina liečiv podlieha v tele človeka metabolizmu mikrozomálnymi enzýmami lokalizovanými v pečeni, sliznici tenkého čreva a v iných orgánoch. Expresia a aktivita mnohých metabolických enzýmov cytochrómov P450 vykazuje širokú interindividuálnu variabilitu, ktorá je sčasti podmienená vplyvmi vonkajšieho prostredia (indukcia či inhibícia enzýmov P450 súčasne užívanými liekmi alebo potravou, fajčenie, alkohol), vekom, patologickým stavom. Dôležitým faktorom variability v metabolizme liečiv je genetický polymorfizmus cytochrómov P450. Rozdiely v metabolizme liečiv môžu ovplyvniť vzťah medzi dávkou a odpoveďou a mať tak klinický významné následky. Výsledný účinok CYP polymorfizmu na metabolizme liečiva závisí na množstve enzýmov, ktoré sa na premene liečiva podieľajú. V prípade, že je metabolizmus liečiva závislý principiálne na jednej izoforme, genetický polymorfizmus môže viesť k významnej zmene účinku tohto liečiva, a to k spomalenému odbúraniu a následnému výskytu nežiaducich účinkov v dôsledku predávkovania (hlavne u liečiv s úzkym terapeutickým indexom) alebo k urýchlenému metabolizmu a zlyhaniu terapeutického účinku. Naopak tam, kde sa na metabolizme liečiva podieľajú viaceré formy CYP, polymorfizmus jedného enzýmu má na zmenu metabolizmu a účinku liečiva menší význam.

CYP2D6

Cytochróm P450 2D6 (CYP2D6) je najviac študovaným enzýmom z rodiny CYP, s ohľadom na genetický polymorfizmus – ide o vôbec prvý objavený polymorfizmus CYP. Dve na sebe nezávislé štúdie v roku 1970 poukázali na rozdielnu farmakologickú odpoveď antihypertenzíva debrisochinu a antiarytmika sparteinu medzi jednotlivcami. Neskoršie štúdie preukázali, že obe látky sú transformované identickým enzýmom, ktorý bol

nazvaný debrisochin/spartein oxidáza (1). Napriek tomu, že je v pečeni kvantitatívne málo zastúpený (4%), CYP2D6 metabolizuje približne 25 % klinicky užívaných liečiv (tabuľka 1) (2). CYP2D6 je vysoko polymorfický, gén pre tento enzým je lokalizovaný na dlhom ramienku 22. chromozómu. Doteraz bolo objavených viac ako 75 variantných aliel, z nich len niektoré sú bežné a podieľajú sa 95 % na polymorfizme tohto enzýmu (3) (tabuľka 2). Aktualizovaný prehľad aliel génu pre cytochróm P450 je dostupný na <http://www.imm.ki.se/CYP-alleles>.

Na predikciu individuálnej metabolickej kapacity sa používa metóda genotypovania a fenotypovania. Genotyp možno určiť analýzou DNA, použitím metódy PCR (polymerázová reťazová reakcia) a RFLP (polymorfizmus dĺžky restriktčných fragmentov).

Výsledok genotypovania nie je ovplyvniteľný faktormi prostredia. Stanovenie troch najčastejších sa vyskytujúcich PM aliel (CYP2D6*3, *4 a *5) určí 95 % pomalých metabolizátorov v testovacej skupine. Citlivosť genotypovania v predikcii výskytu ultrarýchlych metabolizátorov je však stále nízka. V rámci určitej genotypovej skupiny môže existovať veľká variabilita, na ktorej sa podieľajú faktory prostredia (strava, fajčenie, alkohol a v podstatnej miere liekové interakcie), vek, patologický stav. Stanovenie výslednej enzymatickej aktivity in vivo umožňuje fenotypovanie. Fenotypovanie je založené na podaní látky, ktorá je pre určitý enzým vysoko špecifická (probe drug), je teda týmto enzýmom exkluzívne metabolizovaná (tabuľka 3). Výsledná metabolická aktivita sa stanoví z metabolického pomeru MR (materská

Tabuľka 1. Liečivá metabolizované CYP2D6

	odkazy		odkazy
beta-blokátory		antidepresíva	
metoprolol	1, 26–30	amitriptylín	15
propranolol	1, 30	clomipramín	15
timolol	1	desipramín	15
karvedilol	1, 30	fluoxetín	19
		imipramín	15
antiemetiká		maprotilín	15
dolasetron	3, 11–13	mianserin	15
ondasetron	3, 11, 13	nortriptylín	14
palonosetron	3	paroxetín	16–18
tropisetron	3, 11, 13	venlafaxín	16
analgetiká/antitusiká		neuroleptiká	
dextromethorphan	3	haloperidol	21, 23, 24
dihydrokodeín		perfenazín	21
ethylmorfin	3	risperidón	21
hydrokodon	3	thioridazín	21
kodeín	3, 10	zukupentixol	21, 22
tramadol	3, 8, 9		
antiestrogény		antiarytmiká	
tamoxifén	3, 35	propafenon	31–34

látku/metabolit) v krvi či v moči a rozdelí populáciu do odpovedajúcich skupín (1). Pomalí metabolizátori majú najvyššiu hodnotu MR, naopak ultrarýchli metabolizátori vykazujú najnižšiu hodnotu MR.

Jednotlivé metabolické skupiny

Metabolická aktivita CYP2D6 je pod kontrolou rôznych aleli, na základe ktorých možno klasifikovať populáciu do niekoľkých skupín: pomalí metabolizátori (PMs), intermediárni metabolizátori (IMs), extenzívni metabolizátori (EMs) a ultrarýchli metabolizátori (UMs). PMs sú nositeľmi dvoch deficitných aleli, majú tak nízku alebo žiadnu metabolickú aktivitu. Sú vystavení vyššiemu riziku toxicity následkom vysokých hladín nezmetabolizovaného liečiva, alebo naopak je u nich riziko zlyhania terapie v prípade užívania liečiv, ktoré vyžadujú pre svoj účinok metabolickú premenu (3). Najčastejšie sa vyskytujúcou alelou spojenou s PM u belošskej populácie je alela CYP2D6*4 s frekvenciou výskytu okolo 21%. Ďalšími PM alelami sú CYP2D6*3 a CYP2D6*5 a CYP2D6*6 vyskytujúce sa približne v 1–2% u belošskej populácie (4). Označenie IMs nie je jednoznačné. Niektorí autori definujú IM ako nositeľov mutantnej alely spojenej s nižšou metabolickou aktivitou (alely CYP2D6*9, CYP2D6*10, CYP2D6*17 a CYP2D6*41). Zatiaľ čo iní autori používajú označenie IM pre nositeľov jednej funkčnej a jednej defektnej alely (5). IMs majú široké spektrum metabolickej aktivity, od okrajovo vyššej než je u PMs až po aktivitu blízku EMs. Väčšinu populácie tvoria EMs, jedinci s normálnou metabolickou aktivitou enzýmu (3). Za normálnu funkciu enzýmu sú zodpovedné alely CYP2D6*1 a CYP2D6*2 (5). Ultrarýchly metabolizmus (UM) vzniká dôsledkom duplikácie alebo amplifikácie aktívneho génu, keď dochádza k nadmernej expresii enzýmu CYP2D6. Stanovenie UM genotypu na základe genotypovania duplikovanej alely CYP2D6 avšak vysvetľuje len 10–30% ultrarýchleho metabolizmu pozorovaného u belošskej populácie. UMs metabolizujú liečivá rýchlejšie než EMs a môžu vyžadovať vyššie než bežné dávky liečiva, ktoré je substrátom CYP2D6, aby dosiahli terapeutické plazmatické koncentrácie (3, 6).

Mnohé liečivá (substráty CYP2D6 alebo iných enzýmov) sú silnými kompetitívnymi inhibítormi enzýmu CYP2D6. Súčasné podanie inhibítora enzýmu s liečivom, ktoré sa týmto enzýmom metabolizuje, môže viesť k blokade metabolickej premeny. Z extenzívneho metabolizátora sa môže stať intermediárny alebo až pomalý metabolizátor.

Zastúpenie jednotlivých metabolických skupín

Pomalí metabolizátori

Zastúpenie typov polymorfizmu CYP2D6 sa líši medzi jednotlivými etnickými skupinami. Štúdie usku-

Tabuľka 2. Najčastejšie sa vyskytujúce alely CYP2D6

		odkazy**
alely kódujúce inaktívny/žaden enzým	CYP2D6*3	1, 4
	CYP2D6*4	1, 4
	CYP2D6*5	1, 4
	CYP2D6*6	4
alely kódujúce enzým so zníženou aktivitou	CYP2D6*9	1, 5
	CYP2D6*10	1, 4, 5
	CYP2D6*17	1
alely kódujúce enzým s normálnou aktivitou	CYP2D6*41	1, 4, 5
	CYP2D6*1	5
alely kódujúce enzým so zvýšenou aktivitou	CYP2D6*2	5
	CYP2D6*1xN	1, 4
	CYP2D6*2xN	1, 4

**http://www.imm.ki.se/CYP-alleles

Tabuľka 3. Príklady špecifických substrátov (probe drugs) na stanovenie MR enzýmu

CYP 450	3A	2D6	2C9	2C19	1A2
drug	midazolam	dextrometorfan	losartan	omeprazol	kofeín
probe	simvastatin	debrisochin	tolbutamid	mefenytolín	teofylín
	6-betahydroxykortisol	metoprolol	diklofenak		

odkazy 36–38

točené v rôznych krajinách demonštrovali významné rozdiely vo výskyte aleli CYP2D6 medzi etnikami. Najvyšší výskyt PMs je zaznamenaný u belošskej populácie (okolo 7%), frekvencia PMs je u nich spojená s významným výskytom alely CYP2D6*4. Naopak prevalencia PMs je nízka u ázijskej populácie (okolo 1%). Nízku frekvenciu PMs u tejto populácie môžeme pripísať takmer ojedinelému výskytu defektných aleli CYP2D6*3 a CYP2D6*4 (3, 7). Najčastejšie sa vyskytujúcou alelou u ázijskej populácie je alela CYP2D6*10. Okolo 50% Ázijcov je nositeľom tejto mutantnej alely v porovnaní len s 1–2% nositeľmi u belošskej populácie. Alela CYP2D6*10 je spojovaná s nižšou enzymatickou aktivitou a je považovaná za jednu z najčastejšie sa vyskytujúcich sa aleli na svete. Ázijská populácia má tak v porovnaní s belošskou populáciou celkovo nižšiu kapacitu metabolizovať CYP2D6 substráty. Nižšia celková CYP2D6 metabolická aktivita v porovnaní s belošskou populáciou sa vyskytuje i u čiernej africkej a americkej populácie. Nižšia celková enzymatická aktivita je tu pripisovaná značnému výskytu alely CYP2D6*17 (1).

Ultrarýchli metabolizátori

Podobne ako u PMs sa frekvencia výskytu UMs líši medzi etnikami. Veľmi nízka prevalencia UMs bola nájdená u belošskej populácie severnej Európy (okolo 1% švédskej populácie) (3). Vyšší výskyt UMs sa vyskytuje u belošskej populácie obývajúcej oblasti Stredozemného mora (7% španielskej populácie) (5). Rozdiel vo výskyte UMs medzi obyvateľmi severnej a južnej Európy je vysvetľovaný migráciou arabskej populácie na juh Európy. Najvyšší výskyt UMs je zaznamenaný u populácie Etiópie (29%) a Saudskej Arábie (21%) (3).

Klinický význam polymorfizmu CYP2D6 na účinok liečiv

Opioidné analgetiká

Tramadol, syntetické opioidné analgetikum, je účinné v liečbe strednej bolesti. Výhodou je nízke riziko respiračnej depresie, rozvoja tolerancie a vzniku závislosti (8). Ako analgetikum pôsobí dvojakým mechanizmom, samotný tramadol inhibuje reuptake adrenergických mediátorov. Za opioidný analgetický účinok je zodpovedný hlavne jeho metabolit M1 (O-desmethyltramadol), ktorý vzniká za účasti CYP2D6 enzýmu. M1 metabolit vykazuje približne 200-krát vyššiu afinitu k μ -opioidným receptorom než materská látka. CYP2D6 pomalí metabolizátori, obsahujúci 2 inaktívne alely, nemajú schopnosť tvorby aktívneho analgetického metabolitu M1 z tramadolu. Táto časť populácie neodpovedala dostatočne na liečbu tramadolom a častejšie vyžadovala prídavnú analgetickú terapiu v porovnaní s nositeľmi funkčnej alely (8, 9). Wang vo svojej práci poukázal dokonca na významný vplyv genotypu CYP2D6*10 (IMs) na pooperačný analgetický účinok tramadolu u čínskej populácie (9).

Podobne ako u tramadolu je analgetický účinok ďalšieho opioidného analgetika **kodeínu** závislý na bioaktívácii enzýmom CYP2D6. Kodeín je z 10% metabolizovaný na analgeticky účinný metabolit morfín. Okolo 7% belošskej populácie, patriacej medzi PMs, tak nekonvertuje kodeín na morfín a postráda analgetický účinok. Naopak podanie kodeínu populácii UMs môže vyústiť vo zvýšenú tvorbu metabolitu morfínu s následnými prejavmi nežiaducich účinkov (3, 10).

Antagonisti 5-HT₃ receptoru

5-HT₃ receptorový antagonisti patria medzi vysoko účinné antiemetiká, široko používané v profylaxii

xii a terapii nauzey a zvracania vyvolané chemoterapiou a rádioterapiou. Napriek širokému použitiu tejto skupiny liečiv, okolo 20 – 30 % pacientov neodpovedá uspokojivo na túto terapiu (3, 11). Všetky 5-HT₃ receptorový antagonisti sú extenzívne metabolizovaní rôznymi enzýmami CYP P450, CYP2D6 izoforma sa podieľa na metabolizme **ondasetronu, tropisetronu, palonosetronu a dolasetronu**. Metabolizmus granisteronu zahŕňa CYP3A4 izoformu (11, 12, 13). Janicki a kol. porovnávali antiemetický účinok dolasetronu a granisetronu u pacientov po operácii. Absolútny počet pooperačných emetických epizód bol vyšší u ultrarýchlych metabolizátorov liečených dolasetronom, nie však granisetronom (12). Nižší pooperačný antiemetický účinok bol pozorovaný u ultrarýchlych metabolizátorov, ktorým bol podaný ondasetron (13). Podobné výsledky priniesla taktiež štúdia Kaisera et al. s ondasetronom a tropisetronom u pacientov v rámci chemoterapeutickej intervencie (11). Autori tak navrhujú podanie vyšších dávok antiemetik u tejto časti populácie alebo použitie odlišnú antiemetickú intervenciu.

Antidepressíva

Väčšina tricyklických antidepressív (TCA) podlieha v pečeni biotransformačným reakciám katalyzovaných CYP2D6. Genotyp CYP2D6 je považovaný za významný faktor variability plazmatických koncentrácií a je spájaný s vyšším výskytom nežiaducich účinkov a následných rehospitalizácií. Bol zaznamenaný úzky vzťah medzi počtom aktívnych aliel, plazmatickou koncentráciou a dávkou **nortriptylinu**. Bežná dávka pre pacientov s normálnou CYP2D6 metabolickou aktivitou je 100–150 mg nortriptylinu/deň. Odporúčaná denná dávka pre PMs je 10–20 mg/deň, naopak UMs môžu vyžadovať až 500 mg/deň, aby dosiahli rovnaký terapeutický efekt (14). Význam genetického polymorfizmu bol pozorovaný aj u ďalších antidepressív skupiny TCA, a to u **desipraminu, imipraminu, amitriptylinu** (4, 15). Zvýšené riziko kardiovaskulárnych nežiaducich účinkov bolo pozorované u pomalých metabolizátorov užívajúcich **venlafaxin** (SNRI), kde boli namerané výrazne vyššie plazmatické koncentrácie pred podaním v porovnaní s EMs (16). Metabolizmus antidepressív skupiny SSRI je sprostredkovaný niekoľkými izoenzýmami cytochrómu P450, z nich **fluoxetin** a **paroxetin** sú metabolizované prostredníctvom CYP2D6. Niektorí autori popisujú vplyv genetického polymorfizmu CYP2D6 na plazmatické hladiny fluoxetinu a paroxetinu (17, 18, 19). Nedávno boli publikované odporúčanie úpravy dávok antidepressív v závislosti na type genotype pacienta (15, 20).

Antipsychotiká

Interindividuálna variabilita v odpovedi na antipsychotickú liečbu a extrapyramidové nežiadu-

ce účinky sú častým problémom v klinickej praxi. Väčšina antipsychotík sa extenzívne metabolizuje oxidatívnymi enzýmami cytochrómu P450. Z nich najviac študovaným v oblasti psychiatrie je CYP2D6 izoforma, ktorá sa podieľa na metabolizme **perfenazinu, zyklopentixolu, haloperidolu, thioridazinu a risperidonu** (21). Jaanson a kol. popisujú vo svojej práci vzťah medzi genotypom CYP2D6 a plazmatickou hladinou zyklopentixolu v ustálenom stave, pri podávaní v depotnej intramuskulárnej forme (22). Vzťah medzi genotypom a plazmatickou hladinou je popisovaný aj u haloperidolu (23), iní autori tento vzťah nepotvrdili (24). Kirchheiner vo svojej práci uvádza odporúčané úpravy dávok antipsychotík u jednotlivých genotypov (20). Je známe, že dlhodobé užívanie najmä klasických antipsychotík je spojené s rizikom výskytu extrapyramidových nežiaducich účinkov (EPS). PM genotyp by mohol byť jedným z faktorov zvyšujúcich riziko výskytu EPS (21, 25).

Beta-blokátory

Beta-blokátory sú liečivá používané v liečbe kardiovaskulárnych ochorení. Ich účinnosť a tolerabilita sa medzi jednotlivcami líšia. Príčiny týchto rozdielov sú často pripisované rozdielnej expozícii beta-blokátoru medzi jednotlivcami, resp. rozdielmi vo farmakokinetike. Niektoré beta-blokátory sú vylučované v nezmenenej forme do moču, iné však podliehajú oxidatívnej metabolizácii. **Metoprolol**, najviac študovaný lipofilný beta-blokátor, podlieha významnému metabolizmu za účasti CYP2D6. Bola nájdená významná korelácia medzi genotypom CYP2D6 a rozdielmi vo farmakokinetike metoprololu (26). Dlhší biologický poločas a vyššia údolná koncentrácia metoprololu u PMs prispievali k výraznejšiemu poklesu srdečnej frekvencie a väčšej beta-blokáde než u EMs. Vzťah medzi genotypom a zmenou krvného tlaku nebol pozorovaný (27, 30). Predpokladá sa, že zvýšené hladiny metoprololu pozorované u PMs by mohli súvisieť so zvýšeným výskytom nežiaducich účinkov metoprololu. Wutke a kol. pozorovali častejší výskyt bradykardie u PMs, a to hlavne u pacientov so zvýšeným rizikom β-blokády (28). Iní autori nenašli významnú alebo žiadnu asociáciu medzi genotypom CYP2D6 a výskytom nežiaducich účinkov (29, 30).

Propafenon

Antiarytmikum propafenon patriaci do triedy Ic antiarytmík, je bežne používané liečivo v liečbe ventrikulárnych a supraventrikulárnych arytmií. Blokuje rýchle sodíkové kanály, na jeho pôsobení sa uplatňuje aj slabý účinok na β-receptory. Metabolickou premenou prostredníctvom CYP2D6 vzniká aktívny metabolit, ktorý ale postráda blokujúci účinok na β-receptory.

Mörke et al. popisujú prípad staršej pacientky, ktorú prijali na kliniku pre zvrát, pád s následkom zranenia hlavy a bradykardiou. Pacientka užívala pred príjmom okrem iného propafenon pre fibriláciu siení s tachyarytmiou. Následné neurologické a kardiologické vyšetrenia vyšli negatívne. U pacientky bol stanovený fenotyp pomalého metabolizátora (pomocou sparteinu ako probe drug), potvrdený genotypizáciou, ktorá vylúčila možnosť prípadnej liekovej interakcie. Absenciou CYP2D6 enzýmu nedochádzalo ku premene propafenonu na jeho metabolit a k jeho hromadeniu v krvi. Výskyt nežiaducich účinkov súvisel pravdepodobne s nadmernou β-blokujúcou aktivitou, vysadením propafenonu vymizol (31). Vplyv genotypu na farmakokinetiku a účinok propafenonu je popisovaný aj v prácach iných autorov (32, 33, 34).

Tamoxifen

Tamoxifen je selektívny modulátor estrogénového receptora používaný v liečbe hormonálne závislého karcinomu prsníka. Je extenzívne metabolizovaný v pečeni prostredníctvom CYP2D6 na aktívny metabolit endoxifen. Bol pozorovaný nižší terapeutický účinok tamoxifenu u pacientok, ktoré boli nositeľmi dvoch nulových aliel CYP2D6 (PMs) (3, 35).

Záver

Genetický polymorfizmus metabolizmu liečiv zohráva dôležitú úlohu v interindividuálnej variabilite liečiv prejavujúci sa zmenami vo farmakokinetike a farmakodynamike. Nízka metabolická aktivita môže viesť k zvyšovaniu hladín účinnej látky a následkom výskytu nežiaducich účinkov, prípadne k strate účinnosti, ak je podávané liečivo v neaktívnej forme. Naopak, vysoká metabolická aktivita vedie ku zvýšenej biotransformácii liečiva s rizikom poddávkovania pacienta, prípadne k toxickým prejavom pri podávaní liečiv, ktoré sa metabolickou premenou aktivujú. CYP2D6 sa podieľa až 25% na metabolizme všetkých liečiv, z nich mnohé patria do skupiny liečiv s úzkym terapeutickým indexom. Mnohé štúdie poukazujú na významný vplyv genotypu CYP2D6 na plazmatické hladiny a účinok liečiv. Znalosť metabolickej aktivity enzýmu CYP2D6 u pacienta môže prispieť k výberu vhodnej medikácie, nájsť optimálnu dávku a znížiť riziko nežiaducich účinkov.

Mgr. Jana Ďuricová

Ústav klinickej farmakológie FN
a Zdravotné-sociální fakulty Ostravskej univerzity
17. Listopadu 1790, 708 00 Ostrava-Poruba
e-mail: jankaduricova@seznam.cz

Literatúra

1. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004 Jan; 369: 23–37.
2. Mičuda S, Martinková J, Chládek J, et al. Význam polymorfismu metabolismu léčiv v moderní farmakoterapii. *Remedia* 1998; 8: 226–236.
3. Bernard S, Neville KA, Nguyen AT, et al. Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6 in the U. S. population: Clinical Implications. *Oncologist* 2006; 11: 126–135.
4. Cascorbi I. Pharmacogenetics of cytochrome P4502D6: genetic background and clinical implication. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 17–22.
5. Steimer W, Zöpf K, von Amelunxen S, et al. Allele-specific change of concentration and functional gene dose for the prediction of steady-state serum concentrations of amitriptyline and nortriptyline in CYP 2C19 and CY 2D6 extensive and intermediate metabolizers. *Clin Chem* 2004; 50: 1623–1633.
6. Lovlie R, Daly AK, Matre GE, et al. Polymorphisms in CYP2D6 duplication-negative individuals with the ultrarapid metabolizer phenotype: a role for the CYP2D6*35 allele in ultrarapid metabolism. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 45–55.
7. Bertilsson L. Geographical/Interracial differences in polymorphic drug oxidation. *Clin Pharmacokinet* 1995; 29: 192–209.
8. Stamer MU, Lehnen K, Höthker F, et al. Impact of CYP2D6 genotype on postoperative tramadol analgesia. *Pain* 2003; 105: 231–238.
9. Wang GX, Zhang H, He FF, et al. Effect of the CYP2D6*10 C188T polymorphism on postoperative tramadol analgesia in a Chinese population. *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62: 927–931.
10. Fagerlund TH, Braaten O. No pain relief from codeine...? *Acta Anaesthesiol Scand* 2001; 45: 140–149.
11. Kaiser R, Sezer O, Papies A, et al. Patient-tailored antiemetic treatment with 5-hydroxytryptamine type 3 receptor antagonists according to cytochrome P-450 2D6 genotypes. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2805–2811.
12. Janicki PK, Schuler HG, Jarzembowski TM, et al. Prevention of postoperative nausea and vomiting with granisetron and dolasetron in relation to CYP2D6 genotype. *Anesth Analg* 2006; 102: 1127–1133.
13. Candiotti KA, Birnbach DJ, Lubarsky DA, et al. The impact of pharmacogenomics on postoperative nausea and vomiting. *Anesthesiology* 2005; 102: 543–549.
14. Frueh FW, Gurwitz D. From pharmacogenetics to personalized medicine: a vital need for educating health professionals and community. *Pharmacogenomics* 2004; 5: 571–579.
15. Thuerauf N, Lunkenheimer J. The impact of the CYP2D6-polymorphism on dose recommendations for current antidepressants. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2006; 256: 287–293.
16. Grasmäder K, Verwohlt PL, Rietschel M, et al. Impact of polymorphisms of cytochrome-P450 isoenzymes 2C9, 2C19 and 2D6 on plasma concentrations and clinical effects of antidepressants in a naturalistic clinical setting. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; 60: 329–336.
17. Sawamura K, Suzuki Y, Someya T, et al. Effects of dosage and CYP2D6-mutated allele on plasma concentration of paroxetine. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; 60: 553–557.
18. Güzey C, Spigset O. Low serum concentrations of paroxetine in CYP2D6 ultrarapid metabolizers. *J Clin Psychopharmacol* 2006; 26: 211–212.
19. Mancama D, Kerwin RW. Role of pharmacogenetics in individualising treatment with SSRIs. *CNS Drugs* 2003; 17: 143–151.
20. Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, et al. Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 442–473.
21. Tamminga WJ, Wemer J, Oosterhuis B, et al. Polymorphic drug metabolism (CYP2D6) and utilisation of psychotropic drugs in hospitalised psychiatric patients: a retrospective study. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59: 57–64.
22. Jaanson P, Marandi T, Kiivet RA, et al. Maintenance therapy with zuclopenthixol decanoate: associations between plasma concentrations, neurological side effects and CYP2D6 genotype. *Psychopharmacology* 2002; 162: 67–73.
23. Brockmüller J, Kirchheiner J, Schmider J, et al. The impact of the CYP2D6 polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72: 438–452.
24. Ohnuma T, Shibata N, Matsubara Y, et al. Haloperidol plasma concentration in Japanese psychiatric subjects with gene duplication of CYP2D6. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 56: 315–320.
25. Scordo MG, Spina E, Romeo P, et al. CYP2D6 genotype and antipsychotic-induced extrapyramidal side effects in schizophrenic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56: 679–683.
26. Ismail R, Teh LK. The relevance of CYP2D6 genetic polymorphism on chronic metoprolol therapy in cardiovascular patients. *J Clin Pharm Ther* 2006; 31: 99–109.
27. Nozawa T, Taguchi M, Tahara K, et al. Influence of CYP2D6 genotype on metoprolol plasma concentration and β -adrenergic inhibition during long-term treatment. A comparison with bisoprolol. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46: 713–720.
28. Wuttke H, Rau T, Heide R, et al. Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol-associated adverse effects. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72: 429–437.
29. Fux R, Mörike K, Pröhmer AMT, et al. Impact of CYP2D6 genotype on adverse effects during treatment with metoprolol: A prospective clinical study. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78: 378–387.
30. Zineh I, Beitelshes AL, Gaedigk A, et al. Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse events or efficacy in hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76: 536–544.
31. Mörike K, Magadam S, Mettang T, et al. Propafenone in a usual dose produces severe side-effects: the impact of genetically determined metabolic status on drug therapy. *J Intern Med* 1995; 238: 469–472.
32. Siddoway LA, Thompson KA, McAllister B, et al. Polymorphism of propafenone metabolism and disposition in man: clinical and pharmacokinetic consequences. *Circulation* 1987; 75: 785–791.
33. Roden DM. Genetic polymorphisms, drugs and proarrhythmia. *J Interv Card Electrophysiol* 2003; 9: 131–135.
34. Cai WM, Xu J, Chen B, et al. Effect of CYP2D6*10 genotype on propafenone pharmacodynamics in Chinese patients with ventricular arrhythmia. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23: 1040–1044.
35. Rae JM, Goetz MP, Hayes DF, et al. CYP2D6 genotype and tamoxifen response. *Breast Cancer Res* 2005; 7: 6.
36. Christensen M, Andersson K, Dalén P, et al. The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73: 517–528.
37. Frye RF. Probing the world of cytochrome P450 enzymes. *Mol Interv* 2004; 4: 157–162.
38. Zhou H, Tong Z, McLeod JF. „Cocktail“ approaches and strategies in drug development: a valuable tool or flawed science? *J Clin Pharmacol* 2004; 44: 120–134.

Beta-blokátory

ĐURICOVÁ J., GRUNDMANN M.

Ústav klinické farmakologie FN Ostrava a Fakulta zdravotnických studií Ostravské univerzity, Ostrava

Došlo 23. března 2009 / Přijato 1. dubna 2009

SÚHRN

Beta-blokátory

Beta-blokátory patria medzi základné liečivá v terapii kardiovaskulárnych ochorení. Ich spoločný mechanizmus účinku je založený na blokáde β -adrenergických receptorov. Avšak v rámci skupiny beta-blokátorov existujú medzi jednotlivými látkami farmakokinetické a farmakodynamické rozdiely, ktoré sú klinicky relevantné. Navyše odpoveď na beta-blokátor sa môže medzi pacientmi líšiť. Na tom má určitý podiel genetický polymorfizmus biotransformačných enzýmov cytochrómu P450 (ďalej len P450), vrátane P450 2D6, ktorým sa biotransformuje niekoľko bežne užívaných beta-blokátorov. Poznanie vlastností a teda odlišností medzi beta-blokátormi je nevyhnutné pre ich správne klinické využitie.

