

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Studijní program: doktorský

Studijní obor: farmakologie a toxikologie



MUDr. Olga Matoušková

**Vliv genetické predispozice jedince na farmakokinetiku
a farmakodynamiku vybraných opioidů**

**The influence of individual genetic predisposition to the
pharmacokinetics and pharmacodynamics of chosen opioids**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: Prof. MUDr. František Perlík, Dr.Sc

PRAHA, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 9. srpna 2011
MUDr. Olga Matoušková

Identifikační záznam: MATOUŠKOVÁ, Olga. Vliv genetické predispozice jedince na farmakokinetiku a farmakodynamiku vybraných opioidů [The influence of individual genetic predisposition to the pharmacokinetics and pharmacodynamics of chosen opioids]. Praha, 2011. 76 s., 6 příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Farmakologický ústav. Školitel Perlík, František.

ABSTRAKT

Úvod: Cílem dizertační práce je studium vlivu polymorfismu CYP2D6 a MDR1 na farmakokinetiku a farmakodynamiku tramadolu u zdravých dobrovolníků s využitím pupilometrického měření. Sekundárním cílem je zhodnocení vztahu uvedených polymorfismů na analgetickou účinnost a nežádoucí účinky piritramidu u akutní pooperační bolesti.

Soubor a metody: Do dvou prospektivních prací studujících vliv genetické predispozice na farmakokinetické a farmakodynamické parametry tramadolu jsme zařadili celkem 90 zdravých dobrovolníků. Do klinických studií věnujících se opioidní analgezií a vlivu genetické predispozice na farmakoterapeutický efekt a výskyt nežádoucích účinků u pacientů s akutní pooperační bolestí jsme zahrnuli celkem 161 pacientů s akutní pooperační bolestí. Genotypizaci polymorfismu genu CYP2D6 a MDR1 jsme provedli pomocí PCR – RFLP analýzy, ke stanovení koncentrace tramadolu a jeho metabolitu jsme použili plynovou a kapalinovou chromatografii a farmakodynamický efekt opioidů jsme hodnotili pomocí pupilometrického měření a vizuální analogové škály.

Výsledky a závěr: Variabilita opioidního účinku je ovlivněna farmakogeneticky podmíněnými rozdíly v metabolismu vyvolanými polymorfismem genu CYP2D6 a modifikujícím působením efluxního transportéru P-glykoproteinu. Polymorfismus CYP2D6 lze spolehlivě fenotypovat zejména z poměru koncentrací pravotočivého ODT a pravotočivého tramadolu v séru 2,5 hodiny po podání léčiva a polymorfismus MDR1 ze součtu koncentrací pravotočivého a levotočivého ODT ze sběru moče za 2,5 hodiny po podání léčiva. Oba polymorfismy lze také fenotypovat pupilometrickým měřením. Variabilitu analgetického účinku opioidů a výskyt nežádoucích účinků u pacientů s akutní pooperační bolestí ovlivňuje polymorfismus genu CYP2D6 a MDR1.

Klíčová slova: tramadol, pupilometrie, CYP2D6, MDR1, piritramid, akutní pooperační bolest, nežádoucí účinek, toxikologická analýza

ABSTRACT

Introduction: The aim of this thesis is to study the influence of polymorphism of CYP2D6 and MDR1 on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tramadol in healthy volunteers using measurement. A secondary objective is to evaluate these polymorphisms in relation to the analgesic efficacy and side effects of piritramide for acute postoperative pain.

Materials and methods: In two prospective work studying the influence of genetic predisposition on the pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of tramadol, we included a total of 90 healthy volunteers. Clinical studies on opioid analgesia and influence of genetic predisposition to the pharmaco-therapeutic effects and side effects in patients with acute postoperative pain, we included a total of 161 patients with acute postoperative pain. Polymorphism genotyping CYP2D6 and MDR1 gene we performed PCR - RFLP analysis, to determine concentrations of tramadol and metabolite, we used gas and liquid chromatography and pharmacodynamic effects of opioids was evaluated by pupilometric measurement and visual analogue scale.

Results and conclusion: Variability of the opioid effect is influenced by pharmacogenetic differences in metabolism caused by CYP2D6 gene polymorphism and the modifying effect of the efflux transporter P-glycoprotein. Polymorphism of CYP2D6 phenotype can be reliably especially relative concentrations of the ODT and tramadol levels 2,5 hours after drug administration and MDR1 polymorphisms of the sum of concentrations of ODT of urine in 2,5 hours after drug administration. Both polymorphisms can phenotype also using pupilometric measurements. Variability of analgesic effect of opioids and incidence of side effects in patients with acute postoperative pain affects gene polymorphism of CYP2D6 and MDR1.

Key words: tramadol, pupilometry, CYP2D6, MDR1, piritramide, acute postoperative pain, side effects, toxicological analysis

OBSAH

| | |
|--|----|
| SOUHRN..... | 9 |
| SUMMARY..... | 11 |
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK..... | 13 |
| SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ..... | 14 |
| PODĚKOVÁNÍ..... | 15 |
| 1. ÚVOD..... | 16 |
| 1. 1. Opioidy..... | 16 |
| 1.1.1. Tramadol..... | 16 |
| 1.1.2. Piritramid..... | 17 |
| 1. 2. Cytochrom P450..... | 18 |
| 1. 2. 1.CYP2D6..... | 18 |
| 1. 3. MDR1..... | 19 |
| 1. 4. Metody hodnotící farmakodynamický účinek léků..... | 20 |
| 1. 4. 1. Pupilometrie..... | 21 |
| 1. 4. 2. Metody hodnotící bolest..... | 24 |
| 1. 5. Ovlivnění farmakokinetických a farmakodynamických parametrů opioidů genetickou predispozicí..... | 25 |
| 1. 5. 1. Polymorfismus genu CYP2D6..... | 25 |
| 1. 5. 2. Polymorfismus genu MDR1..... | 26 |
| 2. CÍL PRÁCE..... | 27 |
| 3. METODIKA..... | 27 |
| 3. 1. Souborů dobrovolníků a pacientů..... | 27 |
| 3. 1. 1. Vliv genetické predispozice na farmakokinetické a farmakodynamické parametry tramadolu u zdravých dobrovolníků – pilotní studie..... | 27 |
| 3. 1. 2. Vliv genetické predispozice na farmakokinetické a farmakodynamické parametry tramadolu u zdravých dobrovolníků – hlavní studie | 28 |
| 3. 1. 3. Posouzení významu opioidní analgezie v současné pooperační léčbě bolesti - pilotní klinická | 29 |
| 3. 1. 4. Vliv genetické predispozice na farmakoterapeutický efekt a výskyt nežádoucích účinků u pacientů s akutní pooperační bolestí - hlavní klinická..... | 29 |

| | |
|--|----|
| 3. 2. Genetická vyšetření..... | 30 |
| 3. 2. 1. Izolace DNA z krve..... | 30 |
| 3. 2. 2. Genotypizace 2D6..... | 31 |
| 3. 2. 3. Genotypizace MDR 1 (C3435T)..... | 32 |
| 3. 2. 4. Genotypizace MDR 1 (G2677T/A)..... | 33 |
| 3. 3. Chirální stanovení tramadolu a ODT..... | 33 |
| 3. 3. 1. Chirální stanovení tramadolu a ODT v séru..... | 33 |
| 3. 3. 2. Chirální stanovení tramadolu a ODT v moči..... | 34 |
| 3. 4. Metody hodnotící farmakodynamický účinek léků..... | 34 |
| 3. 4. 1. Pupilometrie..... | 34 |
| 3. 4. 2. VAS..... | 35 |
| 3. 5. Statistická analýza..... | 35 |
| 4. VÝSLEDKY..... | 36 |
| 4. 1. Vliv genetické predispozice na farmakokinetické a farmakodynamické parametry tramadolu u zdravých dobrovolníků – pilotní studie..... | 36 |
| 4. 2. Vliv genetické predispozice na farmakokinetické a farmakodynamické parametry tramadolu u zdravých dobrovolníků – hlavní studie | 37 |
| 4. 2. 1. Vliv polymorfismu genu CYP2D6..... | 37 |
| 4. 2. 1. 1. Vliv polymorfismu CYP2D6 na koncentraci tramadolu a ODT v séru..... | 37 |
| 4. 2. 1. 2. Vliv polymorfismu CYP2D6 na koncentraci tramadolu a ODT v moči..... | 49 |
| 4. 2. 2. Vliv polymorfismu genu MDR1..... | 41 |
| 4. 2. 2. 1. Vliv polymorfismu MDR na koncentraci tramadolu a ODT v séru..... | 41 |
| 4. 2. 2. 2. Vliv polymorfismu MDR na koncentraci tramadolu a ODT v moči..... | 42 |
| 4. 2. 3. Interakční vliv polymorfismu genů CYP2D6 a MDR1 C3435T na koncentrace tramadolu a ODT v séru a moči..... | 43 |
| 4. 2. 3. 1. Interakční vliv na koncentrace tramadolu a ODT v séru a moči při rozdělení na skupiny EM 3435CC, EM 3435CT/TT, IM3435 CC, IM 3435CT/TT a PM 3435CT/TT..... | 43 |
| 4. 2. 3. 2. Interakční vliv na koncentrace tramadolu a ODT v séru a moči hodnocen pomocí dvoucestné ANOVY..... | 45 |
| 4. 2. 4. Vliv polymorfismů genů CYP2D6 a MDR1 C3435T na změnu pilometrických parametrů po podání tramadolu..... | 47 |
| 4. 2. 4. 1. Pupilometrické parametry..... | 47 |
| 4. 2. 4. 2. Vliv polymorfismu CYP2D6 na změnu pupilometrických parametrů..... | 49 |

| | |
|---|----|
| 4. 2. 4. 3. Vliv polymorfismu MDR1 na změnu pupilometrických parametrů | 51 |
| 4. 2. 4. 4. Interakční vliv polymorfismů genů CYP2D6 a MDR1 C3435T na změnu pupilometrických parametrů..... | 53 |
| 4. 3. Posouzení významu opioidní analgezie v současné pooperační léčbě bolesti - pilotní klinická studie..... | 54 |
| 4. 4. Vliv genetické predispozice na farmakoterapeutický efekt a výskyt nežádoucích účinků u pacientů s akutní pooperační bolestí - hlavní klinická studie..... | 56 |
| 4. 4. 1. Vliv polymorfismu CYP2D6 na farmakoterapeutický efekt a výskyt nežádoucích účinků u pacientů s akutní pooperační bolestí..... | 56 |
| 4. 4. 2. Vliv polymorfismu MDR1 na farmakoterapeutický efekt a výskyt nežádoucích účinků u pacientů s akutní pooperační bolestí..... | 58 |
| 5. DISKUZE..... | 61 |
| 6. ZÁVĚR..... | 64 |
| 7. LITERATURA..... | 66 |
| 8. SEZNAM PŘÍLOH..... | 70 |
| PŘÍLOHA 1..... | 71 |
| PŘÍLOHA 2..... | 72 |
| PŘÍLOHA 3..... | 73 |
| PŘÍLOHA 4..... | 74 |
| PŘÍLOHA 5..... | 75 |
| PŘÍLOHA 6..... | 76 |

SOUHRN

Dizertační práce se převážně opírá o soubor prací uvedených v přehledu publikací. Popisuje vliv genetických dispozic jedince na farmakokinetiku a farmakodynamiku vybraných opioidních analgetik. Práce je složena ze tří částí: pilotní studie hodnotící vliv polymorfismu CYP2D6 a MDR1 na farmakokinetiku tramadolu, další část popisuje vliv genetické predispozice na koncentrace enantiomerů tramadolu a jeho metabolitu v séru a moči a poslední část hodnotí vliv genetického polymorfismu na farmakodynamiku vybraných opioidních analgetik a na jejich farmakoterapeutickou účinnost a výskyt nežádoucích účinků u pacientů s akutní pooperační bolestí.

V pilotní studii je popsána koncentrace tramadolu a O – desmethyltramadolu (ODT) v závislosti na genotypu CYP2D6 a MDR1 C3435T. Této studii se účastnilo 21 zdravých dobrovolníků. Enzym CYP2D6 biotransformuje pomocí O-demetylace tramadol na ODT, který je zodpovědný za analgetický účinek. U jedinců se sníženou aktivitou CYP2D6 dochází ke snížení tvorby ODT a nedostatečnému analgetickému efektu. Z tohoto důvodu je pro určení fenotypu polymorfního enzymu P450 CYP2D6 výhodné stanovit koncentrace tramadolu a ODT. Výsledky dobře korelovaly s genotypizací CYP2D6, u rychlých a středně rychlých metabolizátorů byly shledány nižší koncentrace tramadolu a vyšší koncentrace ODT než u pomalých metabolizátorů. Rozdíly v koncentracích tramadolu a ODT v závislosti na genotypu MDR1 C3435T byly pozorovány pouze u jedinců s deficitní funkcí CYP2D6.

V další části je popsán vliv polymorfismu genů CYP2D6 a MDR1 na koncentraci (+)-tramadolu, (-)-tramadolu, (+)-ODT a (-)-ODT v séru a moči. Mechanismus účinku každého enantiomeru se liší. (+)-tramadol inhibuje zpětné vychytávání serotoninu, (-)-tramadol inhibuje zpětné vychytávání noradrenalinu, (-)-ODT inhibuje zpětné vychytávání monoaminů a (+)-ODT je velmi silným agonistou opioidních receptorů. Farmakodynamický efekt byl posuzován pomocí pupilometrického měření, zde byla hodnocena velikost a počet miotických a mydriatických reakcí v závislosti na genotypu CYP2D6 a MDR1. Současně byla hodnocena citlivost jednotlivých pupilometrických parametrů. Zkoumaný soubor obsahoval 69 zdravých nepříbuzných dobrovolníků, z toho 31 mužů a 38 žen. Průměrný věk (\pm SD) u dobrovolníků byl 23,2 (\pm 4,9) roků a body mass index (\pm SD) byl 22,1 (\pm 2,7) kg/m². U všech dobrovolníků byla pomocí kapalinové a plynové chromatografie stanovena koncentrace obou enantiomerů tramadolu a ODT v séru i moči, genotypizace CYP2D6 a MDR1 C3435T pomocí

PCR – RFLP a bylo provedeno pupilometrické vyšetření. Výsledky analýz prokázaly vliv polymorfismu CYP2D6 na koncentrace tramadolu a ODT v séru a vliv polymorfismu CYP2D6 a MDR1 C3435T na koncentraci ODT v moči. Stejně tak je ovlivněna oběma polymorfismy zornicová reakce. Největší vliv na zornicovou reakci měly koncentrace pravotočivého ODT v séru.

Poslední část je věnována srovnání opioidních analgetik a nesteroidních protizánětlivých analgetik. Dále byl hodnocen vliv genetického polymorfismu na farmakodynamiku vybraných opioidních analgetik a na jejich farmakoterapeutickou účinnost a výskyt nežádoucích účinků u pacientů s akutní pooperační bolestí. První části této práce se účastnilo 105 pacientů, u kterých byla hodnocena bolest v pravidelných intervalech v akutním pooperačním období. Byl sledován lepší analgetický efekt u pacientů, kterým byl podán opioid. Následné studie, hodnotící vliv polymorfismu CYP2D6 a MDR1G2677T/A, se účastnilo 56 pacientů po chirurgickém odstranění přístřítých tělísek. U všech pacientů byl hodnocen analgetický efekt opioidů, výskyt nežádoucích účinků v pooperačním období a pomocí PCR – RFLP provedena genotypizace polymorfismu CYP2D6 a MDR1 G2677T/A. Z hlediska polymorfismu CYP2D6 byl pozorován lepší analgetický efekt a nižší výskyt nežádoucích účinků u pacientů s fenotypem EM, rozdíl mezi fenotypovými skupinami ve výskytu nežádoucích účinků však nebyl signifikantní. Z hlediska polymorfismu MDR1 jsme našli lepší analgetický efekt a nižší výskyt nežádoucích účinků u pacientů s genotypem 2677GG v porovnání s pacienty s variantní alelou.

Důvodem pro provádění výzkumu v této oblasti je skutečnost, že opioidy jsou pro svojí vysokou analgetickou účinnost velmi často podávaným léčivem. Optimální terapeutická účinnost a riziko vzniku nežádoucích účinků je pro jednotlivé pacienty variabilní. Jednou z příčin této variability je genetická predispozice jedince ovlivňující farmakokinetiku, analgetický efekt i výskyt nežádoucích účinků. Existuje několik kandidátních genů, jejichž polymorfismy jsou důvodem interindividuální variability. Jedním z nich je CYP2D6, podílející se na metabolismu většiny opioidů. Dalším z těchto polymorfismů je MDR1 gen, kódující P-glykoprotein, který je zodpovědný za eliminaci mnoha léků a xenobiotik. Objasnění vlivu genetické predispozice na variabilitu lékové odpovědi u opioidů může napomoci k výběru optimálního analgetika, predikci farmakoterapeutického účinku, případně prevenci vzniku nežádoucích účinků.