Kľúčové slová: beta-blokátory – farmakokinetika – farmakodynamika – P450 2D6

Čes. a slov. Farm., 2009; 58, 60–66

SUMMARY

Beta-blockers

Beta-adrenergic blockers rank among the principal drugs in the treatment of cardiovascular diseases. Their common mechanism of action is based on the β -adrenergic receptor blockade. However, differences in pharmacokinetic and pharmacodynamic properties exist between the individual agents in the beta-blocker class, and these differences may be of clinical relevance. In addition, responses to beta-blockers are variable among patients. Genetic polymorphism in drug-metabolizing enzymes, including cytochrome P450 2D6, has been demonstrated to contribute to the variability of several beta-blockers. The understanding of beta-blocker properties and their differences is thus important for their proper clinical use.

Key words: beta-blockers – pharmacokinetics – pharmacodynamics – P450 2D6

Čes. a slov. Farm., 2009; 58, 60–66

Má

Úvod

Beta-blokátory zohrávajú významnú úlohu v liečbe kardiovaskulárnych ochorení. Využívajú sa pre svoj antianginózný, antiarytmický a antihypertenzívny účinok. Časom získali svoje nezastupiteľné miesto i v liečbe chronického srdečného zlyhávania. Ich účinok je založený na kompetitívnom antagonizme β -adrenergických receptorov. Nadmerná aktivácia adrenergického nervového systému totiž prispieva k patofyziológii kardiovaskulárnych ochorení.

Väčšina účinkov vyvolaných beta-blokátormi je charakteristická a spoločná pre celú skupinu. Avšak, v rámci skupiny možno pozorovať určité farmakokinetické a farmakodynamické rozdiely. Tieto rozdiely sú dané rozdielnou selektivitou beta-blokátorov voči adrenergickým receptorom, na účinku niektorých z nich sa podieľajú i ďalšie mechanizmy. Lipofilita či hydrofilita a rozdielna farmakokinetika majú tiež svoj podiel na odlišnosti účinku beta-blokátorov. Znalosť týchto rozdielov umožňuje predvídať účinok konkrétneho

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Jana Ďuricová

Ústav klinické farmakologie FN Ostrava

17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava-Poruba

e-mail: jankaduricova@seznam.cz nebo jana.duricova@fno.cz

beta-blokátora a pomáha vo výbere optimálnej látky pre konkrétnu situáciu a pacienta.

V poslednej dobe je často diskutovaná otázka vplyvu genetického polymorfizmu na účinok liečiv. Jednou z oblastí štúdia genetického polymorfizmu sú biotransformačné enzýmy superrodiny cytochrómu P450 (ďalej len P450) a najviac študovaným enzýmom z tejto skupiny je P450 2D6. Enzým P450 2D6 zohráva významnú úlohu v biotransformácii niektorých beta-blokátorov. Rozdielna aktivita P450 2D6 vedie k odlišnostiam vo farmakokineticke beta-blokátorov, ktoré sa môžu prejaviť rozdielnou odpoveďou pacienta na daný liek.

Cieľom tohto prehľadového článku je podať obecné informácie o beta-blokátoroch, o ich účinku, odlišnostiach v rámci jednotlivých skupín a pozrieť sa na význam genetického polymorfizmu P450 2D6 na účinok beta-blokátorov.

Mechanizmus účinku beta-blokátorov

Hlavným mechanizmom účinku beta-blokátorov je kompetitívna a reverzibilná blokáda β -adrenergických receptorov. Existujú 3 typy -receptorov, β_1 , β_2 a β_3 receptory. Väčšina liečebných účinkov je daná blokádou β_1 -receptorov, naopak väčší počet nežiadúcich účinkov je daný blokádou β_2 -receptorov. β_1 -receptory sa vyskytujú postsynapticky predovšetkým v srdci, ďalej potom v GIT, ľadvinách a v tukovom tkanive, β_2 -receptory sú umiestnené postsynapticky predovšetkým v bronchiálnom trakte, cievach a pankrease, taktiež v menšej miere i v srdci. β_3 -receptory sú prítomné v tukovom tkanive. Beta-blokátory sa terapeuticky využívajú hlavne pre svoj účinok na kardiovaskulárny systém^{1,2)}.

Antianginózný účinok

Zabránením účinku katecholamínov (noradrenalín a adrenalín) na srdce, beta-blokátory znižujú srdečnú frekvenciu (účinok negatívne chronotropný) a srdečnú kontraktilitu (účinok negatívne inotropný), čo následne vedie k zníženej spotrebe kyslíka myokardom. Upravujú tak teda nepomer medzi potrebou a dodávkou kyslíka, ktorý sa vyskytuje u ischemie myokardu. Zvlášť významné je zníženie srdečnej frekvencie a kontraktility pri aktivácii sympatického nervového systému (napr. pri námahe alebo strese), účinok na frekvenciu a kontraktilitu je v klude menší. Okrem toho, predĺžením diastoly znížením srdečnej frekvencie dochádza k zvýšeniu prekrvenia myokardu³⁾.

Antiarytmický účinok

Beta-blokátory znižujú mieru spontánnej depolarizácie ektopických pacemakerov, spomaľujú prevod v sinoatriálnom (SA) a atrioventrikulárnom (AV) uzle a predlžujú refraktornú fázu v AV uzle (účinok negatívne dromotropný), upravujú barorecepčnú senzitivitu.

Antihypertenzívny účinok

Na antihypertenzívnom účinku beta-blokátorov sa podieľa niekoľko mechanizmov. Patrí tam zníženie tvorby renínu, negatívne inotropný a chronotropný účinok. Dlhodobé užívanie beta-blokátorov vedie nejasným

mechanizmom ku zníženiu periférnej vaskulárnej rezistencie.

Priaznivé účinky u chronického srdečného zlyhávania

Beta-blokátory znižujú objemové parametre a zvyšujú ejekčnú frakciu ľavej komory. Môžu pozitívne ovplyvniť i remodeláciu komory⁴⁾. Na priaznivom účinku sa ďalej podieľa zníženie napätia sympatoadrenálneho systému, zníženie srdečnej frekvencie, predĺženie diastolickej periódy a účinok antiarytmický.

Ďalšie účinky

Beta-blokátory inhibujú agregáciu doštičiek, stabilizujú ateromatózny plát a zabraňujú jeho ruptúre, niektoré beta-blokátory majú antioxidantné účinky a zabraňujú proliferácii hladkej svaloviny ciev.

Nežiaduce účinky beta-blokátorov

Kardiovaskulárne

Blokáda β_1 -receptorov v srdci môže vyústiť v bradykardiu a AV blokádu. Blokáda β_2 -receptorov v cievach môže spôsobovať chladné končatiny a zhoršiť symptómy u pacienta s periférnym vaskulárnym ochorením.

Metabolické

Blokáda β_2 -receptorov nepriaznivo ovplyvňuje lipidový metabolizmus (zvýšenie koncentrácie triglyceridov a zníženie koncentrácie HDL cholesterolu, možné tiež zvýšenie LDL cholesterolu), zhoršuje glukózovú toleranciu a môže maskovať príznaky hypoglykémie (tremor, tachykardia atď.^{5,6)}.

Pľúcne

Beta-blokátory môžu vyvolať bronchokonstriktiu u pacientov s astma bronchiale a u pacientov s chronickou obštrukčnou bronchopulmonálnou chorobou⁷⁾.

Centrálne

Častejšie sa vyskytujú pri užívaní lipofilných beta-blokátorov, ide o únavu, bolesť hlavy, poruchy spánku, živé sny, depresiu, závrate.

Sexuálny poruchy

U niektorých pacientov môžu beta-blokátory spôsobovať stratu libida a erektilné dysfunkcie.

Náhle vysadenie beta-blokátorov

Môže vyústiť v rebound fenomén, k tomuto fenoménu dochádza upreguláciou β -receptorov pri dlhodobom užívaní beta-blokátorov.

Kontraindikácie

Medzi kontraindikácie beta-blokátorov patrí hypotenzia, bradykardia, SA a AV blokáda II. a III. stupňa, akútne srdečné zlyhanie a astma bronchiale. Chronická obštrukčná bronchopulmonálna choroba, periférne vaskulárne ochorenie, metabolický syndróm a porušená glukózová tolerancia patria medzi relatívne kontraindi-

kácie, kedy vysoko rizikovní pacienti môžu profitovať z terapie beta-blokátormi ^{1, 2)}.

Klasifikácia beta-blokátorov

Jedným z dôležitých rozdielov medzi beta-blokátormi je ich selektivita voči β_1 a β_2 -receptorom a vazodilatačný účinok (tab. 1). Môžeme ich teda rozdeliť na

1. neselektívne (blokujú β_1 i β_2 -receptory),
2. selektívne (majú vyššiu afinitu k β_1 než k β_2 -receptorom),
3. beta-blokátory s vazodilatačným účinkom.

Selektivita je však relatívna a na dávke závislá a stráca sa pri užití vyšších dávok. Selektivita k β_1 -receptorom versus k β_2 -receptorom študovaná na membránach ľudského tkaniva myokardu bola najvyššia u nebivololu (321×), nasledovaná bisoprololom (103×), betaxololom (93×), metoprololom (74×) a celiprololom (69×) ⁸⁾. Pretože selektívne β_1 -blokátory majú menší inhibičný účinok na β_2 -receptory, je u nich nižšie riziko periférnej vazokonstrikcie a bronchokonstrikcie ⁷⁾ a v menšej miere zasahujú do metabolizmu sacharidov a lipidov ⁹⁾. Vazodilatačne pôsobiace beta-blokátory, nazývané tiež beta-blokátory tretej generácie, boli pôvodne vyvinuté ako antihypertenzívne látky. Vazodilatačný účinok je daný buď blokádou adrenergických α_1 -receptorov (karvedilol) alebo uvoľnením vazodilatačne pôsobiaceho oxidu dusnatého NO z endotelialných buniek (nebivolol) ⁷⁾. Karvedilol sa vyznačuje navyše antioxidičným účinkom. Určité beta-blokátory vykazujú čiastočnú agonistickú aktivitu po naviazaní na receptor, takzvaný ISA účinok (vnútorný sympatomimetický účinok). Patria tam acebutolol, celiprolol a bopindolol. Beta-blokátory s ISA účinkom spôsobujú nižšiu kardiálnu depresiu, menej ovplyvňujú bronchy a periférny

Tab.1. Klasifikácia beta-blokátorov

Selektívne	Atenolol Betaxolol Bisoprolol Esmolol Metoprolol
Selektívne s ISA	Acebutolol (vazodilatačný) Celiprolol (vazodilatačný)
Neselektívne	Metipranolol Sotalol Timolol
Neselektívne s ISA	Bopindolol Labetalol (vazodilatačný)
Vazodilatačné	Karvedilol (neselektívny) Nebivolol (β_1 -selektívny)

vaskulárny systém. Majú taktiež menší účinok na metabolizmus sacharidov a lipidov. Jednou z nevýhod tejto skupiny je, že u nich chýba alebo je dokonca znížený benefit zo zníženej mortality u pacientov po infarkte myokardu či so srdečným zlyhaním na rozdiel od beta-blokátorov bez ISA účinku ¹⁾.

Farmakokinetické vlastnosti beta-blokátorov

Beta-blokátory sa významne líšia vo farmakokinetických vlastnostiach, ako sú absorpcia, biodostupnosť, biotransformácia, väzba na plazmatické bielkoviny, distribučný objem, rozpustnosť v tukoch, eliminačný polčas (tab. 2).

Tab. 2. Farmakokinetické vlastnosti beta-blokátorov

Beta-blokátor	Rozpustnosť v tukoch	Biodostupnosť (%)	Významná presystémová eliminácia	Väzba na plazmatické proteíny (%)	Hlavná cesta eliminácie	Eliminačný polčas (hod.)
Acebutolol	stredná	30–50	áno	10–25	pečeň/ladviný	3–4
Atenolol	nízka	50–60	nie	< 5–15	ladviný	6–9
Betaxolol	stredná	80	nie	50	pečeň	14–22
Bisoprolol	stredná	80	nie	30	pečeň/ladviný	9–12
Bopindolol	vysoká	60–70	áno	60–65	pečeň/ladviný	4 hod. pre fázu α 14 hod. pre fázu β
Celiprolol	stredná	30	nie	25–30	ladviný	4–5
Esmolol	nízka	–	–	55	pečeň/ladviný	0.12–0.15
Karvedilol	stredná	25–35	áno	98	pečeň	6–10
Metipranolol	vysoká	50	áno	70	pečeň/ladviný	4–6
Metoprolol	vysoká	40–50	áno	10	pečeň	3–4
Nebivolol	vysoká	12	áno	98	pečeň	10
Sotalol	nízka	100	nie	<1	ladviný	15
Timolol	vysoká	75	nie	60	pečeň	2–5

Lipofilné beta-blokátory – (metoprolol, nebivolol, timolol, karvedilol) sú z gastro-intestinálneho traktu rýchlo a kompletne absorbované. Sú extenzívne biotransformované pri prvom prechode črevom a pečeňou, majú vysokú presystémovú elimináciu a tým u nich dochádza k variabilnej biodostupnosti. Lahko prechádzajú do centrálného nervového systému, čo môže prispievať k vyššiemu výskytu centrálnych nežiadúcich účinkov.

Hydrofilné beta-blokátory – (atenolol, sotalol) sú z gastro-intestinálneho traktu absorbované nekompletne a sú prevážne vylúčené nezmenené ľadvinami. Majú menej variabilnú biodostupnosť¹¹⁻¹³).

Jeden z významných enzymatických biotransformačných systémov je cytochróm P450. Enzyémy P450 vykazujú genetický polymorfizmus, sú zodpovedné za rozdielnu biotransformačnú aktivitu následkom čoho dochádza k zmene farmakokinetických parametrov látky a možnému ovplyvneniu jej účinku. Z hľadiska genetického polymorfizmu je najviac preštudovaný enzyém P450 2D6. Z beta-blokátorov sa P450 2D6 podieľa vo väčšej či menšej miere na biotransformácii metoprololu, karvedilolu, nebivololu, timololu, beta-xololu.

Stereošpecificita – väčšina klinicky užívaných beta-blokátorov sa nachádza vo forme racemickej zmesi. Jednotlivé enantioméry sa môžu líšiť vo väzbe na albumín a glykoprotein v plazme, môže u nich dochádzať k odlišnému metabolizmu v pečeni, čo nakoniec môže viesť k ich odlišným hladinám v krvi. Takisto stereoselektivita sa môže podieľať na odlišnom účinku enantiomérov na β -blokáde, kde jeden enantiomér je účinnejší než druhý, prípadne majú oba enantioméry úplne odlišné účinky¹⁴).

Klinický účinok beta-blokátorov

Ischemická choroba srdечná, akútny infarkt myokardu a stav po infarkte myokardu

Účinnosť beta-blokátorov v terapii ischemickej choroby srdечnej je preukázaná mnohými klinickými štúdiami. Beta-blokátory znižujú spotrebu kyslíka znížením srdечnej frekvencie a kontraktility. Zvyšujú prekrvenie ischemickej oblasti predĺžením diastoly. Sú účinné v terapii stabilnej angíny pectoris, kde zvyšujú toleranciu na záťaž, znižujú počet záchvatov a potrebu užívania krátkodobých nitrátov¹⁵). Výsledky meta-analýzy preukázali 13% pokles rizika do progresie akútneho infarktu myokardu u pacientov s akútnym koronárnym syndrómom bez elevácie ST úsekov na EKG užívajúcich beta-blokátory. Terapia beta-blokátormi je u týchto pacientov pri neprítomnosti kontraindikácií doporučená^{16, 17}). Prínos dlhodobého užívania beta-blokátorov u pacientov po infarkte myokardu s eleváciou ST-segmentu je preukázaná niekoľkými štúdiami a meta-analýzami. Beta-blokátory znižujú kardiálnu mortalitu, náhlu srdечnú smrť a opätovný výskyt infarktu myokardu o 20–25 %. V akútnej fáze infarktu myokardu je priaznivý účinok beta-blokátorov najviac pozorovateľný v prvých dvoch dňoch liečby. Znižujú výskyt komorových arytmií, srdечnej zástavy a riziko vzniku ruptúry^{18, 19}).

Chronické srdечné zlyhávanie

Priaznivé účinky pozorované pri terapii chronického srdечného zlyhávania beta-blokátormi, zdá sa potvrdzujú úlohu aktivácie adrenergického systému na srdечnom zlyhávaní a jeho škodlivé účinky²⁰). Liečba beta-blokátormi má za následok zlepšenie funkcie komory, znižuje počet hospitalizácií a o niečo neskôr (za 4–12 mesiacov terapie) dochádza ku zvratu srdечnej remodelácie. Tieto na čase závislé účinky beta-blokátorov sú spoločné pre celú skupinu. Znížená mortalita u pacientov s chronickým srdечným zlyhaním bola preukázaná v dvojite slepých multicentrických štúdiách u karvedilolu, bisoprololu, metoprololu sukcinátu a nebivololu. Beta-blokátory sú doporučené všetkým symptomatickým pacientom so srdечným zlyhaním (NYHA II–IV) v stabilizovanom stave, ischemickej alebo neischemickej etiológie a zníženou ejekčnou frakciou, pri neprítomnosti kontraindikácií^{4, 10, 21, 22}).

Hypertenzia

Postavenie beta-blokátorov v rámci základnej skupiny antihypertenzív sa poslednú dobu oslabuje. Zásľuhu na tom nepochybne majú i nedávno publikované rozsiahle štúdie, v ktorých mali beta-blokátory nižší účinok v znížení rizika cievných mozgových príhod^{23, 24}). Beta-blokátory však naďalej zostávajú liekom prvej voľby pri hypertenzii sprevádzanej ischemickou chorobou srdечnou, srdечným zlyhaním, angínou pectoris, stavmi po infarkte myokardu a u tachyarytmií. Pre dosiahnutie lepšieho antihypertenzívneho účinku je výhodné ich použitie v kombináčnej terapii²⁵). Vzhľadom k ich potenciálnym nežiadúcim metabolickým účinkom sa počet ich vhodných indikácií znížil²⁶). Na antihypertenzívnom účinku beta-blokátorov sa podieľa niekoľko mechanizmov ako je zníženie srdечnej frekvencie, zníženie kontraktility a plazmatickej hladiny renínu.

Arytmie

Beta-blokátory znižujú sínusový rytmus, automáciu a spomaľujú prevod AV uzlom. Sú účinné u supraventrikulárných tachykardií, fibrilácii a flutteru siení a taktiež v kontrole komorových arytmií. Sú účinné v prevencii vzniku arytmií vedúcich k náhlejšiemu srdечnému zlyhávaniu a u kardiomyopatií^{27, 28}).

Genetický polymorfizmus P450 2D6 a jeho vzťah k beta-blokátorom

Genetický polymorfizmus biotransformačných enzyémov je jednou z príčin variability farmakokinetických vlastností liečiv, následkom ktorej môže dôjsť k zmene odpovede pacienta na liek. Významnú úlohu v biotransformácii liečiv zohráva enzymatický systém cytochrómu P450. U človeka bolo popísaných doteraz 21 rodín enzyémov cytochrómu P450, spomedzi nich rodiny 1, 2 a 3 tvoria 70 % celkového obsahu v pečeni a podieľajú sa v 94 % na biotransformácii liečiv v pečeni²⁹). Z hľadiska genetického polymorfizmu je najviac preštudovaným enzyémom z rodiny cytochrómu P450 enzyém P450 2D6. Napriek tomu, že je v pečeni kvantitatívne málo zastúpený (4 %), P450 2D6 biotransformuje približne 25 % kli-

nicky užívaných liečiv, vrátane niektorých beta-blokátorov³⁰⁾. P450 2D6 je vysoko polymorfický, doteraz bolo objavených viac než 100 variantných aliel. Súčasný prehľad genetických variant je na <http://cypalleles.ki.se>. Enzymový defekt je v populácii prenášaný autozomálne recesívne, prejavy sú preto najvýraznejšie u homozygotov pre defektný gén. Na základe stupňa aktivity enzýmov cytochrómu P450 možno rozdeliť populáciu do 4 skupín: pomalí metabolizátori (PMs), intermediárni metabolizátori (IMs), extenzívni metabolizátori (EMs) a ultrarýchli metabolizátori (UMs). PMs postrádajú funkčný enzým, sú tak vystavení vyššiemu riziku toxicity následkom vysokých hladín nezmetabolizovaného liečiva. IMs majú čiastočne zachovanú metabolickú aktivitu, ktorá však nedosahuje aktivity EMs. EMs tvoria väčšinu populácie, ide o jedincov s normálnou metabolickou aktivitou. Najvyššiu metabolickú aktivitu vykazujú UMs. V dôsledku zrýchleného metabolizmu môžu vyžadovať vyššie dávky liečiva, aby dosiahli terapeutického účinku³¹⁾. Zastúpenie jednotlivých skupín sa medzi etnikami líši. V európskej populácii sa vyskytuje okolo 6-10 % PMs a 1-7 % UMs³²⁾.

Vplyv P450 2D6 na jednotlivé beta-blokátory

Z beta-blokátorov sa enzýmom P450 2D6 biotransformujú metoprolol, karvedilol, nebivolol, timolol a betaxolol. Podiel tohoto enzýmu na biotransformácii jednotlivých beta-blokátorov je rôzne zastúpený. Najviac závislý na biotransformačnej aktivite P450 2D6 spomedzi beta-blokátorov je metoprolol.

Timolol

Timolol je neselektívny beta-blokátor, ktorý sa u nás používa v lokálnej terapii glaukomu. Uvádza sa však, že až 80 % lokálne aplikovaného timololu je odvádzaný cez nazolakrimálny kanál a je absorbovaný do systémového obehu s výskytom celkových účinkov. Na biotransformácii timololu sa podieľa predovšetkým P450 2D6 (asi z 90 %), s malým podielom P450 2C19³³⁾. Biotransformáciou vznikajú neaktívne metabolity, ktoré sú následne vylúčené ľadvinami. V dvoch prácach (v jednej na dobrovoľníkoch, v druhej na pacientoch s hypertenziou) bol sledovaný vzťah medzi P450 2D6 fenotypom, stanoveným použitím debrisočinu ako substrátvej látky a metabolizmom jednorázovo per orálne užitého timololu. V oboch prácach bola potvrdená významná korelácia medzi biotransformačnou aktivitou P450 2D6 (P450 2D6 fenotypom) a biodegradáciou timololu. PMs mali významne vyššie hodnoty AUC a priemerné plazmatické koncentrácie než EMs. Stupeň β -blokady za 24 hodín po užití timololu (meraný záťažovým testom) bol významne vyšší u PMs než EMs ($P < 0,01$)^{34, 35)}. Významný vplyv genetického polymorfizmu P450 2D6 na farmakokinetiku a farmakodynamiku timololu bol pozorovaný i pri lokálnom užití timololu vo forme očných prípravkov. PMs mali vyššie maximálne plazmatické koncentrácie timololu, dlhší eliminačný poločas a vyššiu AUC v porovnaní s IMs, EMs a UMs. Medzi poslednými tromi metabolickými skupinami neboli rozdiely pozorované. Tieto rozdiely však záviseli na použitom prípravku, boli významné pri užití vodného roztoku

timololu, naopak neboli pozorované pri užití hydrogelu. Pri užití vodného roztoku timololu bol pozorovaný trend v odlišnosti vzostupu srdečnej frekvencie pri záťažovom teste medzi PMs a ostatnými metabolickými skupinami³⁶⁾.

Karvedilol

Karvedilol je neselektívny beta-blokátor s vazodilatačným účinkom v dôsledku blokady α_1 -receptoru. Klinicky užívaný karvedilol je racemát, za β -blokujúci účinok je zodpovedný S(-)-enantióm, na α_1 -blokade sa podieľajú oba enantiómy rovnakou mierou. Per orálne podaný karvedilol podlieha významnej stereoselektívnej pre-systémovej eliminácii, ktorá je závislá na biotransformačnej aktivite P450 2D6. Enzým P450 2D6 preferenčne biotransformuje R-karvedilol, ktorý je zodpovedný len za α_1 -blokáciu^{37, 38)}. V práci Honda a kolektív bol sledovaný polymorfizmus P450 2D6 na stereoselektívnu biotransformáciu karvedilolu u zdravých dobrovoľníkov po jednorázovom užití karvedilolu. Orálna clearance a distribučný objem oboch enantiómov boli signifikantne nižšie u jedincov majúcich aspoň jednu alelu so zníženou funkciou (P450 2D6*10 alela) v porovnaní s nositeľmi alely s normálnou funkciou (P450 2D6*1 a *2 alela), výraznejšia zmena v oboch farmakokinetických parametroch bola pozorovaná s R-karvedilolom³⁹⁾. Vplyv polymorfizmu P450 2D6 na farmakokinetiku karvedilolu bol potvrdený i v ďalšej štúdií, kde clearance u IM metabolizátorov bola o 39 % nižšia⁴⁰⁾. Práca Graffa a kolektív sledovala účinok flouxetinu (silný inhibítor aktivity P450 2D6) na farmakokinetiku a účinok karvedilolu u stabilných pacientov s chronickým srdečným zlyhaním na dlhodobej terapii karvedilolom. Podanie flouxetinu malo za následok stereospecifickú inhibíciu biotransformácie karvedilolu, k inhibícii biotransformácie R-karvedilolu došlo vo väčšej miere v porovnaní s S-karvedilolom. Vyššia koncentrácia R-karvedilolu u jedincov so zníženou aktivitou enzýmu P450 2D6 predpokladá väčšiu blokáciu α_1 -receptoru, a tým aj väčšiu vazodilataciu. Avšak neboli pozorované žiadne rozdiely vo výskyte nežiadúcich účinkov, v hodnotách krvného tlaku a srdečnej frekvencie medzi skupinou pacientov s a bez flouxetinu⁴¹⁾.

Nebivolol

Nebivolol je lipofilný vysoko selektívny beta-blokátor s vazodilatačným účinkom sprostredkovaným prostredníctvom uvoľnenia vazodilatačne pôsobiaceho NO z endotelu ciev. Nebivolol je extenzívne biotransformovaný na aktívne metabolity. Podlieha významnej pre-systémovej eliminácii prostredníctvom enzýmu P450 2D6⁸⁾. Klinicky užívaný nebivolol je racemická zmes D- a L-nebivololu. D-nebivolol je prisudzovaný hlavný podiel na β -blokade, L-nebivolol je naopak prisudzovaný určitý podiel na vazodilatačnom účinku. Štúdia na hypertenzívnych pacientoch preukázala 10- a 15-násobne vyššie priemerné trough koncentrácie v ustálenom stave u PMs v porovnaní s EMs. Avšak napriek výrazným rozdielom v plazmatických hladinách, pokles krvného tlaku a výskyt nežiadúcich účinkov sa medzi skupinou PMs a EMs nelíšil. Podobný účinok nebivololu

medzi metabolickými skupinami môže byť vysvetlený prítomnosťou aktívnych metabolitov nebivololu, ktoré sa zdajú byť ekvipotentné ⁴²⁾.

Betaxolol

Betaxolol je selektívny beta-blokátor. Nepodlieha presystémovej eliminácii, má preto pomerne vysokú biodostupnosť. Hlavná cesta vylučovania je však prostredníctvom biodegradácie v pečeni na neaktívne metabolity ^{13, 43)}. Zdá sa, že P450 2D6 zohráva určitú úlohu v biotransformácii betaxololu, podieľa sa na tvorbe menej zastúpeného metabolitu hydroxybetaxololu ⁴⁴⁾. Zateyshchikov vo svojej práci sledoval vzťah medzi klinickou odpoveďou betaxololu u hypertenzívnych pacientov a polymorfizmom P450 2D6. Popísali významnú asociáciu medzi polymorfizmom P450 2D6 a účinkom betaxololu. Pokles kludovej srdečnej frekvencie bol významne väčší u pacientov s detekovanou mutáciou v gène pre P450 2D6 (nositelia Ser/Pro genotypu). Nižšia srdečná frekvencia a diastolický tlak pri záťažovom teste boli taktiež pozorované u tejto skupiny pacientov. Pokles priemerného denného systolického tlaku počas 24-hodinového ambulantného monitorovania krvného tlaku bol výraznejší u pacientov so Ser/Pro genotypom ⁴⁵⁾.

Metoprolol

Metoprolol je β_1 -selektívny lipofilný beta-blokátor, ktorý podlieha v pečeni výraznej presystémovej eliminácii. Biotransformuje sa 3 cestami: O-demetyláciou s následnou oxidáciou, oxidatívnou deamináciou a alifatickou hydroxyláciou. Metabolity majú 1/10 aktivity materskej látky, ich účinok na β -blokáde je však klinicky nevýznamný ⁴⁶⁾. Alifatická hydroxylácia a sčasti O-demetylácia prebiehajú prostredníctvom P450 2D6. Metoprolol sa používa ako substrátová látka pre stanovenie aktivity enzýmu P450 2D6, tvorba metabolitu α -hydroxymetoprololu sa totiž zdá byť exkluzívne sprostredkovaná práve týmto enzýmom ⁴⁷⁾. Klinicky užívaný metoprolol je vo forme racemickej zmesi. Enantioméry majú odlišnú afinitu k β_1 -receptorom, za blokádu β_1 -receptorov je zodpovedný hlavne S-metoprolol. Odlišnosti medzi enantiomérmi sa nachádzajú i v biotransformácii s rýchlejšou elimináciou R-metoprololu u EMs, čo má za následok vyššie plazmatické hladiny aktívnejšieho S-metoprololu ⁴⁸⁾. Medzi jednotlivými metabolickými skupinami P450 2D6 možno pozorovať výrazné rozdiely v hladinách a vo farmakokinetických parametroch metoprololu ^{49, 50)}. S genotypom sa mení i preferencia metabolizmu enantiomérov, u PMs tak dochádza spomalením biotransformácie k vyrovnaniu koncentrácií R- a S-metoprololu, naopak u UMs sa podiel aktívnejšieho S-metoprololu ešte zvyšuje ⁵¹⁾. Zmeny farmakokinetiky metoprololu medzi metabolickými skupinami majú dopad i na zmenu farmakodynamiky. Avšak odlišnosťou v preferencii biotransformácie S- a R-metoprololu u PMs a UMs v porovnaní s jedincami s normálnou biotransformačnou aktivitou nie sú farmakodynamické zmeny úplne odrazom farmakokinetických. U PMs v porovnaní s EMs bol pozorovaný významne výraznejší pokles námahou-indukovanej srdečnej frek-

vencie, ktorá je dobrým ukazovateľom β_1 -blokády. PMs mali taktiež nižšiu i kludovú srdečnú frekvenciu ^{52–54)}. Vyššie plazmatické koncentrácie u PMs viedli k predpokladu, že PMs môžu byť vystavený vyššiemu riziku nežiadúcich účinkov v porovnaní s EMs. Wutke a kol. pozorovali 5-násobne vyššie riziko výskytu nežiadúcich účinkov u PMs ⁵⁵⁾. Iní autori však tento predpoklad nepotvrdili ^{56, 57)}.