SUMMARY

This thesis relies mainly on the body of work contained in the inventory of publications. The influence of individual genetic predisposition to the pharmacokinetics and pharmacodynamics of chosen opioid analgesics are described. The thesis consists of three parts: pilot study evaluating the influence of CYP2D6 and MDR1 polymorphisms on pharmacokinetics of tramadol, another part describes the impact of genetic predisposition to concentrations of tramadol and its metabolites in plasma and urine and the last part assesses the impact of genetic polymorphisms on the pharmacodynamics of chosen opioid analgesics and their pharmaco-therapeutic efficacy and side effects in patients with acute postoperative pain.

In the pilot study is described concentrations of tramadol and O - desmethyltramadol (ODT), depending on the genotype of CYP2D6 and MDR1 C3435T. In this study was included 21 healthy volunteers. The lack of analgesic effect is caused by the decreased activity of CYP2D6. From this reason it was necessary to determine concentrations of both enantiomers for parent drug and ODT for phenotypization of polymorphic cytochrome P450 2D6. Phenotype results were compared with the results of genotypization, in extensive and intermediate metabolizers were found lower concentrations of tramadol and higher concentration of ODT than in poor metabolizers. Differences in concentrations of tramadol and ODT, depending on the C3435T MDR1 genotype was only observed in poor metabolizers.

The next part describes the influence of CYP2D6 polymorphism on the concentration and MDR1 (+)-tramadol, (-)-tramadol, (+)-ODT and (-)-ODT in plasma and urine. Each enantiomer displays different binding properties for various receptors: (+)-tramadol preferentially inhibits serotonin reuptake while (-)-tramadol mainly inhibits noradrenalin reuptake. (-)-ODT possesses potent monoamine reuptake inhibitory activity, (+)-ODT is a potent opioid receptor agonist. The pharmacodynamic effect was assessed by pupillometry, there was evaluated the size and amount of miotic and mydriatic responses depending on the genotype of CYP2D6 and MDR1. It was also evaluated the sensitivity of pupilometric parameters. In this study was included 69 healthy unrelated volunteers, 31 men and 38 women. Average age (\pm SD) in volunteers was 23.2 (\pm 4.9) years and body mass index (\pm SD) was 22.1 (\pm 2.7) kg/m². In all subjects, using liquid and gas chromatography, was performed concentrations of both enantiomers of tramadol and ODT in plasma and urine, genotyping CYP2D6 and

MDR1 C3435T was performed by PCR - RFLP and was made pupillometric measure. Results of analysis confirm the influence of CYP2D6 polymorphism on concentrations of tramadol and ODT in the plasma and the influence of polymorphism of CYP2D6 and MDR1 C3435T ODT concentration in urine. The pupil response is influenced by both these polymorphisms. The biggest influence on the pupil response had concentration of (+)-ODT.

The last part is devoted to a comparison of opioid analgesics and nonsteroidal anti-inflammatory analgesics. Also was evaluated the influence of genetic polymorphism on the pharmacodynamics of chosen opioid analgesics and their pharmacotherapeutic efficacy and side effects in patients with acute postoperative pain. 105 patients, whose was assessed pain at regular intervals in the acute postoperative period, was included in the first part of this thesis. The better analgesic effect was found in patients who received opioids. Subsequent studies that evaluated the impact of CYP2D6 polymorphism and MDR1G2677T / A participated in 56 patients after surgical removal of the parathyroid glands. All patients were evaluated the analgesic effect of opioid, side effects in the postoperative period, and by PCR - RFLP genotyping performed polymorphism of CYP2D6 and MDR1 G2677T / A. In light of CYP2D6 polymorphism has been observed a better analgesic effect and lower incidence of side effects in patients with EM phenotype, phenotypic difference between the groups in the incidence of side effects was not significant. In light of the MDR1 polymorphism was observed better analgesic effect and lower incidence of side effects in patients with genotype 2677GG in thr comparison with patients with the variant allele.

The reason for conducting research in this area is that the opioid analgesic are often administered drug for their high efficiency. The optimal therapeutic efficacy and the risk of side effects are currently unpredictable for individual patients. Genetic predisposition is one of the causes of variability in pharmacokinetics, analgesic effect and side effects. There are several candidate genes whose polymorphisms are the reason for the observed interindividual response to these drugs. One of them is CYP2D6 involved in metabolism of most opioids. Another of these polymorphisms is the MDR1 gene encoding P-glycoprotein, which is responsible for the elimination of many drugs and xenobiotics. Clarifying the impact of genetic predisposition to drug response may contribute to choose the optimal analgesic and predicting pharmacotherapeutic effects or prevent side effects.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- ATC - anatomicko – terapeutická – chemická klasifikace léčiv
- AUC - plocha pod křivkou sérových koncentrací
- CCD - kamera - charge coupled device – snímání obrazu v digitální podobě
- C_{max} - maximální koncentrace léčiva v séru
- CNS - centrální nervový systém
- CYP450 - cytochrom P - 450
- DDD - denní definovaná dávka
- EM - rychlí metabolizátoři – jedinci s normální metabolickou aktivitou
- FINAL - finální pupilometrický parametr
- GC - plynová chromatografie
- IM - středně rychlí metabolizátoři – jedinci se sníženou metabolickou aktivitou
- INIT - iniciální pupilometrický parametr
- MAO - monoaminoxydáza
- MDR1 - multidrug resistance protein 1 – transportér
- MIN - minimální pupilometrický parametr
- m/z - efektivní hmota iontu
- LC - kapalinová chromatografie
- ODT - O-desmetyltramadol
- PCR - polymerázová řetězová reakce
- PM - pomalí metabolizátoři - jedinci s deficitní metabolickou aktivitou
- R^2 (%) - hodnota popisující procentuální podíl hodnot vysvětlených efektem polymorfismu
- RA - reflexní amplituda, rozdíl iniciálního pupilometrického parametru a finálního pupilometrický parametr
- RFLP - určení genetického profilu pomocí délky restrikčních fragmentů
- SD - směrodatná odchylka
- SPID - součet rozdílů intenzity bolesti
- SS_{effect} - součet čtverců efektu od průměrů skupin
- SS_{error} - součet čtverců odchylek od průměrů skupin
- SSRI - selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
- TCA - tricyklická antidepresiva
- TTM - time to minimum, čas k dosažení minimálního parametru

SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

Sumární IF: 10,50

Tyto publikace jsou předmětem dizertační práce:

1. Matoušková, O., Slanař, O., Chytil, L., Perlík, F. (2010) Pupillometry in healthy volunteers as a biomarker of tramadol efficacy. *J Clin Pharm Ther.* **36**: 513-7. **IF (2009): 1,67**
2. Matoušková, O., Slanař, O., Chytil, L., Perlík, F. (2010) Pupilometrie jako bioindikátor účinku léčiv. *Čas Lék Česk* **149**: 66–68.
3. Matoušková, O., Slanař, O., Adámková, J., Pafko, P., Perlík, F., Adámek, S. (2011) Impact of MDR1 genetic polymorphisms on postoperative piritramide analgesia. *Bratisl Lek Listy.* **IF (2010): 0,37 (v tisku)**
4. Adámek, S., Matoušková, O., Pafko, P., Slanař, O., Perlík, F. (2010) The role of diclofenac and piritramide in the management of acute postoperative pain in hernioplasty: a retrospective study. *Bratisl Lek Listy* **111**: 616 – 618. **IF (2009): 0,35**
5. Chytil, L., Štícha, M., Matoušková, O., Perlík, F., Slanař, O. (2009) Enantiomeric determination of tramadol and O-desmethyltramadol in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**: 1937 – 1942. **IF (2009) 2,78**
6. Slanař, O., Nobilis, M., Květina, J., Matoušková, O., Idle, JR., Perlík, F. (2007) Pharmacokinetics of tramadol is affected by MDR1 polymorphism C3435T *Europ J Clin Pharmacol* **63**: 419 – 421. **IF (2006): 2,18**

Ostatní publikace:

1. Chytil L., Matoušková, O., Černá, O., Pokorná, P., Vobruba, V., Perlík, F., Slanař, O. (2010) Enantiomeric determination of tramadol and O-desmethyltramadol in human plasma by fast liquid chromatographic technique coupled with mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**: 481 – 486. **IF (2009): 2,78**
2. Nespešná, L., Štícha, M., Matoušková, O., Perlík, F., Slanař, O. (2011) Stanovení nabumetonu a kyseliny 6-methoxy-2-naftyloctové v plasmě pomocí HPLC s UV a MS detekcí. *Česka Slov Farm.* **60**: 17-24
3. Slanař, O., Dupal, P., Matoušková, O., Vondráčková, H., Pafko, P., Perlík, F., (2011) Tramadol efficacy in patients with postoperative pain in relation to CYP2D6 and MDR1 polymorphisms *Bratisl Lek Listy.* **IF (2010): 0,37 (v tisku)**
4. Žourková, A., Slanař, O., Juřica, J., Večeřová, M., Matoušková, O., (2011) Polymorfismus genu MDR1 a výskyt sexuálních poruch při dlouhodobé léčbě paroxetinem *Psychiatrie*, **15**: 48-48

PODĚKOVÁNÍ

Především bych chtěla poděkovat svému školiteli Prof. MUDr. Františku Perlíkovi, DrSc. za odborné rady, laskavou pomoc a vedení během postgraduálního studia i při vzniku této dizertační práce.

Dále děkuji přednostovi Farmakologického ústavu 1. LF UK Doc. MUDr. Ondřeji Slanařovi Ph. D. za poskytnuté konzultace a všestrannou podporu mé činnosti. Mé další poděkování patří i Ing. Lukáši Chytilovi, Ph. D. z Ústavu soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN za provedené chemické analýzy, které jsem použila pro farmakokinetickou část práce. Za spolupráci při statistickém hodnocení děkuji pracovní skupině RNDr. Jaromíra Běláčka, CSc. z Ústavu biofyziky a informatiky 1. LF UK. Za přátelské prostředí a pochopení děkuji též svým spolupracovníkům z Farmakologického ústavu 1. LF UK.

Srdečné poděkování za podporu a trpělivost patří i mým blízkým.

1. ÚVOD

Úvodní část se věnuje vybraným opioidům a to především tramadolu a piritramidu a polymorfismům genů CYP2D6 a MDR1. Dále popisuje metody hodnotící farmakodynamický účinek léků i současné poznání vztahu genetické predispozice a farmakokinetiky i farmakodynamiky opioidů.

1. 1. Opioidy

Opioidní analgetika působí především v CNS, v oblastech, ve kterých dochází k transmissi a modulaci bolestivých impulsů: v míše, thalamu, periakveduktální šedé hmotě, hypotalamu, retikulární formaci, mozkové kůře, ale i v periférních tkáních, na periférních nociceptorech. Místem jejich periférního působení je rovněž intramurální nervová pleteň, která reguluje gastrointestinální motilitu. Uvedená místa jsou bohatě zásobená neurony obsahující endogenní opioidní peptidy. Souběžně se zde vyskytují specifické receptory, na které se vážou nejen endogenní opioidní peptidy, ale také exogenně podaná opioidní analgetika.

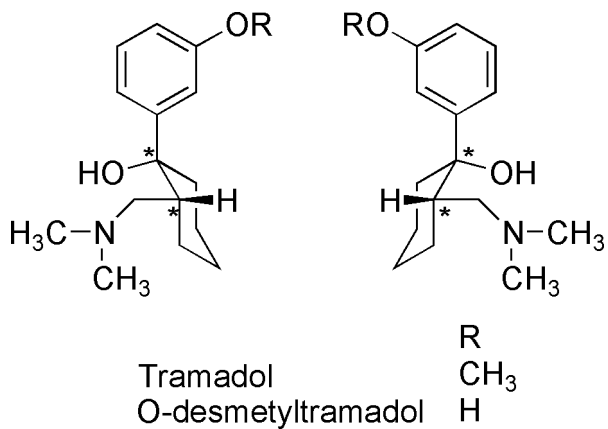
1. 1. 1. Tramadol

Tramadol je představitelem tzv. atypických opioidních analgetik s afinitou k μ -, δ - a κ -opioidních receptorů s vyšší afinitou k μ -receptorům, používá se k léčbě střední až středně těžké bolesti. Na jeho analgetickém působení se také podílejí neopioidní mechanismy, především blokáda zpětného vychytávání noradrenalinu a serotoninu do nervových zakončení, čímž dochází k aktivaci descendentních inhibičních drah. Jeho analgetický účinek je asi 6krát nižší než u morfinu. Délka účinku je 4 - 6 hodin. Výskyt nežádoucích účinků je po terapeutických dávkách velmi malý, prakticky nevyvolává obstipaci a netlumí dýchání. Riziko vzniku lékové závislosti je mizivé. Výhodou je možnost perorální aplikace. Tramadol v současnosti patří mezi nejpoužívanější centrálně působící analgetika (Lincová et al., 2007).

Po perorálním podání se absorbuje více než 90% tramadolu. Průměrná absolutní biologická dostupnost je přibližně 70%. First-pass efekt po perorálním podání je maximálně 30%. Metabolismus tramadolu u lidí je poměrně komplikovaný. Dochází ke vzniku 11 nekonjugovaných a 12 konjugovaných metabolitů. Nejdůležitější je N- a O-demetylace mateřské látky, která probíhá v játrech cestou cytochromu P450 pomocí enzymu CYP 2D6. Genetický polymorfismus cytochromu CYP2D6, jeho

indukce i inhibice může výrazně ovlivnit koncentrace tramadolu nebo jeho účinného metabolitu. Druhým důležitým metabolickým procesem je konjugace O-demetylovaného metabolitu s kyselinou glukuronovou. Farmakologicky aktivní je pouze O-desmetyltramadol. Strukturální vzorec tramadolu a O – desmetyltramadolu je znázorněn na obrázku 1. U metabolitů existují velké kvantitativní rozdíly mezi jednotlivci. Tramadol a jeho metabolity jsou téměř kompletně vylučovány ledvinami. Eliminační poločas je u mateřské látky i u jeho metabolitu (-)-ODT v rozmezí 5,4 - 9,6 hod, u pacientů s renální nebo hepatální insuficiencí může být 2 – 3 krát delší. Tramadol prostupuje hematoencefalickou bariérou a placentární bariérou a má v terapeutickém dávkovém rozmezí lineární farmakokinetický profil. Vztah mezi sérovými koncentracemi a analgetickým účinkem je závislý na dávce. Obvykle jsou účinné sérové koncentrace 100 - 300 ng/ml.

Obr. 1 Strukturální vzorec tramadolu a O – desmetyltramadolu



1. 1. 2. Piritramid

Má analgetické účinky srovnatelné s morfinem, ale působí déle. Piritramid je derivátem difenylpropylpiperidinu, vyznačuje se centrálním analgetickým účinkem. Analgezie je podmíněna aktivací míšních opioidních μ -receptorů a ve vyšších centrech pro vnímání bolesti v thalamu a mozkové kůře. Tím se zvyšuje práh pro vnímání bolesti. Klinickými studiemi byl potvrzen rychlý nástup účinku: po intravenózním podání nastává analgezie již do 1-2 minut, po intramuskulárním nebo subkutánním podání

nastává analgezie do 15-30 minut a působí značně dlouho. Výskyt nežádoucích účinků je nižší než u morfinu. Vyvolává v menší míře dechový útlum i zvracení. K biotransformaci piritramidu dochází především v játrech. Struktura jeho metabolitů nebyla doposud přesně určena. Po intramuskulárním podání je dosaženo vrcholové plazmatické hladiny po 15 minutách. Piritramid je vylučován zejména stolicí, bez závislosti na funkci ledvin.

1. 2. Cytochrom P450

Pojmem cytochrom P450 je označena velká skupina (superfamilie) enzymů obsahujících ve své molekule hem. Jméno je odvozeno od charakteristické vlastnosti enzymů (izoforem) této nadrodiny, kterou je UV absorpční maximum při 450 nm pokud jsou v komplexu s oxidem uhelnatým.

Fylogeneticky se jedná o velmi starý systém, který je konkrétními enzymy zastoupen u všech žijících organismů. Velké množství objevených genů si vynutilo zavedení jednotné nomenklatury založené na shodě sekvencí aminokyselin v proteinovém řetězci jednotlivých izoforem. Cytochrom P450 se dělí na rodiny (40% shoda sekvencí), podrodiny (55% shoda) a na konkrétní enzymy. Označení konkrétního enzymu z rodiny P450 se tedy skládá s předpony CYP, následované arabskou číslicí označující rodinu, velkým písmenem pro podrodinu a dalším arabským písmenem pro označení konkrétního enzymu např. CYP3A4.

V lidském genomu se doposud podařilo identifikovat 64 genů pro různé izoformy CYP, které lze zařadit do 18 rodin a 43 podrodin. Až na výjimky jsou všechny exprimovány převážně v játrech dále pak v tenkém střevě, plicích, mozku, ledvinách a v kůži. Exprimované produkty těchto genů - enzymy, představují nejdůležitější systém I. fáze biotransformace endo- (např. steroidy, žlučové kyseliny, mastné kyseliny, prostaglandiny, leukotrieny, biogenní aminy) ale především exogenních látek. Tomu odpovídá i značně převažující exprese izoforem zapojených do metabolismu xenobiotik. Pro metabolismus léčiv jsou významné především CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 a CYP1A2.

1. 2. 1. CYP2D6

V organismu se CYP2D6 nachází především v játrech ale i v mozku, plicích a GIT. Kvantitativně je málo zastoupen, v metabolismu léčiv je však po CYP3A4 druhým

nejvýznamnějším enzymem. Účastní se rovněž eliminace karcinogenů a aktivace prokarcinogenů (Mičuda et al., 2004). Exprese tohoto cytochromu vykazuje nejvýraznější genetický polymorfismus vůbec. Příčinou je lokalizace genetického základu na dlouhém raménku 22. chromozomu v blízkosti lokusů kódujících protilátky. Tato oblast je geneticky nestabilní se silnou tendencí rychle reagovat na měnící se podmínky zevního prostředí. Dochází k nahromadění mutací s následnou alterací exprese enzymu. Kromě polymorfismů podmiňujících zpomalení metabolismu nebo úplnou absenci funkčního cytochromu (asi 7% bělochů), jejich metabolismus je pomalý a jsou schopni biotransformovat méně látky v porovnání se zbytkem populace. Vznikají i poměrně výjimečné defekty (amplifikace) genomu, které vedou k urychlení metabolismu, což vede ke schopnosti metabolizovat podstatně větší množství léku. Na změnu aktivity enzymu CYP 2D6 má největší vliv přítomnost mutací v alelách CYP2D6*3*4*5*6 (<http://www.cypalleles.ki.se/>).

Substráty CYP2D6 jsou léčiva ze skupiny antiarytmik, antidepressiv, neuroleptik a β – blokátorů. Význam určení fenotypu genu CYP2D6 pro farmakoterapii popisuje ve svých studiích řada autorů (Slanař et al., 2007, Juřica et al., 2010).

1. 3. MDR1

Podkladem interindividuálních rozdílů v účinku léků bývá polymorfismus transformačních enzymů, transportních systémů zajišťujících osud léků v organismu i receptorů, enzymů či signálních molekul ovlivňujících vlastní účinek léčiva (Bultas, 2010). P–glykoprotein je efluxní transmembránová pumpa, která má významnou roli v absorpci, distribuci a eliminaci řady léčiv a je důležitým obranným mechanismem před vstupem xenobiotik do organismu. Gen MDR 1 je lokalizován na dlouhém raménku chromozómu 7q21-21.1. Molekulární mechanismus funkce P–glykoproteinu, není stále ještě přesně jasný, ačkoli existuje řada teorií a modelů o funkci P–glykoproteinu. V roce 1988 byl jako první popsán model pumpy, ve kterém specifická vazebná místa rozeznávají své substráty, které jsou pak pumpovány přímo přes cytoplazmatickou membránu za využití energie uvolněné při hydrolýze ATP.

P–glykoprotein hraje významnou roli v ochraně organismu před vstupem xenobiotik do organismu a zároveň napomáhá jejich eliminaci. Přenašeč je strategicky situován v epitelálních buňkách orgánů podílejících se na absorpci a distribuci látek, jako jsou enterocyty, buňky hematoencefalické a testikulární bariéry a také v lokalizacích s čistě

exkretční funkcí – v kanalikulární membráně hepatocytů, na apikální straně epitelových buněk žlučových kanálků a renálního proximálního tubulu. P-glykoprotein je mimo jiné součástí procesu distribuce a transportu některých endogenních látek v organismu. Pro P-glykoprotein je typické, v porovnání s ostatními transportéry, že s ním interaguje velké množství látek, často chemicky i funkčně odlišných. Patří sem kromě mnoha xenobiotik nejen léčiva z různých farmakoterapeutických skupin, ale i endogenní hormony a jiné látky. Pro většinu substrátů je typické, že jsou hydrofobní nebo amfifilní povahy. P-glykoprotein méně často přenáší i některé neutrální (např. digoxin) nebo i negativně nabitě molekuly (např. atorvastatin), dokonce i molekuly hydrofilní povahy, jako je metotrexát. V genu MDR 1 je popisován vysoký výskyt bodových polymorfismů, neboli záměn jedné báze na specifickém místě genu za jinou. Bylo jich zaznamenáno více než 50. Polymorfismy byly popsány na úrovni DNA v pozicích G2995A v exonu 24 (Hoffmeyer et al., 2000) nebo na pozici G2677T/A a C3435T v exonu 21 a v exonu 26 (Penna et al., 2010). Polymorfismus v exonu 26 mění intenzitu exprese proteinu v duodenu a tím ovlivňuje absorpci svých substrátů a jejich plazmatické koncentrace, které jsou u jedinců homozygotních pro alelu T několikanásobně vyšší. Další výskyt bodové mutace byl nalezen v exonu 12 na pozici C1236T (Bellusci et al., 2010) nebo na pozici G1199A v exonu 11, tato záměna mění funkci proteinu změnou náboje (Gréen et al., 2008). Podobně jako v případě polymorfismů jiných genů existují výrazné mezirasové rozdíly ve frekvenci výskytu polymorfismů MDR 1. Například pro C3435T je frekvence C/C a T/T v bělošské populaci srovnatelná, přibližně 25%, zatímco v africké populaci je frekvence T/T genotypu pouze 6%. V současné době není stanovení genotypu MDR1 běžnou rutinní metodikou, ale probíhá jen na úrovni výzkumu.

1. 4. Metody hodnotící farmakodynamický účinek léků

Metod hodnotících farmakodynamický účinek léků je velké množství. Tato kapitola se věnuje pupilometrickému měření a metodám hodnotící analgetický účinek opioidů.

1. 4. 1. Pupilometrie

Pupilometrie a hodnocení velikosti zornice je tradiční součástí studia účinku léčiv, zejména jejich vlivu na vegetativní nervový systém (Slanař et al., 2004). Dále je pupilometrie široce využívána v akutní medicíně k hodnocení stupně bezvědomí pacienta, k hodnocení odpovědi organismu při léčbě bolesti nebo při diagnostice poruch spánku. Cholinergní stimulace vyvolává miózu způsobenou kontrakcí m. sphincter pupillae, adrenergní stimulace působí mydriázu vyvolanou kontrakcí m. dilatator pupillae. Sfinkter, jehož vliv na výsledný průměr zornic je větší ve srovnání s dilatátorem, je aktivován zvýšenou stimulací Edinger – Westfalova jádra prostřednictvím drah parasymptatiku a jeho antagonista dilatátor je aktivován drahou sympatiku začínající v hypotalamu. Regulace Edinger – Westfalova jádra podléhá ipsilaterálním i kontralaterálním stimulačním impulsům z pretektálních oblastí a z okcipitálního laloku. Jeho inhibiční inervace je součástí centrálního noradrenergního systému. Reflexní reakce zornic na osvětlení oka je primárně způsobená sníženou stimulací parasymptatiku z pretektálních oblastí. Díky překřížení části vláken optického nervu v chiasmatu je vyjádřena reflexní reakce na osvit kontralaterálního oka, která by mohla interferovat s pupilometrickým výsledkem.

Dilatace pupil jako reflexní reakce na bolestivý stimulus nebo hluk je mediována nejen sympatickou inervací, ale také synergistickým působením inhibičních centrálních noradrenergních drah na Edinger – Westfalova jádra. V něm se integrují kortikální a subkortikální impulsy pro pupilární systém a jsou hlavním regulačním systémem pro změnu průměru zornic na světelné podněty. Tonus hladkých svalů, které regulují průměr zornic, může být ovlivněn léčivými interferujícími s vedením cholinergních nebo noradrenergních impulsů na centrální i lokální úrovni a některé látky účinkují též přímým působením na buňky efektorových svalů oka (Slanař et al., 2005). Typickými léčivými, výrazně působícími na průměr zornic, jsou látky se sympatomimetickým a sympatolytickým účinkem, jejich přehled je uveden v tabulce 1.

Tab. 1 Přehled léčiv ovlivňujících průměr zornic

| Výsledný efekt na zornici | Převažující mechanismus působení | Příklady |
|----------------------------------|---|--|
| mióza | sympatolytický | α - adrenergní blokátory (fentolamin, tolazolin) |
| | | nikotin |
| | | celková sedativní narkotika |
| | parasymptomimetický | histamin |
| | | prostaglandiny |
| | | agonisté cholinergních receptorů (muskarin, pilokarpin) |
| | | inhibitory acetylcholinesterázy (neostigmin aj.) |
| | mydriáza | sympatomimetický |
| psychostimulantia | | |
| parasympatolytický | | blokátory cholinergního receptoru (atropin, chlorpromazin, skopolamin) |
| | | inhibitory pre – a post – gangliárních zakončení nervových zakončení (botulotoxin) |
| | | klonidin |

Využití pupilometrie při hodnocení léčiv řeší celá řada prací, některé jsou uvedeny v tabulce 2. Pupilometry sestávají ze speciálně upravené CCD kamery snímající ze standardní vzdálenosti od oka zornici nasvícenou infračerveným světlem z diod. Kamery umožňují snímat dynamiku změny průměru zornice v průběhu volitelného času. Pupilometrické přístroje jsou dále vybaveny též diodami s viditelným emitovaným světlem, jejichž zábleskem je možno vyvolat reflexní reakci na osvit. Intenzitu infračervených i osvitových diod je možno nastavovat stejně jako délku světelného záblesku při měření světelného reflexu. Parametry, které je možné sledovat, jsou průměr zornice na počátku měření. Latence reakce na osvit, amplituda a rychlost vyvolané konstriktce a čas redilatace. Pupilometry mohou být jak v nepřenosné, tak i v přenosné verzi.

Tab. 2 Příklady využití pupilometrie při hodnocení léčiv

| Hodnocení účinku | Látka | Citace |
|---------------------------------|----------------------------------|---|
| opioidní působení | tramadol, buprenorfin, kodein | Collart et al., 1993 Knags et al., 2004 Slanař et al., 2006 |
| bdělost a stav vědomí | amfetamin, kofein | Ghodse et al., 1999 |
| stupeň závislosti a euforie | morfin, heroin | Lanier et al., 2007 Murillo et al., 2004 |
| sedativní účinky | diazepam histamin | Taylor et al., 2003 Boev et al., 2005 |
| serotoninergní působení | TCA SSRI | Baer et al., 2004 Noehr-Jensen et al., 2009 |
| deficit acetylcholinu a demence | alkohol | Boettcher et al., 2005 |

Důležitým předpokladem pro správnou léčbu bolesti je hodnocení intenzity bolesti. Hodnocení zahrnuje i fyzikální vyšetření se zaměřením na fyziologické a behaviorální odpovědi na bolest a probíhá metodou algometrie (dolormetrie), která zahrnuje verbální i neverbální hodnocení – škály.

1. 4. 2. Metody hodnotící bolest

VAS (Visual Analog Scale) – vizuální analogová škála – je nejčastěji používaná, má více modifikací: vertikální nebo horizontální. Podává informaci pouze o **intenzitě** bolesti. Horizontální VAS představuje 100 mm dlouhou úsečku, kde bod vlevo představuje žádnou bolest a bod vpravo nejvyšší intenzitu dosud prožité bolesti

NRS (Numerical Rating Scale) – je číselnou variantou VAS, využívá úsečku s číselnými hodnotami od 0 do 10, přičemž 0 označuje žádnou bolest a 10 nesnesitelnou bolest

Wonk – Bakerova škála bolestivé tváře – slouží k orientačnímu hodnocení bolesti u malých dětí podle grimasování a afektivních výrazů obrázku obličeje

Mapy bolesti – registrace bolestivých míst (oblastí) podle Margolese, kdy pacient do mapy bolesti zakreslí oblasti, kde pociťuje bolest barevně, přičemž červená barva je palčivá bolest, modrá je bolest všeobecně, žlutá je tupá nebo bodavá bolest, zelená je svíravá, křečovitá bolest

VDS (Verbal Description Scale) – slovně popisná škála, může být ve více stupních. Vyšší počet stupňů zvyšuje citlivost hodnocení. Nejčastější jsou stupnice 0 – 3 (žádná bolest – mírná – středně silná – silná) a 0 – 5 (žádná bolest – mírná – středně silná – silná – krutá – nesnesitelná)

MPQ (McGill Pain Questionnaire) – McGillský dotazník bolesti – 78 popisujících výrazů, používá se při hodnocení mnoha dimenzí bolesti, především neuropatické. Pro jeho náročnost se používá spíše zkrácená verze – SF-MPQ (Short Form McGill Pain Questionnaire), vytvořená stejným autorem Melzackem – 15 popisných výrazů (například bolest tepavá, vystřelující, bodavá, tupá, pálivá, ostrá, křečovitá atd.)

Flow Sheet – tj. průběžný záznam, kdy pacient, rodina, nebo sestra zaznamenává intenzitu bolesti a reakce na intervence i nežádoucí účinky v čase. Je důležité, aby se po

celou dobu hodnocení bolesti s pacientem používala stejná metoda hodnocení, která bude vyhovovat potřebám pacienta v dané době (Rokyta et al., 2006).

1. 5. Ovlivnění farmakokinetických a farmakodynamických parametrů opioidů genetickou predispozicí

Následující kapitoly popisují současné poznání vztahu polymorfismu genů CYP2D6 a MDR1 k farmakokinetice i farmakodynamice opioidů.

1. 5. 1. Polymorfismus genu CYP2D6

Tramadol je podáván ve formě dvou enantiomerů tramadolu (+) - a (-)-tramadol. Obě tyto formy tramadolu jsou metabolizovány především N- a O-demetylací a konjugací O-demetylovaných produktů s kyselinou glukuronovou. Pouze ODT je farmakologicky aktivní. Enzym odpovědný za O-demetylací je CYP2D6, který vede k tvorbě (+)-ODT a (-)-ODT, tyto metabolity jsou z hlediska klinického významu nejdůležitější. Biotransformace tramadolu je proto závislá na fenotypu CYP2D6. Dopad fenotypu CYP2D6 na farmakokinetiku tramadolu je srovnatelný po jednorázovém perorálním, opakovaném perorálním a intravenózní aplikaci zobrazující významné farmakokinetické rozdíly mezi fenotypy EM a PM v koncentracích (+)-tramadol, (-)-tramadol, (+)- ODT a (-)-ODT. (+)-ODT má přibližně 70 - krát vyšší afinitu k μ -opioidním receptorům než (-)-ODT a je prokázáno, že právě tento metabolit je zodpovědný za analgetický i miotický účinek tramadolu. Sérové koncentrace (+)-ODT v PM jsou velmi nízké, téměř nulové, což je důsledek deficitní aktivity CYP 2D6 u těchto jedinců. Koncentrace obou enantiomerů tramadolu, průměrné plochy pod křivkami sérových koncentrací i hodnoty pro perorální clearance jsou signifikantně vyšší o 75% u jedinců s fenotypem PM než u fenotypu EM. Naopak průměrné hodnoty AUC hodnoty (+)-ODT a (-)-ODT byly 4,33-a 0,89-krát vyšší u jedinců s fenotypem EM v porovnání s fenotypem PM. Signifikanční rozdíl v závislosti na fenotypu CYP2D6 byl pozorován i u koncentrací tramadolu a ODT v moči. Halling et al., 2008 shledal 14x vyšší poměr koncentrací ODT a tramadolu u jedinců s fenotypem EM než u fenotypu PM.

Chronická opioidní léčba je u vybraných a pravidelně sledovaných pacientů s chronickou bolestí účinným farmakoterapeutickým postupem. Nicméně opioidní léčba s sebou může nést celou řadu závažných nežádoucích účinků (Leštíanský et al., 2010). Negativní dopad funkčně nedostatečné varianty CYP2D6 na analgetický účinek léku

byl popsán v mnoha experimentálních modelech bolesti u zdravých dobrovolníků (Poulsen et al., 1996), stejně tak u pacientů, u nichž bylo indikováno podání tramadolu (Stamer et al., 2003). Velmi nízká analgetická aktivita tramadolu u jedinců s fenotypem PM je zprostředkována přes non-opioidní monoaminergní cesty. Polymorfismus CYP2D6 ovlivňuje i spotřebu morfinu a kodeinu u pacientů s pomalým metabolismem (Kummer et al., 2011). Jiné práce zdůrazňují nutnost rozvoje individuálního přístupu k pacientům s nocicepční bolestí, neuropatickou bolestí a depresí a souvislost polymorfismu CYP2D6 s výskytem nežádoucích účinků po podání opioidů (Rauers et al., 2010, Leppert et al., 2010). Jiné práce popisují vliv tohoto polymorfismu na metabolismus opioidů a možnost predikce toxického účinku (Johansson et al., 2011).