ZÁVER

Beta-blokátory majú svoje nezastupiteľné miesto v terapii kardiovaskulárnych ochorení. Mnohé účinky beta-blokátorov sú podložené štúdiami, v ktorých boli preukázané priaznivé účinky v oplyvnení mortality pacientov. Aj keď základný mechanizmus účinku je spoločný pre celú skupinu, možno pri ich podrobnejšom preskúmaní nájsť výrazné rozdiely medzi jednotlivými zástupcami. Jednak sú to rozdiely v základných farmakokinetických vlastnostiach beta-blokátorov, tak i rozdiely vo farmakodynamických vlastnostiach, ktoré majú rozhodujúci vplyv na výsledný účinok danej látky. Poznanie vlastností danej látky je nevyhnutné pre správnu voľbu správneho beta-blokátora pre konkrétneho pacienta. Trendom posledných rokov je individualizácia terapie pre každého pacienta. Jedným z nástrojov je skúmanie príčin veľkej variability terapie medzi pacientmi, na ktorých sa významne podieľajú zmeny v aktivite biotransformačných enzýmov dané buď genetickými či negenetickými vplyvmi. Mnohé beta-blokátory podliehajú významnej biotransformácii v pečeni a ako možno badať z článku môže zmena biotransformačnej aktivity určitého enzýmu výrazne ovplyvňovať hladiny a vylučovanie beta-blokátora, a tým vyvolať i zmeny v samotnom účinku daného liečiva.

LITERATÚRA

1. Reiter M. J.: Prog Cardiovasc Dis., 2004; 47, 11–33.
2. López-Sendón J., Swedberg K., McMurray J. et al.: Eur Heart J., 2004; 25, 1341–1362.
3. O'Rourke S. T.: Am J Pharm Educ., 2007; 71, 1–6.
4. Bristow M. R.: Circulation, 2000; 101, 558–569.
5. Vítovec J., Špinar J.: Interní Med., 2008; 10, 126–128.
6. Cruickshank J. M.: Circulation., 1990; 82, 60–65.
7. Andrus M. R., Loyed J. V.: Drugs Aging., 2008; 25, 131–144.
8. Prisant L. M.: J Clin Pharmacol., 2008; 48, 225–239.
9. Souček M.: Interní Med., 2008; 2, 58–61.
10. Keating G. M., Jarvis B.: Drugs, 2003; 63, 1697–1741.
11. McDevitt D. G.: Eur Heart J., 1987; 8, 9–14.
12. Riddell J. G., Harron D. W. G., Shanks R. G.: Clin Pharmacokinet., 1987; 12, 305–320.
14. Mehvar R., Brocks D. R.: J Pharm Pharm Sci., 2001; 4, 185–200.
15. Fox K., García M. A., Ardissino D. et al.: Eur Heart J., 2006; 27, 1341–1381.

16. **Bassand J. P., Hamm C. H. W., Ardissino D. et al.:** *Eur Heart J.*, 2007; 28, 1598–1660.
17. **Bělohávek J., Aschermann M.:** *Cor Vasa*, 2008; 50, 1S7–1S23.
18. **Janoušek S.:** *Interv Akut Kardiol.*, 2004; 3, 189–191.
19. **van de Werf F., Bax J., Betriu A. et al.:** *Eur Heart J.*, 2008; 29, 2909–2945.
20. **Gourine A., Bondar S. I., Spyer K. M. et al.:** *Circ Res.*, 2008; 102, 633–636.
21. **Špinar J., Hradec J., Meluzín J. et al.:** *Cor Vasa*, 2007; 49, 5–34.
22. **Prakash A., Markham A.:** *Drugs*, 2000; 60, 647–678.
23. **Dahlöf B., Sever P. S., Poulter N. R. et al.:** *Lancet*, 2005; 366, 895–906.
24. **Dahlöf B., Devereux R. B., Kjeldsen S. E. et al.:** *Lancet*, 2002; 359, 1004–1010.
25. **Grundmann M., Kacířová I.:** *Postgraduální medicína.*, 2007; 9, 652–660.
26. **Widimský J., Cífková R., Špinar J. et al.:** *Cor Vasa.*, 2008; 50, 5–22.
27. **Zipes D. P., Camm A. J., Borggrefe M. et al.:** *Europeace.*, 2006; 8, 746–837.
28. **Blomström-Lundqvist C, Sheinman MM, Aliot EM a kol.:** *J Am Coll Cardiol.*, 2003; 42: 1493–1531.
29. **Anzenbacher P., Anzenbacherová E.:** *CMLS Cell Mol Life Sci.*, 2001; 58, 737–747.
30. **Mičuda S., Martínková J., Chládek J. et al.:** *Remedia.*, 1998; 8, 226–236.
31. **Bernard S., Neville K. A., Nguyen A. T. et al.:** *Clinical Implications. Oncologist.*, 2006; 11, 126–135.
32. **Buzková H., Pechandová K., Slanař O. et al.:** *Prague Med Rep.*, 2006; 107, 383–393.
33. **Volotinen M., Turpeinen M., Tolonen A. et al.:** *Drug Metab Dispos.*, 2007; 35, 1135–1141.
34. **Lewis R. V., Lennard M. S., Jackson P. R. et al.:** *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1985; 19, 329–333.
35. **Lennard M. S., Lewis R. V., Brawn L. A.:** *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1989; 27, 429–434.
36. **Nieminen T., Uusitalo H., Mäenpää J. et al.:** *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2005; 61, 811–819.
37. **Zhou H. H., Wood A. J. J.:** *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1995; 57, 518–524.
38. **Ishida K., Taira S., Morishita H. et al.:** *Bil. Pharm. Bull.*, 2008; 31, 1297–1300.
39. **Honda M., Nozawa T., Igarashi N. et al.:** *Biol. Pharm. Bull.*, 2005; 28, 1476–1479.
40. **Takekuma Y., Takenaka T., Kiyokawa M. et al.:** *Biol. Pharm. Bull.*, 2007; 30, 537–542.
41. **Graff D. W., Williamson K. M., Pieper J. A. et al.:** *J. Clin. Pharmacol.*, 2001; 41, 97–106.
42. **Lefebvre J., Poirier L., Poirier P. et al.:** *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2006; 63, 575–582.
43. **Beresford R., Heel R. C.:** *Drugs.*, 1986; 31, 6–28.
44. **Frishman W. H., Tepper D., Lazar E. J. et al.:** *J. Clin. Pharmacol.*, 1990; 30, 686–692.
45. **de Groot M. J., Ackland M. J., Horne V. A. et al.:** *J. Med. Chem.*, 1999; 42, 4062–4070.
46. **Zateyshchikov D. A., Minushkina L. O., Brovkin A. N. et al.:** *Fund. Clin. Pharmacol.*, 2007; 21, 437–443.
47. **Regårdh C. G., Johnsson G.:** *Clin. Pharmacokinet.*, 1980; 5, 557–569.
48. **Peřinová I., Ďuricová J., Brozmanová H., Kacířová I., Grundmann M.:** *Čes. a slov. Farm.*, 2008; 57, 254–259.
49. **Cerqueira P. M., Cesarino E. J., Mateus F. H. et al.:** *Chirality.*, 1999; 11, 591–597.
50. **Ismail R., Teh L. K.:** *J Clin Pharm Ther.*, 2006; 31, 99–109.
51. **Koytchev R., Alken R. G., Vlahov V. et al.:** *Eur J Clin Pharmacol.*, 1998; 54, 469–474.
52. **Seeringer A., Brockmüller J., Bauer S. et al.:** *Eur J Clin Pharmacol.*, 2008; 64, 883–888.
53. **Kirchheiner J., Heesch C., Bauer S. et al.:** *Clin Pharmacol Ther.*, 2004; 76, 302–312.
54. **Goryachkina K., Burbello A., Boldueva S. et al.:** *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64, 1163–1173.
55. **Bijl M. J., Visser L. E., van Schaik R. H. N. et al.:** *Clin Pharmacol Ther.*, 2009; 85, 45–50.
56. **Wuttke H., Rau T., Heide R. et al.:** *Clin Pharmacol Ther.*, 2002; 72, 429–437.
57. **Fux R., Mörike K., Pröhmer A. M. T. et al.:** *Clin Pharmacol Ther.*, 2005; 78, 378–387.
58. **Zineh I., Beitelshees A. L., Gaedigk A. et al.:** *Clin Pharmacol Ther.*, 2004; 76, 536–544.

Stanovení metoprololu a jeho metabolitu α -hydroxymetoprololu v séru metodou HPLC s fluorescenční detekcí

PEŘINOVÁ I., ĐURICOVÁ J., BROZMANOVÁ H., KACÍŘOVÁ I., GRUNDMANN M.
Ostravská univerzita Ostrava, Ústav klinické farmakologie FN a Zdravotně-sociální fakulty

Došlo 25. srpna 2008 / Přijato 10. října 2008

SOUHRN

Stanovení metoprololu a jeho metabolitu α -hydroxymetoprololu v séru metodou HPLC s fluorescenční detekcí

V práci je popsána metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která byla zavedena pro účely fenotypizace enzymu CYP2D6 metoprololem jako substrátovou látkou. Metoprolol, α -hydroxymetoprolol a nadolol (vnitřní standard) byly extrahovány ze séra dichlormethanem s přidávkem 1 mol/l NaOH. Látky byly separovány na koloně s reverzní fází Supercosil™ LC-18 (15 cm \times 3 mm, 5 μ m) mobilní fází o složení acetonitril : methanol : voda : triethylamin (15 : 5 : 80 : 0,1; pH 3,0) při průtoku 0,7 ml/min. Fluorescenční detekce (FL) probíhala při vlnové délce 230 nm (excitace) a 300 nm (emisní). Celková doba analýzy byla 12 min. Retenční časy byly pro α -hydroxymetoprolol (h-MET) 2,04 minut, pro nadolol (IS) 3,02 minut a pro metoprolol (MET) 9,04 minut. Přesnosti v sérii a mezi sériemi vyjádřené jako relativní směrodatné odchylky byly nižší než 7,2 % a recovery se pohybovalo v rozmezí 98,2–103,0 %. Kalibrační křivka byla lineární v rozmezí 25–500 ng/ml ($r = 0,999$) pro obě látky. Detekční limit byl stanoven pro metoprolol a α -hydroxymetoprolol na 5 ng/ml a kvantifikační limit na 25 ng/ml. Prezentovaná metoda může být vhodná pro analýzu metoprololu a α -hydroxymetoprololu v séru u pacientů s hypertenzí, ICHS i jiných onemocnění.

Klíčová slova: fenotypizace CYP2D6 – metoprolol – α -hydroxymetoprolol – HPLC-FL

Čes. slov. Farm., 2008; 57, 254–259

SUMMARY

Determination of metoprolol and its metabolite α -hydroxymetoprolol in serum by HPLC method with fluorescence detection

High-performance liquid chromatography method has been developed with a view of its future use in the phenotyping of CYP2D6 enzyme by metoprolol as a probe drug. Metoprolol, α -hydroxymetoprolol and the internal standard nadolol were extracted from serum with dichloromethane alkalized with 1 mol/l NaOH. Chromatographic separations were performed on the reversed-phase column Supercosil™ LC-18 (15 cm \times 3 mm, 5 μ m) with the mobile phase containing acetonitril:methanol:water:triethylamine (15 : 5 : 80 : 0.1, pH 3.0) at a flow rate of 0.7 ml/min. Fluorescence detection (FL) was made at 230 nm (excitation) and 300 nm (emission). The total analysis time was 12 min. The retention time for α -hydroxymetoprolol, nadolol and metoprolol were 2.04, 3.02 and 9.04 min, respectively. The intra-assay and inter-assay precisions (coefficients of variation) were less than 7.2 %, and recovery values were found to be within 98.2–103.0 %. The calibration curve of the method was linear over a concentration range of 25–500 ng/ml ($r = 0.999$) for both compounds. The limit of detection was 5 ng/ml and the limit of quantification was 25 ng/ml for both metoprolol and α -hydroxymetoprolol. The reported method could be suitable for measurements of metoprolol and α -hydroxymetoprolol in serum from patients with hypertension, IHD and other illnesses.

Key words: phenotyping CYP2D6 – metoprolol – α -hydroxymetoprolol – HPLC-FL

Čes. slov. Farm., 2008; 57, 254–259

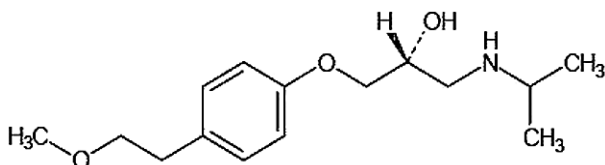
Má

Adresa pro korespondenci:

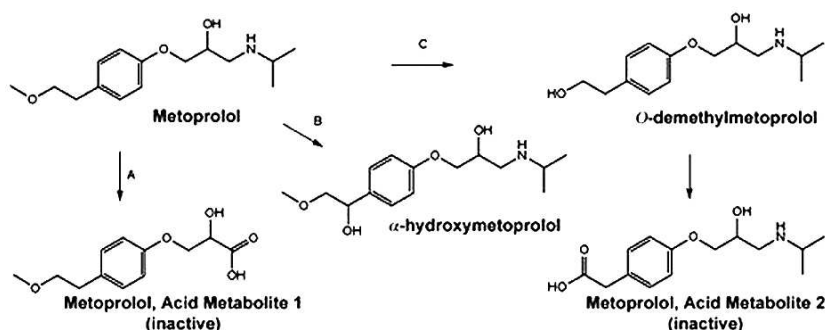
Mgr. Ilona Peřinová, Ph.D.
Ústav klinické farmakologie FN a Zdravotně sociální fakulta OU
17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava – Poruba
e-mail: ilona.perinova@fno.cz

Úvod

Metoprolol, (2*RS*)-3-(isopropylamino)-1-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]propan-2-ol (obr. 1), je lipofilní β_1 – selektivní antagonist a adrenerních receptorů používaný v léčbě kardiovaskulárních i nekardiovaskulárních onemocnění.



Obr. 1. Chemický vzorec metoprololu



Obr. 2. Hlavní cesty metabolismu metoprololu ⁴⁾

Je extenzivně metabolizován v játrech na několik metabolitů, které postrádají klinicky významný -blokující účinek ¹⁾. Hlavními metabolickými cestami jsou O-dealkylace (65 %), deaminace (10 %) a alifatická hydroxylace (10 %) ²⁾ (obr. 2).

Tvorba metabolitu α -hydroxymetoprololu je exkluzivně zprostředkována cytochromem P450 2D6 (CYP2D6). CYP2D6, metabolizující přibližně 25 % všech užívaných léčiv, je známý vysokou interindividuální variabilitou. Tato variabilita je dána zejména faktory genetickými, přidruženými nemocemi a v menší míře i faktory zevního prostředí. Metoprolol, spolu s dalšími látkami, se využívá jako specifický substrát pro stanovení aktuální aktivity CYP2D6 enzymu (fenotypizace). Metabolický poměr α -hydroxymetoprolol/metoprolol určí příslušný fenotyp jedince ³⁾.

Bylo popsáno několik metod na stanovení metoprololu společně s jeho metabolitem α -hydroxymetoprololem. Jedná se především o metody kapalinové chromatografie s UV detekcí ^{5, 6)} nebo FL detekcí ⁷⁻¹⁷⁾ při různých vlnových délkách. Látky byly extrahovány z biologického materiálu (plazmy, séra nebo moči) pomocí extrakce na pevné fázi ⁷⁻⁹⁾ nebo extrakce kapalinou (diethyletherem, dichlormethanem, chloroformem, ethylethanolátem nebo kombinací) při alkalickém pH ^{5, 10-14)}. Jako vnitřní standard byl použit pindolol ^{10, 15)}, phenacetin ⁵⁾, alprenolol ^{8, 13)}, guanoxan ⁷⁾ nebo dextromethorfan ^{9, 14)}. Mobilní fázi tvořila směs

voda : acetonitril ^{5, 8, 10, 11, 13, 16, 17)}, voda : acetonitril:methanol ⁷⁾ nebo voda : acetonitril:tetrahydrofuran ^{9, 14)}. Analýza probíhala na kolonách s reverzní fází ^{5-7, 10, 11, 13, 16, 17)}, na kyano-koloně ⁸⁾ nebo na phenyl-koloně ^{12, 14, 15)}. Doba analýzy se pohybovala ve většině prací od 20 do 35 minut, méně pak do 15 min ^{9, 13, 14)}. Jen výjimečně se metoprolol a α -hydroxymetoprolol stanovuje pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí ¹⁸⁾ nebo plynové chromatografie s hmotnostní detekcí ^{19, 20)}.

Cílem práce bylo zavést, optimalizovat a validovat HPLC metodu na stanovení metoprololu a α -hydroxymetoprololu pro účely fenotypizace enzymu CYP2D6 metoprololem jako substrátovou látkou. Požadavkem byla rychlá a selektivní metoda s jedнокrokovou extrakcí malého množství séra, vhodná pro rutinní analýzu patientských vzorků.

POKUSNÁ ČÁST

Chemikálie a roztoky

Substance metoprololu (metoprolol tartarát) a nadololu byly získány od firmy Sigma, α -hydroxymetoprolol byl získán od firmy Astra Zeneca. Dichlormethan (LiChrosolv[®], pro kapalinovou chromatografii), acetonitril a methanol (LiChrosolv[®], gradient grade for liquid chromatography) byly zakoupeny od firmy Merck, voda (Chromasolv[®] Plus HPLC) a triethylamin (TEA – triethylamine, 99%) od firmy Sigma-Aldrich. 1 mol/l NaOH (Sodium hydroxide Solution for HPCE) byl získán od firmy Fluka.

Přístrojové vybavení a chromatografické podmínky

HPLC zařízení firmy Spectra Physics Analytical se skládalo z čerpadla (Spectra SYSTEM P1500), smyčky pro manuální nástřik a fluorescenčního detektoru (Spectra SYSTEM FL 2000). Byla použita kolona firmy Supelco, Supercosil[™] LC-18 (15 cm × 3 mm, 5 μ m). Mobilní fázi tvořila směs acetonitril : methanol : voda : TEA (15 : 5 : 80 : 0,1; pH 3,0), průtok mobilní fáze byl 0,7 ml/min. Fluorescenční detektor byl nastaven na 230 nm (excitační) a 300 nm (emisní) vlnové délky. Celková délka analýzy byla 12 min.

Příprava roztoků pro kalibraci a validaci

Zásobní roztoky metoprololu (MET), α -hydroxymetoprololu (hMET) a nadololu (vnitřní standard – IS) byly připraveny v koncentracích 100 $\mu\text{g/l}$. Ředěním zásobních roztoků methanolem byly připraveny pracovní roztoky všech tří látek o koncentraci 1000 ng/ml. Standardní a kontrolní roztoky metoprololu a α -hydroxymetoprololu byly připraveny ředěním jednotlivých pracovních roztoků na koncentrace 25, 50, 100, 250, 500 ng/ml a 40, 200, 400 ng/ml, resp. Roztok nadololu byl použit o koncentraci 1000 ng/ml. Všechny roztoky byly uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazničce.

Příprava vzorků pro analýzu

Vzorky pro kalibraci a validaci

Standardní a kontrolní vzorky se připravily odpařením 100 μl jednotlivých standardních, resp. kontrolních roztoků a 50 μl vnitřního standardu. Extrakce probíhala stejně jako u neznámých vzorků.

Neznámé vzorky

K 50 μl odpařeného vnitřního standardu se přidalo 200 μl neznámého séra (nulového séra v případě standardních a kontrolních vzorků), 50 μl 1 mol/l NaOH a 1,5 ml dichlormethanu. Vzorky se 1 min extrahovaly. Po 10 min centrifugaci při 3800 ot./min se odsála horní vrstva a spodní dichlormethanová vrstva se přenesla do čisté zkumavky a nechala se odpařit pod dusíkem. Odpa-

rek se rozpustil ve 20 μl methanolu a 50 μl HPLC vody, 20 μl se injikovalo na kolonu.

Validace metody

Přesnost a správnost

Během 3 dnů byly proměřeny standardní vzorky v 5 koncentračních hladinách (25, 50, 100, 250, 500 ng/ml, $n = 6$ pro každou koncentrační hladinu) a kontrolní vzorky ve 3 koncentračních hladinách (40, 200, 400 ng/ml, $n = 6$ pro každou koncentrační hladinu). Vzorky byly analyzovány kompletním postupem a odečteny z kalibrační křivky připravené v den analýzy. Přesnost byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD) pro analýzu v sérii (intra-assay) a analýzu mezi sériemi (inter-assay). Správnost byla vyjádřena jako recovery (R).

Linearita

Proměřením náhodně vybraných vzorků (vzorky před podáním, 1, 2, 3 a 4 hodiny po podání) pacientů, kterým byl podáván metoprolol v různých dávkách v rámci antihypertenzní terapie, se získala představa o koncentračním rozmezí metoprololu a α -hydroxymetoprololu. Ze základního standardního roztoku blízkého horní hranici pracovního rozsahu se naředěním připravilo 5 standardních roztoků s klesající koncentrací analytu tak, aby došlo k pokrytí celého pracovního rozsahu měření – 25, 50, 100, 250 a 500 ng/ml pro metoprolol i α -hydroxymetoprolol. Kalibrační křivka byla zkonstruována na základě analýzy nejmenších čtverců jako poměr plochy píků jed-

Tab. 1. Optimalizace chromatografických podmínek

Kombinace	kolona	mobilní fáze	průtok (ml/min)	vlnová délka (nm)
1	SGX C18*	ACN : methanol : voda : TEA 15 : 15 : 70 : 0,05; pH 3,0	0,12	UV (220)**
2	SGX C18	ACN : methanol : voda : TEA 9 : 1 : 90 : 0,1; pH 3,0	0,12	FL (230/300)
3	SGX C18	ACN : methanol : voda : TEA 5 : 15 : 80 : 0,08; pH 3,0	0,12	FL (230/300)
4	SGX C18	ACN : methanol : voda : TEA 15 : 5 : 80 : 0,05; pH 4,6	0,12	FL (230/300)
5	SGX C18	ACN : methanol : voda : TEA 15 : 15 : 70 : 0,01; pH 3,0	0,12	FL (230/300)
6	SGX C18	ACN : methanol : voda : TEA 30 : 10 : 60 : 0,04; pH 3,4	0,05	FL (230/300)
7	LC 18	ACN : methanol : voda : TEA 30 : 10 : 60 : 0,04; pH 3,4	0,07	FL (230/300)
8	LC 18	ACN : methanol : voda : TEA 15 : 5 : 80 : 0,1; pH 3,0	0,07	FL (230/300)

*kolona SGX C18 (15 cm \times 1 mm, 5 μm) firmy Tessek

**detektor Spectra Series UV 100 firmy Thermo Separation Product

notlivých látek k ploše píku vnitřního standardu v závislosti na koncentraci.

Detekční limit (LOD) a kvantifikační limit (LOQ)

LOD (nejnižší detekovatelná koncentrace látky) a LOQ (nejnižší koncentrace látky ve vzorku, stanovitelná s přijatelnou přesností a správností za uvedených podmínek metody) byly stanoveny na základě poměru sig-

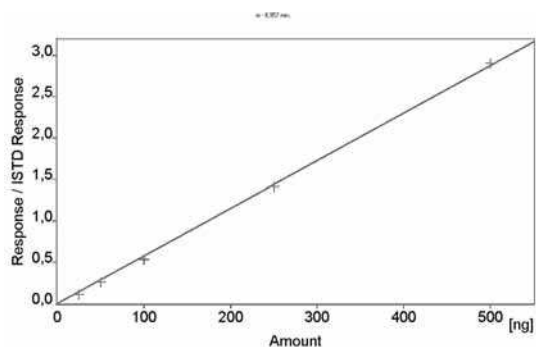
nálu k šumu (S/N). Pro LOD byl poměr S/N stanoven na 3 : 1 a pro LOQ na 10 : 1.

Selektivita

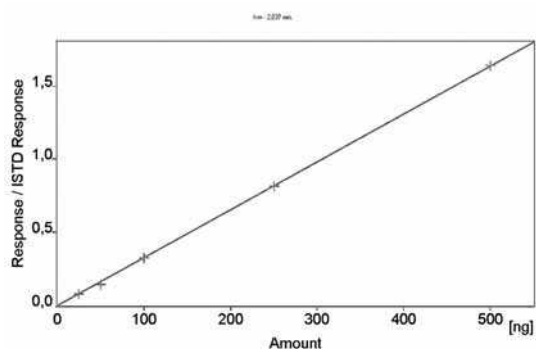
Byla testována schopnost měřit správně a specificky stanovenou látku v přítomnosti jiných látek, které mohou být očekávány ve vzorku. Analyzoval se vzorek séra o tzv. nulové koncentraci (krev neléčeného dárce

Tab. 2. Přesnost a správnost metody

Látka	teoretická koncentrace (Ůg/l)	naměřená koncentrace (Ůg/l ± SD)	přesnost (intra-assay) RSD (%)	přesnost (inter-assay) RSD (%)	správnost R (%)	
MET	25	24,8 ± 0,8	3,3		99,2	
	50	49,1 ± 2,1	4,2		98,2	
	100	99,9 ± 5,3	5,4		99,9	
	250	251,7 ± 3,8	1,5		100,7	
	500	504,7 ± 7,0	1,4		100,9	
	40	38,7 ± 1,5		4,0	96,9	
	200	202,7 ± 4,1		2,0	101,4	
	400	403,3 ± 19,3		4,8	100,8	
	Š-hMET	25	25,4 ± 0,8	3,1		101,8
		50	50,9 ± 3,7	7,2		101,8
100		103,0 ± 6,3	6,1		103,0	
250		252,9 ± 6,5	2,6		101,1	
500		494,4 ± 11,2	2,3		98,9	
40		39,5 ± 1,4		3,6	98,8	
200		202,0 ± 7,0		3,5	101,0	
400		397,3 ± 12,2		3,1	99,3	



Obr. 3. Kalibrační křivka metoprololu



Obr. 4. Kalibrační křivka Š-hydroxymetoprololu

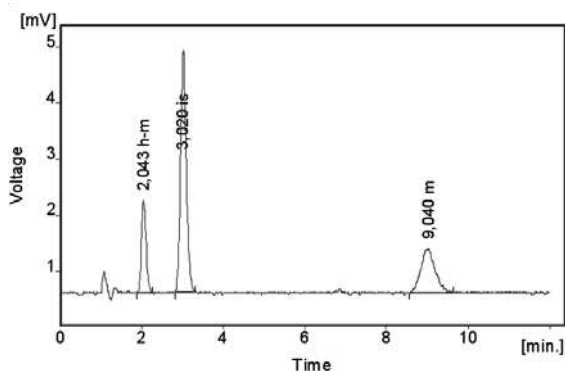
testovaná na přítomnost HIV a HBsAg) a během 2 měsíců bylo stanoveno 98 vzorků séra pacientů léčených metoprololem při antihypertenzní terapii.

Robustnost

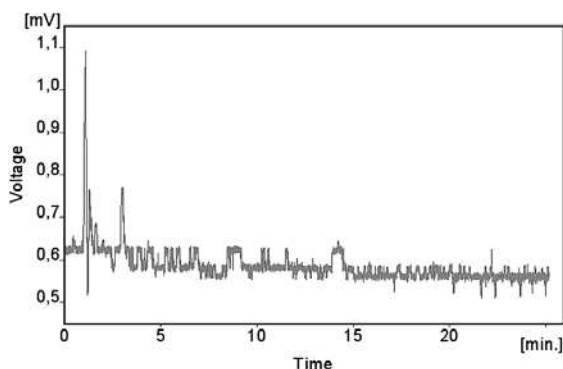
Sledovalo se jak výběr stacionární fáze a změna ve složení mobilní fáze ovlivní analýzu metoprololu a α -hydroxymetoprololu. Vybrané podmínky jsou shrnuty v tabulce 1.