Při využití pupilometrie k určení fenotypu CYP2D6 po podání tramadolu byla pozorována výrazně vyšší miotická reakce u pacientů s fenotypem EM a to jak ve statických, tak i v dynamických pupilometrických parametrech (Fliegert et al., 2005, Slanař et al., 2006). Práce dokazují korelaci pupilometrie s farmakokinetikou i farmakodynamikou tramadolu. Tyto výsledky potvrdil ve své studii Slanař et al., 2007. U jedinců s fenotypem EM pozoroval trojnásobně vyšší pupilární konstriktu než u jedinců s fenotypem PM. K podobnému závěru dospěli i jiní autoři, kteří ve své práci pozorovali rozšíření zornic po podání tramadolu u jedinců s fenotypem PM (např. Nielsen et al., 2010). Předpokládá se, že účinek tramadolu a ODT na pupilární průměr je antagonistický. Mateřská látka sama o sobě generuje mydriatickou reakci, zatímco ODT vyvolává pupilární konstriktu přes centrální stimulaci μ -opioidních receptorů (Freye et al., 2000, Knaggs et al., 2004).

1. 5. 2. Polymorfismus genu MDR1

Individuální variabilita lékové odpovědi a složitost metabolismu opioidů naznačují, že příčinou by mohl být i jiný genetický polymorfismus než CYP2D6. Opiody jsou mimo jiné substrátem P-glykoproteinu a pravděpodobně polymorfismus genu MDR1 přispívá k jejich různým centrálním účinkům (Wandel et al., 2002). Vliv tohoto polymorfismu byl popsán již dříve v souvislosti se zvýšenou koncentrací morfinu v mozku myši, u nichž byla funkce P-glykoproteinu inhibována (Thompson et al., 2000). Další práce pozorovali vyšší koncentraci morfinu v krvi u pacientů s genotypem 3435TT (Klepstad et al., 2005). Ve studii, které se zúčastnilo 74 pacientů po operaci tlustého střeva byl pozorován nižší výskyt nežádoucích účinků morfinu u pacientů s genotypem 2677GG-3435CC (Coulbault et al., 2006). Výsledky byly potvrzeny o dva roky později, byl

popsán menší výskyt ospalosti, zmatenosti a halucinací u pacientů léčených morfinem s genotypem 2677GG (Ross et al., 2008). Této studii se zúčastnilo 228 onkologických pacientů. Souvislost farmakokinetiky, biologické dostupnosti a následně zjištěných rozdílů v úlevě od bolesti s polymorfismem genu MDR1 pozorovali i jiní autoři (Campa et al., 2008). V případě tramadolu poskytly klinické studie řadu nejasných a rozporuplných výsledků týkajících se značné variability ve farmakokinetice i farmakodynamice. I v tomto případě se předpokládá, že příčinou by vedle známého polymorfismu CYP2D6 mohl být i polymorfismus MDR 1. Tento vliv byl popsán i v naší studii (Slanař et al., 2007), v které byl pozorován mírně stoupající trend v koncentracích tramadolu v séru shodně v souvislosti se stoupajícím počtem T alel. Pupilometrické měření je jednou z možností, jak vztah těchto dvou polymorfismů objasnit.

2. CÍL PRÁCE

Cílem dizertační práce je studium vlivu polymorfismu CYP2D6 a MDR1 na farmakokinetiku a farmakodynamiku tramadolu u zdravých dobrovolníků s využitím pupilometrického měření. Sekundárním cílem je zhodnocení vztahu uvedených polymorfismů na analgetickou účinnost a nežádoucí účinky piritramidu u akutní pooperační bolesti.

3. METODIKA

Tato část popisuje stručně metodiku použitou v dizertační práci, další detaily jsou uvedeny v příložených publikacích.

3. 1. Souborů dobrovolníků a pacientů

Následující řádky popisují design studií a soubory zdravých dobrovolníků a pacientů.

3.1.1. Vliv genetické predispozice na farmakokinetické a farmakodynamické parametry tramadolu u zdravých dobrovolníků – pilotní studie

Naší pilotní studie se zúčastnilo 21 zdravých nepříbuzných dobrovolníků. Klinické hodnocení bylo realizováno po souhlasu Etické komise VFN v Praze a po podepsání informovaného souhlasu. Dobrý zdravotní stav byl potvrzen fyzikálním vyšetřením a rutinním laboratorním vyšetřením jater a ledvin. Měsíc před vyšetřením neužívali

dobrovolníci žádné léky s výjimkou žen s dlouhodobou hormonální antikoncepcí. Do souboru byli zařazeni pouze nekuřáci s maximální spotřebou alkoholu do 15g/den u žen a 30g/den u mužů. Dobrovolníkům byl podán tramadol (Tramal Retard 100mg por. tbl. Zentiva Praha a.s.) perorálně. Lék byl podáván ve 150 ml vody v 8 hodin ráno po desetihodinovém lačnění. Odběr krve byl proveden v 0., 2,5., 4., 8., 12. a 24. hodině po podání léku. Z krevních vzorků byly pomocí kapalinové chromatografie stanoveny koncentrace tramadolu a ODT a pomocí PCR – RFLP metody byl stanoven genotyp CYP2D6 a MDR1 C3435T a G2677T/A.

3.1.2. Vliv genetické predispozice na farmakokinetické a farmakodynamické parametry tramadolu u zdravých dobrovolníků – hlavní studie

Druhé studie se celkem zúčastnilo 69 zdravých nepříbuzných dobrovolníků (z toho 31 mužů a 38 žen). Klinické hodnocení bylo realizováno po souhlasu Etické komise VFN v Praze a po podepsání informovaného souhlasu. Tato studie byla provedena v souladu s Helsinskou deklarácí. Průměrný věk (\pm SD) u dobrovolníků byl 23,2 (\pm 4,9) roků a body mass index (\pm SD) byl 22,1 (\pm 2,7) kg/m². Dobrý zdravotní stav byl potvrzen fyzikálním vyšetřením a rutinním laboratorním vyšetřením jater a ledvin. Měsíc před vyšetřením neužívali dobrovolníci žádné léky s výjimkou žen s dlouhodobou hormonální antikoncepcí. Do souboru byli zařazeni pouze nekuřáci s maximální spotřebou alkoholu do 15g/den u žen a 30g/den u mužů. Subjekty s očním onemocněním, které by bránilo pupilometrickému vyšetření, nebyli do studie zařazeni. Dobrovolníkům byl podán tramadol kapky (Tramal por. gtt. sol., Gruenthal GmbH, Aachen, SRN) perorálně ve standardní dávce 0,7 mg/kg, průměrná dávka na jednotlivce byla 48,2 mg. Lék byl podáván ve 150 ml vody v 8 hodin ráno po desetihodinovém lačnění. Pupilometrická vyšetření byla provedena před podáním léku a 2,5 hodiny po jeho aplikaci. Bezprostředně po druhém pupilometrickém měření byla dobrovolníkům odebrána krev a moč na genetické vyšetření a stanovení koncentrace tramadolu a ODT. V této části studie jsou koncentrace tramadolu a ODT uvedeny v ng/ml. Pro převod na jednotku mol lze použít následný vzorec:

$$\frac{\text{molární hmotnost } \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}{\text{množství látky (g)}} : 100 \text{ (mol)}$$

Molární hmotnost tramadolu je 263 g/mol, ODT 249 g/mol.

3. 1. 3. Posouzení významu opioidní analgezie v současné pooperační léčbě bolesti - pilotní klinická studie

V úvodní části této studie jsme hodnotili vliv prvního aplikovaného analgetika na průběh léčby pooperační bolesti (Adámek et al., 2010). Do této studie bylo zařazeno 105 pacientů, u kterých byla indikována plastika tříselné kýly podle Lichtensteina, byli operováni v roce 2009 v celkové anestezii. Do studie byli zařazeni pouze pacienti, kteří neužívali nesteroidní analgetika nebo opioidy v uplynulém jednom týdnu před plánovaným výkonem. Pro premedikaci byl použit diazepam perorálně. Celková anestezie byla provedena na základě kombinace propofolu a sufentanylu. Intenzita pooperační bolesti byla hodnocena pomocí VAS před podáním léků proti bolesti a 1 hodinu po jeho podání. Do studie byli zařazeni pouze pacienti s počáteční intenzitou bolesti větší než 40 mm. Pooperační bolest byla léčena podáním diklofenaku (Dolmina 75 mg, inj., Sol. Zentiva, im) nebo piritramidu (Dipidolor 15 mg, inj., Sol, Janssen-Cilag s. r. o., i. m.). Od hodnoty získané z VAS, jsme vypočítali úlevu od bolesti (rozdíl mezi hodnotou před podáním a hodnota po uplynutí jedné hodiny po podání) v absolutních číslech i v procentech. Pacienti byli rozděleni na ty, kterým byl podán jako první piritramid a na druhou skupinu, které byl jako první podán diklofenak. Samostatně jsme hodnotili pacienty, kteří byli bez bolesti jednu hodinu po první aplikaci analgetika. ATC / DDD metodika byla použita k posouzení spotřeby léčiv. Údaje jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka.

3. 1. 4. Vliv genetické predispozice na farmakoterapeutický efekt a výskyt nežádoucích účinků u pacientů s akutní pooperační bolestí - hlavní klinická studie

V další fázi této studie jsme studovali vliv polymorfismu MDR1 G2677T/A na pooperační bolest, která byla léčena opioidním analgetikem piritramidem (Matoušková et al., 2011). Tato část je doplněna hodnocením vlivu polymorfismu CYP2D6 na farmakoterapii bolesti a výskyt nežádoucích účinků. Do prospektivní studie bylo zahrnuto 56 pacientů s primární hyperparatyreózou, u kterých bylo indikováno chirurgické odstranění příštítných tělísek. Všichni pacienti podepsali před operací informovaný souhlas. Studie byla schválena místní etickou komisí a byla provedena v souladu s Helsinskou deklarácí. Mezi důvody pro vyloučení ze studie

patřily závažné nemoci jater a ledvin, deprese, úzkosti, epilepsie, alergie na opioidy a podání nesteroidních analgetik nebo opioidů jeden týden před operací. Odběr krve pro izolaci DNA byl proveden během předoperačního biochemického vyšetření.

Všichni pacienti podstoupili operaci v celkové anestezii na navozenou kombinací propofolu a sufentanylu. Pro premedikaci byl podán diazepam perorálně. Po návratu z operačního sálu, byl podáván po celou dobu studie pouze piritramid (Dipidolor 15 mg. Inj. Sol. Janssen-Cilag s. r. o.). Analgetikum bylo podáno intramuskulárně na vyžádání v dávce 15 mg pro jednu aplikaci. Pacienti s počáteční bolestí menší než 40 mm nebyli zahrnuti do této studie. Intenzita bolesti byla hodnocena pomocí VAS a to 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 a 24 hodinu po operaci. Byly vypočítány rozdíly mezi intenzitou bolesti před aplikací analgetika a jednu hodinu po aplikaci. Tyto hodnoty byly použity pro výpočet součtu rozdílů intenzity bolesti (SPID), pro výpočet maximálního rozdílu v intenzitě bolesti a dále byl vypočítán počet respondentů s více než 50% snížení bolesti na VAS ve srovnání s výchozí hodnotou. Dále byl hodnocen výskyt nežádoucích účinků (nauzea, bolest hlavy, zvracení, sedace a závratě).

3. 2. Genetická vyšetření

Mezi použitá genetická vyšetření jsme zahrnuli genotypizaci genu CYP2D6 a MDR1.

3. 2. 1. Izolace DNA z krve

Vzorky periferní žilní krve byly odebrány do jednorázových odběrných zkumavek s přídavkem K₂EDTA které byly zmrazeny a uchovávány při – 20°C do dalšího zpracování. Izolace DNA probíhala podle postupu kitu DNA – QIAmp Blood Mini Kitu. Do označených mikrozkušavek bylo postupně nanášeno 20µl QIAGEN proteázy, 200µl krve a 200µl pufru AL. Obsah mikrozkušavek byl důkladně promíchán na vortexu a následně byl inkubován ve vodní lázni po dobu 10 minut při 56°C. Po ukončení inkubace bylo ke směsi přidáno 200 µl 96 % vychlazeného ethanolu, následně byl celý objem krátce zamíchán na vortexu, poté byl pipetou přenesen do plastové soupravy QIAmp Minin Column s filtrem a centrifugován 1 minutu při 8000 otáčkách za minutu. Po přefiltrování celého objemu byl filtr vložen do nové spodní nádoby – (Collection Tube), filtrát již dále nebyl používán. Na filtr bylo nanášeno 500 µl pufru AW1 a celá sestava byla centrifugována při 8000 otáčkách za minutu po dobu 1 minuty. Opět byl filtr vložen do nové mikrozkušavky a filtrát byl znehodnocen. Na

filtr bylo nanášeno 500 µl pufru AW2 a celý objem byl centrifugován po dobu 6 minut při 14000 otáčkách za minutu. Do nové popsané mikroskopavky byl vložen filtr a na něj bylo nanášeno 200 µl pufru AE, celá směs se nechala po dobu 6 minut odstát při pokojové teplotě. Mikroskopavka s filtrem byla centrifugována po dobu 1 minuty při 8000 otáčkách za minutu, nyní byl znehodnocen filtr. Finální DNA ve filtrátu v mikroskopavce byla uschována v lednici při - 4 °C.

3. 2. 2. Genotypizace CYP2D6

Genotypizace CYP2D6*3, *4, *5 a *6 byla provedena pomocí PCR – RFLP analýzy podle popsané metodiky (Buzková et al., 2008). PCR reakce probíhala v termocykleru podle tohoto popisu: iniciální denaturace (94 °C, 2 minuty), následovalo 35 cyklů denaturace (94 °C, 20 sekund), navázání primerů (57 °C, 70 sekund) a dokončení (68 °C, 7 minut). Celá reakce probíhala v reakční směsi obsahující 100 ng genomické DNA, 0,240 mM primerů (P100/P200), viz tabulka 3, 1 LA PCR buffer (Top-Bio s.r.o., Praha, Česká republika), 500 mM dNTPs (Fermentas, Litva), 1,7 mM MgCl₂ (Top-Bio sro Praha, Česká republika) a 1,5 jednotek LA polymerázy MIX (Top-Bio s.r.o., Praha, Česká republika). Následující PCR reakce sestávala z následujícího programu: iniciální denaturace (94 °C, 2 minuty), poté se opakovalo 25 cyklů – denaturace (94 °C, 30 sekund), annealing (60 °C, 40 sekund) a dokončení (72 °C, 7 minut). Byla použita reakční směs obsahující 1 µl zředěného LA-PCR produktu z předchozí společné reakce, PCR pufr (Fermentas, Litva), 1,2 mM MgCl₂ (Fermentas, Litva), 200mM dNTPs (Fermentas, Litva), primery (P51/D2 pro CYP2D6 * 3 a P * 3/P2 pro CYP2D6 * 4 a * 6) a 0, 75 jednotek Tag polymerázy (Fermentas, Litva). PCR produkty byly inkubovány 12 hodin s BSA AI (New England Biolabs USA) pro CYP2D6 * Bst 3 nebo NI (New England Biolabs USA) pro CYP2D6 * 4, * 6 při teplotě 37 °C a 60 °C, resp. Výsledné fragmenty byly rozděleny na 3 % agarózovém Top vision gelu (Fermentas, Litva), ten byl následně obarven ethidiumbromidem a detekován pod UV lampou. Přítomnost genu duplikace a CYP2D6 *5 byla identifikována pomocí primerů Cyp17/Cyp32 a P13/P24/P81, resp. Ostatní podmínky byly totožné s výše uvedenými podmínkami. Fragmenty byly detekovány na 1% agarózovém gelu.

Tab. 3 Oligonukleotidové primery pro analýzu CYP 2D6 varianty alely 8-10

| Označení primeru | Nukleotidová sekvence |
|------------------|---|
| P100 | 5' - GGC CTA CCC TGG GTA AGG GCC TGG AGC AGG A- 3' |
| P200 | 5' - CTC AGC CTG AAC GTA CCC CTG TCT CAA ATC CG- 3' |
| p*3 | 5' -CCT GGG CAA GAA GTC GCT GGA CCA G - 3' |
| P2 | 5' - GAG ACT CCT CGG TCT CTC G -3' |
| P51 | 5' - GCT GGG GCC TGA GAC TT- 3' |
| D2 | 5' -GGC TGG GTC CCA GGT CAT AC- 3' |
| Cyp17 | 5' -TCC CCC ACT GAC CCA ACT CT- 3' |
| Cyp32 | 5' -CAC GTG CAG GGC ACC TAG AT- 3' |
| P13 | 5' -ACC GGG CAC CTG TAC TCC TCA- 3' |
| P24 | 5' -GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C3' |
| P81 | 5' -CGT CTA GTG GGG AGA CAA AC- 3' |

3. 2. 3. Genotypizace MDR 1 (C3435T)

Genotypizace C3435T byla provedena pomocí PCR – RFLP analýzy (polymerázové řetězové reakce a následná restrikce PCR produktů restrikčními endonuklázami, podle popsané metodiky (Pechandová et al., 2006). PCR reakce probíhala v termocycleru podle tohoto popisu: iniciální denaturace (94 °C, 2 minuty), následovalo 35 cyklů denaturace (94 °C, 20 sekund), annealing (60 °C, 120 sekund) a dokončení (72 °C, 7 minut). Byla použita reakční směs obsahující 2 µl DNA, PCR pufr (Fermentas, Litva), 1,2 mM MgCl₂ (Fermentas, Litva), 200mM dNTPs (Fermentas, Litva), primery MDR – 11 a MDR – 12, nukleotidová sekvence je uvedena v tabulce 4, a 0, 75 jednotek Tag polymerázy (Fermentas, Litva). PCR produkt byl inkubován 12 hodin s Bsp 1431 (New England Biolabs USA) při teplotě 37 °C. Výsledné fragmenty byly rozděleny na 3, 5 % agarózovém Top vision gelu (Fermentas, Litva), ten byl následně obarven ethidiumbromidem a detekován pod UV lampou.