VÝSLEDKY

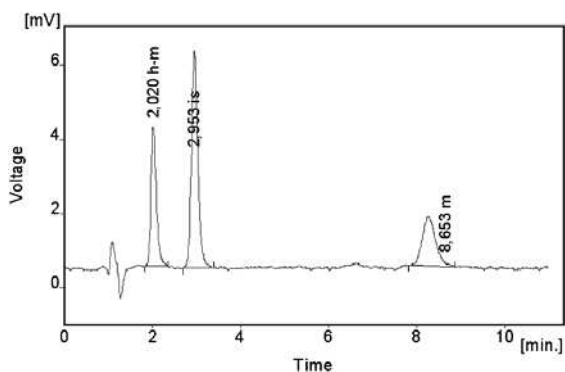
Byla zavedena, optimalizována a validována, HPLC metoda na stanovení metoprololu a α -hydroxymetoprololu v séru. Na základě předběžných studií uvedených v tabulce 1 byl vybrán jako nejvhodnější postup č. 8, HPLC metoda s fluorescenční detekcí (230 nm excitační a 300 nm emisní vlnové délky), s reverzní stacionární fází LC 18 (15 cm × 3 mm, 5 μ m) a ternární mobilní fází acetonitril : methanol : voda : TEA (15 : 5 : 80 : 0,1; pH 3,0). Průtok mobilní fáze byl 0,7 ml/min. Použitím mobilní fáze s větším obsahem vodné složky (vyžadovalo větší přidavek TEA) se ve srovnání s organičtější fází mírně zhoršila citlivost, ale výrazně se zvýšila selektivita metody. Jako vnitř-



Obr. 5. Chromatogram extrahovaného standardního vzorku metoprololu (m) a α -hydroxymetoprololu (h-m) o koncentraci 100 ng/ml



Obr. 5. Chromatogram nulového séra



Obr. 7. Chromatogram patientského vzorku – koncentrace metoprololu (m) 84,8 ng/ml a koncentrace α -hydroxymetoprololu (h-m) 162,7 ng/ml

ní standard byl nejdříve testován pindolol. Vzhledem k jeho nízké detekovatelnosti při použité vlnové délce byl pro konečnou analýzu vybrán nadolol. Optimalizován byl také extrakční postup pro přečištění vzorků séra. Pro danou metodu byla vybrána jako nejvhodnější extrakce dichlormethanem (1,5 ml) s přidavkem 50 μ l 1 mol/l NaOH. Při analýze se vycházelo z malého množství séra (200 μ l), což je vhodné pro rutinní měření patientských vzorků.

Kalibrační křivka pro metoprolol a jeho metabolit α -hydroxymetoprolol byla lineární v rozmezí 25–500 ng/ml s korelačním koeficientem 0,999 pro obě látky (obr. 3 a 4). Na obrázku 5 je ukázán chromatogra-

fický záznam extrahovaného standardního vzorku metoprololu a α -hydroxymetoprololu o koncentraci 100 ng/ml. Retenční časy byly pro α -hydroxymetoprolol (h-MET) 2,04 minut, pro nadolol (IS) 3,02 minut a pro metoprolol (MET) 9,04 minut. Detekční limit (LOD – S/N = 3 : 1) byl stanoven pro metoprolol i α -hydroxymetoprolol 5 ng/ml a kvantifikační limit (LOQ – S/N = 10 : 1) 25 ng/ml. LOQ byl potvrzen analýzou 6 vzorků této koncentrace s dostatečnou přesností a správností – RSD pro MET byla 3,3 % a pro h-MET 3,1 %, R pro MET bylo 99,2 % a pro h-MET 101,8 %. Přesnost a správnost metody je shrnuta v tabulce 2. Relativní směrodatné odchylky metoprololu a α -hydroxymetoprololu pro analýzu v sérii byly \leq 5,4 % (MET) a 7,2 % (h-MET) a pro analýzu mezi sériemi \leq 4,8 % (MET) a 3,6 % (h-MET). Recovery metoprololu bylo v rozmezí 98,2–100,9 % a α -hydroxymetoprololu v rozmezí 98,8–103,0 %. Tyto hodnoty jsou přijatelné podle platných kritérií pro validační parametry chromatografických metod^{21–26}. Při analýze vzorku séra o nulové koncentraci nebyly nalezeny žádné interferující látky (obr. 6). Interference nenastává ani s léky, které jsou běžně podávány pacientům s hypertenzí (obr. 7).

DISKUZE

Uvedená HPLC metoda s fluorescenční detekcí je přesná, správná a selektivní metoda, vhodná pro stanovení metoprololu a α -hydroxymetoprololu v séru. Metoda vyžaduje minimální množství séra a jednoduchou úpravu vzorků. Celková doba analýzy je pouze 12 minut, což je vhodné pro rutinní používání. Na rozdíl od většiny citovaných prací, které používají dvousložkovou mobilní fázi acetonitril-voda, byla v práci použita ternární mobilní fáze. Přidavek methanolu do mobilní fáze zlepšil symetrii píků a prodloužil životnost kolony. Jako vnitřní standard byl nově použit β -blokátor nadolol, což je látka podobné chemické struktury jako metoprolol a blízké polarity jako α -hydroxymetoprolol. V České republice není nadolol k farmakoterapii používán. Nadolol byl dokonale oddělen od obou složek, vykazoval dobrou fluorescenční intenzitu při použité vlnové délce a extrahovatelnost při zvoleném postupu.

Metoda byla vyvinuta pro měření jak vzorků s nižšími koncentracemi (před podáním léku) tak vzorků s vyššími koncentracemi (po podání léku), takže by mohla být vhodná pro terapeutické monitorování metoprololu (TDM) a může být použita pro testování fenotypu enzymu CYP2D6 v séru pacientů, kteří metoprolol užívají.

Předběžně se zavedená metoda testovala také pro stanovení metoprololu a α -hydroxymetoprololu v moči. Jednalo se o vzorky ranní moče pacientů s hypertenzí. První výsledky ukazují, že po naředění vzorků moče a přečištění uvedenou extrakční procedurou bude metoda využitelná i pro stanovení fenotypu CYP2D6 v moči.

LITERATURA

1. **Fux, R., Mörike, K., Pröhmer, A. M. et al.:** Clin. Pharmacol. Ther., 2005; 78, 378–387.
2. **Silas, J. H., Lennard, M. S., Tucker, G. T. et al.:** Br. J. Clin. Pharmacol., 1984; 17, 11–19.
3. **Duricová, J., Grundmann, M.:** Ces. slov. Farm., 2007; 56, 220–224.
4. **Bodor, N., Buchwald, P.:** AAPS J., 2005; 7, 820–833.
5. **Ismail, R., The, L. K.:** J. Clin. Pharm. Ther., 2006; 31, 99–109.
6. **Godbillon, J., Duval, M.:** J. Chromatogr., 1984; 309, 198–202.
7. **Chiu, F. C., Damani, L. A., Li, R. C., Tomlinson, B.:** J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 1997; 696, 69–74.
8. **Fang, J., Semple, H. A., Song, J.:** J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 2004; 809, 9–14.
9. **Mistry, B., Leslie, J., Eddington, N. E.:** J. Pharm. Biomed. Anal., 1998; 16, 1041–1049.
10. **Sohn, D. R., Kusaka, M., Shin, S. G. et al.:** Ther. Drug. Monit., 1992; 14, 184–189.
11. **Li, G., Wang, R.:** Chin. Med. J., 2006; 119, 2013–2017.
12. **Ramenskaya, G. V., Savchenko, A. Y., Agafonov, A. A. et al.:** Bull. Exp. Biol. Med., 2002; 134, 159–160.
13. **Lecaillon, J. B., Godbillon, J., Abadie, F., Gosset, G.:** J. Chromatogr., 1984; 305, 411–417.
14. **Goryachkina, K., Burbello, A., Boldueva, S. et al.:** Eur. J. Clin. Pharmacol., 2008; 64, 275–282.
15. **Bramer, S. L., Suri, A.:** Clin. Pharmacokinet., 1999; 37, 41–51.
16. **Kirchheiner, J., Heesch, C., Bauer, S. et al.:** Clin. Pharmacol. Ther., 2004; 76, 302–312.
17. **Rutledge, D. R., Garrick, C.:** J. Chromatogr. Sci., 1989; 27, 561–565.
18. **Asimus, S., Elsherbiny, D., Hai, T. N. et al.:** Fundam. Clin. Pharmacol., 2007; 21, 307–316.
19. **Mautz, D. S., Shen, D. D., Nelson, W. L.:** Pharm. Res., 1995; 12, 2053–2056.
20. **Hoffmann, K. J., Gyllenhaal, O., Vessman, J.:** Biomed. Environ. Mass. Spectrom., 1987; 14, 543–548.
21. **Rewiewer of Guidance. Validation of Chromatographic Methods. Center of Drug Evaluation and Research (CDER), CMC 3, 1994.**
22. **Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. The International Conference on Harmonisation of Thechnical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), 1996.**
23. **Thompson, M., Ellison, S. L. R., Wood, R.:** Pure Appl. Chem., 2002; 74, 835–855.
24. **Bievre, B. et al.:** The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, EURACHEM Guide. 1998, s. 14.
25. **Brown, R., Caphart, M., Faustino, P. et al.:** LCGC, 2001; 19, 74–79.
26. **Causon, R.:** J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 1997; 689, 175–180.

Comparison of metoprolol/ α -hydroxy-metoprolol metabolic ratio after a single dose and in steady state

ĐURICOVÁ J., PEŘINOVÁ I., KACÍŘOVÁ I., GRUNDMANN M.

Department of Clinical Pharmacology, University Hospital Ostrava, and Faculty of Medicine, University of Ostrava, Czech Republic

Received 27 August 2010 / Accepted 5 October 2010

SUMMARY

Comparison of metoprolol/ α -hydroxymetoprolol metabolic ratio after a single dose and in steady state

Metoprolol/ α -hydroxymetoprolol metabolic ratio (MR) 3 hours after a single metoprolol dose is used for cytochrome P450 2D6 phenotyping. The aim was to compare cytochrome P450 2D6 metabolic activity after the first metoprolol dose and in steady state. Thirteen adult hypertensive patients (7 females) in whom an introduction of the beta-blocker metoprolol was indicated were included. Age (mean \pm SD) was 42.8 ± 12.9 years, weight (mean \pm SD) was 94.0 ± 25.4 kg. Metoprolol dose was chosen based on clinical grounds on the day of metoprolol first ingestion. Blood samples were drawn after the first dose and at least 2 weeks since metoprolol introduction to ensure steady state. The patients were phenotyped as extensive metabolizers in both periods, after metoprolol first ingestion and in steady state. We observed a significant correlation ($r_s = 0.8418$, $P = 0.0003$) between the metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MRs. All the patients were phenotyped as extensive metabolizers in both periods, despite statistically significant differences between the median MRs (0.59 versus 0.81, $P = 0.0266$). The differences were not of such an extent so as to assign subjects to different phenotypic groups. Metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR in steady state is an appropriate alternative to metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR after a single dose.

Key words: cytochrome P450 2D6 – phenotype – probe drug – metoprolol

Čes. slov. Farm., 2010; 59, 222–226

SÚHRN

Porovnanie metabolického pomeru metoprololu/ α -hydroxymetoprololu po jednorázovom a opakovanom užití

Metabolický pomer (MR) metoprololu/ α -hydroxymetoprololu za 3 hod po užití jednorázovej dávky metoprololu sa používa na stanovenie fenotypu enzýmu cytochrómu P450 2D6. Cieľom tejto práce bolo porovnať metabolickú aktivitu cytochrómu P450 2D6 po prvom a opakovanom užití metoprololu. Do tejto práce bolo zahrnutých 13 pacientov s hypertenziou (7 žien), u ktorých bolo plánované nasadenie beta-blokátora metoprololu. Vek (priemer \pm SD) bol $42,8 \pm 12,9$ rokov, telesná hmotnosť (priemer \pm SD) bola $94,0 \pm 25,4$ kg. Dávka metoprololu bola u každého pacienta zvolená na základe klinického stavu pacienta v deň užitia prvej tablety. Krvné odbery boli urobené po užití prvej dávky metoprololu a najmenej 2 týždne od nasadenia metoprololu k zaručeniu ustáleného stavu (opakované užívanie). Na základe hodnôt MR boli všetci pacienti po jednorázovom i opakovanom užití zaradení do tej istej fenotypovej skupiny. Pozorovali sme tesnú koreláciu medzi MR po jednorázovom a opakovanom užití metoprololu ($r_s = 0,8418$, $P = 0,0003$). Všetci pacienti boli v oboch odberoch zaradení do rovnakej fenotypovej skupiny, extenzívny metabolizátor i napriek významnému rozdielu medzi MR metoprololu/ α -hydroxymetoprololu po jednorázovom

Address for correspondence:

PharmDr. Jana Ďuricová

Department of Clinical Pharmacology, University Hospital Ostrava, and Faculty of Medicine, University of Ostrava

17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava

e-mail: jankaduricova@seznam.cz, jana.duricova@fno.cz

a opakovanom užití (medián 0,59 vs. 0,81, $P = 0,0266$), Využitie MR metoprololu/ α -hydroxymetoprololu u pacientov na dlhodobej terapii metoprololom je vhodné pre stanovenie fenotypu enzýmu cytochrómu P450 2D6.

Kľúčové slová cytochróm P450 2D6 – fenotyp – substrátová látka – metoprolol

Introduction

The human cytochrome P450 2D6 (P450 2D6) is involved in the oxidative metabolism of about 25 % of all commonly prescribed drugs¹⁾. The enzyme is characterized by a high range of interindividual variability²⁾. It is highly polymorphic with more than 100 variant alleles described so far³⁾. However, beside the genetic polymorphism environmental factors may also play important role in metabolic activity⁴⁾. Individual P450 2D6 activity can be affected by gender⁵⁾, liver diseases⁶⁾, pregnancy⁷⁾ and nutritional habits⁸⁾. Administration or discontinuation of an enzyme inhibitor can significantly change the metabolic activity; a phenotypic shift may even occur^{9–11)}. Thus, the ability to measure the activity of P450 2D6 enzyme is of high significance. Genotyping alone is not sufficient to accurately predict an individual's actual P450 2D6 activity, phenotyping on the other hand can determine the exact enzymatic activity as it also reflects non-genetic factors. Phenotyping is usually based on single administration of a probe drug, a compound that is predominately or exclusively metabolized by the enzyme. The resulting metabolic activity is determined from the metabolic ratio MR (maternal compound/metabolite) in urine or in blood¹²⁾. Bimodal or trimodal distributions of the MR are typically seen in European populations with the poor metabolizer phenotype representing a separate subgroup, which can be clearly defined by an antimode¹³⁾. Metoprolol serves as one of the probe drugs with 70–80% of its metabolism mediated by P450 2D6, of which α -hydroxylation is exclusively mediated by P450 2D6¹⁴⁾. The metabolic ratio of metoprolol over its metabolite α -hydroxymetoprolol in plasma 3 hours after a single metoprolol administration has been validated under standard conditions for the measurement of enzyme activity of P450 2D6 *in vivo*¹⁵⁾. A single dose of metoprolol is usually used for P450 2D6 phenotyping. Use of metoprolol MR in patients routinely treated with metoprolol would eliminate the need for administration of an additional probe drug. The fraction of metoprolol dose available systematically may increase during long-term treatment with metoprolol¹⁶⁾. P450 2D6 has a high affinity and a low capacity and P450 2D6 dependant metabolism could saturate during chronic exposure leading to a reduction of metabolic capacity¹⁷⁾. To our knowledge, no direct comparison of metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR after a single dose and in steady state has been performed. The aim of the present study was to compare P450 2D6 metabolic activity using metoprolol as a probe drug in patients after first metoprolol dose and in metoprolol steady state.

MATERIALS AND METHODS

Thirteen adult patients (7 females) attending outpatient clinic for hypertension treatment at the Department of Clinical Pharmacology, University Hospital Ostrava, were included. Age (mean \pm SD) was 42.8 ± 12.9 years, body weight (mean \pm SD) was 94.0 ± 25.4 kg. In all of these patients, an introduction of the beta-blocker metoprolol to their therapy was indicated due to non-satisfactory treated hypertension. Two of the patients had already been on the beta-blocker atenolol, however with persisting higher pulse, thus a shift to metoprolol was indicated. At the time of admission, one patient had been treated with 6 antihypertensive drugs, three of the patients had been treated with 5 antihypertensive agents, one patient had 3 antihypertensive drugs, three patients had been on 2 antihypertensive drugs and three patients on antihypertensive monotherapy, two patients had been without previous antihypertensive medication. To optimize the metoprolol therapy, therapeutic drug monitoring (TDM) of metoprolol was recommended as well as P450 2D6 phenotyping.

The patients were invited to our department on the day of their first ingestion of metoprolol. They were instructed to take other "morning" medications (if they were on polytherapy) at home on the study day. The dose of metoprolol was chosen based on clinical grounds (7 patients were prescribed 200 mg of metoprolol, 5 patients were given 100 mg of metoprolol and one patient was given 50 mg of metoprolol). Blood samples (4.5 ml each) were drawn into a neutral tube at 1, 3 and 4 hours after metoprolol intake. Baseline data including renal function test (serum creatinine, urea) and liver function test (ALT, AST, γ -GT) were obtained on the study day or were recorded if they were not older than 3 months. The patients further continued in the prescribed therapy with metoprolol. Blood samples in metoprolol steady state were drawn on the next check-up, at least 2 weeks since metoprolol introduction to ensure metoprolol steady state. The scheme of blood collections was the same as at first metoprolol ingestion including blood sample before metoprolol intake. Patients' medical history was recorded and screened for the presence of the P450 2D6 inhibitor. In 5 patients a change in medication was reported between the two periods of blood collections. In most cases a new antihypertensive agent was added (doxazosin, rilmenidine, telmisartan, trandolapril and hydrochlorothiazide), further sibutramin, allopurinol and tamsulosin were also prescribed in one case.

Assay of metoprolol and α -hydroxymetoprolol

Serum concentrations of metoprolol and α -hydroxymetoprolol were measured by means of high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection at 230–300 nm, as described previously¹⁸⁾.

Data and statistical analysis

Data are expressed as median and range. The P450 2D6 phenotype was determined using serum metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR 3 hours post-dose. The antimode value distinguishing between extensive metabolizers and poor metabolizers was set at MR = 10.5, in agreement with the literature¹⁹⁾. Values are given as median and range. Spearman's rank correlation test was used for evaluating the relationship between MR after the first metoprolol dose and in steady state. To assess the differences between MR after the first metoprolol dose and in steady state, the Wilcoxon matched-pairs test was applied. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPad

Prism for Windows version 5.0 (GraphPad Prism Software, Inc).

RESULTS

Results are summarized in Table 1. All the patients continued with the same metoprolol dose after introduction of metoprolol to their therapy. When we examined changes in patients' medication between the two sampling periods, we did not find any drug interfering with P450 2D6 enzyme. Therefore no effect of these drugs on P450 2D6 metabolic activity between the two periods is likely to occur. We observed a significant correlation ($r_s = 0.8418$, $P = 0.0003$) between the MR 3 hours after a metoprolol single dose and during repeated treatment (Fig. 1). The patients were phenotyped as extensive metabolizers in both periods, after metoprolol first ingestion and in steady state, despite statistically significant differences between the median metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR 3 hours after the first metoprolol dose and in steady state (0.59

Table 1. Serum concentrations of metoprolol and α -hydroxymetoprolol at 3 hours post-dose, metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR at 3 hours post-dose after the first dose and in steady state

Patient	Daily dose (mg)	Metoprolol C_F (ng/ml)	α -OH-Met C_F (ng/ml)	MR _F	Metoprolol C_{SS} (ng/ml)	α -OH-Met C_{SS} (ng/ml)	MR _{SS}	MR _{SS} – MR _F
1	200	43.7	210.6	0.21	131.5	323.0	0.41	0.20
2	200	47.7	93.1	0.51	95.2	52.8	1.80	1.29
3	100	60.2	80.6	0.75	78.3	117.5	0.67	-0.08
4	200	185.7	40.1	4.63	272.1	65.2	4.17	-0.46
5	100	53.2	31.6	1.68	95.7	46.2	2.07	0.39
6	100	32.1	42.2	0.76	46.6	48.1	0.97	0.21
7	200	62.2	91.8	0.68	103.2	102.2	1.01	0.33
8	100	24.2	81.9	0.30	30.4	94.7	0.32	0.02
9	200	53.9	91.0	0.59	101.5	150.0	0.68	0.09
10	50	3.2	11.4	0.28	10.1	27.9	0.36	0.08
11	200	33.6	78.1	0.43	100.4	124.1	0.81	0.38
12	100	30.3	10.1	3.00	64.0	19.6	3.27	0.27
13	200	30.0	106.9	0.28	58.5	135.1	0.43	0.15
median	200	43.7	80.6	0.59	95.2	94.7	0.81	0.20
range	(50–200)	(3.2–185.7)	(10.1–210.6)	(0.21–4.63)	(10.1–272.1)	(19.6–323.0)	(0.32–4.17)	(-0.46–1.29)

MR_F – MR after first dose, α -OH-Met – α -hydroxymetoprolol, MR_{SS} – MR in steady state, C_F – concentration at 3 hours after first metoprolol dose, C_{SS} – concentration at 3 hours after metoprolol dose in steady state

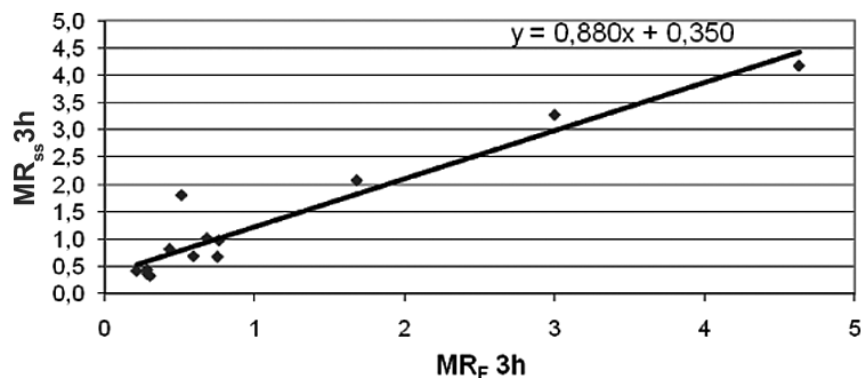


Fig. 1. Correlation between metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR at 3 hours post-dose after the first dose and in steady state, ($r_s = 0.8418$, $P = 0.0003$)*
 MR_F – MR after first dose, MR_{SS} – MR in steady state, * Spearman's rank correlation test

versus 0.81, $P = 0.0266$). A great variability in MR values was observed, ranging from 0.21 to 4.63 after ingestion of the first metoprolol dose and from 0.32 to 4.17 in steady state.

DISCUSSION

Beta-blocker metoprolol is widely used in patients for the treatment of different cardiovascular diseases. Metoprolol also serves as one of the probe drugs for P450 2D6 phenotyping. However, most of the studies performed so far have used a single dose of metoprolol to determine the P450 2D6 phenotype. We compared metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR after a single dose of metoprolol and in steady state.

First studies on P450 2D6 phenotyping were conducted by assessing the urinary MR of the probe drug derived from urine samples collections during the post-dose of 6- to 12-h period. Thus, a more practical alternative has been sought based on only one-point sample collected at a shorter time. Sohn et al. examined the utility of the single post-dose 3-plasma metabolic ratio after an oral single dose of 100 mg metoprolol in two Asian populations. He found statistically significant ($r_s = 0.688$ and 0.810 , $p < 0.0001$) correlations between the post-dose urinary and plasma MR, confirming the utility of this one-point plasma MR¹⁵. This finding was further confirmed by Tamminga et al. who observed good correlations ($r_p = 0.997$, $P = 0.049$) between the metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR of the AUC₀₋₁₂ and the MR values taken from the 3-hour plasma sample after a single metoprolol dose²⁰. The metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR 3 hours after a single metoprolol dose was further used in the study of Jonkers et al. to phenotype the subjects¹⁹. Metoprolol MR in patients receiving the drug for several days was used in two studies. However, the MR was calculated from the area under the curve (AUC) of metoprolol to its

metabolite α -hydroxymetoprolol^{21, 22}. Ismail et al. studied the relevance of P450 2D6 genetic polymorphism on chronic metoprolol therapy in cardiovascular patients. P450 2D6 phenotypes were determined using metoprolol as a probe drug. The distribution of the phenotypes was calculated according to the plasma ratio of metoprolol to its metabolite α -hydroxymetoprolol at 4 hours after drug intake²³. Rau et al. studied the effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism and the metabolic ratio during long-term therapy. The metoprolol to α -hydroxymetoprolol ratio was determined from two blood samples drawn 1 hour apart, the first sample was drawn at a median of 3 hours after administration of the last metoprolol dose²⁴. Pronounced effects of multiple dosing on the bioavailability of metoprolol have been reported¹⁶. P450 2D6 is an enzyme with a high affinity and a low capacity for its substrates and it becomes saturated at relatively low concentrations¹⁷. Higher metoprolol systemic availability upon repeated administration of metoprolol may be the consequence of the saturation of the enzyme. Such an effect has been observed e.g. for haloperidol, where higher haloperidol doses decreased pharmacokinetic differences between P450 2D6 genotype groups²⁵. The clearance of metoprolol may be also decreased during chronic treatment as a result of a potential reduction in hepatic blood flow. Hence in our study we tried to compare the metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR after a single dose and during repeated metoprolol treatment and to assess whether the two MRs may be used interchangeably. We observed a significant correlation between the MR after a metoprolol single dose and during repeated treatment. Despite statistically significant differences between the median metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR 3 hours after first metoprolol dose and in steady state, the patients were phenotyped as extensive metabolizers in both periods, after metoprolol first ingestion and in steady state. The differences were not of such an extent so as to assign subjects to different phenotypic groups between the two sampling periods. The differences

between the MRs after a single dose and in steady state might be of relevance in the case of MR values close to the antimode separating the phenotypes.

The metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR in steady state is an appropriate alternative to metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR after a single metoprolol dose. The use of metoprolol MR in patients routinely treated with metoprolol would eliminate a need for administration of an additional probe drug for P450 2D6 phenotyping.

REFERENCES

1. **Duricova, J., Grundmann, M.:** CYP2D6 a jeho klinický význam. *Klin. Farmakol. Farm.*, 2007; 21, 80–83.
2. **Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E.:** Cytochrome P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001; 58, 737–747.
3. Home page of the human cytochrome P450 (CYP 2D6) allele nomenclature [updated 2010 July 20]. Available from: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>
4. **Aklillu, E., Herrlin, K., Gustafsson, L. L., Bertilsson, L., Ingelman-Sundberg, M.:** Evidence for environmental influence on CYP2D6-catalysed debrisoquine hydroxylation as demonstrated by phenotyping and genotyping of Ethiopians living or in Sweden. *Pharmacogenetics*, 2002; 12, 375–383.
5. **Thürmann, P. A., Haack, S., Werner, U., Szymanski, J., Haase, G., Drewelow, B., Reimann, I. R., Hippus, M., Siegmund, W., May, K., Hasford, J.:** Tolerability of β -blockers metabolized via cytochrome P450 2D6 is sex-dependent. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2006; 80, 551–553.
6. **Villeneuve, J.P., Pichette, V.:** Cytochrome P450 and liver diseases. *Curr. Drug. Metab.*, 2004; 5, 273–282.
7. **Wadelius, M., Darj, E., Frenne, G., Rane, A.:** Induction of CYP2D6 in pregnancy. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1997; 62, 400–407.
8. **Nekvindova, J., Anzenbacher, P.:** Interactions of food and dietary supplements with drug metabolising cytochrome P450 enzymes. *Čes. slov. Farm.*, 2007; 56, 165–173.
9. **Zourkova, A., Hadasova, E.:** Paroxetine-induced conversion of cytochrome P450 2D6 phenotype and occurrence of adverse effects. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2003; 22, 103–113.
10. **Labbé, L., O'Hara, G., Lefebvre, M., Lessard, E., Gilbert, M., Adedoyin, A., Champagne, J., Hamelin, B., Turgeon, J.:** Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction between mexiletine and propafenone in human beings. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2000; 67, 44–57.
11. **Grundmann, M., Duricova, J., Perinova, I., Kacirova, I., Jeziskova, I., Jurckova, N.:** Influence of propafenone on enzymatic activity of P4502D6 in a patient on long therapy with metoprolol. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2009; 105(Suppl 1), 44.
12. **Frye, R. F.:** Probing the world of cytochrome P450 enzymes. *Mol. Interv.*, 2004; 4, 157–162.
13. **Zanger, U. M., Raimundo, S., Eichelbaum, M.:** Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 2004; 369, 23–37.
14. **Frank, D., Jaehde, U., Fuhr, U.:** Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2007; 63, 321–333.
15. **Sohn, D. R., Kusaka, M., Shin, S. G., Jang, I. J., Chiba, K., Ishizaki, T.:** Utility of a one-point (3-hour postdose) plasma metabolic ratio as a phenotyping test using metoprolol in two East Asian populations. *Ther. Drug. Monit.*, 1992; 14, 184–189.
16. **Regårdh, C. G., Johnsson, G.:** Clinical pharmacokinetics of metoprolol. *Clin. Pharmacokinet.*, 1980; 5, 557–569.
17. **Brosen, K., Gram, L. F.:** Clinical significance of the sparteine/debrisoquine oxidation polymorphism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1989; 36, 537–547.
18. **Perinova, I., Duricova, J., Brozmanova, H., Kacirova, I., Grundmann, M.:** Determination of metoprolol and its metabolite α -hydroxymetabolite in serum by HPLC method with fluorescence detection. *Ceska. slov. Farm.*, 2008; 57, 254–259
19. **Jonkers, R. E., Koopmans, R. P., Portier, E. J. G., van Bostel, Ch. J.:** Debrisoquine phenotype and the pharmacokinetics and beta-2-receptor pharmacodynamics of metoprolol and its enantiomers. *J. Pharmacol. Experimental. Ther.*, 1990; 256, 959–966.
20. **Tamminga, W. J., Wemer, J., Oosterhuis, B., Brakenhoff, J. P. G., Gerrits, M. G. F., de Zeeuw, R. A. de Leij, L. F. M. H., Jonkman, J. H. G.:** An optimized methodology for combined phenotyping and genotyping on CYP2D6 and CYP2C19. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2001; 57, 143–146.
21. **Goryachkina, K., Burbello, A., Boldueva, S., Babak, S., Bergman, U., Bertilsson, L.:** CYP2D6 is a major determinant of metoprolol disposition and effects in hospitalized Russian patients treated for acute myocardial infarction. *Eur. J. Pharmacol.*, 2008; 64, 1163–1173.
22. **Goryachkina, K., Burbello, A., Boldueva, S., Babak, S., Bergman, U., Bertilsson, L.:** Inhibition of metoprolol metabolism and potentiation of its effects by paroxetine in routinely treated patients with acute myocardial infarction (AMI). *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2008; 64, 275–282.
23. **Ismail, R., The, L. K.:** The relevance of the CYP2D6 genetic polymorphism on chronic metoprolol therapy in cardiovascular patients. *J. Clin. Pharm. Ther.*, 2006; 31, 99–109.
24. **Rau, T., Heide, R., Bergmann, K., Wuttke, H., Werner, U., Feifel, N., Eschenhagen, T.:** Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. *Pharmacogenetics*, 2002; 12, 165–172.
25. **Roh, H. K., Chung, J. Y., Oh, D. Y., Park, Ch. S., Svensson, J. O., Dahl M. L., Bertilsson L.:** Plasma concentrations of haloperidol are related to CYP2D6 genotype at low, but not high doses of haloperidol in Korean schizophrenic patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2001; 52, 265–271.