Tab. 4 Oligonukleotidové primery pro analýzu C3435T

| Označení primeru | Nukleotidová sekvence |
|------------------|---------------------------------|
| MDR – 11 | 5' – TGTTTTTCAGCTGCTTGATGG – 3' |
| MDR – 12 | 5' – AAGGCATGTATGTTGGCCTC – 3' |

3. 2. 4. Genotypizace MDR 1 (G2677T/A)

Genotypizace pro G2677T/A polymorfismus v genu MDR1 byl proveden pomocí PCR - RFLP analýzy, stejně jako genotypizace pro C3435T. Rozdílná byla pouze doba nasedání primerů (1 minuta při 60 °C pro G2677T a 45 sekund při 60 °C pro G2677A). Nukleotidovou sekvenci popisuje tabulka 5.

Tab. 5 Oligonukleotidové primery pro analýzu G2677T/A

| Označení primeru | Nukleotidová sekvence |
|------------------|--------------------------------|
| MDR – 9 | 5'– TGCAGGCTATAGGTTCCAGG – 3' |
| MDR – 10 | 5'– GTTTGACTCACCTTCCCAG – 3' |
| MDR – 10A | 5'– TTTAGTTTGACTCACCTTCCC – 3' |

3. 3. Chirální stanovení tramadolu a ODT

Separace a kvantifikace enantiomerů tramadolu a ODT byla provedena dvěma různými analytickými metodami, které na našem pracovišti zavedl Ing. Lukáš Chytil, Ph.D. (Chytil et al., 2009, 2010). K analýze v moči bylo použito chirální GC-MS, zatímco analýza v séru byla, vzhledem k nižším koncentracím, prováděna pomocí citlivé LC-MS/MS metody.

3. 3. 1. Chirální stanovení tramadolu a ODT v séru

Pro stanovení koncentrace enantiomerů tramadolu a jeho primárního metabolitu ODT byla použita kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS). Tramadol-(13) C, D (3) byl použit jako izotopově značený vnitřní standard pro kvantifikaci. Izolace stanovovaných látek spočívala v jednoduché extrakci na pevné fázi. Separace byla provedena na chirálně selektivní koloně (chirální selektor: celulóza modifikovaná chlorovaným metylkarbamátem), při izokratické eluci směsí hexanem/isopropanol/dietylamin (90:10:0.1, v / v / v) a při průtoku mobilní fáze 1,3 ml/min. Detekce analytů byla provedena pomocí chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) s pozitivní ionizací. Všechny analyty a vnitřní standard byly snímány v módu multiple reaction monitoring: m/z 264,2→58,2 pro tramadol, m/z 250,1→58,2

pro ODT a m/z 264,2→58,2 pro vnitřní standard. Kalibrace byla lineární v rozsahu 1 - 800 ng / ml a 1 - 400 ng / ml ($R^2 \geq 0,999$) pro oba enantiomery tramadolu a ODT. Správnost metody byla v rozsahu 94,2-109,1% pro všechny analyty v celém rozsahu kalibrace.

3. 3. 2. Chirální stanovení tramadolu a ODT v moči

Pro stanovení stereoselektivity tramadolu a jeho farmakologicky aktivního metabolitu I. fáze, O-desmetyltramadolu, v lidské moči byla použita metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Jako vnitřní standard byl použit nefopam. Metoda zahrnovala jednoduchou extrakci na pevné fázi, která předcházela chirální chromatografii na β cyklodextrinové chirální koloně s hmotnostní detekcí, operující v módu SIM (tramadol: m/z 263; 58, ODT: m/z 249; 58, a nefopam: m/z 179; 58). Kalibrační křivky byly lineární v koncentračním rozmezí 0,1-20 mg/ml ($R^2 \geq 0,998$). Správnost metody byla v rozsahu 95,2-105,7% pro všechny analyty v celém rozsahu kalibrace.

3. 4. Metody hodnotící farmakodynamický účinek léků

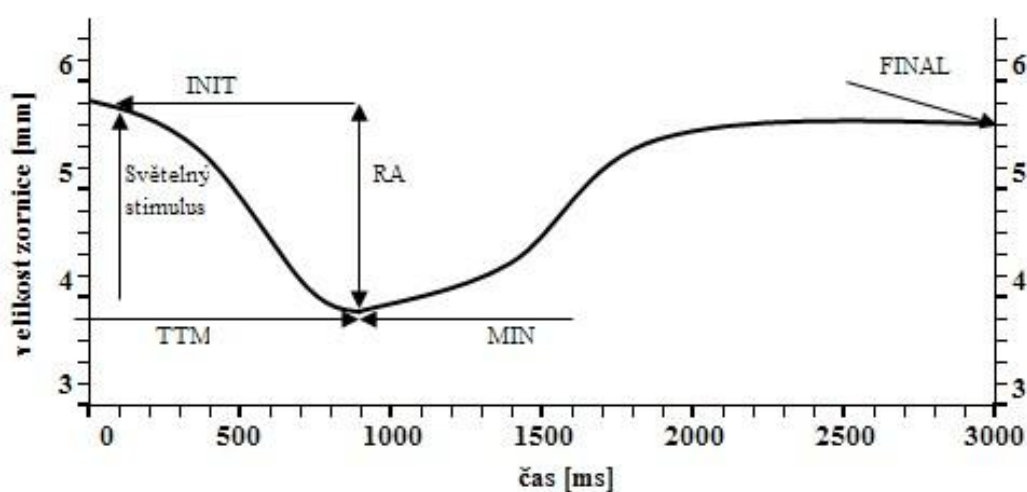
Farmakodynamický účinek tramadolu jsme hodnotili pomocí pupilometrického měření, farmakoterapeutický účinek piritramidu i dalších analgetik pomocí VAS.

3. 4. 1. Pupilometrie

Infračervená pupilometrie byla provedena pomocí komerčně vyrobeného Pupilscau II^(TM) v zatemněné, tiché a přiměřeně temperované místnosti. Pouze byly mírně otevřeny dveře na chodbu, pro zajištění minimálního množství světla v místnosti (přibližně 3 luxy). Po pětiminutové adaptaci na tmou bylo provedeno pupilometrické vyšetření nejprve vpravo a bezprostředně poté vlevo. Měření probíhalo vždy před podáním a 2,5 hodiny po podání léčiva. Měřili jsme statické a světelným zábleskem vyvolané dynamické parametry. Mezi statické pupilometrické parametry se řadí iniciální průměr zornice (INIT), měřený před světelným zábleskem. K dynamickým pupilometrickým parametrům, měřeným po dobu 3 sekund, patří minimální průměr v průběhu zornicové reakce (MIN), konečný průměr zornic po redilataci (FINAL) a doba, za kterou došlo k dosažení minimálního průměru zornic (TTM – time to minimum). Dále byl vypočítán

rozdíl mezi hodnotou INIT a MIN (parametr RA – reflexní amplituda). Hodnocené pupilometrické parametry a jejich rozměry jsou znázorněny na obrázku 2.

Obr. 2 Pupilometrické parametry. INIT – iniciální pupilometrický parametr, MIN – minimální pupilometrický parametr, FINAL – finální pupilometrický parametr, RA – reflexní amplituda, rozdíl iniciálního pupilometrického parametru a finálního pupilometrický parametr, TTM – time to minimum, čas k dosažení minimálního parametru



3. 4. 2. VAS

Metoda hodnocení VAS jsem popsala v úvodní části dizertační práce.

3. 5. Statistická analýza

Statistická signifikance rozdílů pupilometrických parametrů a hodnot koncentrací tramadolu a ODT a jejich vzájemných poměrů rozdělených podle příslušnosti k jednotlivým fenotypovým skupinám, byla testována Wilcoxonovým a Kruscal – Wallisovým testem pro závislé výběry na 5 % hladině významnosti a pomocí χ^2 – testu. Interakční vliv polymorfismu CYP2D6 a MDR1 C3435T popisuje parametr R^2 , který byl získán použitím dvoucestné ANOVY.

$$R^2 = \frac{SS_{\text{effect}}}{SS_{\text{effect}} + SS_{\text{error}}} (\%)$$

SS_{effect} – součet čtverců efektu od průměrů skupin

SS_{error} – součet čtverců odchylek od průměrů skupin

Rozdíly hodnot pupilometrických parametrů naměřených před podáním a po podání léčiva byly testovány pomocí párového neparametrického testu.

Spotřeba analgetik a intenzita bolesti mezi jednotlivými skupinami rozdělených podle polymorfismu CYP2D6 a MDR1 byla hodnocena pomocí Mann-Whitney a Wilcoxonova testu pro dvě závislé proměnné. Dále byl použit χ^2 – test pro srovnání počtu respondentů a non-responderů. Rozdíly byly považovány za statisticky významné při $p < 0,05$.

4. VÝSLEDKY

Následující kapitola shrnuje výsledky z prací uvedených v příloze.

4.1. Vliv genetické predispozice na farmakokinetické a farmakodynamické parametry tramadolu u zdravých dobrovolníků – pilotní studie

První prací, která se zabývala vlivem polymorfismu CYP2D6 a MDR1 C3435T na farmakokinetiku tramadolu byla studie, které se zúčastnilo 21 dobrovolníků vybraných z naší databáze (Slanař et al., 2007). Průměrná (SD) C_{max} koncentrace tramadolu byla 495,4 (91,1), 529,3 (161,7) a 600,2 (179,9) nmol / l v 3435CC, 3435CT a 3435TT skupinách, resp. Odpovídající hodnoty pro AUC_{0-24} v jednotlivých skupinách byly 7,393.9 (2,299.1), 7,710.1 (3,304.7), a 8,478.8 (3,771.0) nmol · h / l. Rozdíly však nedosáhly úrovně statistické významnosti. Podobný trend nebyl pozorován u ODT. Největší vliv MDR1 C3435T na koncentrace tramadolu a ODT byl pozorován u dobrovolníků s fenotypem PM v rámci polymorfismu CYP2D6. U této skupiny dobrovolníků byl shledán signifikantní rozdíl mezi skupinami 3435CC/CT a 3435TT u C_{max} tramadolu. Průměrná (SD) C_{max} koncentrace tramadolu byla 631,4 (126,0) a 867,8 (6,0) nmol/l ve skupinách 3435CC/CT a 3435TT ($p = 0,04$), resp. Odpovídající hodnoty pro AUC_{0-24} v těchto skupinách byly 10266,7 (2514,5) a 14738,4 (2138,6) nmol · h / l. ($p = \text{ns}$). Vliv polymorfismus G2677T/A na koncentrace tramadolu a ODT nebyl prokázán.

4.2. Vliv genetické predispozice na farmakokinetické a farmakodynamické parametry tramadolu u zdravých dobrovolníků – hlavní studie

Dalším krokem naší práce bylo studium vlivu polymorfismu CYP2D6 a MDR1 C3435T na koncentraci tramadolu a ODT v séru a v moči.

4. 2. 1. Vliv polymorfismu genu CYP2D6

Tato kapitola je rozdělena na 2 podkapitoly, které hodnotí vliv polymorfismu genu CYP2D6 na koncentraci tramadolu a ODT v séru a v moči.

4. 2. 1. 1. Vliv polymorfismu CYP2D6 na koncentraci tramadolu a ODT v séru

U skupiny dobrovolníků s fenotypem EM byla průměrná hladina tramadolu (SD) 2,5 hodiny po podání tramadolu 99,77 (29,47), u IM 130,01 (24,67) a u PM 174,40 (22,42) ng/ml. Průměrné hladiny ODT (SD) byly u skupiny dobrovolníků s fenotypem EM 21,49 (6,65), u IM 16,18 (7,00) a u PM 6,64 (2,58). Tabulka 6 popisuje jednotlivé koncentrace [+] -T, [-] -T, [+] -ODT, [-] -ODT a následně poměry mezi tramadolem a ODT v závislosti na fenotypu jedince. Rozdíly mezi skupinami rozdělených podle polymorfismu CYP2D6 byly signifikantní u všech hodnot koncentrací i jejich vzájemných poměrů.

Vysoce statisticky významně se tento polymorfismus projevil u metabolického poměru [+] -ODT/[+] -T ($p = 1,8 \cdot 10^{-8}$) a dále pak u poměru součtů [+] -ODT+[-] -ODT a [+] -T+[-] -T ($p = 4,1 \cdot 10^{-8}$).

Tab. 6 Vliv polymorfismu CYP2D6 na koncentrace tramadolu a ODT v séru (průměr ± SD) 2,5 hodiny po podání

| | EM (n=32) ng/ml | IM (n=27) ng/ml | PM (n=6) ng/ml | p | R² |
|---|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------|----------------------|
| [+]-T | 51,20 ± 15,10 | 69,36 ± 13,31 | 88,32 ± 11,59 | p < 0,01 | 41,8% |
| [-]-T | 46,47 ± 14,28 | 46,47 ± 14,28 | 81,48 ± 12,79 | p < 0,01 | 42,1% |
| [+]-ODT | 10,23 ± 3,17 | 7,31 ± 3,61 | 2,33 ± 0,63 | p < 0,01 | 35,7% |
| [-]-ODT | 10,23 ± 3,68 | 8,30 ± 3,24 | 4,61 ± 1,92 | p < 0,01 | 25,6% |
| [+]-ODT/[+]-T | 0,21 ± 0,10 | 0,11 ± 0,05 | 0,02 ± 0,01 | p < 0,01 | 38,9% |
| [-]-ODT/[-]-T | 0,25 ± 0,12 | 0,14 ± 0,06 | 0,05 ± 0,03 | p < 0,01 | 33,1% |
| [+]-ODT+[-]-ODT | 21,46 ± 6,65 | 16,18 ± 7,00 | 6,64 ± 2,58 | p < 0,01 | 31,7% |
| [+]-T+[-]-T | 99,77 ± 29,47 | 130,01 ± 24,67 | 174,40 ± 22,42 | p < 0,01 | 42,5% |
| [+]-ODT+[-]-ODT/ [+]-T+[-]-T | 0,23 ± 0,11 | 0,12 ± 0,05 | 0,03 ± 0,01 | p < 0,01 | 36,2% |

R² – procentuální podíl hodnot vysvětlených efektem polymorfismu, získaný použitím dvoucestné ANOVY.

p – signifikantní rozdíl mezi skupinami EM, IM a PM.

4. 2. 1. 2. Vliv polymorfismu CYP2D6 na koncentraci tramadolu a ODT v moči

U skupiny dobrovolníků s fenotypem EM byla průměrná hladina tramadolu (SD) 5,58 (4,89), u IM 10,99 (11,63) a u PM 5,44 (3,68) ng/ml. Průměrné hladiny ODT (SD) byly u skupiny dobrovolníků s fenotypem EM 7,45 (5,73), u IM 5,30 (3,26) a u PM 0,69 (0,52) ng/ml. Tabulka 7 popisuje jednotlivé koncentrace [+] -T, [-] -T, [+] -ODT, [-] -ODT a následně poměry mezi tramadolem a ODT v závislosti na fenotypu jedince.

Rozdíly mezi skupinami rozdělených podle polymorfismu CYP2D6 byly signifikantní u většiny hodnot koncentrací i jejich vzájemných poměrů. Vysoce statisticky významně se tento polymorfismus projevil u součtu [+] -ODT + [-] -ODT ($p = 0,5 \cdot 10^{-8}$).