Cytochrome P450 2D6 phenotype and genotype in hypertensive patients on long-term therapy with metoprolol

Jana Duricova ¹, Ilona Perinova ¹, Nikola Jurckova ², Ivana Jeziskova ², Ivana Kacirova ¹, Milan Grundmann ¹

¹ Department of Clinical Pharmacology Faculty of Medicine University of Ostrava and University Hospital Ostrava, ² Department of Medical Genetics University Hospital Ostrava

Structured Abstract

Objective The aim was to compare cytochrome P450 2D6 phenotype and genotype using metoprolol as a probe drug. Further to investigate the influence of P450 2D6 activity on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients on metoprolol therapy.

Background Cytochrome P450 2D6 is a highly polymorphic enzyme that contributes to the variability of metoprolol. However, environmental factors also modify drug disposition.

Methods Forty-nine hypertensive patients were enrolled. Serum metoprolol and α -hydroxymetoprolol concentrations, resting heart rate were measured before, 1, 3 and 4 hours post-dose. Metoprolol and α -hydroxymetoprolol serum concentrations were measured by high – performance liquid chromatography with fluorescence detection. Metabolic ratio of metoprolol/ α -hydroxymetoprolol 3 hours post-dose was used for P450 2D6 phenotyping. Three allelic variants P450 2D6 *3, *4 and *6 were analysed.

Results Discordance between P450 2D6 genotype and phenotype was observed. Three patients were phenotyped as poor metabolizers compared to one when genotyped. Significantly higher normalized metoprolol serum concentrations, normalized metoprolol AUC₀₋₄ and metoprolol oral clearance was observed in patients with lower P450 2D6 metabolic activity. A trend towards lower resting heart rate before metoprolol intake was also observed in this group of patients. The differences in metoprolol disposition were more expressed when P450 2D6 phenotype instead of genotype was determined.

Conclusion Significant variations exist in metoprolol disposition in hypertensive patients. Both genotyping and phenotyping provides a valuable method in determining enzymatic activity and in optimising metoprolol therapy.

Key words metoprolol, cytochrome P450 2D6, genotype, phenotype

Condensed abstract

Cytochrome P450 2D6 is a highly polymorphic enzyme that contributes to the variability of metoprolol. Environmental factors also modify drug disposition. We observed significant variations in metoprolol disposition based on P450 2D6 genotype and phenotype. The differences in metoprolol disposition were more expressed when P450 2D6 phenotype instead of genotype was determined.

Introduction

The cytochromes P450 (P450) are a superfamily of heme-containing monooxygenases playing important role in the biotransformation of both endogenous and exogenous compounds [1]. Most human P450s that participate in drug metabolism show considerable interindividual variability in both levels of expression and catalytic activity. This variability is due to both environmental and genetic factors [2]. P450 2D6 (known as debrisoquine/sparteine hydroxylase) is a highly polymorphic enzyme [3]. To date, more than 100 different P450 2D6 allelic variants and sub-variants have been defined [4]. In general, genotypes may be differentiated in four subgroups: poor (PM), intermediate (IM), extensive (EM) and ultrarapid (UM) metabolizers. Subjects with a PM genotype lack any functional allele, whereas EMs have two and UM subjects have more than two functional alleles. Subjects with IM genotype are heterozygous for a specific variant allele and/or possess alleles with reduced activity [4]. The frequency of individual variants of P450 2D6 shows a marked interethnic difference. In white European populations, the percentage of PM varies from 3.2 % (Finish) to 11.7 % (Germans), but PMs constitute less than 1 % of Asian subjects [6, 7]. Beside the genetic variability, environmental factors such as dietary habits [8] or drug interactions may also modify drug disposition [9]. In vivo P450 phenotyping has proven to be very successful in predicting the actual enzymatic activity. It is based on administration of an adequate probe drug followed by measurement and calculation of metabolic ratio (MR) of a parent compound to its metabolite mediated by P450 of interest. The MR of P450 2D6 probe drugs shows bimodal or even trimodal distribution - the EM, (IM) and PM subgroups. Metoprolol serves as one of the probe drugs, with 70-80 % of its metabolism mediated by P450 2D6, of which α -hydroxylation seems to be exclusively mediated by P450 2D6 [10, 11].

Genetic polymorphism in cytochrome P450 2D6 (P450 2D6) has been demonstrated to contribute to the variability of several beta-blockers. Cytochrome P450 2D6 contributes mainly to the metabolism of β_1 selective blocker metoprolol [12]. Single dose studies and studies with repeated dosing demonstrated that plasma concentrations of metoprolol were higher in patients with reduced enzyme activity. A 6-fold difference in metoprolol availability has been observed between the EMs and PMs. The elimination half-life was much longer in PMs than in EMs. Additionally studies indicate that PMs experience enhanced or prolonged β -blockade compared with EMs [13-17]. Thus, patients treated with metoprolol might have a quite different cardiovascular responsiveness, depending on

their P450 2D6 genotype. PM genotype might be even associated with higher incidence of metoprolol-associated adverse effects [18, 19].

The aim of the present study was to compare P450 2D6 phenotype with P450 2D6 genotype using metoprolol as a probe drug. Secondly we investigated the influence of P450 2D6 metabolic activity on pharmacokinetics and pharmacodynamics of metoprolol in our hypertensive patients on routine treatment with metoprolol.

Methods

Subjects and study protocol

Forty-nine adult patients (33 females) attending outpatient clinic for hypertension treatment in our department were included. Median age was 58 years (21 – 86), median body weight was 82 kg (51 – 149). The patients were on routine treatment with metoprolol succinate (Betoloc ZOK, AstraZeneca, UK) and metoprolol tartrate (Betoloc SR, AstraZeneca, UK; Vasocardin, Zentiva, Slovak Republic; Apo-Metoprolol, Apotex Europe BV, Netherlands; Emzok, Ivax Pharmaceuticals, Czech Republic) at doses between 50-200 mg per day. Indication for treatment was hypertension. There were no dosage changes for at least 2 weeks before blood sampling. The dosage was based solely on clinical grounds and no titration to the maximally tolerated dose was attempted. Five patients (11 %) were on metoprolol monotherapy, nine patients (18 %) had one additional antihypertensive drug, nine patients (18 %) had two additional antihypertensive drugs, eleven patients (23 %) were treated by three other antihypertensive agents, nine patients (18 %) by four additional antihypertensive drugs, four patients (8 %) by five and two patients (4 %) by six additional antihypertensive drugs. Antagonists of renin-angiotensin-aldosterone were used by thirty-five patients (71 %), calcium channel blockers by twenty-nine patients (59 %), diuretics were used by twenty-one patients (43 %) and central antihypertensive agents by twenty patients (41 %). Baseline data including renal function test (serum creatinine, urea) and liver function test (ALT, AST, γ -GT) were obtained either on the day of blood sampling or within 3 months prior to the patient visit. Patients' medical history other than antihypertensive medication was recorded and screened for the presence of P450 2D6 inhibitor.

Patients were retained in the ward for a half-a-day. After an overnight fast blood samples (~ 5 ml each) were drawn into a neutral tube before and at 1, 3 and 4 hours after metoprolol intake. Serum was separated immediately and samples were frozen and stored

at -20 °C until processing. In addition, after a written informed consent, 5 ml of venous blood was taken into EDTA tube for DNA extraction. The patients were instructed to take other “morning” medications (if they were on poly-therapy) at home on the study day. The patients were asked to refrain from coffee drinking throughout the day, breakfast was not allowed until 1 hour after the drug intake. Heart rate was recorded on a 10-lead resting ECG. Blood pressure was measured twice with a mercury sphygmomanometer after a 5-min rest in a sitting position and the second measurement was taken. Blood pressure and heart rate were measured before metoprolol intake and before each blood sample was taken.

In the second part of the study thirty patients (21 females) were chosen to assess the impact of P450 2D6 genotype and phenotype on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. These patients were treated with the same metoprolol preparation (Betaloc SR) and they were not treated with medication known to inhibit P450 2D6.

Assay of metoprolol and α -hydroxymetoprolol

Serum concentrations of metoprolol and α -hydroxymetoprolol were measured by high – performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection at 230–300 nm, as described previously [20]. Briefly, metoprolol and α -hydroxymetoprolol were separated from 200 μ l serum with 50 μ l 1M NaOH following by extraction with 1.5 ml of dichloromethane. The mobile phase consisted of acetonitrile : methanol : water : TEA (15 : 5 : 80 : 0.1, pH 3.0). Column Supercosil™ LC-18 (15 cm x 3mm, 5 μ m) was used. Flow rate was 0,7 ml/min. Nadolol was used as an internal standard. After evaporation, the analyte was dissolved in 20 μ l of methanol and 50 μ l of water and 20 μ l was injected on the column.

Genotyping of P450 2D6

Total genomic DNA was isolated from peripheral blood using the Gentra Puregene Blood Kit (Qiagene, Hilden, Germany). Genetic polymorphism of P450 2D6 was detected by PCR followed by melting curve analysis in LightCycler 1.5 Instrument (Roche, Nutley, United States). Three allelic variants of P450 2D6 - *3 (4168delA), *4 (G3465A) and *6 (3326delT) were analysed. Genotyping of P450 2D6*3 and *4 allelic variants was performed using LightMix Kits - mixtures of primers and probes designed by TIB

MOLBIOL (Berlin, Germany). P450 2D6*6 allelic variant was genotyped using primers and probes as described previously [21]. PCR reaction mixture was performed in a volume of 10 μ l. PCR conditions were as follows: 15 minutes at 95°C, followed by target amplification via 40 cycles of 0 seconds at 95°C (denaturation), 10 seconds at 55°C (annealing) and 40 seconds at 72°C (extension). Subsequent melting curve analysis was performed by heating at 95°C for 1 second, followed by cooling at 60°C for 20 seconds and 52°C for 20 seconds and gradual heating (0,3 °C/s) up to 85°C. Final cooling step was at 40°C for 30 seconds. Melting temperatures of the homozygous wildtype P450 2D6*3, *4 and *6 alleles were 58.1 °C, 56 °C and 65 °C. Melting temperatures of the homozygous mutant genotypes were 51 °C, 64.3 °C and 70 °C, respectively.

Data and statistical analysis

Data are expressed as median and range. P450 2D6 phenotype was determined using serum metoprolol/ α -hydroxymetoprolol metabolic ratio (MR) at 3 hours post-dose. The antimode value distinguishing between EMs and PMs was set at MR = 10.5, in agreement with literature [22]. The area under the plasma concentration vs. time curve (AUC) between 0 and 4 hours was calculated according to the standard trapezoidal rule. The oral clearance was estimated using the expression: dose per kg/metoprolol serum concentration. For differences between groups, the nonparametric Mann-Whitney test was used. Prevalence of allele frequencies between the study results and Czech population was compared by the Fischer's exact test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism for Windows version 5.0 (GraphPad Prism Software, Inc).

Results

Part one

Genotype

Distribution of P450 2D6 alleles is shown in Table 1. There was no significant difference in the frequency of any of the alleles between the patients studied and the population in Czech Republic [23]. Eighteen patients (37 %) were heterozygous for defective alleles. One patient was genotyped as a PM P450 2D6*4/*4. Fifteen patients were found to be carriers of one P450 2D6*4 defective allele, four patients were heterozygous for P450 2D6*3 allele and one patient was heterozygous for defective allele P450 2D6*6 allele. P450 2D6*1 was assumed to be present, when none of the above variant alleles had been identified.

Table 1 Frequency of P450 2D6 defective alleles in our patients and in Czech population [23]

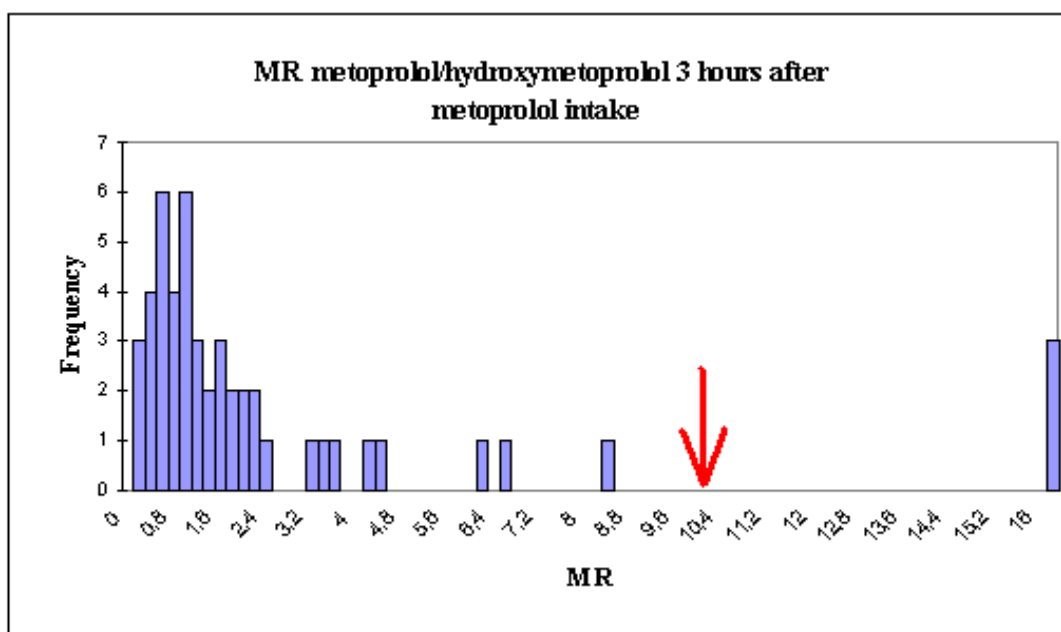
P450 2D6 alleles	Number of alleles in our patients	Frequency in our patients (%)	Frequency in Czech population (%)	Significance (p value)
*3	4	4.1	1.1	NS (p = 0.0601)
*4	15	15.3	22.9	NS (p = 0.1049)
*6	1	1.0	0.2	NS (p = 0.3281)

Phenotype

Forty-six patients were phenotyped as EMs. A great variability in MR metoprolol/ α -hydroxymetoprolol was observed in EMs, ranging from 0.13 to 8.33. Three patients were phenotyped as PMs. One of these PMs was also a PM determined by genotyping (P450 2D6*4/*4). The second patient was genotyped as a heterozygote for the defective allele P450 2D6*4 and in the third patient no defective allele was detected. In these two patients an inhibitor of P450 2D6 activity was included in the medication (an antiarrhythmic agent propafenone and an antidepressive agent sertraline). Inhibitors of P450 2D6 activity were further prescribed in two patients phenotyped as EMs. One of these patients was heterozygous for P450 2D6*4 defective allele, the patient was taking antidepressive agent

fluoxetine and her MR was 8.33 which was close to the antimode. The second EM patient was taking antidepressive agent sertraline, no defective allele was detected in this patient, the value of MR was 0.81. For the distribution of metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MRs see figure 1.

Fig 1. Distribution of metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR in our patients



A red arrow – shows the antimode 10.5 distinguishing between EMs and PMs

Part two

Metoprolol concentrations and demography in genotype, phenotype groups

Thirty patients were included in this second part of the study. The same controlled released formulation of metoprolol (Betaloc SR, AstraZeneca, UK) was prescribed to all of these patients. Daily dose ranged between 100-200mg. Metoprolol serum concentrations varied extensively between patients, even among patients with the same daily dose. After metoprolol concentrations were normalized for dose per kg the variation was less pronounced, however still evident, Tab 2. There was no significant difference in the daily metoprolol dose prescribed and dose per body weight between both the genotype and phenotype groups. Statistically significant difference was found in median age (69 versus 52 years, $p < 0.01$) between the genotype groups. The respective data are given in Table 3.

Table 2 Metoprolol and normalized metoprolol serum concentrations (metoprolol serum concentration/dose per kg) before and 1, 3, 4 hours after metoprolol intake

	Metoprolol concentrations (ng/ml)	Normalized metoprolol concentrations
before	12.9 (0-231.4)	9.0 (0-100.1)
1 hour	55.5 (23.9-316.2)	31.5 (12.3-136.8)
3 hours	108.1 (30.4-515.5)	56.3 (22.5-223.0)
4 hours	93.4 (35.4-530.6)	56.4 (18.0-229.5)

median and range

Table 3 Patients' demographic data in the genotype and phenotype groups

	Genotype		Phenotype	
	*1 / *1 (n = 19)	*1 / DA (n = 11)	MR<1.0 (n = 14)	MR 1.0-10.5 (n = 16)
Age (years)	52 (21-73)	69 (32-80) ⁺	54.5 (21-74)	63 (32-80)
Weight (kg)	87.8 (64.9-119.5)	82.0 (63.0-123.0)	78.0 (64.9-123)	90.8 (63-119.5)
Dose per body weight (mg/kg)	2.11 (0.95-3.08)	1.59 (0.97-2.82)	2.19 (1.04-3.08)	1.96 (0.95-2.82)

Median and range, Mann-Whitney test, ⁺ p < 0.01, DA – defective allele, MR - metoprolol/ α -hydroxymetoprolol metabolic ratio

Metoprolol pharmacokinetic parameters and pharmacodynamics in relation to P450 2D6 genotype

Metoprolol serum concentrations were normalized for the daily drug dose per body weight to compensate for individual doses prescribed and the body masses. Heterozygous EMs (n = 11) for the defective allele exhibited 1.5-2.5-fold higher median normalized metoprolol serum concentrations than homozygous EMs (n = 19). The differences were not statistically significant except for normalized metoprolol serum concentration 1 hour after metoprolol dose (p < 0.05), Fig. 2. A 1.8-fold higher median normalized metoprolol AUC₀₋₄ in heterozygous EMs (median 243.3, range 107.7-704.3) compared to patients without any defective allele (median 138.6, range 79.7-400.1) was observed (p < 0.05), Fig. 3. As expected, serum concentrations of metabolite, α -hydroxymetoprolol were lower in heterozygous EMs than in homozygous EMs. The differences were significant (p < 0.05) except for the trough α -hydroxymetoprolol concentrations, Fig. 4. Metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR was 2.4-fold higher in patients with the presence of one defective

allele (median 1.91, range 0.67 – 6.60) compared with patients with no defective allele (median 0.81, range 0.32 – 4.17), $p < 0.05$. The oral clearance of metoprolol was about 1.8-fold higher in patients without any defective allele compared with patients with one defective allele (median 0.0201, range 0.0077 – 0.0444 versus median 0.0114, range 0.0045 – 0.0311), however the difference did not reach statistical significance.

Resting heart rate was used as a measure of metoprolol pharmacodynamics. Blood pressure was also registered, but served only as a measure of clinical effect of antihypertensive medication. A trend towards lower median resting heart rate before metoprolol intake was observed in patients with inherited one defective allele when compared with patients without any defective allele (median 60, range 47-83 versus median 68, range 58-113, $p = 0.0738$).

Fig 2. Normalized metoprolol serum concentrations between two genotype groups - subjects with 2 ($n = 19$) and 1 ($n = 11$) functional P450 2D6 allele, ($p < 0.05$, for intergroup differences, Mann-Whitney test), DA – defective allele, Met - metoprolol

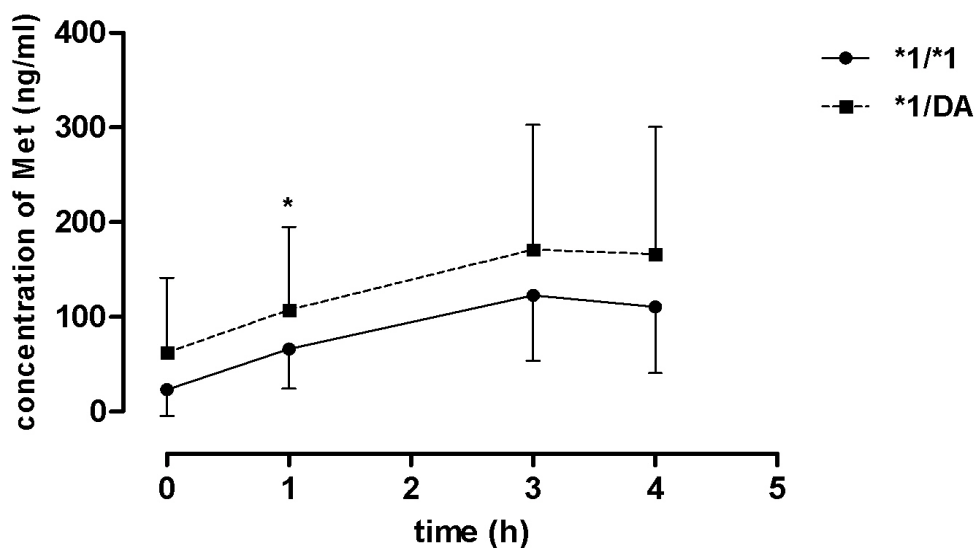


Fig 3. Distribution of normalized metoprolol AUC₀₋₄ between two genotype groups - subjects with 2 (n = 19) and 1 (n = 11) functional P450 2D6 allele, (p < 0.05, for intergroup differences, Mann-Whitney test), DA – defective allele

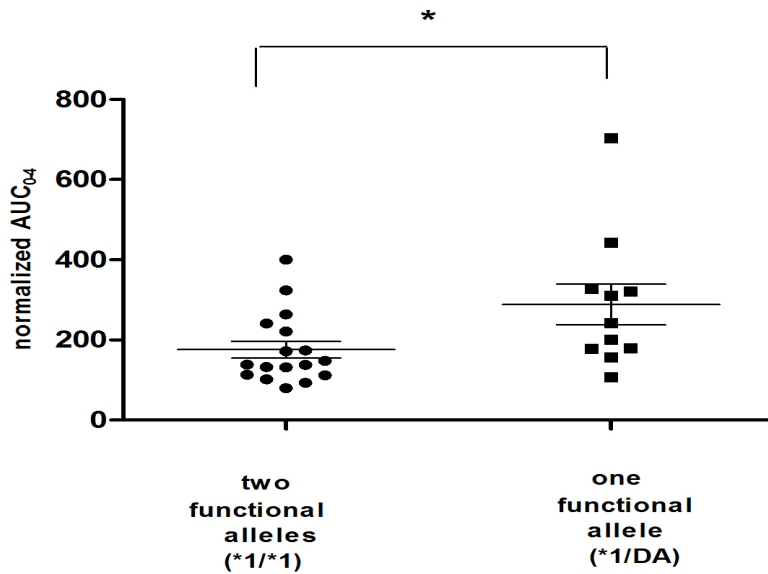
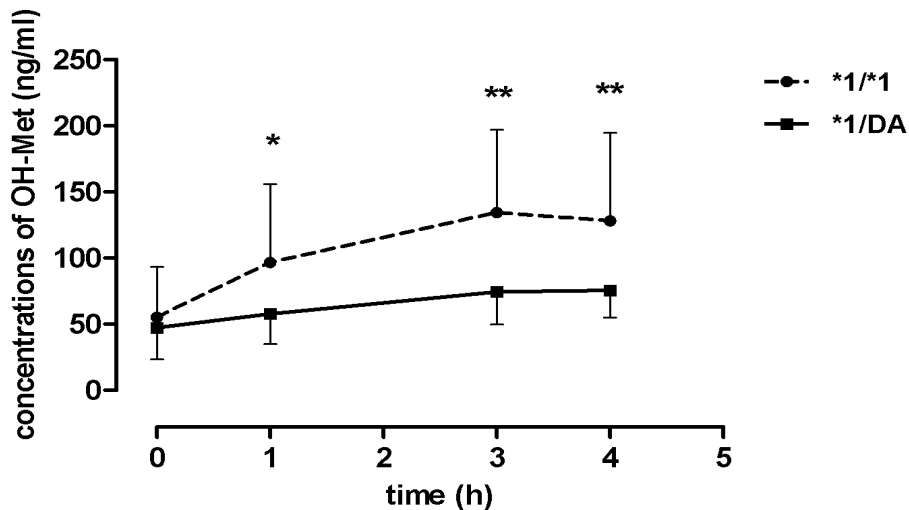


Fig 4. α -hydroxymetoprolol serum concentrations between two genotype groups - subjects with 2 (n = 19) and 1 (n = 11) functional P450 2D6 allele, (* p < 0.05, ** p < 0.01, for intergroup differences, Mann-Whitney test), DA – defective allele, OH-Met = α -hydroxymetoprolol



Metoprolol pharmacokinetic parameters and pharmacodynamics in relation to P450 2D6 phenotype

Patients were classified into two groups according to their phenotype, those with a value of metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR < 1.0 (n = 14) and with MR 1.0-10.5 (n = 16). In accordance with MR, normalized metoprolol serum concentrations were 1.4-2.8-fold higher in patients with MR 1.0-10.5. The differences were statistically significant except for normalized metoprolol serum concentration before metoprolol intake ($p < 0.0001$), Fig. 5. A 2-fold higher median normalized metoprolol AUC₀₋₄ was observed in patients with MR 1.0-10.5 (median 253.6, range 131.5-704.3) compared to patients MR < 1.0 (median 122.6, range 79.7-220.7), ($p < 0.0001$), Fig. 6. Serum concentrations of metabolite, α -hydroxymetoprolol, were lower in patients with MR 1.0-10.5 than in patients with MR < 1.0. The differences were significant ($p < 0.05$) except for the trough α -hydroxymetoprolol concentrations, Fig. 7. The oral clearance of metoprolol was about 2.4-fold higher in patients with MR < 1.0 compared with patients with MR 1.0-10.5 (median 0.0257, range 0.0109 – 0.0444 versus median 0.0107, range 0.0045 – 0.0217), ($p < 0.0001$), Fig 8. A trend towards lower median resting heart rate before metoprolol intake was observed in patients with MR 1.0-10.5 when compared with patients with MR < 1.0 (median 61, range 47-83 versus median 69, range 59-113, $p = 0.0620$).