Tab. 7 Vliv polymorfismu CYP2D6 na koncentrace tramadolu a ODT ze sběru moče (průměr ± SD) za 2,5 hodiny po podání

| | EM (n=32) ng/ml | IM (n=27) ng/ml | PM (n=6) ng/ml | p | R² |
|---|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------|----------------------|
| [+]-T | 2,91 ± 2,53 | 5,81 ± 6,30 | 2,74 ± 1,76 | ns | 9,8% |
| [-]-T | 2,66 ± 2,35 | 5,17 ± 5,33 | 2,68 ± 1,91 | ns | 9,6% |
| [+]-ODT | 3,04 ± 2,34 | 2,01 ± 1,31 | 0,14 ± 0,23 | p < 0,01 | 18,1% |
| [-]-ODT | 4,40 ± 3,40 | 3,28 ± 2,05 | 0,54 ± 0,32 | p < 0,01 | 14,4% |
| [+]-ODT/[+]-T | 1,51 ± 1,53 | 0,65 ± 0,91 | 0,09 ± 0,18 | p < 0,01 | 14,9% |
| [-]-ODT/[-]-T | 2,21 ± 1,95 | 1,01 ± 0,93 | 0,28 ± 0,33 | p < 0,01 | 18,2% |
| [+]-ODT+[-]-ODT | 7,45 ± 5,72 | 5,03 ± 3,26 | 0,69 ± 0,51 | p < 0,01 | 16,1% |
| [+]-T+[-]-T | 5,57 ± 4,88 | 10,99 ± 11,63 | 5,43 ± 3,67 | ns | 9,7% |
| [+]-ODT+[-]-ODT/ [+]-T+[-]-T | 1,85 ± 1,75 | 0,82 ± 0,90 | 0,18 ± 0,25 | p < 0,01 | 16,8% |

R² – procentuální podíl hodnot vysvětlených efektem polymorfismu, získaný použitím dvoucestné ANOVY.

p – signifikantní rozdíl mezi skupinami EM, IM a PM.

4. 2. 2. Vliv polymorfismu genu MDR1

Tato kapitola je rozdělena na 2 podkapitoly, které hodnotí vliv polymorfismu genu MDR1 na koncentraci tramadolu a ODT v séru a v moči.

4. 2. 2. 1. Vliv polymorfismu MDR na koncentraci tramadolu a ODT v séru

U skupiny dobrovolníků s genotypem 3435CC byla průměrná hladina tramadolu (SD) 121,04 (34,39), u skupiny 3435CT/TT 118,81(35,55) ng/ml. Průměrné hladiny ODT (SD) byly u skupiny dobrovolníků s genotypem 3435CC 20,14 (9,16), u skupiny 3435CT/TT 36,38 (50,66) ng/ml. Nebyl zde shledán signifikantní rozdíl ani u koncentrací tramadolu a ODT ani u žádného z jejich vzájemných poměrů. Tabulka 8 popisuje jednotlivé hodnoty koncentrací tramadolu a ODT a jejich vzájemných poměrů.

Tab. 8 Vliv polymorfismu MDR1 na koncentraci tramadolu a ODT v séru (průměr ± SD) 2,5 hodiny po podání

| | 3435CC (n = 12) ng/ml | 3435CT/TT (n = 53) ng/ml | p | R² |
|-------------------------------------|--------------------------------------|---|----------|----------------------|
| [+]-T | 60,38 ± 7,68 | 63,39 ± 18,77 | ns | 0,0% |
| [-]-T | 54,98 ± 16,58 | 58,10 ± 17,21 | ns | 0,1% |
| [+]-ODT | 9,40 ± 4,39 | 7,30 ± 3,88 | ns | 2,1% |
| [-]-ODT | 10,23 ± 4,32 | 8,11 ± 3,82 | ns | 1,5% |
| [+]-ODT/[+]-T | 0,15 ± 0,06 | 0,15 ± 0,10 | ns | 0,0% |
| [-]-ODT/[-]-T | 0,18 ± 0,06 | 0,18 ± 0,12 | ns | 0,0% |
| [+]-ODT+[-]-ODT | 20,14 ± 9,16 | 17,39 ± 7,50 | ns | 1,9% |
| [+]-T+[-]-T | 121,04 ± 34,39 | 118,81 ± 35,55 | ns | 0,1% |
| [+]-ODT+ [-]-ODT/ [+]-T+[-]-T | 0,17 ± 0,06 | 0,17 ± 0,11 | ns | 0,0% |

R² – procentuální podíl hodnot vysvětlených efektem polymorfismu, získaný použitím dvoucestné ANOVY.

p – signifikantní rozdíl mezi skupinami 3435CC a 3435CT/TT

4. 2. 2. 2. Vliv polymorfismu MDR na koncentraci tramadolu a ODT v moči

U skupiny dobrovolníků s genotypem 3435CC byla průměrná hladina tramadolu (SD) 8,76 (7,33), u skupiny 3435CT/TT 7,60 (8,98) ng/ml. Průměrné hladiny ODT (SD) byly u skupiny dobrovolníků s genotypem 3435CC 8,89 (9,16), u skupiny 3435CT/TT 5,27 (4,33) ng/ml. Mezi hodnotami koncentrací tramadolu a ODT v moči a jejich vzájemných poměrů rozdělených na skupiny s genotypem 3435CC a 3435CT/TT byl shledán signifikantní rozdíl u koncentrace [+] -ODT ($p = 0,023$), [-] -ODT ($p = 0,018$) a u součtu [+] -ODT + [-] -ODT ($p = 0,016$). Tabulka 9 popisuje jednotlivé hodnoty koncentrací tramadolu a ODT a jejich vzájemných poměrů. Vysoce statisticky významně se tento polymorfismus projevil u součtu [+] -ODT + [-] -ODT ($p = 0,016$).

Tab. 9 Vliv polymorfismu MDR1 na koncentraci tramadolu a ODT ze sběru moče (průměr ± SD) 2,5 hodiny po podání

| | 3435CC (n = 12) ng/ml | 3435CT/TT (n = 53) ng/ml | p | R² |
|--|--------------------------------------|---|-------------|----------------------|
| [+] -T | 4,56 ± 3,75 | 4,00 ± 4,85 | ns | 0,2% |
| [-] -T | 4,20 ± 3,58 | 3,59 ± 4,12 | ns | 0,3% |
| [+] -ODT | 3,56 ± 2,72 | 2,07 ± 1,74 | $p = 0,023$ | 8,3% |
| [-] -ODT | 5,32 ± 3,65 | 3,19 ± 2,62 | $p = 0,018$ | 8,0% |
| [+] -ODT/[+] -T | 0,17 ± 1,30 | 0,99 ± 1,33 | ns | 0,3% |
| [-] -ODT/[-] -T | 1,79 ± 1,29 | 1,48 ± 1,71 | ns | 0,5% |
| [+] -ODT + [-] -ODT | 8,88 ± 6,35 | 5,26 ± 4,32 | $p = 0,016$ | 8,3% |
| [+] -T + [-] -T | 8,76 ± 7,32 | 7,59 ± 8,97 | ns | 0,3% |
| [+] -ODT + [-] -ODT / [+] -T + [-] -T | 1,46 ± 1,26 | 1,23 ± 1,55 | ns | 0,4% |

R² – procentuální podíl hodnot vysvětlených efektem polymorfismu, získaný použitím dvoucestné ANOVY.

p – signifikantní rozdíl mezi skupinami 3435CC a 3435CT/TT

4. 2. 3. Interakční vliv polymorfismu genů CYP2D6 a MDR1 C3435T na koncentrace tramadolu a ODT v séru a moči

Interakční vliv polymorfismu genů CYP2D6 a MDR1 C3435T na koncentrace tramadolu a ODT v séru a moči byl hodnocen pomocí rozdělení na skupiny EM 3435CC, EM 3435CT/TT, IM3435CC, IM 3435CT/TT a PM3435CT/TT a pomocí dvoucestné ANOVY.

4. 2. 3. 1. Interakční vliv při rozdělení na skupiny EM 3435CC, EM 3435CT/TT, IM 3435CC, IM 3435CT/TT a PM 3435CT/TT na koncentrace tramadolu a ODT v séru a moči

Dalším naším krokem bylo rozdělení hodnot koncentrací tramadolu a ODT v séru a moči do pěti skupin podle interakčního vlivu polymorfismů CYP2D6 a MDR1 C3435T na skupiny EM 3435CC, EM 3435CT/TT, IM3435CC, IM 3435CT/TT a PM3435CT/TT. Průměrné hodnoty koncentrací tramadolu a ODT v jednotlivých skupinách shrnují tabulky 10 a 11, statistické hodnocení této analýzy shrnuje tabulka 12. Abychom eliminovali skutečnost, že kombinace PM3435CC v našem souboru není zastoupena, experimentálně jsme porovnali skupiny dobrovolníků rozdělených podle polymorfismu CYP2D6, vyloučením skupiny PM3435CT/TT. Zde byly prokázány signifikantní rozdíly u koncentrací tramadolu v séru a u ODT v séru i moči. Dále jsme experimentálně vyloučili skupinu PM3435CT/TT a porovnali zbývající dobrovolníky podle polymorfismu MDR1 rozdělených na skupinu s genotypem 3435CC a skupinou 3435CT/TT. Zde ovšem stejně jako bez vyloučení skupiny PM3435CT/TT byl prokázán signifikantní rozdíl pouze u koncentrace ODT v moči, průměrná koncentrace (SD) 8,76 (7,33) a 7,88 (9,44) ng/ml, ve skupinách 3435CC a 3435CT/TT ($p = 0,04$).

Tab. 10 Průměrné hodnoty koncentrací tramadolu a ODT v jednotlivých skupinách v séru (průměr ± SD) 2,5 hodiny po podání

| | EM 3435CC (n = 6) ng/ml | EM 3435CT/TT (n = 26) ng/ml | IM 3435CC (n = 6) ng/ml | IM 3435CT/TT (n = 19) ng/ml | PM 3435CT/TT (n = 6) ng/ml |
|-----------------------------|--|--|--|--|---|
| [+]-T | 55,56 ± 21,10 | 51,45 ± 14,08 | 70,75 ± 11,17 | 68,07 ± 14,28 | 90,36 ± 11,17 |
| [-]-T | 50,63 ± 18,41 | 46,83 ± 13,69 | 65,13 ± 11,75 | 60,26 ± 11,60 | 84,03 ± 11,90 |
| [+]-ODT | 10,54 ± 5,92 | 10,37 ± 2,26 | 8,90 ± 3,20 | 7,28 ± 3,85 | 2,26 ± 0,6 |
| [-]-ODT | 11,16 ± 5,89 | 11,03 ± 3,17 | 9,67 ± 3,26 | 8,21 ± 3,48 | 4,38 ± 1,99 |
| [+]-ODT/[+]-T | 0,19 ± 0,06 | 0,22 ± 0,10 | 0,12 ± 0,02 | 0,11 ± 0,06 | 0,02 ± 0,00 |
| [-]-ODT/[-]-T | 0,22 ± 0,07 | 0,25 ± 0,13 | 0,14 ± 0,03 | 0,14 ± 0,06 | 0,05 ± 0,03 |
| [+]-ODT+[-]-ODT | 21,71 ± 11,79 | 21,41 ± 5,20 | 18,58 ± 6,31 | 15,49 ± 7,18 | 6,64 ± 2,58 |
| [+]-T+[-]-T | 106,20 ± 39,48 | 98,28 ± 27,44 | 135,88 ± 22,68 | 128,34 ± 25,48 | 174,40 ± 22,4 |
| [+]-ODT+[-]-ODT/[+]-T+[-]-T | 0,20 ± 0,07 | 0,23 ± 0,11 | 0,13 ± 0,02 | 0,12 ± 0,06 | 0,03 ± 0,01 |

Tab. 11 Průměrné hodnoty koncentrací tramadolu a ODT v jednotlivých skupinách ze sběru moče (průměr ± SD) 2,5 hodiny po podání

| | EM 3435CC (n = 6) ng/ml | EM 3435CT/TT (n = 26) ng/ml | IM 3435CC (n = 6) ng/ml | IM 3435CT/TT (n = 19) ng/ml | PM 3435CT/TT (n = 6) ng/ml |
|-----------------------------|--|--|--|--|---|
| [+]-T | 4,84 ± 4,10 | 2,46 ± 1,87 | 4,28 ± 3,73 | 6,25 ± 6,88 | 2,74 ± 1,76 |
| [-]-T | 4,39 ± 3,91 | 2,26 ± 1,70 | 4,01 ± 3,57 | 5,50 ± 5,77 | 2,68 ± 1,91 |
| [+]-ODT | 4,52 ± 3,58 | 2,69 ± 1,89 | 2,59 ± 1,11 | 1,84 ± 31,33 | 0,14 ± 0,23 |
| [-]-ODT | 6,67 ± 4,84 | 3,88 ± 2,86 | 3,96 ± 1,22 | 3,09 ± 2,22 | 0,54 ± 0,32 |
| [+]-ODT/[+]-T | 0,96 ± 0,59 | 1,64 ± 1,66 | 1,37 ± 1,81 | 0,44 ± 0,27 | 0,09 ± 0,18 |
| [-]-ODT/[-]-T | 1,67 ± 0,97 | 2,34 ± 2,11 | 1,91 ± 1,64 | 0,75 ± 0,37 | 0,28 ± 0,33 |
| [+]-ODT+[-]-ODT | 11,20 ± 8,42 | 6,58 ± 4,72 | 6,56 ± 2,23 | 4,94 ± 3,46 | 0,69 ± 0,51 |
| [+]-T+[-]-T | 9,23 ± 8,02 | 4,73 ± 3,57 | 8,29 ± 7,29 | 11,76 ± 12,64 | 5,43 ± 3,67 |
| [+]-ODT+[-]-ODT/[+]-T+[-]-T | 1,29 ± 0,76 | 1,98 ± 1,89 | 1,62 ± 1,69 | 0,59 ± 0,30 | 0,18 ± 0,25 |

Tab. 12 Statistické hodnocení vlivu polymorfismů CYP2D6 a MDR1 na koncentrace tramadolu, ODT a jejich vzájemných poměrů 2,5 hodiny po podání v séru a moči

| | Vliv interakce polymorfismů v séru | Vliv interakce polymorfismů ve sběru moče |
|------------------------------|---|--|
| | p | p |
| [+]-T | p < 0,01 | ns |
| [-]-T | p < 0,01 | ns |
| [+]-ODT | p < 0,01 | p < 0,01 |
| [-]-ODT | p < 0,01 | p < 0,01 |
| [+]-ODT/[+]-T | p < 0,01 | p < 0,01 |
| [-]-ODT/[-]-T | p < 0,01 | p < 0,01 |
| [+]-ODT+[-]-ODT | p < 0,01 | p < 0,01 |
| [+]-T+[-]-T | p < 0,01 | ns |
| [+]-ODT+[-]-ODT/ [+]-T+[-]-T | p < 0,01 | p < 0,01 |

p - signifikantní rozdíl mezi skupinami EM 3435CC, EM 3435CT/TT, IM3435CC, IM 3435CT/TT a PM3435CT/TT

4. 2. 3. 2. Interakční vliv na koncentrace tramadolu a ODT v séru a moči hodnocen pomocí dvoucestné ANOVY

Následujícím krokem této části dizertační práce byla analýza samostatného účinku polymorfismu CYP2D6 a MDR1C3435T a analýza interaktivního účinku obou polymorfismů na koncentrace tramadolu a ODT a jejich vzájemných poměrů v séru a moči. K tomuto zhodnocení byla použita dvoucestná ANOVA, výsledky shrnuje tabulka 13.

Tab. 13 Statistické hodnocení interakčního vlivu polymorfismů CYP2D6 a MDR1 polymorfismů CYP2D6, MDR1 a jejich interakce na koncentrace tramadolu, ODT a jejich vzájemných poměrů 2,5 hodiny po podání v séru a moči

| | Vliv interakce polymorfismů v séru | Vliv interakce polymorfismů ve sběru moče |
|------------------------------------|---|--|
| | R² | R² |
| [+]-T | 42,3% | 13,1% |
| [-]-T | 43,1% | 12,8% |
| [+]-ODT | 36,9% | 25,3% |
| [-]-ODT | 26,6% | 22,0% |
| [+]-ODT/[+]-T | 39,6% | 20,5% |
| [-]-ODT/[-]-T | 33,8% | 23,1% |
| [+]-ODT+[-]-ODT | 32,9% | 23,7% |
| [+]-T+[-]-T | 43,3% | 13,0% |
| [+]-ODT+[-]-ODT/[+]-T+[-]-T | 36,9% | 22,0% |

R² – procentuální podíl hodnot vysvětlených efektem polymorfismu, získaný použitím dvoucestné ANOVY

Hodnocení vlivu polymorfismu genů CYP2D6 a MDR1 C3435T na koncentraci tramadolu, ODT a jejich vzájemných poměrů v séru a moči pomocí dvoucestné ANOVY umožnilo rozdělení našich dat do tří skupin. V první skupině jsou koncentrace [+]-ODT, koncentrace [-]-ODT a součet koncentrací [+]-ODT+[-]-ODT v moči, zde byl prokázán vyšší vliv polymorfismu CYP2D6, přesto je vliv polymorfismu MDR1 C3435T přítomen a finální efekt a signifikantní rozdíly mezi hodnotami těchto parametrů tento polymorfismus posiluje. Ve druhé skupině jsou koncentrace tramadolu a ODT v séru, zde byl prokázán pouze vliv polymorfismu CYP2D6, vliv polymorfismu MDR1 C3435T je prakticky nepřítomen. Ve třetí skupině jsou koncentrace [+]- T, [-]- T, poměry [+]-ODT/ [+]-T, [-]-ODT/ [-]-T, [+]-ODT+ [-]-ODT/ [+]-T+[-]-T a součet [+]- T + [-]- T v moči, zde bohužel hodnoty R² mají pouze nízký význam.