Fig 5. Normalized metoprolol serum concentrations between two phenotype groups: MR<1.0 (n = 14) and MR 1.0-10.5 (n = 16), (* $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$, for intergroup differences, Mann-Whitney test), MR – metoprolol/ α -hydroxymetoprolol metabolic ratio

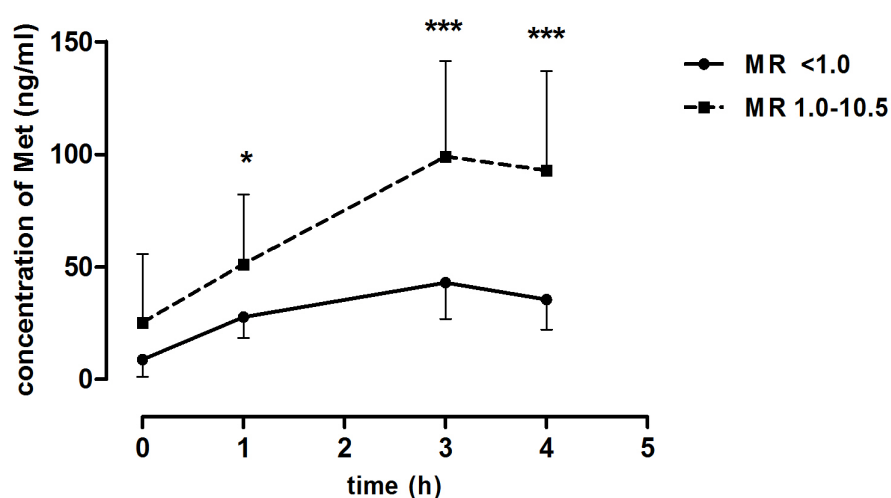


Fig 6. Distribution of normalized metoprolol AUC₀₋₄ between two phenotype groups: MR<1.0 (n = 14) and MR 1.0–10.5 (n = 16), (p < 0.0001, for intergroup differences, Mann-Whitney test), MR – metoprolol/ α -hydroxymetoprolol metabolic ratio

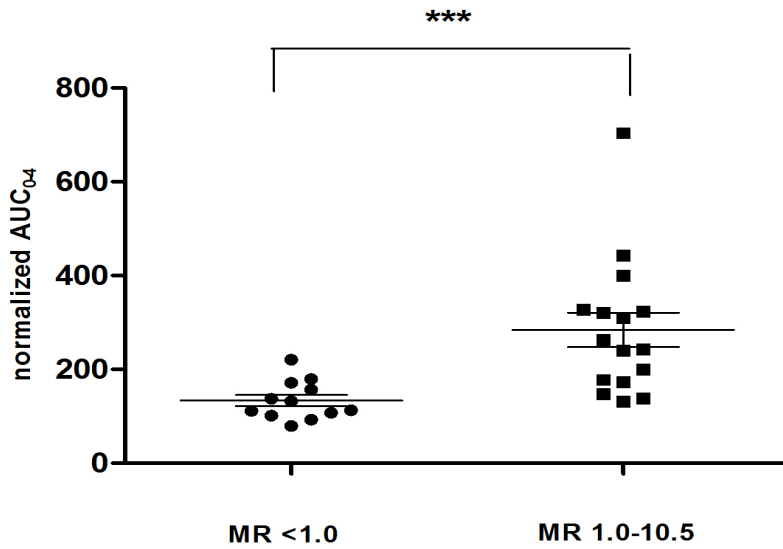


Fig 7. α -hydroxymetoprolol serum concentrations between two phenotype groups: MR<1.0 (n = 14) and MR 1.0-10.5 (n = 16), (* p < 0.05, ** p < 0.01, for intergroup differences, Mann-Whitney test), OH-Met = α -hydroxymetoprolol, MR – metoprolol/ α -hydroxymetoprolol metabolic ratio

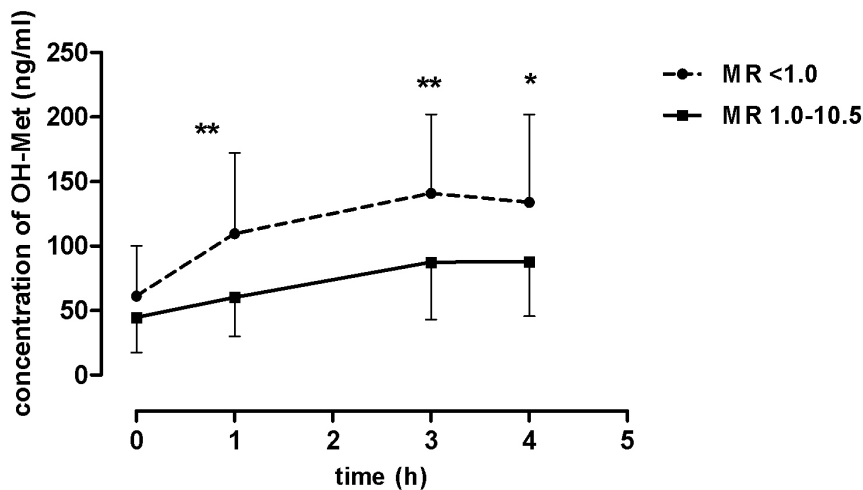
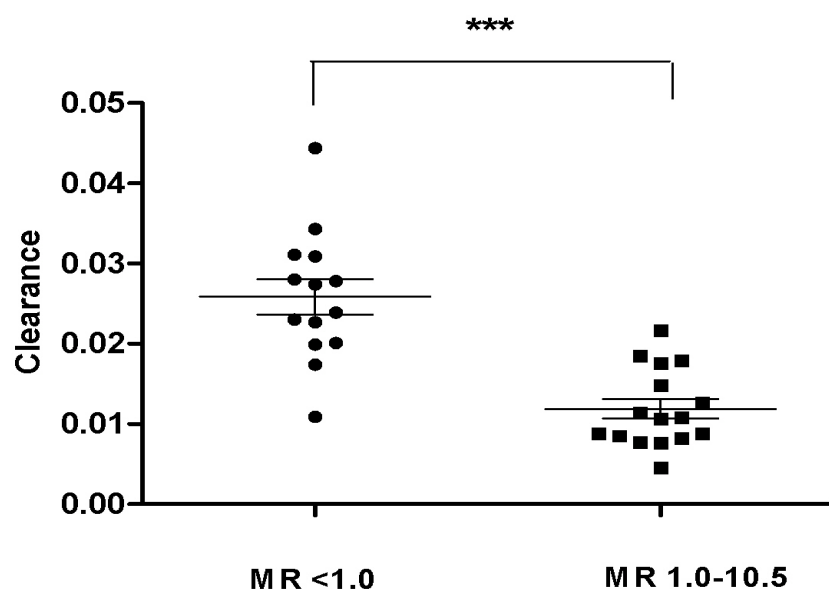


Fig 8. Distribution of metoprolol oral clearance between two phenotype groups: MR<1.0 (n = 14) and MR 1.0–10.5 (n = 16), (p < 0.0001, for intergroup differences, Mann-Whitney test), MR – metoprolol/ α -hydroxymetoprolol metabolic ratio



Discussion

We investigated the enzymatic activity of P450 2D6 in patients on a long term-therapy with metoprolol using metoprolol as a probe substrate and compared these results with P450 2D6 genotype and phenotype. Significant differences exist in metoprolol disposition in relation to P450 2D6 genotype and phenotype during long-term metoprolol therapy. However, the differences were more expressed between phenotype groups.

Wide interindividual variations in metoprolol serum concentrations have been observed in our and previous studies [16, 24]. After metoprolol concentrations were normalized for dose per kg the variation was less pronounced, however still evident. It thus appears that other factors than the dose and the patient weight play an important role in the variation. A great variability in MR metoprolol/ α -hydroxymetoprolol was observed in our patients. Contrary to genotyping, phenotyping revealed three patients with a PM phenotype. One of these patients was simultaneously taking antiarrhythmic agent propafenone the second one antidepressive agent sertraline, agents known to inhibit P450 2D6 activity. Two to five-fold increase in steady-state levels of metoprolol has been described in patients after propafenone was added to the metoprolol therapy even with occurrence of adverse effects in some patients [25, 26]. Discontinuation of propafenone therapy switched a patient's phenotype from PM to EM [26]. A less pronounced inhibitory effect was described with sertraline, which increased metoprolol AUC by 48 % and 67 % [27]. It is questionable whether the PM phenotype in this latter patient was caused solely by the inhibitory effect of sertraline or presence of other defective P450 2D6 alleles not determined in our department of genetics might play the role.

The variations in metoprolol plasma concentrations have been mainly associated with variations in metabolism due to genetic polymorphism [13-17]. We have demonstrated that significant differences may exist between individuals homozygous for the wild type P450 2D6 gene and heterozygous carriers of one variant allele. Clinically significant differences in metoprolol disposition have also been demonstrated in a study between homozygous and heterozygous P450 2D6 healthy volunteers. Metoprolol AUC and minimum steady-state metoprolol concentrations were more than twice higher in heterozygous individuals [28]. In contrast to these findings no significant differences in MR and metoprolol plasma concentration were found between the heterozygous EMs and homozygous EMs in a study investigating consequences of P450 2D6 genotype on metoprolol disposition in patients on

long term-therapy [29]. The discrepancy could be due to the contribution of *IM alleles (e.g.*41, *9, etc.) [4], that were not tested in our and above-mentioned study. *IM alleles were significantly associated with higher plasma concentrations of metoprolol and metabolic ratio if inherited in conjunction with a defective allele [29]. However, more distinct differences in metoprolol disposition were observed when P450 2D6 phenotype instead of the genotype was taken into consideration. Phenotyping can determine the exact enzymatic activity as it also reflects non-genetic factors [10]. Besides drug interactions, the effect of age, gender might play a certain role in metabolic activity. Most of our patients included in this study were of older age, when pre-systemic elimination might be reduced due to changes in hepatic blood flow, volume of distribution [30]. Furthermore, women have been found to have greater metoprolol exposure than men [31]. Metoprolol serves as one of the probe drugs for P450 2D6 phenotyping. The metabolic ratio of metoprolol over its metabolite α -hydroxymetoprolol in plasma 3 hours after metoprolol administration has been validated under standard conditions for the measurement of enzyme activity of P450 2D6 *in vivo* [11]. Thus use of metoprolol MR based on a single blood sample in patients routinely treated with metoprolol would provide a simple alternative for determination of metabolic activity [32].

Metoprolol has a dose-dependent effect, the β_1 -blocking effect increases with increasing daily doses of metoprolol up to a complete β_1 -blockade observed at plasma concentrations > 400 nmol/l (about 107 ng/ml). However 30 % of the maximum effect is necessary for a clinically significant effect, this limit was observed at metoprolol plasma concentration of 45 nmol/l (about 12 ng/ml). [33]. In a population-based study significantly lower adjusted heart rate was seen in IMs (*1 / *4) compared with EMs, however the most distinguished effect was observed in PMs [34]. Similarly significantly higher mean reduction in resting heart rate measured before metoprolol dose administration was observed in heterozygotes for defective allele than in EMs [28]. In contrast in a study examining the effect of P450 2D6 genotype in patients with systolic heart failure no differences in clinical effect were found between genotype groups [35]. In our study metoprolol effect was determined by measuring resting heart rate. A trend towards lower median resting heart rate was observed in patients with higher metoprolol concentrations (patients with inherited one defective allele and with MR 1.0-10.5), this trend was observed only at metoprolol trough concentrations. The lack of difference in resting heart rate after metoprolol administration might be caused by increase in metoprolol

concentrations above the limit that is necessary for clinically significant effect [33]. Some of our patients achieved maximum metoprolol serum concentrations that were several-fold higher than that observed for complete beta₁-blocking effect. It is thus questionable whether these high metoprolol concentrations are required for optimal clinical effect in these patients and whether the patients might profit from lower dose reducing the risk of adverse effects [26].

We are aware of limitations of our study. The number of patients included in our study was quite low. However, we tried to include the most homogenous sample with respect to metoprolol dose and to metoprolol preparation that could contribute to differences in metoprolol pharmacokinetic parameters. Secondly, our patients were only genotyped for three defective alleles that are responsible for almost all PM genotype, thus further stratification of patients to more genotype groups was not possible.

In conclusion we observed significant variation in metoprolol disposition in hypertensive patients. The effect of P450 2D6 genetic polymorphism is an important factor in metoprolol disposition. However, one should also remember the role of non-genetic factors. Age, gender and hepatic disorders can modify metabolic activity. The influence of concomitant medication on metabolic activity is a well-recognised factor for genotype-phenotype discordance that may even lead to a transformation of a phenotype. Thus, apart from genotyping, phenotyping provides a valuable method in determining enzymatic activity and in optimising metoprolol therapy.

References

1. Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58 (5-6): 737-747.
2. Daly AK. Pharmacogenetics of the cytochrome P450. *Curr Top Med Chem* 2004; 4 (16): 1733-1744.
3. Eichelbaum M. Polymorphic oxidation of debrisoquine and sparteine. *Prog Clin Biol Res* 1986; 214: 157-67.
4. <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>
5. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004; 369 (1): 23-37.
6. Llerena A, Dorado P, Peñas-Lledó EM. Pharmacogenetics of debrisoquine and its use as a marker for CYP2D6 hydroxylation capacity. *Pharmacogenomics* 2009; 10 (1): 17-28.
7. Bertilsson L. Geographical/Interracial differences in polymorphic drug oxidation. *Clin Pharmacokinet* 1995; 29 (3): 192-209
8. Aklillu E, Herrlin K, Gustafsson LL, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. Evidence for environmental influence on CYP2D6-catalysed debrisoquine hydroxylation as demonstrated by phenotyping and genotyping of Ethiopians living in Ethiopia or in Sweden. *Pharmacogenetics* 2002; 12 (5), 375-383.
9. Zourkova A, Hadasova E. Paroxetine-induced conversion of cytochrome P450 2D6 phenotype and occurrence of adverse effects. *Gen Physiol Biophys* 2003; 22, 103-113.
10. Frank D, Jaehde U, Fuhr U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63 (4): 321-333.
11. Sohn DR, Kusaka M, Shin SG, Jang IJ, Chiba K, Ishizaki T. Utility of a one-point (3-hour postdose) plasma metabolic ration as a phenotyping test using metoprolol in two East Asian populations. *Ther Drug Monit* 1992; 14 (3): 184-189.
12. Ďuricová J, Grundmann M. Beta-blokátory. *Čes Slov Farm* 2009; 58 (2), 60-66.
13. McGourty JC, Silas JH, Freestone S, Ramsay LE, Tucker GT, Woods HF et al. Metoprolol metabolism and debrisoquine oxidation polymorphism – population and family studies. *Br J Clin Pharmacol* 1985; 20 (6): 555-566.

14. Silas JH, McGourty JC, Lennard MS, Tucker GT, Woods HF. Polymorphic metabolism of metoprolol: clinical studies. *Eur J Clin Pharmacol* 1985; 28 Suppl: 85-88.
15. Lennard MS, Silas JH, Freestone S, Trevethick J. Defective metabolism of metoprolol in poor hydroxylators of debrisoquine. *Br J Clin Pharmacol* 1982; 14 (2): 301-303.
16. Ismail R, The LK. The relevance of CYP2D6 genetic polymorphism on chronic metoprolol therapy in cardiovascular patients. *J Clin Pharm Ther* 2006; 31 (1): 99-109.
17. Nozawa T, Taguchi M, Tahara K, Hashimoto Y, Igarashi N, Nonomura M et al. Influence of CYP2D6 genotype on metoprolol plasma concentration and β -adrenergic inhibition during long-term treatment. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46 (5): 713-720.
18. Wuttke H, Rau T, Heide R, Bergmann K, Böhm M, Weil J et al. Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol-associated adverse effects. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72 (4): 429-437.
19. Fux R, Mörike K, Pröhmer AM, Delabar U, Schwab M, Schaeffeler E et al. Impact of CYP2D6 genotype on adverse effects during treatment with metoprolol: A prospective clinical study. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78 (4): 378-387.
20. Peřinová I, Ďuricová J, Brozmanová H, Kacřřová I, Grundmann M. Determination of metoprolol and its metabolite α -hydroxymetabolite in serum by HPLC method with fluorescence detection. *Āes Slov Farm* 2008; 57 (6): 254-259.
21. Roijers JFM, Jansen-Houtepen L, Jakobs BS, van Wijk EM. Detection of the CYP2D6*6 allele by LightCycler real-time PCR. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2007; 32 (4): 270-272.
22. Jonkers RE, Koopmans RP, Portier EJ, van Boxtel CJ. Debrisoquine phenotype and the pharmacokinetics and beta-2-receptor pharmacodynamics of metoprolol and its enantiomers. *J Pharmacol Exp Ther* 1990, 256 (3): 959-966.
23. Buzková H, Pechandová K, Slanar O, Perlík F. Frequency of single nucleotide polymorphisms of CYP2D6 in the Czech population. *Cell Biochem Funct* 2008; 26 (1): 76-81.
24. Bengtsson C, Johnsson G, Regårdh CG. Plasma levels and effects of metoprolol on blood pressure and heart rate in hypertensive patients after an acute dose and between two doses during long-term treatment. *Clin Pharmacol Ther* 1975; 17 (4): 400-408.
25. Wagner F, Kalusche D, Trenk D, Jähnchen E, Roskamm H. Drug interaction between propafenone and metoprolol. *Br J Clin Pharmacol* 1987; 24 (2): 213-20.

26. Duricova J, Perinova I, Jurckova N, Kacirova I, Grundmann M. Clinically important interaction between metoprolol and propafenone. Accepted to Can Fam Physician
27. Preskorn SH, Greenblatt DJ, Flockhart D, Luo Y, Perloff ES, Harmatz JS et al. Comparison of duloxetine, escitalopram, and sertraline effects on cytochrome P450 2D6 function in healthy volunteers. *J Clin Psychopharmacol* 2007; 27 (1): 28-34.
28. Koytchev R, Alken RG, Vlahov V, Kirkov V, Kaneva R, Thyroff-Friesinger U et al. Influence of the cytochrome P4502D6*4 allele on the pharmacokinetics of controlled-release metoprolol. *Eur J Clin Pharmacol* 1998; 54 (6): 469-474.
29. Rau T, Heide R, Bergmann K, Wuttke H, Werner U, Feifel N et al. Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. *Pharmacogenetics* 2002; 12 (6): 465-472.
30. Regardh CG, Johnsson G. Clinical pharmacokinetics of metoprolol. *Clin Pharmacokinet* 1980; 5 (6): 557-569.
31. Luzier AB, Killian A, Wilton JH, Wilson MF, Forrest A, Kazierad DJ. Gender-related effects on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66 (6): 594-601.
32. Ďuricová J, Peřinová I, Kacířová I, Grundmann M. Comparison of metoprolol/ α -hydroxymetoprolol metabolic ratio after a single dose and in steady state. *Čes Slov Farm* 2010; 59 (5): 222-226.
33. Abrahamsson B, Lückner P, Olofsson B, Regårdh CG, Sandberg A, Wieselgren I et al. The relationship between metoprolol plasma concentration and beta 1-blockade in healthy subjects: a study on conventional metoprolol and metoprolol CR/ZOK formulations. *J Clin Pharmacol* 1990; 30 (2 Suppl): S46-54.
34. Bijl MJ, Visser LE, van Schaik RH, Kors JA, Witteman JC, Hofman A et al. Genetic variation in the CYP2D6 gene is associated with a lower heart rate and blood pressure in β -blocker users. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 85 (1): 45-50.
35. Sharp CF, Gardiner SJ, Jensen BP, Roberts RL, Troughton RW, Lainchbury JG et al. CYP2D6 genotype and its relationship with metoprolol dose, concentrations and effect in patients with heart failure. *Pharmacogenetics J* 2009; 9 (3): 175-18

Case report

Clinically important interaction between metoprolol and propafenone

Jana Duricova, Mgr ¹; Ilona Perinova, Mgr PhD ¹; Nikola Jurckova, Mgr ²; Ivana Kacirova, MD ¹; Milan Grundmann, MD PhD ¹

¹ Department of Clinical Pharmacology University Hospital Ostrava and Faculty of Health Studies University of Ostrava , Czech Republic

² Department of Medical Genetics University Hospital Ostrava, Czech Republic

Abstract

Aims: We present here a case of an interaction between metoprolol and propafenone with an impact of high metoprolol concentrations on patient's condition.

Description of case: A 66-year-old polymorbid female on long-term treatment with metoprolol, propafenone and other cardiovascular and non-cardiovascular therapy was referred to our outpatient department because of non-compensated hypertension. Since the medication adjustment the blood pressure was controlled. However, she was repeatedly complaining about increased tiredness and dyspnoea on exertion. Therefore measurement of metoprolol serum concentrations and cytochrome P450 2D6 phenotyping and genotyping was indicated. Phenotyping revealed a poor metabolizer with metabolic ratio of metoprolol/ α -hydroxymetoprolol 104.3, genotyping revealed an intermediate metabolizer P450 2D6 *4/*9. Metoprolol dose was reduced to half (100mg daily) the patient's condition improved. After propafenone discontinuation the metabolic ratio metoprolol/ α -hydroxymetoprolol dropped to 1.4 indicative of a phenotypic shift.

Conclusions: We have observed an impact of co-administration of the antiarrhythmic drug propafenone on the metabolism of metoprolol. Inhibitory effect of propafenone on metoprolol biotransformation resulted in the phenotypic shift with the occurrence of adverse effects due to high metoprolol levels in our patient.

Key words metoprolol, propafenone, cytochrome P450 2D6, phenotype

Introduction

A combination of antiarrhythmic drugs with β 1-selective blocking agents has often been used. Many of them are metabolised via cytochrome P450 enzyme system, hence potential drug interactions are of major clinical significance. The antiarrhythmic agent propafenone undergoes P450 2D6-dependent metabolism.¹ It is also an inhibitor of the enzyme, the inhibitory constant has been estimated at 50 nmol/L, similar to that of quinidine (60 nmol/L).² Metoprolol, β 1-selective blocking agent, undergoes extensive pre-systemic elimination by P450 2D6, metabolites were shown not to significantly contribute to the β 1-blockade.^{3,4} It has a dose-dependent effect, dose adjustment is commonly performed to the highest dose tolerated in order to achieve the maximal effect in the absence of adverse effects.⁵ Two to five-fold increase in steady-state levels of metoprolol has been described after propafenone was added to metoprolol therapy.⁶ The disposition of P450 2D6 substrates depends also on P450 2D6 genotype. In general four subgroups may be differentiated: poor (PM), intermediate (IM), extensive (EM) and ultrarapid (UM) metabolizers. PMs lack any functional allele, UMs have more than two functional alleles. IMs are heterozygous for a specific variant allele and/or possess alleles with reduced activity.⁷

We present here a case of an interaction between metoprolol and propafenone with an impact of high metoprolol concentrations on patient's condition.

Description of case

A 66-year-old female (weight 81 kg) was referred to our outpatient department because of non-compensated hypertension, grade III by WHO. Blood pressure was in sitting position 154/82 mmHg, heart rate 60 beats/min. The patient had undergone kidney transplantation for polycystic kidney disease several years ago and was on cyclosporine (175 mg daily) and azathioprine (50 mg daily). Further co-morbidities were ischaemic heart disease without angina pectoris syndrome (NYHA III-IV) and chronic venous insufficiency. At the time of admission the patient was treated with the following cardiovascular medication: metoprolol (200 mg daily), losartan (100 mg daily), rilmenidine (1mg daily), furosemide (60 mg daily), captopril on demand, acidum acetylsalicylicum (100 mg daily) and isosorbide mononitrate (20 mg daily). Propafenone (600 mg daily) had been prescribed for

the prevention of atrial fibrillation. During the following check-ups amlodipine (5 mg daily) was introduced to the therapy. Since the medication adjustment the patient's blood pressure was compensated (Table 1). However, she was repeatedly complaining about increased tiredness and dyspnoea on exertion. Therefore determination of metoprolol and α -hydroxymetoprolol serum concentrations was indicated.⁸ Metoprolol/ α -hydroxymetoprolol metabolic ratio (MR) at 3 hours post-dose was used for P450 2D6 phenotyping.⁹ Genotyping of P450 2D6 was also performed. A DNA direct sequencing analysis of the whole coding sequence of P450 2D6 gene was performed using the ABI PRISM 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, USA). Copy number variants of the gene were detected using the long-range PCR method and amplified products were visualized on 1% agarose gel electrophoresis.

The patient was genotyped as an IM with detected variant alleles P450 2D6 *4/*9. However, metabolic ratio (MR) of metoprolol/ α -hydroxymetoprolol at 3 hours post-dose was 104.3 indicative of a PM phenotype. For metoprolol and α -hydroxymetoprolol serum concentrations see Table 1. A survey of her concomitant medication revealed a use of propafenone an inhibitor of P450 2D6 activity. Metoprolol dose was reduced to 100 mg daily. The patient's condition has improved, tiredness and dyspnoea disappeared.

About half a year later the patient was admitted to the internal department for chest pain on exertion and on rest lasting for about 14 days with irradiation to the right arm, further for dyspnoea, intolerance of horizontal position and oedema of lower extremities. Blood pressure was on admission 160/80 mmHg, heart rate 51 beats/min. The patient was diagnosed a global cardiac failure with atrial bradyfibrillation. A relevant therapy was initiated with an adjustment of her medication. Metoprolol dosage was reduced to 12.5 mg daily and propafenone was withdrawn. Two weeks later the patient was discharged from the hospital haemodynamically stable.

Several days after the discharge, the patient herself has increased metoprolol to previous dose, 100 mg daily. During the next outpatient's visit P450 2D6 phenotype after propafenone discontinuation was determined (Table 1) and revealed a significant decrease in metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR from previous PM phenotype (MR = 104.3) to EM phenotype (MR = 1.4).

Table1. Metoprolol, α -hydroxymetoprolol serum concentrations; metoprolol/ α -hydroxymetoprolol metabolic ratio (MR); heart rate, blood pressure with and without propafenone before and/or 1, 3 hours after metoprolol intake

Metoprolol daily dose	Metoprolol ($\mu\text{g/L}$)	α-hydroxymetoprolol ($\mu\text{g/L}$)	MR	Pulse/min	Blood pressure (mmHg)
200mg + propafenone					
Before	152.4	4.4	34.6	66	136/76
1 hour	333.2	3.8	87.7	59	134/72
3 hours	412.2	4.0	104.3	61	128/76
100mg + propafenone					
Before	79.2	7.7	10.3	68	132/68
1 hour	168.6	4.0	42.2	67	138/74
100mg without propafenone					
Before	10.3	32.0	0.3	55	124/62
1 hour	53.8	44.0	1.2	62	126/70
3 hours	134.9	97.7	1.4	53	

Discussion

We present a case of an inhibitory effect of propafenone on metoprolol biotransformation resulting in the occurrence of adverse effects due to high metoprolol levels.

Propafenone was shown to be metabolized by the same hepatic enzyme as sparteine/debrisoquine, however with higher affinity for P450 2D6, thereby being able to cause a shift of metabolizer phenotype.¹ Metoprolol undergoes extensive pre-systemic elimination, with this enzyme accounting for 70 to 80 % of its metabolism. In our patient a marked decrease in metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR has been observed after propafenone therapy was stopped, the patient's phenotype switched from PM to EM. Since other patient's medication was retained we attribute this phenotypic shift to vanished inhibitory effect. In the study of Labbé et al. the addition of propafenone to P450 2D6 substrate mexiletine in EMs caused pharmacokinetic changes of mexiletine to such an extent that differences between EMs and PMs were almost absent.¹⁰ Thus, results of phenotyping may be falsified by the presence of interfering medications, resulting in discrepancy between the phenotype and genotype. In the study of Wagner et al addition of propafenone increased steady-state levels of metoprolol 2-5 times in four patients. Two patients even developed side effects during the drug combination (severe nightmares and left ventricular failure), which disappeared after metoprolol dose reduction or metoprolol discontinuation.⁶ Our patient suffered from tiredness and dyspnoea on exertion likely due to high metoprolol serum concentrations caused by the inhibitory effect of propafenone. Significant increases in metoprolol concentrations have also been observed after addition of antiarrhythmic drug amiodarone, antihistamine drug diphenhydramine.^{11, 12} Addition of selective serotonin reuptake inhibitors, fluoxetine and paroxetine, resulted even in occurrence severe adverse effects, which subsided after inhibitor discontinuation.^{13, 14}

The patient's genotype revealed a heterozygote for P450 2D6 *4/*9 alleles. Individuals who carry P450 2D6*9 allele have an altered ability to metabolize P450 2D6 substrates and are IM whereas P450 2D6*4 allele results in a loss of enzyme activity.¹⁵ The combination of IM and defective allele is not associated with PM phenotype, however it shows significantly higher MR than does the EM/PM genotype.¹⁶ The (S) enantiomer of propafenone has also been shown to display β -blocking action. The degree of beta-blockade reflects genetically determined variations in propafenone metabolism, with subjects with PM phenotype having significantly more beta-blockade.¹⁷ Unfortunately we

were not able to determine the propafenone serum concentration and thus to assess its contribution to occurrence of the adverse effects. However, after reduction of metoprolol dose to half (100 mg daily), the side effects disappeared.

Interestingly, blood pressure and mainly heart rate did not change significantly after metoprolol dose reduction and after propafenone discontinuation. Pharmacodynamic modelling of the β_1 -blocking effect of metoprolol shows a steep linear relationship to plasma concentration, with a maximum effect at 400 nmol/L (106.96 $\mu\text{g/L}$). However only 30 % of the maximum β_1 -blocking effect is necessary for a clinically significant effect, this limit was observed at metoprolol plasma concentration of 45 nmol/L (12.03 $\mu\text{g/L}$).⁴ We speculate that the permanent metoprolol serum concentrations in our patient above this concentration limit preserved stable heart rate in spite of gradual decline in metoprolol concentrations.

Conclusion

Co-administration of propafenone to metoprolol may result in elevation of metoprolol serum concentration even with impact on patient's clinical condition. Clinicians should be aware of the potential interaction when prescribing this combination and start either with lower metoprolol dose or follow up the patient more carefully. Therapeutic drug monitoring could serve as a valuable tool in clarifying patient's condition.

Key points

- Propafenone may inhibit metoprolol metabolism, high metoprolol serum concentrations may have clinical impact.
- Clinicians should be aware of this potential interaction and start either with lower metoprolol dose or follow up patients more carefully.
- Therapeutic drug monitoring could serve as a valuable tool in clarifying patient's condition.

References

1. Kroemer HK, Fischer Ch, Meese CO, Eichelbaum M. Enantiomer/enantiomer interaction of (S)- and (R)-propafenone for cytochrome P450 2D6-catalyzed 5-hydroxylation: In vitro evaluation of the mechanism. *Mol Pharmacol* 1991;40(1):135-42.
2. Otton SV, Inaba T, Kalow W. Competitive inhibition of sparteine oxidation in human liver by β -adrenoceptor antagonists and other cardiovascular drugs. *Life Sci* 1984;34(1):73-80.
3. Frank D, Jaehde U, Fuhr U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol* 2007;63(4):321-33.
4. Abrahamsson B, Lücker P, Olofsson B, Regårdh CG, Sandberg A, Wieselgren I et al. The relationship between metoprolol plasma concentration and beta1-blockade in healthy subjects: A study on conventional metoprolol and metoprolol CR/ZOK formulations. *J Clin Pharmacol* 1990;30(2 Suppl):S46-54.
5. Regårdh CG, Johnsson G. Clinical pharmacokinetics of metoprolol. *Clin Pharmacokinet* 1980;5(6):557-69
6. Wagner F, Kalusche D, Trenk D, Jähnchen E, Roskamm H. Drug interaction between propafenone and metoprolol. *Br J Clin Pharmacol* 1987;24(2):213-20.
7. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004;369(1):23-37.
8. Perinova I, Duricova J, Brozmanova H, Kacirova I, Grundmann M. Determination of metoprolol and its metabolite α -hydroxymetabolite in serum by HPLC method with fluorescence detection. *Ces slov Farm.* 2008;57(6): 254-9.
9. Jonkers RE, Koopmans RP, Portier EJG, van Boxtel ChJ. Debrisoquine phenotype and the pharmacokinetics and beta-2-receptor pharmacodynamics of metoprolol and its enantiomers. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256(3):959-66.
10. Labbé L, O'Hara G, Lefebvre M, Lessard E, Gilbert M, Adedoyin A et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction between mexiletine and propafenone in human beings. *Clin Pharmacol Ther* 2000;67(1):44-57.