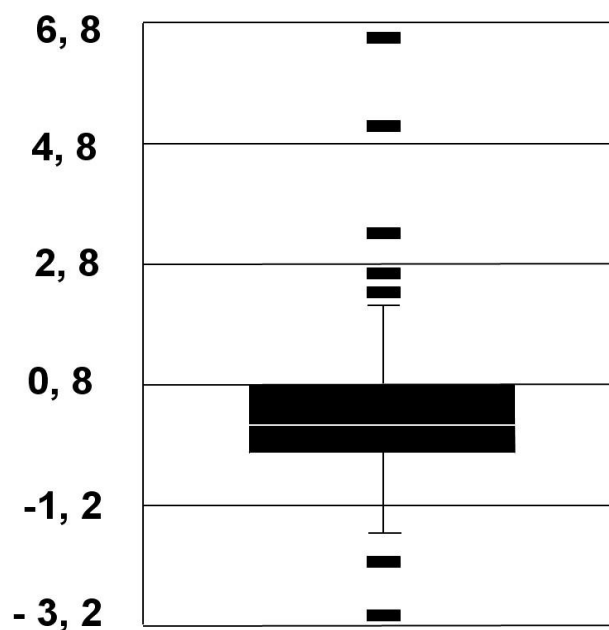
4. 2. 4. Vliv polymorfismů genů CYP2D6 a MDR1 C3435T na změnu pupilometrických parametrů po podání tramadolu

Na tomto místě je popsán vliv polymorfismů genů CYP2D6 a MDR1 C3435T na změnu farmakodynamických parametrů tramadolu

4. 2. 4. 1. Pupilometrické parametry

V poslední části této studie jsme se zaměřili na výběr optimálního pupilometrického parametru a jeho změnu po podání tramadolu (Matoušková et al., 2010). V reakci zornice po podání tramadolu jsme pozorovali značné interindividuální rozdíly. Variabilitu celého souboru jsme analyzovali u parametru INIT pomocí box blot grafu na obrázku 3.

Obr. 3 Analýza rozdílů iniciálního pupilometrického parametru před podáním a po podání tramadolu (kladné hodnoty popisují míru miotické reakce, záporné hodnoty popisují míru mydriatické reakce)



Téměř u jedné třetiny vyšetřovaných nedošlo po podání tramadolu k miotické reakci, byla pozorována mydriáza. Naopak u jedné čtvrtiny dobrovolníků byla miotická reakce tramadolu nad horním kvantilem. Změřené hodnoty se odlišují od normálního rozdělení; standardizovaná šikmost 5, 2 a špičatost 9, 1. Tabulka 14 zobrazuje pupilometrické parametry před a po podání tramadolu. K signifikantnímu poklesu došlo u hodnot INIT a FINAL na obou očích a u hodnoty MIN na oku levém. Změny ostatních dynamických parametrů s výjimkou parametr TTM pravého oka nejsou statisticky významné. Při porovnání diferencí měřených parametrů obou očí jsme statisticky významné rozdíly neprokázali.

Tab. 14 Pupilometrické parametry před a po podání tramadolu, (průměr ± SD)

| Parametr | Před | Po | Rozdíl | p* |
|---------------------------|--------------|--------------|---------------|----------|
| pravé oko (n = 60) | | | | |
| INIT (mm) | 7,81 ± 1,34 | 7,32 ± 1,16 | 0,49 ± 1,46 | p < 0,01 |
| MIN (mm) | 5,90 ± 1,32 | 5,58 ± 1,26 | 0,32 ± 1,36 | ns |
| FINAL(mm) | 7,34 ± 1,22 | 6,98 ± 1,15 | 0,36 ± 1,29 | p < 0,01 |
| RA (mm) | 1,77 ± 0,56 | 1,79 ± 0,58) | -0,02 ± 0,64 | ns |
| TTM (ms) | 0,79 ± 0,10 | 0,76 ± 0,11 | 0,03 ± 0,10 | p < 0,01 |
| levé oko (n = 60) | | | | |
| INIT (mm) | 7,22 ± 0,86) | 6,81 ± 1,17) | 0,41 ± 0,84) | p < 0,01 |
| MIN (mm) | 5,29 ± 0,88) | 4,93 ± 1,14) | 0,36 ± 0,88) | p < 0,01 |
| FINAL (mm) | 6,90 ± 0,80) | 6,49 ± 1,09) | 0,41 ± 0,82) | p < 0,01 |
| RA (mm) | 1,97 ± 0,63) | 1,89 ± 0,46) | 0,08 ± 0,59) | ns |
| TTM (ms) | 0,76 ± 0,07) | 0,77 ± 0,07) | - 0,01± 0,78) | ns |

* Wilcoxonův test pro závislé výběry, ns - nesignifikantní , INIT – počáteční průměr , MIN – minimální průměr, FINAL – konečný průměr, RA – reflexní amplituda, TTM – doba dosažení minimálního průměru

4. 2. 4. 2. Vliv polymorfismu CYP2D6 na změnu pupilometrických parametrů

Dále jsme studovali vliv polymorfismu CYP2D6 na variabilitu statických i dynamických pupilometrických parametrů po podání tramadolu (Matoušková et al., 2011). Zatímco u dobrovolníků s fenotypem PM byla pozorována převážně mydriatická reakce, u dobrovolníků s fenotypem EM byla různě intenzivní mioza ($\chi^2 = 15, 58$; $p = 0, 0004$). Statistické hodnocení pupilometrických parametrů souhrně uvádí tabulka 15. Podání tramadolu jedincům s fenotypem EM vyvolalo signifikantní pokles jak parametru INIT tak i dynamických pupilometrických parametrů s výjimkou parametru RA a CV. Rozdíly parametru INIT signifikantně korelovali s parametry MIN ($r = 0, 84$) a FINAL ($r = 0, 88$) změřenými po stimulaci zornice světelným zábleskem. Obrázek 4 znázorňuje signifikantní rozdíly velikosti iniciálního průměru zornice před a po podání tramadolu v závislosti na fenotypu jedince.

Tab. 15 Vliv polymorfismu CYP2D6 na rozdíl pupilometrický parametrů po podání tramadolu, (průměr \pm SD)

| Pupilometrické parametry | EM (n = 34) | IM (n = 29) | PM (n = 6) | p |
|---------------------------------|--------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------|
| INIT (mm) | 0,81 \pm 1,25 | -0,02 \pm 1,14 ^a | 0,04 \pm 0,04 ^{b,c} | p < 0,01 |
| MIN (mm) | 0,69 \pm 0,78 | 0,02 \pm 0,73 ^a | -0,67 \pm 0,98 ^c | p < 0,01 |
| FINAL (mm) | 0,65 \pm 0,77 | 0,24 \pm 0,59 ^a | -0,73 \pm 0,90 ^{b,c} | p < 0,01 |
| RA (mm) | 0,08 \pm 0,55 | -0,08 \pm 0,40 | 0,46 \pm 1,15 | ns |
| CV (mm/ms) | -1,16 \pm 8,9 | 0,93 \pm 4,21 | -1,62 \pm 10,04 | ns |
| TTM (s) | 0,22 \pm 1,04 | 0,06 \pm 0,29 | 0,08 \pm 0,07 ^{b,c} | p < 0,01 |

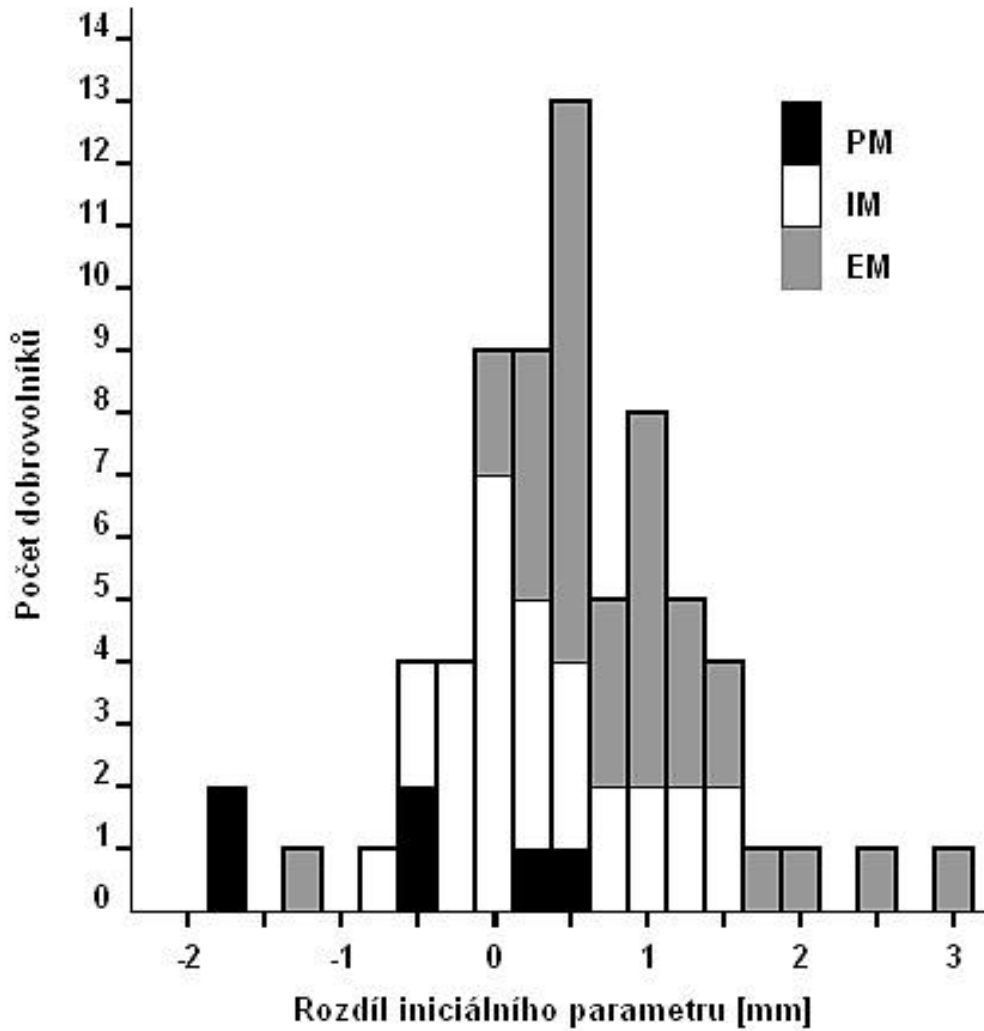
Údaje jsou prezentovány jako rozdíly před a po podání tramadolu INIT-iniciální parametr (po světelném záblesku). MIN-minimální parametr FINAL-finalní parametr RA-reflexní amplituda. CV- konstriční rychlost, TTM- doba k dosažení minimálního parametru

a Signifikantní rozdíl mezi skupinami EM a IM p < 0.05

b Signifikantní rozdíl mezi skupinami IM a PM p < 0.05

c Signifikantní rozdíl mezi skupinami EM a PM p < 0.05

Obr. 4 Histogram rozdílů iniciálních parametrů v závislosti na fenotypu CYP2D6, kladné hodnoty popisují míru miotické reakce, záporné hodnoty popisují míru mydriatické reakce



4. 2. 4. 3. Vliv polymorfismu MDR1 na změnu pupilometrických parametrů

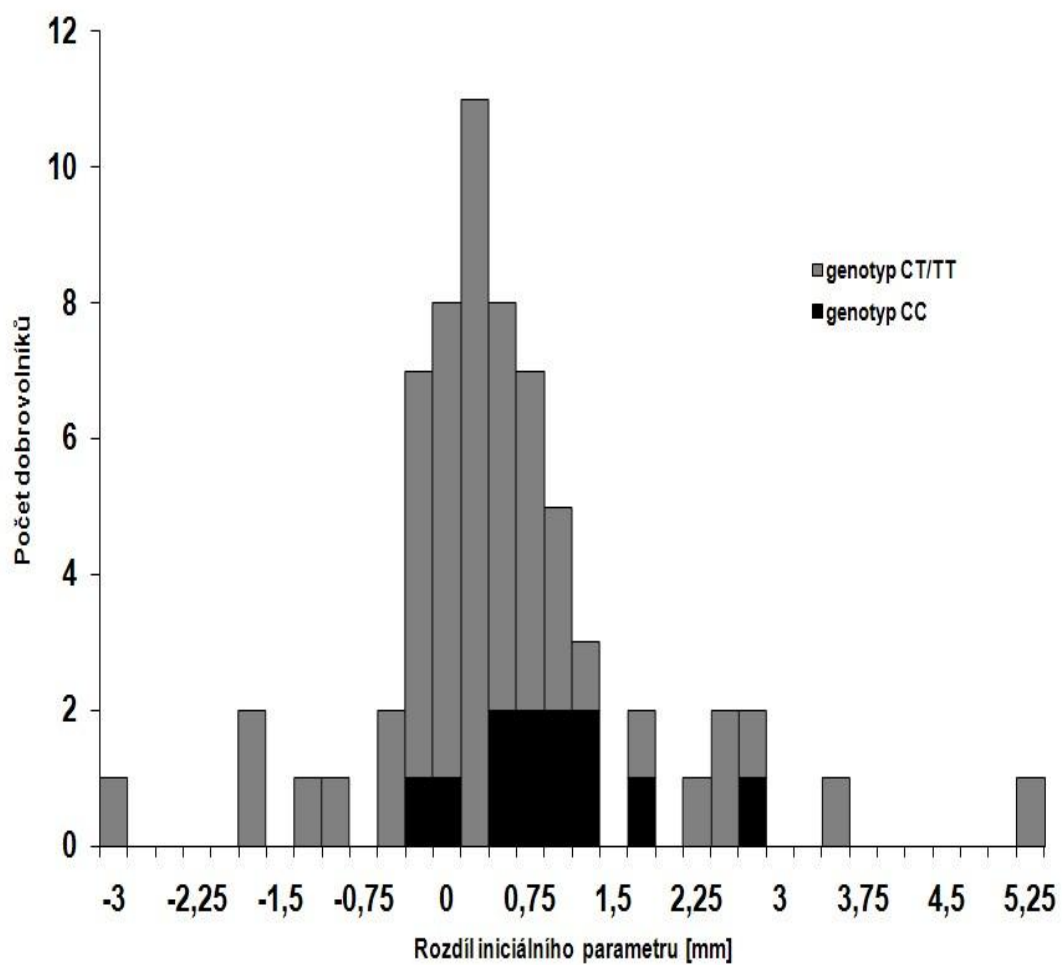
Dalším cílem naší práce bylo zhodnocení vlivu polymorfismu MDR1 C3435T (exon 26) na zornicovou reakci i jednotlivé pupilometrické parametry. Statistické hodnocení všech pupilometrických parametrů souhrně uvádí tabulka 16.

Tab. 16 Vliv polymorfismu MDR1 C3435T na pupilometrické parametry po podání tramadolu, (průměr ± SD)

| Pupilometrické parametry | 3435CC (n = 12) | 3435CT/TT (n = 53) | p |
|--------------------------|-----------------|--------------------|-------|
| INIT (mm) | 0,82 ± 0,81 | 0,32 ± 1,28 | 0,026 |
| MIN (mm) | 0,89 ± 1,07 | 0,21 ± 1,40 | ns |
| FINAL (mm) | 0,79 ± 0,81 | 0,33 ± 1,34 | ns |
| RA (mm) | 0,38 ± 1,06 | 0,06 ± 0,48 | ns |
| CV (mm/ms) | 0,69 ± 0,48 | -0,21 ± 0,57 | ns |
| TTM (s) | 0,04 ± 0,08 | 0,03 ± 0,10 | ns |

Údaje jsou prezentovány jako rozdíly před a po podání tramadolu, INIT-iniciální parametr (po světelném záblesku), MIN-minimální parametr, FINAL-finalní parametr, RA-reflexní amplituda, CV- konstriční rychlost, TTM- doba k dosažení minimálního parametru. Při podrobnější analýze jsme hodnotili vzájemný poměr mezi miotickou a mydriatickou reakcí v závislosti na genotypu MDR1 C3435T. Ve skupině dobrovolníků s genotypem CC byla mydriáza pozorována u 2 z 12 (17%), ve skupině CT/TT u 20 z 53 (38%). Ve skupině s variantní alelou je tedy vyšší výskyt mydriatické reakce, signifikantní rozdíl od skupiny s genotypem CC ovšem nebyl prokázán. Tuto skutečnost znázorňuje obrázek 5.