11. Fukumoto K, Kobayashi T, Tachibana K, Kato R, Kazuhiko T, Komamura K. Effect of amiodarone on the serum concentration/dose ratio of metoprolol in patients with cardiac arrhythmia. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006;21(6): 501-5.
12. Hamelin BA, Bouayad A, Méthot J, Jobin J, Desgagnés P, Poirier P et al. Significant interaction between the nonprescription antihistamine diphenhydramine and the CYP2D6 substrate metoprolol in healthy men with high or low CYP2D6 activity. *Clin Pharmacol Ther* 2000;67(5):466-77.
13. Walley T, Pirmohamed M, Proudlove C, Maxwell D. Interaction of metoprolol and fluoxetine. *Lancet* 1993;341(8850):967-8.
14. Onalan O, Cumurcu BE, Bekar L. Complete atrioventricular block associated with concomitant use of metoprolol and paroxetine. *Mayo Clin Proc* 2008;83(5):595-99.
15. Home page of the human cytochrome P450 (CYP 2D6) allele nomenclature [updated 2010 Apr 8; cited May 20]. Available from: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>
16. Sachse Ch, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: Allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 1997;60:284-95.
17. Lee JT, Kroemer HK, Silberstein DJ, Funck-Bretano C, Lineberry MD, Wood AJ et al. The role of genetically determined polymorphic drug metabolism in the beta-blockade produced by propafenone. *N Engl J Med* 1990;322(25):1764-8

4. DISKUZE

Interindividuální variabilita v odpovědi na léčivo je významným klinickým problémem. Výsledkem variability může být nedostatečný terapeutický účinek, pokud je eliminace léčiva příliš rychlá, nebo naopak může dojít k projevům toxicity, pokud dochází k akumulaci léčiva v organismu. Nežádoucí účinky způsobené léčivy jsou běžné, některé z nich můžou být pro pacienta i fatální. Fatální nežádoucí účinky léčiv se řadí mezi čtvrtou vedoucí příčinu úmrtí v USA po kardiovaskulárním onemocnění a rakovině [57]. Dnes již víme, že podstatná část variability účinku léčiv je daná geneticky. Značná pozornost genetického polymorfizmu je věnovaná biotransformačním enzymům první fáze cytochromu P450. Účinek genetického polymorfizmu na aktivitu metabolických enzymů se může projevit změnou farmakokinetiky (změnou koncentrace léčiva), která může mít následně dopad na změnu farmakodynamiky (ovlivnění účinku léčiva). Enzym CYP2D6 patří mezi nejlépe studované enzymy z hlediska genetického polymorfizmu, podílí se na metabolismu zhruba čtvrtiny běžně užívaných léčiv. Genetický polymorfizmus je hlavním faktorem velké interindividuální variability v aktivitě tohoto enzymu. Existují ovšem případy, kdy stanovený genotyp jedince nekoreluje s fenotypem. Tento nesoulad mezi genotypem a fenotypem je daný vlivem negenetických faktorů, jako věk, onemocnění, potrava, další medikace, atd. Pro posouzení aktuální metabolické aktivity je proto vhodné využití metody stanovení fenotypu. Určitou nevýhodou oproti stanovení genotypu je využití substrátové látky. Měla by to být látka bezpečná, přednostně metabolizovaná daným testovaným enzymem. Pro stanovení fenotypu enzymu CYP2D6 je možno použít následující substrátové látky - debrisochin, spartein, dextrometorfan, metoprolol [21]. Z uvedených substrátových látek enzymu CYP2D6 jsme si pro naši práci zvolili beta-blokátor metoprolol, který splňuje výše uvedená kritéria, navíc je široce používaný a tím snadno dostupný. Základním požadavkem implementování stanovení fenotypu v rámci terapeutického monitorování léčiv je zavedení jednoduché, spolehlivé a rychlé metody pro stanovení hladiny substrátové látky a jejího metabolitu. Zavedli jsem proto metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí pro stanovení hladiny metoprololu a jeho metabolitu α -hydroxymetoprololu v séru [58]. Jedná se o rychlou selektivní metodu s jednokrokovou extrakcí malého množství séra, vhodnou pro rutinní analýzu patientských vzorků. Metoda vyžaduje minimální množství séra a jednoduchou úpravu vzorků. Celková doba analýzy je pouze 12 minut, což je vhodné pro rutinní používání. Na rozdíl od většiny prací, které používají dvousložkovou mobilní fázi

acetonitril-voda [59-61], byla v práci použita ternární mobilní fáze. Jako vnitřní standard byl nově použit β -blokátor nadolol, látka podobné chemické struktury jako metoprolol. Metoda byla vyvinuta pro měření vzorku s jak nižšími koncentracemi (před podáním), tak i s vyššími koncentracemi (po podání léku). Měla by tedy být vhodná pro terapeutické monitorování metoprololu i pro testování fenotypu enzymu CYP2D6 v séru pacientů s využitím metoprololu jako substrátové látky.

Další výhodou metoprololu jako substrátové látky je jeho široké využití a používání v klinické praxi v léčbě kardiovaskulárních i nekardiovaskulárních onemocnění. Využití MR metoprololu a jeho metabolitu u pacientů užívajících metoprolol dlouhodobě by tak eliminovalo potřebu užití substrátové látky pro stanovení CYP2D6 aktivity. Většina dosud publikovaných prací používala jednorázové podání metoprololu pro stanovení aktivity metabolického enzymu CYP2D6 [56, 62, 63]. CYP2D6 je enzym s vysokou afinitou a nízkou kapacitou pro substráty, při nízkých koncentracích dochází k jeho saturaci [64]. Uvedený efekt byl pozorován například u haloperidolu, kde vyšší dávky haloperidolu snížily farmakokinetické rozdíly mezi CYP2D6 genotypovými skupinami [65]. Při dlouhodobém užívání metoprololu může docházet ke snížení jeho clearance následkem sníženého průtoku krve játry [39]. Opakované užívání metoprololu může tedy vést k vyšší dostupnosti metoprololu. Dosud však nebyla publikovaná práce, která by srovnávala MR metoprololu/ α -hydroxymetoprololu u jedinců po jednorázovém užití metoprololu a u jedinců na chronické terapii metoprololem. Cílem této práce bylo tedy porovnat MR metoprololu po jednorázovém a opakovaném užití a zjistit, zda je možné využít metoprolol jako substrátovou látku enzymu CYP2D6 u pacientů užívajících metoprolol dlouhodobě [66]. V naší práci jsme pozorovali signifikantní korelaci mezi MR po jednorázovém a opakovaném užití ($r_s = 0.8418$, $P = 0.0003$). I přes statisticky významný rozdíl mezi mediánem MR metoprolol/ α -hydroxymetoprolol za 3 hod po jednorázovém i opakovaném užití (0.59 versus 0.81, $P = 0.0266$), byly všichni pacienti zařazení do stejné fenotypové skupiny, tj. extenzivní metabolizátor. Rozdíly mezi skupinami byly pouze nepatrného rozsahu. Z důvodu širokého použití se metoprolol tedy jeví jako výhodná a snadno dostupná alternativa pro potřeby stanovení fenotypu enzymu CYP2D6, která vyžaduje pouze jednorázový odběr za 3 hod po užití ke stanovení MR metoprololu v séru. Antiarytmikum propafenon je dalším pěkným příkladem léčiva užívaného v běžné klinické praxi, které je možno využít ke stanovení fenotypu CYP2D6. Metoda vyžaduje 1-rázový odběr za 2 hod po užití léku k určení MR propafenonu a jeho metabolitu 5-hydroxypropafenonu v plazmě [67].

O tom, zda změna koncentrace léčiva bude mít klinicky relevantní dopad rozhoduje několik faktorů. Jedním z nich je terapeutická šířka léčiva. U léčiv s velkou terapeutickou šířkou malé změny v koncentraci nevyvolají změnu účinku, naopak u léčiv s úzkou terapeutickou šíří mohou i malé změny farmakokinetiky mít klinicky závažné důsledky. Vzhledem k tomu, že mezi početné substráty enzymu CYP2D6 patří také léčiva s úzkou terapeutickou šíří, předpokládalo se, že tento enzym bude mít největší počet léčiv, u kterých bude stanovení genotypu nebo fenotypu před zahájením terapie klinicky relevantní. Avšak výsledky studií tento předpoklad nepotvrdily [68-69]. CYP2D6 se podílí na metabolismu mnohých antidepresiv a antipsychotik. Z antidepresiv, které jsou substráty enzymu CYP2D6, jsou to zejména tricyklická antidepresiva a venlafaxin, u kterých je doporučováno terapeutické monitorování na základě prokázaného vztahu mezi koncentrací v plazmě a účinkem léčiva. Z antipsychotik jsou to klasická antipsychotika a z atypických risperidon [70]. Některé léčiva se biotransformují na aktivní metabolity, které mají obdobnou aktivitu jako mateřská látka. Předpokládá se teda, že je možno očekávat stejný terapeutický účinek nezávisle na změně poměru mezi léčivem a jeho metabolitem. Celková suma mateřské látky a metabolitu se mezi EMs a PMs nemění, výsledný účinek by se tedy měl rovnat součtu účinku mateřské látky a metabolitu. U některých látek i přes obdobný účinek metabolitu ve srovnání s léčivem, může vlivem změny poměru mezi hladinou mateřské látky a metabolitu v důsledku genetického polymorfizmu dojít k odlišnostem v terapeutickém účinku a výskytu nežádoucích účinků. Příkladem je antidepresivum venlafaxin, které je metabolizováno prostřednictvím CYP2D6 na ekvipotentní metabolit O-desmethylvenlafaxin. Celková suma aktivních látek není tedy genotypem významně ovlivněna, pacientům s pomalým metabolismem se však přisuzuje vyšší riziko kardiotoxicity [71, 72]. Podobně i u další látky, antipsychotika risperidonu, je u PMs pozorována vyšší toxicita ve srovnání s EMs i přes neměnicí se poměr mezi mateřskou látkou a aktivním metabolitem 9-hydroxyrisperidonem mezi genotypovými skupinami [73]. Podobný efekt mělo i současné užívání s inhibitory enzymu CYP2D6 [74]. Přesný dopad změny poměru léčiva a metabolitu není však mnohdy plně objasněn. Nebivolol je ultraselektivní beta-blokátor podléhající významné presystémové eliminaci prostřednictvím enzymu CYP2D6. I přes významné rozdíly v průměrných údolních koncentracích mezi PMs a EMs (až 10-15násobné rozdíly), nebyl pozorován vliv na účinek nebo výskyt nežádoucích účinků. Jedním z vysvětlení je přítomnost aktivních metabolitů, které se zdají být ekvipotentní [75].

Beta-blokátory jsou další větší skupinou látek, u kterých se podílí enzym CYP2D6 určitým podílem na jejich metabolismu. Z nich metoprolol podléhá nejvíce metabolismu tímto enzymem. I když se nejedná o léčivo s úzkou terapeutickou šíří, je to léčivo široce používané v léčbě kardiovaskulárních onemocnění, proto byla snaha objasnit vliv genetického polymorfizmu na dispozici a účinek metoprololu. Byly provedeny studie na zdravých dobrovolnících i pacientech s jednorázovým i opakovaným užíváním metoprololu, které potvrdily zejména výrazný vliv genetického polymorfizmu na dispozici metoprololu [41-52]. Aktivita enzymu CYP2D6 však může být významně modifikována i jinými faktory než genetickým polymorfizmem, a to lékovými interakcemi, věkem, pohlavím, onemocněním, atd. Pacienti užívající metoprolol jsou často polymorbidní, různého věku a současně užívají další farmakoterapii, stanovení pouze CYP2D6 genotypu tak neumožní odhalit skutečný stav enzymu. Proto jsme se v další části práce zaměřili na porovnání aktivity metabolického enzymu CYP2D6 stanovením genotypu i fenotypu s využitím metoprololu jako substrátové látky. Současně jsme zkoumali vliv metabolické aktivity CYP2D6 na farmakokinetiku a farmakodynamiku metoprololu u pacientů hypertoniků, kteří užívali metoprolol dlouhodobě [76]. Pozorovali jsem signifikantní rozdíly v dispozici metoprololu v závislosti na CYP2D6 genotypu i fenotypu u pacientů na dlouhodobé terapii metoprololem. Rozdíly v dispozici metoprololu byly však více zvýrazněny, pokud jsme je porovnávali v rámci fenotypové skupiny. Většina pacientů zařazených do naší práce byla staršího věku, kdy mohou být pre-systémová eliminace a metabolismus snižené [39]. V rámci genotypu byl ve skupině sledovaných pacientů detekován 1 PM na rozdíl od fenotypu, které odhalilo 3 pacienty s fenotypem PM. Jeden z PM ve fenotypové skupině byl heterozygotem pro defektní alelu, u druhého nebyla námi stanovovaná defektní alela nalezena. Jeden z pacientů užíval v další medikaci sertralin, další propafenon, které mohli do určité míry modifikovat aktivitu metabolického enzymu [77, 78]. Současně mohly být u pacientů přítomny další variantní alely, jejichž metody stanovení nebyly na pracovišti genetiky v naší nemocnici zavedeny [6]. 1.8-násobně vyšší normalizovaná AUC_{0-4} metoprololu byla pozorovaná u heterozygotních EMs ve srovnání s pacienty bez detekované defektní alely, $p < 0.05$. Pacienti mající 1 defektní alelu měly také 2.4-násobně vyšší MR metoprolol/ α -hydroxymetoprolol ve srovnání s pacienty bez defektní alely, $p < 0.05$. Orální clearance metoprololu byla 1.8-násobně vyšší u pacientů bez defektní alely ve srovnání s pacienty s 1 defektní alelou. Klinicky významné rozdíly v dispozici metoprololu mezi CYP2D6 homozygotními a heterozygotními zdravými dobrovolníky byly demonstrovány i v následující studii. AUC metoprololu a minimální

koncentrace metoprololu v steady-state byly více než 2-krát vyšší u heterozygotů [79]. Naopak, v další práci nebyly pozorovány významné rozdíly v MR a plasmatické koncentraci metoprololu mezi heterozygotními EMs a homozygotními EMs. Práce se zabývala důsledky genotypu CYP2D6 genotype na dispozici metoprololu u pacientů na dlouhodobé terapii [80]. Vysvětlením uvedené diskrepance může být přítomnost alel se sníženou metabolickou aktivitou (např. *41, *9, atd.) [6], které nebyly testované v naší a výše uvedené práci. Efekt metoprololu byl u našich pacientů sledován měřením tepové frekvence na EKG. Pozorovali jsem trend k nižší tepové frekvenci před užitím léku u pacientů s vyšší hladinou metoprololu, tj. pacienti mající 1 defektní alelu a pacienti s vyšší hodnotou MR. Výsledky jsou ve shodě i s jinými pracemi [51, 79].

Vliv současné medikace je významným faktorem podílejícím se na neshodě mezi genotypem a fenotypem. Přidání inhibitoru může vést ke změně fenotypu jedince, tzn. že se z jedince s extenzivním metabolizmem stává PM. Konverze na fenotyp PM byla například popsána u psychiatrických pacientů užívajících antidepressivum ze skupiny SSRI, paroxetin, patřící mezi silné inhibitory enzymu CYP2D6 [81]. Využití stanovení CYP2D6 fenotypu (případně s doplněním genotypu) nám v tomto případě umožní objasnit dopad inhibitoru na metabolickou aktivitu enzymu a posoudit možný vliv i na jiné substráty tohoto enzymu. Praktické využití fenotypu v rámci TDM a jeho význam uvádíme v následující kazuistice u naší pacientky užívající dlouhodobě metoprolol v běžné klinické praxi [82]. Prezentujeme zde interakci mezi 2 substráty enzymu CYP2D6 metoprololem a propafenonem u polymorbidní postarší pacientky. Propafenone se metabolizuje enzymem CYP2D6 jako spartein/debrisoquin, avšak má vyšší afinitu pro tento enzym, následkem čeho by mohl způsobit konverzi fenotypu aktivity CYP2D6 [83]. U naší pacientky jsme pozorovali výrazný pokles v hodnotě MR metoprolol/ α -hydroxymetoprolol po vysazení propafenonu ze 104.3 na 1.4, došlo tedy ke změně fenotypu z PM na EM. Obdobné výsledky pozorovala i studie Labbé et al., která sledovala vliv propafenonu na farmakokinetiku mexiletinu u EMs. Po přidání propafenonu se rozdíly mezi CYP2D6 EMs a PMs téměř úplně vytratily [84]. Po přidání propafenonu byl pozorován také 2-5 násobný vzestup hladiny metoprololu s objevením se nežádoucích účinků u některých pacientů, které odezněly po snížení dávky metoprololu nebo jeho vysazení [78]. Při současném užívání metoprololu a propafenonu jsme zjistili u naší pacientky vysoké hladiny metoprololu v séru, což vedlo následně ke snížení dávky metoprololu, snížení sérové koncentrace metoprololu a subjektivnímu zlepšení klinického stavu pacientky. Zajímavé je, že krevní tlak a zejména srdeční frekvence se významně nezměnily po snížení dávky

metoprololu a vysazení propafenonu. Farmakodynamické modelování beta1-blokujícího efektu metoprololu ukazuje na prudký lineární vztah k plazmatické koncentraci s maximálním účinkem při koncentraci 400 nmol/l (106.96 µg/l). Pro klinicky signifikantní účinek postačuje 30 % maximální beta1-blokády, což se rovná koncentraci metoprololu 45 nmol/l (12.03 µg/l) [85]. Kazuistika je tedy jedním z mnohá příkladů využití stanovení genotypu a fenotypu ve snaze o individualizaci farmakoterapie léčiv [86]. Je třeba si uvědomit, že mnohá léčiva jsou podávána ve formě racemické směsi, jednotlivé enantiomery se mohou lišit nejen ve své aktivitě, ale i v preferenci enzymu, kterým se metabolizují. Výrazné změny v koncentraci celkového léčiva tak mohou vést k menším změnám v účinku léčiva. Dopad stereoselektivity možno pozorovat například i u metoprololu, který se používá ve formě racemické směsi S- a R-metoprolol. Za beta-blokádu je především zodpovědný S-metoprolol, preferenčně je však enzymem CYP2D6 biotransformován R-metoprolol. U PMs se poměr S/R metoprololu mění ve prospěch R-metoprololu, u UMs je tomu naopak [46-48]. To může také vysvětlovat proč výrazné změny v celkové koncentraci metoprololu neodráží adekvátně změny ve farmakodynamice.

Stanovení enzymatické aktivity genotypováním nebo fenotypováním by mohlo být užitečné zejména v případech, kdy pacient reaguje na podanou standardní dávku léčiva nepřiměřeným způsobem, a to objevením se nežádoucích účinků nebo naopak selháním terapie. Se situací, kdy pacient neodpovídá na užívanou medikaci je možné se střetnout například v psychiatrii. Neúčinnost terapie může být dána non-compliance pacienta, v ojedinělých případech se však může jednat o důsledek ultrarychlého metabolismu léčiva, kdy pacient vyžaduje vyšší dávky léčiva, než jsou běžně užívané v populaci pro dosažení terapeutických hladin. Kawanishi a kol. popisuje zvýšený výskyt duplikace alel CYP2D6 (10 %) u pacientů s přetrvávající depresí i přes užívání terapie ve srovnání s běžnou švédskou populací (1-2 % UMs) [87]. V retrospektivní studii, která sledovala důvod požadavku na stanovení genotypu enzymu CYP2D6 u psychiatrických pacientů zjistili, že u PMs to byl výskyt nežádoucích účinků a u UMs nedostatečná odpověď na terapii nebo selhání terapie, které dali podnět ke genetickému vyšetření. Nedostatečná odpověď byla zaznamenána u téměř 90 % pacientů genotypovaných jako UMs. Výskyt nežádoucích účinků byl zaznamenán jen u třech pacientů s UM genotypem, všichni tito pacienti užívali léčiva, u kterých došlo metabolismem přes CYP2D6 ke tvorbě aktivních metabolitů (risperidon a venlafaxin) [88].

U mnohých léčiv dosud chybějí jednoznačné závěry vlivu příslušného genetického polymorfizmu na výsledný účinek. Do jaké míry bude terapeutický účinek léčiva ovlivněn změnami v expozici daného léčiva, závisí na vztahu mezi farmakokinetikou-farmakodynamikou. Pro řadu léčiv zatím není dostatečné množství přesvědčivých informací, které by prokázaly účelnost farmakogenetického vyšetření před zahájením terapie. Problémem při interpretaci dat je fakt, že mnoho farmakogenetických studií bylo provedeno na zdravých dobrovolnících užívajících obvykle nižší dávky léčiv a zaměřených zejména na sledování změn farmakokinetických parametrů, často po užití pouze jednorázové dávky. Pozitivem naší práce je tedy, že je provedena u pacientů užívajících dané léčivo dlouhodobě, tedy za podmínek běžné klinické praxe. Dalším problémem studií je i velikost sledovaného souboru. Mnohé studie mají malý počet sledovaných subjektů, což může vést ke kontroverzním výsledkům, čímž si uvědomujeme limity i naší práce.

Nicméně, i když se zatím nejeví v blízké době reální rutinní zavedení stanovení genotypu či fenotypu enzymu cytochromu P450 do klinické praxe, mají tyto metody nepochybně významný přínos v určitých vzpomínaných situacích. U některých látek již byly zařazeny informace o vlivu genetického polymorfizmu do SPC léčiv. Časem se možná u těchto léčiv ukáže přínos rutinního používání metod fenotypu a genotypu v klinické praxi.

5. ZÁVĚRY

1. Peřinová I., Ďuricová J., Brozmanová H., Kacířová I., Grundmann M.

Stanovení metoprololu a jeho metabolitu α -hydroxymetoprololu v séru metodou HPLC s fluorescenční detekcí

Zavedli jsem rychlou a selektivní metodu s jednokrokovou extrakcí malého množství séra, vhodnou pro terapeutické monitorování metoprololu i pro testování fenotypu enzymu CYP2D6 v séru pacientů s využitím metoprololu jako substrátové látky

2. Ďuricová J., Peřinová I., Kacířová I., Grundmann M.

Comparison of metoprolol/ α -hydroxymetoprolol metabolic ratio after single dose and in steady state

Prokázali jsem, že využití MR metoprolol/ α -hydroxymetoprolol u pacientů na dlouhodobé terapii metoprololem je vhodné pro stanovení metabolické aktivity enzymu CYP2D6.

3. Duricova J, Perinova I, Jurckova N, Jeziskova I, Kacirova I, Grundmann M.

Cytochrome P450 2D6 phenotype and genotype in hypertensive patients on long-term therapy with metoprolol

Pozorovali jsem signifikantní rozdíly v dispozici metoprololu v závislosti na CYP2D6 genotypu a fenotypu u pacientů na dlouhodobé terapii metoprololem. CYP2D6 genetický polymorfismus patří mezi významné faktory ovlivňující dispozici i efekt metoprololu. Avšak, nesmíme zapomenout ani faktory prostředí, které mohou někdy významně modifikovat metabolickou aktivitu. Obě metody, tj. stanovení genotypu i fenotypu poskytují cenné informace při stanovování enzymatické aktivity a optimalizování terapie.

4. Duricova J, Perinova I, Jurckova N, Kacirova I, Grundmann M.

Clinically important interaction between metoprolol and propafenone

Tato kazuistika poukazuje na význam využití terapeutického monitorování léčiv, včetně stanovení fenotypu a genotypu, k individualizaci farmakoterapie pro konkrétního pacienta v běžné klinické praxi.

6. LITERATURA

1. Omiecinski CJ, Remmel RP, Hosagrahara VP. Concise review of the cytochrome P450s and their roles in toxicology. *Toxicol. Sci.* 1999; 48, 151-156.
2. Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2001; 58, 737-747.
3. Mičuda S, Martinková J, Chládek J, et al. Význam polymorfismu metabolismu léčiv v moderní farmakoterapii. *Remedia* 1998; 8: 226-236
4. Guengerich F.P. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *The APPS J.* 2006; 8, E101-110.
5. Buzková H, Pechandová K, Slanar O, Perlík F. Genetic polymorphism of cytochrome P450 and methods for its determination. *Prague. Med. Rep.* 2006; 107: 383-393.
6. Home page of the human cytochrome P450 (CYP 2D6) allele nomenclature [updated 2011 June 16] <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>.
7. Bertilsson L. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin. Pharmacokinet.* 1995; 29, 192-209.
8. Rogers JF, Nafzinger AN, Bertino JS. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450 – metabolized drugs. *Am. J. Med.* 2002; 113, 746-750.
9. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends. Pharmacol. Sci.* 2004; 25, 193-200.
10. Steiner E, Iselius L, Alván G, Lindsten J, Sjöqvist F. A family study of genetic and environmental factors determining polymorphic hydroxylation of debrisoquin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1985; 38, 394-401.
11. Aklillu E, Herrlin K, Gustafsson LL, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. Evidence for environmental influence on CYP2D6-catalysed debrisoquine hydroxylation as demonstrated by phenotyping and genotyping of Ethiopians living or in Sweden. *Pharmacogenetics* 2002; 12, 375-383.

12. Wolbold R, Klein K, Burk O, Nüssler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology* 2003; 38, 978-988.
13. Villeneuve JP, Pichette V. Cytochrome P450 and liver diseases. *Curr. Drug. Metab.* 2004; 5, 273-282.
14. Tracy TS, Venkataramanan R, Glover D, Caritis SN. Temporal changes in drug metabolism (CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 activity) during pregnancy. *Am J Obstet. Gynecol.* 2005; 192, 633-639.
15. Schaffer SD, Yoon S, Zadezensky I. A review of smoking cessation: potentially risky effects on prescribed medications. *J. Clin. Nurs.* 2009; 18, 1533-1540.
16. Nekvidová J, Anzenbacher P. Interactions of food and dietary supplements with drug metabolising cytochrome P450 enzymes. *Ceska Slov. Farm.* 2007; 56, 165-173.
17. Guengerich FP. Influence of nutrients and other dietary materials on cytochrome P-450 enzymes. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995; 61, 651-658.
18. Tanaka E, Hisawa S. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with psychoactive drugs: antidepressants and antipsychotics and the cytochrome P450 system. *J. Clin. Pharm. Ther.* 1999; 24, 7-16.
19. Perucca E. Clinically relevant drug interactions with antiepileptic drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2005; 61, 246-255.
20. Pirmohamed M, Park BK. Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions. *Toxicology* 2003; 192, 23-32.
21. Frank D, Jaehde U, Fuhr U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007; 63:321-333.
22. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004 Jan;369: 23-37
23. Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet.* 1977; 2: 584-586
24. Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ. Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol.* 1979; 16: 183-187.

25. Gaedigk A, Gotschall RR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL, Leeder JS. Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics*. 1999; 9: 669-682.
26. Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*. 1997; 60:284-295.
27. Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* 2002; 3: 229-243
28. Wang SL, Huang JD, Lai MD, Liu BH, Lai ML. Molecular basis of genetic variation in debrisoquin hydroxylation in Chinese subjects: polymorphism in RFLP and DNA sequence of CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther*. 1993; 53: 410-418.
29. Gaedigk A, Bradford LD, Marcucci KA, Leeder JS. Unique CYP2D6 activity distribution and genotype-phenotype discordance in black Americans. *Clin Pharmacol Ther*. 2002; 72: 76-89.
30. Wennerholm A, Dandara C, Sayi J, Svensson JO, Abdi YA, Ingelman-Sundberg M, Bertilsson L, Hasler J, Gustafsson LL. The African-specific CYP2D617 allele encodes an enzyme with changed substrate specificity. *Clin Pharmacol Ther*. 2002; 71: 77-88.
31. Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F. Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995; 274: 516-520.
32. Agúndez JA, Ledesma MC, Ladero JM, Benítez J. Prevalence of CYP2D6 gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a white population. *Clin Pharmacol Ther*. 1995; 57:265-269.
33. Aklillu E, Persson I, Bertilsson L, Johansson I, Rodrigues F, Ingelman-Sundberg M. Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996; 278: 441-446.
34. McLellan RA, Oscarson M, Seidegård J, Evans DA, Ingelman-Sundberg M. Frequent occurrence of CYP2D6 gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics*. 1997; 7: 187-191.
35. Ďuricová J, Grundmann M. CYP2D6 a jeho klinický význam. *Klinická farmakologie a farmacie* 2007; 21: 133-136

36. Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet.* 2009; 48: 689-723.
37. Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: part II. *Clin Pharmacokinet.* 2009; 48: 761-804.
38. Ďuricová J, Grundmann M. Beta-blokátory. *Česká a slovenská farmacie* 2009; 58: 60-66
39. Regårdh C. G., Johnsson G. Clinical pharmacokinetics of metoprolol. *Clin Pharmacokinet.* 1980; 5, 557-569
40. Johnson JA, Burlew BS. Metoprolol metabolism via cytochrome P4502D6 in ethnic populations. *Drug Metab Dispos.* 1996; 24: 350-355.
41. McGourty JC, Silas JH, Freestone S, Ramsay LE, Tucker GT, Woods HF et al. Metoprolol metabolism and debrisoquine oxidation polymorphism – population and family studies. *Br J Clin Pharmacol* 1985; 20 (6): 555-566.
42. Silas JH, McGourty JC, Lennard MS, Tucker GT, Woods HF. Polymorphic metabolism of metoprolol: clinical studies. *Eur J Clin Pharmacol* 1985; 28 Suppl: 85-88.
43. Lennard MS, Silas JH, Freestone S, Trevethick J. Defective metabolism of metoprolol in poor hydroxylators of debrisoquine. *Br J Clin Pharmacol* 1982; 14 (2): 301-303.
44. Ismail R, The LK. The relevance of CYP2D6 genetic polymorphism on chronic metoprolol therapy in cardiovascular patients. *J Clin Pharm Ther* 2006; 31 (1): 99-109.
45. Nozawa T, Taguchi M, Tahara K, Hashimoto Y, Igarashi N, Nonomura M et al. Influence of CYP2D6 genotype on metoprolol plasma concentration and β -adrenergic inhibition during long-term treatment. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46 (5): 713-720.
46. Lennard MS, Tucker GT, Silas JH, Freestone S, Ramsay LE, Woods HF. Differential stereoselective metabolism of metoprolol in extensive and poor debrisoquin metabolizers. *Clin Pharmacol Ther.* 1983; 34: 732-737.
47. Sharp CF, Gardiner SJ, Jensen BP, Roberts RL, Troughton RW, Lainchbury JG, Begg EJ. CYP2D6 genotype and its relationship with metoprolol dose, concentrations and effect in patients with systolic heart failure. *Pharmacogenomics J.* 2009; 9: 175-184.

48. Zineh I, Beitelshes AL, Gaedigk A, Walker JR, Pauly DF, Eberst K, Leeder JS, Phillips MS, Gelfand CA, Johnson JA. Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse events or efficacy in hypertension. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 76: 536-544.
49. Rau T, Wuttke H, Michels LM, Werner U, Bergmann K, Kreft M, Fromm MF, Eschenhagen T. Impact of the CYP2D6 genotype on the clinical effects of metoprolol: a prospective longitudinal study. *Clin Pharmacol Ther.* 2009; 85: 269-272.
50. Goryachkina K, Burbello A, Boldueva S, Babak S, Bergman U, Bertilsson L. CYP2D6 is a major determinant of metoprolol disposition and effects in hospitalized Russian patients treated for acute myocardial infarction. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008; 64: 1163-1173.
51. Bijl MJ, Visser LE, van Schaik RH, Kors JA, Witteman JC, Hofman A, Vulto AG, van Gelder T, Stricker BH. Genetic variation in the CYP2D6 gene is associated with a lower heart rate and blood pressure in beta-blocker users. *Clin Pharmacol Ther.* 2009; 85: 45-50.
52. Fux R, Mörike K, Pröhmer AM, Delabar U, Schwab M, Schaeffeler E et al. Impact of CYP2D6 genotype on adverse effects during treatment with metoprolol: A prospective clinical study. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78 (4): 378-387.
53. Wuttke H, Rau T, Heide R, Bergmann K, Böhm M, Weil J et al. Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol-associated adverse effects. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72 (4): 429-437.
54. Goryachkina K, Burbello A, Boldueva S, Babak S, Bergman U, Bertilsson L. Inhibition of metoprolol metabolism and potentiation of its effects by paroxetine in routinely treated patients with acute myocardial infarction (AMI). *Eur J Clin Pharmacol.* 2008; 64: 275-282.
55. Walley T, Pirmohamed M, Proudlove C, Maxwell D. Interaction of metoprolol and fluoxetine. *Lancet.* 1993; 341: 967-968.
56. Jonkers, R.E., Koopmans, R.P., Portier, E.J.G., van Boxtel, Ch.J. Debrisoquine phenotype and the pharmacokinetics and beta-2-receptor pharmacodynamics of metoprolol and its enantiomers. *J. Pharmacol. Experimental. Ther.* 1990; 256, 959-966.

57. Lazarou J., Pomeranz B. H., Corey P. N. Incidence of adverse drug reactions in hospitalised patients – a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*, 1998; 279: 1200-1205
58. Peřinová I., Ďuricová J., Brozmanová H., Kacířová I., Grundmann M. Stanovení metoprololu a jeho metabolitu / α -hydroxymetoprololu v séru metodou HPLC s fluorescenční detekcí. *Čes slov Farm*; 57: 254-259
59. Fang J, Semple HA, Song J. Determination of metoprolol, and its four metabolites in dog plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004;809:9-14.
60. Lecaillon JB, Godbillon J, Abadie F, Gosset G. Determination of metoprolol and its alpha-hydroxylated metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1984;305:411-417.
61. Rutledge DR, Garrick C. Determination of metoprolol and its alpha-hydroxide metabolite in serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci*. 1989;27:561-565.
62. Sohn DR, Kusaka M, Shin SG, Jang IJ, Chiba K, Ishizaki T. Utility of a one-point (3-hour postdose) plasma metabolic ratio as a phenotyping test using metoprolol in two east Asian populations. *Ther Drug Monit*. 1992;14:184-189.
63. Tamminga WJ, Wemer J, Oosterhuis B, Brakenhoff JP, Gerrits MG, de Zeeuw RA, de Leij LF, Jonkman JH. An optimized methodology for combined phenotyping and genotyping on CYP2D6 and CYP2C19. *Eur J Clin Pharmacol*. 2001;57:143-146.
64. Brøsen K, Gram LF. Clinical significance of the sparteine/debrisoquine oxidation polymorphism. *Eur J Clin Pharmacol*. 1989;36:537-547.
65. Roh HK, Chung JY, Oh DY, Park CS, Svensson JO, Dahl ML, Bertilsson L. Plasma concentrations of haloperidol are related to CYP2D6 genotype at low, but not high doses of haloperidol in Korean schizophrenic patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52:265-271.
66. Ďuricová J., Peřinová I., Kacířová I., Grundmann M. Comparison of metoprolol/ α -hydroxymetoprolol metabolic ratio after single dose and in steady state. *Čes slov Farm* 2010; 59: 222-22
67. Anzenbacherová E, Anzenbacher P, Perlik F, Kvetina J. Use of a propafenone metabolic ratio as a measure of CYP2D6 activity. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2000; 38: 426-429.

68. Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group. Recommendations from the EGAPP Working Group: testing for cytochrome P450 polymorphisms in adults with nonpsychotic depression treated with selective serotonin reuptake inhibitors. *Genet Med.* 2007;9: 819-825.
69. Fleeman N, McLeod C, Bagust A, Beale S, Boland A, Dundar Y, Jorgensen A, Payne K, Pirmohamed M, Pushpakom S, Walley T, de Warren-Penny P, Dickson R. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of testing for cytochrome P450 polymorphisms in patients with schizophrenia treated with antipsychotics: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2010; 14: 1-157.
70. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, Conca A, Dietmaier O, Egberts K, Fric M, Gerlach M, Greiner C, Gründer G, Haen E, Havemann-Reinecke U, Jaquenoud Sirot E, Kirchherr H, Laux G, Lutz UC, Messer T, Müller MJ, Pfuhlmann B, Rambeck B, Riederer P, Schoppek B, Stingl J, Uhr M, Ulrich S, Waschgler R, Zernig G. AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011. *Pharmacopsychiatry.* 2011; 44: 195-235.
71. Lessard E, Yessine MA, Hamelin BA, O'Hara G, LeBlanc J, Turgeon J. Influence of CYP2D6 activity on the disposition and cardiovascular toxicity of the antidepressant agent venlafaxine in humans. *Pharmacogenetics.* 1999; 9: 435-443.
72. Shams ME, Arneth B, Hiemke C, Dragicevic A, Müller MJ, Kaiser R, Lackner K, Härtter S. CYP2D6 polymorphism and clinical effect of the antidepressant venlafaxine. *J Clin Pharm Ther.* 2006; 31: 493-502.
73. de Leon J, Susce MT, Pan RM, Fairchild M, Koch WH, Wedlund PJ. The CYP2D6 poor metabolizer phenotype may be associated with risperidone adverse drug reactions and discontinuation. *J Clin Psychiatry.* 2005; 66: 15-27.
74. de Leon J, Susce MT, Pan RM, Wedlund PJ, Orrego ML, Diaz FJ. A study of genetic (CYP2D6 and ABCB1) and environmental (drug inhibitors and inducers) variables that may influence plasma risperidone levels. *Pharmacopsychiatry.* 2007; 40: 93-102.
75. Lefebvre J, Poirier L, Poirier P, Turgeon J, Lacourciere Y. The influence of CYP2D6 phenotype on the clinical response of nebivolol in patients with essential hypertension. *Br J Clin Pharmacol.* 2007; 63: 575-582.

76. Duricova J, Perinova I, Jurckova N, Jeziskova I, Kacirova I, Grundmann M. Cytochrome P450 2D6 phenotype and genotype in hypertensive patients on long-term therapy with metoprolol. Bratisl Lek Listy, prijato do tisku
77. Preskorn SH, Greenblatt DJ, Flockhart D, Luo Y, Perloff ES, Harmatz JS et al. Comparison of duloxetine, escitalopram, and sertraline effects on cytochrome P450 2D6 function in healthy volunteers. *J Clin Psychopharmacol* 2007; 27: 28-34.
78. Wagner F, Kalusche D, Trenk D, Jahnchen E, Roskamm H. Drug interaction between propafenone and metoprolol. *Br J Clin Pharmacol* 1987; 24 (2): 213-20.
79. Koytchev R, Alken RG, Vlahov V, Kirkov V, Kaneva R, Thyroff-Friesinger U et al. Influence of the cytochrome P4502D6*4 allele on the pharmacokinetics of controlled-release metoprolol. *Eur J Clin Pharmacol* 1998; 54 (6): 469-474.
80. Rau T, Heide R, Bergmann K, Wuttke H, Werner U, Feifel N et al. Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. *Pharmacogenetics* 2002; 12 (6): 465-472.
81. Žourková A, Hadašová E. Paroxetine-induced conversion of cytochrome P450 2D6 phenotype and occurrence of adverse effects. *Gen Physiol Biophys* 2003; 22: 103-113
82. Duricova J, Perinova I, Jurckova N, Kacirova I, Grundmann M. Clinically important interaction between metoprolol and propafenone. *Can Fam Physician*, prijato do tisku
83. Kroemer HK, Fischer Ch, Meese CO, Eichelbaum M. Enantiomer/enantiomer interaction of (S)- and (R)-propafenone for cytochrome P450 2D6-catalyzed 5-hydroxylation: In vitro evaluation of the mechanism. *Mol Pharmacol* 1991;40(1):135-42.
84. Labbé L, O'Hara G, Lefebvre M, Lessard E, Gilbert M, Adedoyin A et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction between mexiletine and propafenone in human beings. *Clin Pharmacol Ther* 2000;67(1):44-57.
85. Abrahamsson B, Lucker P, Olofsson B, Regårdh CG, Sandberg A, Wieselgren I, Bergstrand R. The relationship between metoprolol plasma concentration and beta 1-blockade in healthy subjects: a study on conventional metoprolol and metoprolol CR/ZOK formulations. *J Clin Pharmacol*. 1990; 30: S46-54.

86. Vašků A., Špinarová L., Pávková-Goldbergová M., Špinar J., Souček M., Vítovec J. Příspěvek k farmakogenetice chronického srdečního selhání – betablokátory. Čas. Lék. čes., 2006, 145, pp. 148-152.
87. Kawanishi Ch, Lundgren S, Ågren H a kol. Increased incidence of CYP2D6 gene duplication in patients with persistent mood disorders: ultrarapid metabolism of antidepressants as a cause of nonresponse. A pilot study. Eur J Clin Pharmacol 2004; 59: 803-807
88. Sjöqvist F., Eliasson E. The convergence of conventional therapeutic drug monitoring and pharmacogenetic testing in personalized medicine: Focus on antidepressants. Clin Pharmacol Ther., 2007; 81: 899-902

7. SOUHRN

Enzym cytochrom P450 2D6 je zodpovědný za metabolismus přibližně 25 % běžně užívaných léčiv. Aktivita tohoto enzymu je vysoce variabilní z důvodu genetických i negenetických faktorů. Možnost měřit aktivitu tohoto enzymu by mohlo přispět k individualizaci farmakoterapie. Samotné stanovení genotypu nám neumožňuje určit přesnou aktivitu enzymu, protože aktivita může být ovlivněna i faktory prostředí. Pro posouzení aktuální metabolické aktivity je proto vhodné využití metody stanovení fenotypu. Určitou nevýhodou oproti stanovení genotypu je využití substrátové látky. Měla by to být látka bezpečná, přednostně metabolizovaná daným testovaným enzymem. Beta-blokátor metoprolol splňuje výše uvedená kritéria. Využití metoprololu u pacientů užívajících metoprolol dlouhodobě by tak eliminovalo potřebu užití substrátové látky. Dosud však nebyla publikována práce, která by srovnávala MR metoprololu/ α -hydroxymetoprololu u jedinců po jednorázovém užití metoprololu a u jedinců na chronické terapii metoprololem. Zavedli jsem proto metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení hladiny metoprololu a jeho metabolitu α -hydroxymetoprololu v séru. Následně jsme prokázali, že je možné využít metoprolol jako substrátovou látku i u pacientů užívajících metoprolol dlouhodobě. Dále jsme se zaměřili na objasnění vlivu genetického polymorfizmu a faktorů prostředí na dispozici a účinek metoprololu u pacientů na dlouhodobé terapii metoprololem. Pozorovali jsem signifikantní rozdíly v dispozici metoprololu v závislosti na CYP2D6 genotypu i fenotypu. Pacienti s nižší aktivitou enzymu měly významně vyšší hladiny metoprololu a nižší orální clearance. Byl u nich také pozorován trend k nižší tepové frekvenci před užitím léku. Rozdíly v dispozici metoprololu byly však více zvýrazněny, pokud jsme je porovnávali v rámci fenotypové skupiny. Faktory prostředí mohou významně modifikovat aktivitu enzymu a tím dispozici a účinek léčiva. Praktický význam zavedení fenotypu prezentujeme na příkladu pacientky u které došlo vlivem medikace ke konverzi CYP2D6 fenotypu s klinickým projevem.

SUMMARY

The human cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) is involved in the oxidative metabolism of about 25 % of all commonly prescribed drugs. It is characterized by high range of interindividual variability due to both environmental and genetic factors. The ability to measure the activity of CYP2D6 enzyme is of high significance. Genotyping alone is not sufficient to accurately predict an individual's actual CYP2D6 activity. Phenotyping on the other hand can determine the exact enzymatic activity as it also reflects non-genetic factors. However it requires the use of a probe drug, a drug exclusively metabolized by a given enzyme. Beta-blocker agent metoprolol is a suitable candidate for CYP2D6 probe drug. Use of metoprolol in patients routinely treated with metoprolol would eliminate the need for administration of an additional probe drug. To our knowledge, no direct comparison of metoprolol/ α -hydroxymetoprolol MR after a single dose and in steady state was performed. Therefore, we introduced a method of high-performance liquid chromatography for the determination of metoprolol concentrations and its metabolite α -hydroxymetoprolol in serum. Subsequently, we showed that metoprolol can be used as a probe drug also in patients on long-term therapy with metoprolol. Furthermore, we focused on clarifying the influence of CYP2D6 genetic polymorphism and environmental factors on metoprolol disposition and effect in patients receiving metoprolol long-term. We observed significant variations in metoprolol disposition in both CYP2D6 genotype and phenotype, however with phenotype exhibiting greater differences. Patients with a lower enzymatic activity had significantly higher metoprolol disposition and lower oral clearance, trend to lower heart rate before metoprolol intake was also observed. Environmental factors can significantly modify the enzymatic activity with alterations in the drug disposition and effect. The practical impact of CYP2D6 phenotyping was presented in a case of a patient experiencing phenotyping shift with clinical manifestation due to drug interaction.

8. PUBLIKOVANÉ PRÁCE

Práce související s disertační prací

I. Původní vědecké publikace in extenso v časopisech s IF

1. Duricova J, Perinova I, Jurckova N, Kacirova I, Grundmann M. Clinically important interaction between metoprolol and propafenone. Can Fam Physician, přijato do tisku
2. Duricova J, Perinova I, Jurckova N, Jeziskova I, Kacirova I, Grundmann M. Cytochrome P450 2D6 phenotype and genotype in hypertensive patients on long-term therapy with metoprolol. Bratisl Lek Listy, přijato do tisku

II. Původní vědecké publikace in extenso v recenzovaných vědeckých časopisech

1. Peřinová I., Ďuricová J., Brozmanová H., Kacířová I., Grundmann M. Stanovení metoprololu a jeho metabolitu / α -hydroxymetoprololu v séru metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Čes slov Farm; 57: 254-259
2. Ďuricová J., Peřinová I., Kacířová I., Grundmann M. Comparison of metoprolol/ α -hydroxymetoprolol metabolic ratio after single dose and in steady state. Čes slov Farm 2010; 59: 222-22

III. Přehledné práce v recenzovaných vědeckých časopisech

1. Ďuricová J, Grundmann M. CYP2D6 a jeho klinický význam. Klinická farmakologie a farmacie 2007; 21: 133-136
2. Ďuricová J, Grundmann M. Beta-blokátory. Česká a slovenská farmacie 2009; 58: 60-66
3. Ďuricová J, Grundmann M. Význam genetického polymorfizmu enzymů cytochrómu P450, část I. Enzymový systém cytochrómu P450 a cytochróm P450 1A2. Čes slov Farm. 2011; 60 (3): 110-115
4. Ďuricová J, Grundmann M. Význam genetického polymorfizmu enzymů cytochrómu P450, část II. Cytochróm P450 2C9. Čes slov Farm. 2011; 60 (4): 165-170
5. Ďuricová J, Grundmann M. Význam genetického polymorfizmu enzymů cytochrómu P450, část III. Cytochróm P450 2C19. Čes slov Farm, 2011; 60 (5): 211-218
6. Ďuricová J, Grundmann M. Význam genetického polymorfizmu enzymů cytochrómu P450, část IV. Cytochróm P450 3A4 a 3A5. Čes slov Farm, přijato do tisku

IV. publikovaná abstrakta (pouze 1. autor)

1. Ďuricová J., Grundmann M. Možnosti fenotypizácie v klinickej medicíne. 8. konferencia klinickej farmakológie, 13. konferencia TDM a 10. konferencia DURG, České Budějovice 21. – 23. 9. 2006. Folia Phoenix 2006,11/suppl. 1
2. Ďuricová J., Brozmanová H., Grundmann M. Fenotypizácia CYP 2D6 a beta blokátory. 8. konferencia klinickej farmakológie, 13. konferencia TDM a 10. konferencia DURG, České Budějovice 21. – 23. 9. 2006. Folia Phoenix 2006,11/suppl. 1
3. Ďuricová J, Grundmann M. Možnosti fenotypizácie při dávkování léčiv. III. Česko-Slovenská konferencia klinickej farmakológie, IX. Česká konferencia klinickej farmakológie, XV. Slovenská konferencia klinickej farmakológie, XIV. Česká konferencia TDM a XI Česká konferencia DURG, Rožnov pod Radhoštěm 18.10. – 20.10.2007, zborník abstraktov, str. 22, ISBN 978-80-7368-333-7
4. Ďuricová J, Komzáková I, Kacířová I, Grundmann M. What blood sample time is the most suitable for the determination of metoprolol metabolic ratio? 58. Farmakologické dni, Praha 3.9. – 5.9.2008, Prague Medical Report 2008; 109: Suppl: 29-31
5. Duricova J, Jeziskova I, Perinova I, Kacirova I, Grundmann M. Comparison of CYP2D6 genotype and phenotype using metoprolol as a probe drug. X. Czech conference in clinical pharmacology, XV. Czech conference in TDM, XII. Czech conference DURG, Roznov pod Radhostem 16.10. – 18.10.2008, zborník abstraktov, str. 14, ISBN 978-80-7368-511-9
6. Duricova J, Perinova I, Kacirova I, Grundmann M. Use of metoprolol as a probe drug in CYP2D6 phenotypization. X. Czech conference in clinical pharmacology, XV. Czech conference in TDM, XII. Czech conference DURG, Roznov pod Radhostem 16.10. – 18.10.2008, zborník abstraktov, str. 14, ISBN 978-80-7368-511-9
7. Duricova J, Perinova I, Kacirova I, Grundmann M, Jeziskova I, Jurckova N. A discordance between P450 2D6 genotype and phenotype. 9th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics 12-15 July 2009, Edinburgh, UK, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2009; 105 (Suppl. 1), 75
8. Ďuricová J, Peřinová I, Ježíšková I, Jurčková N, Kacířová I, Grundmann M. Význam fenotypizácie P450 2D6 použitím metoprololu u hypertenzivných pacientov. Sympóziu klinické farmakologie 25.9.2009, Ostrava, sborník přednášek, str. 50, ISBN 978-80-7368-672-7
9. Ďuricová J., Peřinová I., Kacířová I., Grundmann M. Porovnanie metabolického pomeru

- metoprolol/ α -hydroxymetoprolol po jednorázovom a opakovanom užití. 12. konferencia klinickej farmakológie, 17. česká konferencia TDM a 14. česká konferencia DURG, České Budějovice 13. – 16. 10. 2010. Sborník abstrakt, str. 15, ISBN 978-80-7368-715-1
10. Ďuricová J, Grundmann M. Význam fenotypizácie a genotypizácie pri TDM. 12. konferencia klinickej farmakológie, 17. česká konferencia TDM a 14. česká konferencia DURG, České Budějovice 13. – 16. 10. 2010. Sborník abstrakt, str. 15, ISBN 978-80-7368-715-1
11. Duricova J, Perinova I, Jurckova N, Jeziskova I, Kacirova I, Grundmann M. Cytochrome P450 2D6 phenotype and genotype in hypertensive patients on long-term therapy with metoprolol. 5. česko-slovenská konference klinické farmakologie, 18. česká konference TDM, 15. česká konference DURG. Ostrava 4.5.-7.5.2011. Klinická farmakologie a farmacie 2011, 25 (Suppl. A): 27

V. přednášky/postery přednesené na veřejných odborných fórech (pouze 1. autor)

1. Ďuricová J., Grundmann M. Možnosti fenotypizácie v klinickej medicíne. 8. konferencia klinickej farmakológie, 13. konferencia TDM a 10. konferencia DURG, České Budějovice 21. – 23. 9. 2006. Folia Phoenix 2006,11/suppl. 1
2. Ďuricová J., Brozmanová H., Grundmann M. Fenotypizácia CYP 2D6 a beta blokátory. 8. konferencia klinickej farmakológie, 13. konferencia TDM a 10. konferencia DURG, České Budějovice 21. – 23. 9. 2006. Folia Phoenix 2006,11/suppl. 1
3. Ďuricová J, Grundmann M. Možnosti fenotypizácie při dávkování léčiv. III. Česko-Slovenská konferencia klinickej farmakológie, IX. Česká konferencia klinickej farmakológie, XV. Slovenská konferencia klinickej farmakológie, XIV. Česká konferencia TDM a XI Česká konferencia DURG, Rožnov pod Radhoštěm 18.10. – 20.10.2007, zborník abstraktov, str. 22, ISBN 978-80-7368-333-7
4. Ďuricová J, Komzáková I, Kacířová I, Grundmann M. What blood sample time is the most suitable for the determination of metoprolol metabolic ratio? 58. Farmakologické dni, Praha 3.9. – 5.9.2008, Prague Medical Report 2008; 109: Suppl: 29-31
5. Duricova J, Jeziskova I, Perinova I, Kacirova I, Grundmann M. Comparison of CYP2D6 genotype and phenotype using metoprolol as a probe drug. X. Czech conference in clinical pharmacology, XV. Czech conference in TDM, XII. Czech conference DURG, Rožnov pod Radhoštěm 16.10. – 18.10.2008, zborník abstraktov, str. 14, ISBN 978-80-7368-511-9

6. Duricova J, Perinova I, Kacirova I, Grundmann M. Use of metoprolol as a probe drug in CYP2D6 phenotypization. X. Czech conference in clinical pharmacology, XV. Czech conference in TDM, XII. Czech conference DURG, Roznov pod Radhostem 16.10. – 18.10.2008, zborník abstraktov, str. 14, ISBN 978-80-7368-511-9
7. Duricova J, Perinova I, Kacirova I, Grundmann M, Jeziskova I, Jurckova N. A discordance between P450 2D6 genotype and phenotype. 9th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics 12-15 July 2009, Edinburgh, UK, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2009; 105 (Suppl. 1), 75
8. Ďuricová J, Peřinová I, Ježířková I, Jurčková N, Kacířová I, Grundmann M. Význam fenotypizácie P450 2D6 použitím metoprololu u hypertenzivných pacientov. Sympóziu klinické farmakologie 25.9.2009, Ostrava, sborník přednášek, str. 50, ISBN 978-80-7368-672-7
9. Ďuricová J., Peřinová I., Kacířová I., Grundmann M. Porovnanie metabolického pomeru metoprolol/ α -hydroxymetoprolol po jednorázovom a opakovanom užití. 12. konferencia klinickej farmakológie, 17. česká konferencia TDM a 14. česká konferencia DURG, České Budějovice 13. – 16. 10. 2010. Sborník abstrakt, str. 15, ISBN 978-80-7368-715-1
10. Ďuricová J, Grundmann M. Význam fenotypizácie a genotypizácie pri TDM. 12. konferencia klinickej farmakológie, 17. česká konferencia TDM a 14. česká konferencia DURG, České Budějovice 13. – 16. 10. 2010. Sborník abstrakt, str. 15, ISBN 978-80-7368-715-1
11. Duricova J, Perinova I, Jurckova N, Jeziskova I, Kacirova I, Grundmann M. Cytochrome P450 2D6 phenotype and genotype in hypertensive patients on long-term therapy with metoprolol. 5. česko-slovenská konference klinické farmakologie, 18. česká konference TDM, 15. česká konference DURG. Ostrava 4.5.-.7.5.2011. Klinická farmakologie a farmacie 2011, 25 (Suppl. A): 27

Ostatní práce

I. Původní vědecké publikace in extenso v časopisech s IF

1. Toivanen M, Ryyänen A, Huttunen S, Duricová J, Riihinen K, Torronen R, Lapinjoki S, Tikkanen-Kaukanen C. Binding of *Neisseria meningitidis* Pili to Berry Polyphenolic Fraction. *J Agric Food Chem.* 2009; 57: 3120-3127
2. Toivanen M, Huttunen S, Duricová J, Soininen P, Laatikainen R, Loimaranta V, Haataja S, Finne J, Lapinjoki S, Tikkanen-Kaukanen C. Screening of binding activity of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus suis* to berries and juices. *Phytother Res.* 2010; 24: S95-S101

II. Přehledné práce v recenzovaných vědeckých časopisech

1. Ďuricová J, Grundmann M. Cytochróm P450 3A polymorfizmus a jeho význam pri terapii cyklosporínom a takrolimom u transplantovaných pacientov. *Česká a slovenská farmacie* 2007; 56: 220-224
2. Ďuricová, J., Dostálek, M. Lékové interakce na úrovni biotransformačních procesů u perorálních kontraceptiv. *Postgraduální medicína* 2010; 8: 912-914

III. publikovaná abstrakta (pouze 1. autor)

1. Ďuricová J., Grundmann M., Kořístková B., Brozmanová H., Komzáková I., Kacířová I. Phenotypization of carbamazepine in adults – CBZ-E/CBZ metabolic ratio. 8th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, Amsterdam 29.8. – 1.9. 2007. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2007; 101 (Suppl. 1), 79
2. Duricova J, Marsalkova P, Komzakova I, Brozmanova H, Grundmann M. Phenotypization of Cyclosporine A in stable renal transplant patients. Ehrlich II. 2nd World conference on magic bullets, Nürnberg, Germany 3.10. – 5.10.2008, www.ehrlich-2008.org/Abstractbook_2008
3. Ďuricová J., Brozmanová H., Peřinová I., Kacířová I., Grundmann M. Příčiny neočekávaných koncentrací u perorálně užívaných léčiv. 14. kongres nemocničných lékárníků, Hradec Králové, 12.11.-14.11.2010, Sborník abstrakt, str. 16, ISBN 978-80-254-8662-7
4. Ďuricová J., Brozmanová H., Peřinová I., Kacířová I., Grundmann M. Příčiny neočekávaných koncentrací aminoglykozidových a glykopeptidových antibiotik. XII. Symposium klinické farmacie René Macha, Mikulov 26.-27.11.2010, Sborník abstrakt,

str. 44-45, ISBN 978-80-254-7871-4

5. Duricova J, Kacirova I, Brozmanová H, Grundmann M. Drug-drug interaction between ketoconazole and cyclosporine A (a case report). 5. česko-slovenská konference klinické farmakologie, 18. česká konference TDM, 15. česká konference DURG. Ostrava 4.5.-7.5.2011. Klinická farmakologie a farmacie 2011, 25 (Suppl. A): 24

IV. přednášky/postery přednesené na veřejných odborných fórech (pouze 1. autor)

1. Ďuricová J., Grundmann M., Kořístková B., Brozmanová H., Komzáková I., Kacířová I. Phenotypization of carbamazepine in adults – CBZ-E/CBZ metabolic ratio. 8th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, Amsterdam 29.8. – 1.9. 2007. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2007; 101 (Suppl. 1), 79
2. Duricova J, Marsalkova P, Komzakova I, Brozmanova H, Grundmann M. Phenotypization of Cyclosporine A in stable renal transplant patients. Ehrlich II. 2nd World conference on magic bullets, Nürnberg, Germany 3.10. – 5.10.2008, www.ehrlich-2008.org/Abstractbook_2008
3. Ďuricová J, Grundmann M. Význam fenotypizácie a genotypizácie při TDM. Aktuální problematika terapeutického monitorování léčiv, Olomouc, 8.6.2010
4. Ďuricová J., Brozmanová H., Peřinová I., Kacířová I., Grundmann M. Příčiny neočekávaných koncentrací u perorálně užívaných léčiv. 14. kongres nemocničných lékárníků, Hradec Králové, 12.11.-14.11.2010, Sborník abstrakt, str. 16, ISBN 978-80-254-8662-7
5. Ďuricová J., Brozmanová H., Peřinová I., Kacířová I., Grundmann M. Příčiny neočekávaných koncentrací aminoglykozidových a glykopeptidových antibiotik. XII. Symposium klinické farmacie René Macha, Mikulov 26.-27.11.2010, Sborník abstrakt, str. 44-45, ISBN 978-80-254-7871-4
6. Duricova J, Kacirova I, Brozmanová H, Grundmann M. Drug-drug interaction between ketoconazole and cyclosporine A (a case report). 5. česko-slovenská konference klinické farmakologie, 18. česká konference TDM, 15. česká konference DURG. Ostrava 4.5.-7.5.2011. Klinická farmakologie a farmacie 2011, 25 (Suppl. A): 24