Obr. 5 Histogram rozdílů iniciálních parametrů v závislosti na fenotypu MDR1, kladné hodnoty popisují míru miotické reakce, záporné hodnoty popisují míru mydriatické reakce



4. 2. 4. 4. Interakční vliv polymorfismů genů CYP2D6 a MDR1 C3435T na změnu pupilometrických parametrů

V této části dizertační práce jsme studovali vliv genu MDR1 C3435T a CYP2D6 na změnu statických a dynamických parametrů zornicové reakce ovlivněných podáním tramadolu. Analýza obou genotypů u souboru dobrovolníků teoreticky umožnila vznik šesti kombinací. V našem souboru jsme zjistili zastoupení skupin uvedených v tabulce 17. V přehledu jsou dále uvedeny průměrné hodnoty \pm SD rozdílů počátečního a konečného měření. Největší zastoupení subjektů bylo v kombinaci EM 3435CT/TT. Kombinace PM 3435CC v našem souboru není zastoupena. Největší mióza byla pozorována u dobrovolníků s fenotypem EM 3435CC, největší mydriatickou reakci jsme pozorovali u skupiny dobrovolníků s fenotypem IM 3435CT/TT. Ze statistického hodnocení vyplývá signifikantní rozdíl u statického parametru INIT a u dynamických veličin MIN a FINAL. U těchto parametrů jsme pomocí Kruscal – Wallis testu porovnali vzájemné rozdíly každé skupiny se všemi ostatními. Signifikantní rozdíl v počtu mydriatických a miotických reakcí mezi těmito pěti skupinami nebyl prokázán.

Tab. 17 Vliv genu CYP2D6 a MDR1 na rozdíl hodnot pupilometrických parametrů, (průměr ± SD)

| | INIT (mm) | MIN (mm) | FINAL (mm) | RA (mm) | CV (mm/ms) | TTM (ms) |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|--------------|---------------|-------------|
| EM 3435CC (n = 6) | 1,29 ± 0,81 | 1,35 ± 1,26 | 1,16 ± 0,94 | -0,18 ± 0,63 | -0,94 ± 3,95 | 0,03 ± 0,07 |
| EM 3435CT/TT (n = 26) | 0,70 ± 1,33 * | 0,74 ± 1,41 | 0,89 ± 1,31 | -0,10 ± 0,45 | -1,87 ± 4,57 | 0,02 ± 0,07 |
| IM 3435CC (n = 6) | 0,36 ± 0,52 * | 0,42 ± 0,65 | 0,43 ± 0,47 | -0,58 ± 1,41 | -0,43 ± 5,85 | 0,04 ± 0,10 |
| IM 3435CT/TT (n = 19) | -0,08 ± 1,24 * | -0,29 ± 1,32 * ** | -0,19 ± 1,22 * ** | 0,18 ± 0,48 | 1,41 ± 3,64 | 0,02 ± 0,13 |
| PM 3435CT/TT (n = 6) | 0,05 ± 0,28 * | -0,31 ± 0,51 * ** | -0,30 ± 0,66 * ** | 0,33 ± 0,33 | 1,32 ± 11,92 | 0,04 ± 0,04 |
| Kruskal- Wallis test | 11, 85 | 12, 54 | 16,12 | 4,82 | 6,67 | 3,22 |
| p - value | 0, 019 | 0, 014 | 0, 0029 | ns | ns | ns |

* - signifikantní k hodnotě skupiny EM 3435CC

** - signifikantní k hodnotě skupiny EM 3435CT/TT

4. 3. Opioidní analgezie v současné pooperační léčbě bolesti - pilotní klinická studie

U všech pacientů zařazených do naší pilotní klinické práce byla operace provedena bez výraznějších komplikací. Nepozorovali jsme žádné významné rozdíly mezi oběma skupinami pacientů, týkající se demografických údajů, délky operace nebo trvání anestezie, tabulka 18 shrnuje srovnání těchto údajů.

Tab. 18 Základní charakteristika obou skupin pacientů, (průměr ± SD)

| | Piritramid (n = 43) | Diklofenak (n = 62) | p - value |
|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------|
| Věk (roky) | 52,16 ± 13,05 | 55,61 ± 12,19 | ns |
| BMI (kg/m²) | 25,51 ± 3,07 | 27,17 ± 5,09 | ns |
| Pohlaví (muži/ženy) | 33/10 | 56/6 | ns |
| Délka operace (min) | 51,09 ± 18,71 | 51,76 ± 16,84 | ns |
| Délka anestezie (min) | 74,88 ± 24,26 | 75,65 ± 20,52 | ns |

Úleva od bolesti byla výrazně zvýšena u pacientů, kterým byl podán piritramid, jednu hodinu po podání piritramidu byla u 39,5% pacientů popsána úplná úleva od bolesti, zatímco u pacientů kterým byl podán jako první diklofenak byla pozorována úplná úleva od bolesti pouze u 19,4% pacientů ($\chi^2 = 5,17$, $p = 0,02$). Ve skupině pacientů, u nichž byl podáván jako první diklofenak, u 76% pacientů bylo třeba další podávání léků proti bolesti. Pokud byl jako první podáván jako první piritramid, pouze 54% pacientů vyžadovalo další podání léků proti bolesti ($\chi^2 = 5,69$, $p = 0,02$). Z těchto údajů lze vyhodnotit, že ve skupině pacientů léčených piritramidem, byl delší interval k podání dalších analgetik, průběh léčby pooperační bolesti popisuje tabulka 19.

Tab. 19 Vliv analgetického efektu první dávky na úlevu od bolesti, počet aplikovaných analgetik a délku hospitalizace, (průměr ± SD), ns – nesignifikantní

| | Piritramid (n = 23) | Diklofenak (n = 47) | p - value |
|--|--------------------------------|--------------------------------|------------------|
| Iničiální intenzita bolesti (VAS) | 4,75 ± 1,03 | 4,39 ± 0,49 | ns |
| Úleva od bolesti (VAS) | 3,84 ± 1,27 | 3,34 ± 0,77 | 0,026 |
| Úleva od bolesti (%) | 81,40 ± 19,90 | 76,53 ± 14,92 | 0,030 |
| Interval mezi první a druhou aplikací analgetik (min) | 458,04 ± 181,93 | 348,15 ± 258,98 | 0,010 |
| Počet aplikovaných injekcí | 1,7 ± 0,88 | 2,7 ± 1,74 | 0,015 |
| Délka hospitalizace (dny) | 1,09 ± 0,81 | 1,45 ± 0,95 | 0,026 |

Tabulka 20 shrnuje počet následně aplikovaných injekcí a denních definovaných dávek u skupin nemocných rozdělených podle první podané dávky (Adámek et al., 2010). Počet následně aplikovaných injekcí byl nižší u skupiny, kde byl jako první aplikován piritramid ve srovnání se skupinou, které byl podán diklofenak, nicméně statisticky významný rozdíl byl nalezen pouze u skupiny s následnou aplikací piritramidu. Počet definovaných denních dávek (DDD) byl nižší u skupiny s počáteční aplikací piritramidu při srovnání se skupinou, kde byl jako první podán diklofenak. Statistická významnost byla prokázána jen ve skupinách s aplikací piritramidu, nebo diklofenaku.

Tab. 20 Počet následně aplikovaných injekcí a denních definovaných dávek (DDD), (průměr ± SD), ns – nesignifikantní.

| | Piritramid (n = 23) | Diklofenak (n = 47) | p - value |
|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------|
| Počet injekcí | | | |
| Piritramid | 1,00 ± 0,000 | 1,706 ± 0,772 | 0,015 |
| Diklofenak | 1,20 ± 0,422 | 1,375 ± 0,744 | ns |
| Kombinace | 2,75 ± 0,463 | 3,955 ± 1,703 | ns |
| Počet DDD | | | |
| Piritramid | 0,333 ± 0,000 | 0,449 ± 0,273 | p < 0,01 |
| Diklofenak | 0,858 ± 0,362 | 0,927 ± 0,329 | 0,024 |
| Kombinace | 1,364 ± 0,252 | 1,795 ± 0,720 | ns |

4. 4. Vliv genetické predispozice na farmakoterapeutický efekt a výskyt nežádoucích účinků u pacientů s akutní pooperační bolestí - hlavní klinická studie

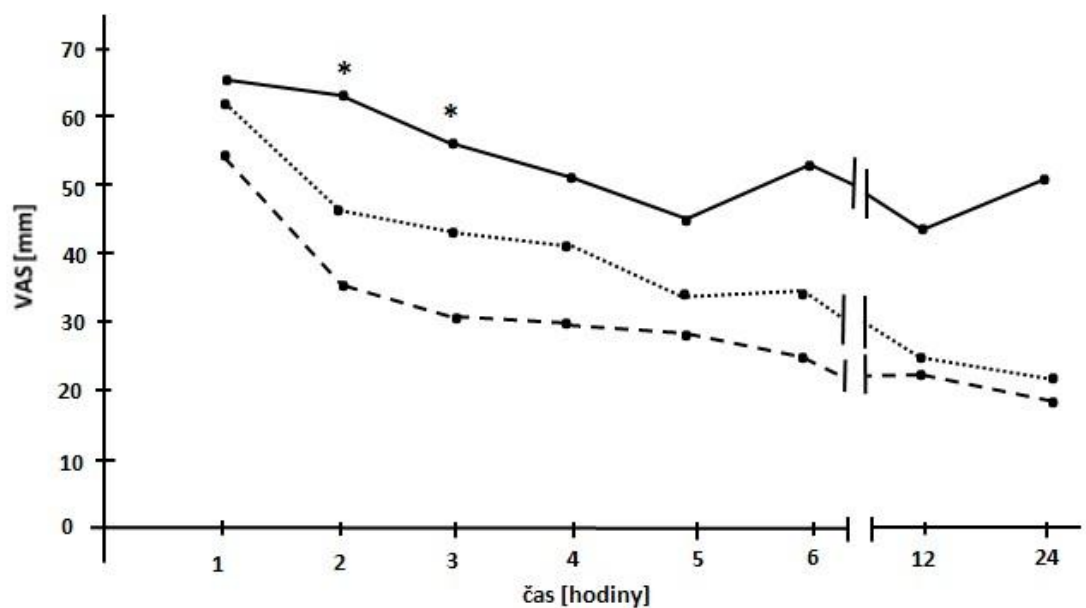
Tato kapitola popisuje interakci polymorfismu CYP2D6 a MDR1 na farmakoterapeutický efekt a výskyt nežádoucích účinků u pacientů s akutní pooperační bolestí

4. 4. 1. Vliv polymorfismu CYP2D6 na farmakoterapeutický efekt a výskyt nežádoucích účinků u pacientů s akutní pooperační bolestí

Při rozdělení pacientů podle polymorfismu CYP2D6 vznikla skupina s fenotypem EM, v které je 37 pacientů, skupina s fenotypem IM, v které je 15 pacientů a skupina s fenotypem PM, v které jsou 4 pacienti. Skupina s fenotypem UM v našem souboru

nebyla zastoupena. Ve zkoumaných skupinách nebyly zjištěny žádné zásadní komplikace spojené s operací. Demografická charakteristika, stejně jako délka či doba trvání anestezie se mezi genotypovými skupinami významně nelišila. Průměrná intenzita bolesti, hodnocená pomocí VAS do 24 hodin po operaci ve všech fenotypových skupinách je znázorněna v grafu (obrázek 6).

Obr. 6 Průměrná intenzita bolesti v jednotlivých časových intervalech u skupiny pacientů s fenotypem EM (přerušovaná čára), IM (tečkovaná čára) a PM (plná čára)



*Signifikantní rozdíl ($p < 0.05$)

Výraznější pokles intenzity bolesti byl u skupiny s fenotypem EM. Hodnoty se významně liší mezi skupinami 2. a 3. hodinu po operaci. U hodnot maximálního rozdílu bolesti a SPID byly shledány signifikantní rozdíly, které jsou popsány v tabulce 21.

Tab. 21 Pooperační bolest (VAS) a počet injekcí piritramidu ve skupinách nemocných podle polymorfismu CYP2D6, (průměr ±SD)

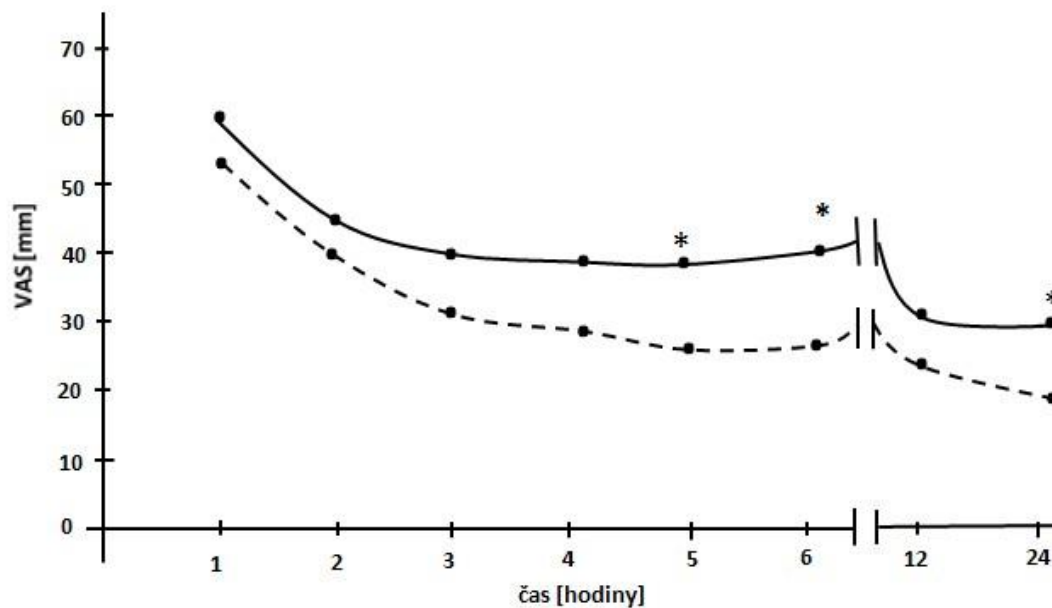
| | EM (n =37) | IM (n =15) | PM (n =4) | p - value |
|---|-----------------------|-----------------------|----------------------|------------------|
| Iniciální intenzita bolesti (mm) | 57,02 ± 15,96 | 64,22 ± 15,94 | 60,00 ± 21,60 | ns |
| Maximální rozdíl bolesti (mm) | 26,75 ± 15,99 | 20,66 ± 17,09 | 25,00 ± 50,00 | 0,024 |
| SPID (mm) | 185,52 ± 93,51 | 140,71 ± 84,71 | 37,50 ± 20,61 | p < 0,01 |
| Celkový počet aplikovaných injekcí piritramidu | 1,89 ± 0,93 | 2,65 ± 0,67 | 3,30 ± 0,81 | 0,036 |

Ve skupině pacientů s fenotypem EM bylo 64% respondentů s více než 50% úlevou od bolesti ve srovnání s výchozí hodnotou. Ve skupině s fenotypem IM bylo 25% respondentů a ve skupině s fenotypem PM nebyl žádný pacient s úlevou větší než 50%. ($\chi^2 = 12, 61$; $p = 0,018$). Navíc celková spotřeba piritramidu, který byl aplikován na požádání, byla nejnižší u pacientů s fenotypem EM ($p = 0,036$). Celkový výskyt nežádoucích účinků byl nejvyšší u skupiny dobrovolníků s fenotypem PM, rozdíl mezi fenotypovými skupinami však nebyl signifikantní.

4. 4. 2. Vliv polymorfismu MDR1 na farmakoterapeutický efekt a výskyt nežádoucích účinků u pacientů s akutní pooperační bolestí

Rozdělením pacientů podle polymorfismu G2677T/A vznikla skupina 15 pacientů s genotypem 2677GG a 41 pacientů s genotypem 2677GT/TT. V rámci polymorfismu G2677A byli nalezeni pouze 3 pacienti s genotypem 2677GA a nebyl shledán žádný pacient s genotypem 2677AA. Z tohoto důvodu nebyl vliv tohoto polymorfismu hodnocen. Ve zkoumaných skupinách nebyly zjištěny žádné zásadní komplikace spojené s operací. Demografická charakteristika, stejně jako délka či doba trvání anestezie se mezi genotypovými skupinami významně nelišila. Průměrná intenzita bolesti po podání piritramidu, hodnocená pomocí VAS do 24 hodin po operaci v obou genotypových skupinách je znázorněna na grafu (obrázek 7).

Obr. 7 Průměrná intenzita bolesti v jednotlivých časových intervalech u skupiny pacientů s genotypem 2677GG (přerušovaná čára) a genotypem 2677TT a 2677GT (plná čára)



*Signifikantní rozdíl ($p < 0.05$)

Výraznější pokles intenzity bolesti byl 2677GG skupiny. Hodnoty se významně liší mezi skupinami 5, 6 a 24 hodin po operaci. Maximální rozdíl bolesti a SPID byly signifikantně vyšší u pacientů s genotypem 2677GG ve srovnání s nosiči variantní T alely, srovnání obou skupin popisuje tabulka 22.

Tab. 22 Pooperační bolest ve skupinách rozdělených podle polymorfismu MDR1, (průměr ± SD)

| | 2677GG (n = 15) | 2677GT/TT (n = 41) | p - value |
|---|----------------------------|-------------------------------|------------------|
| Iniciální intenzita bolesti (mm) | 54,00 ± 13,50 | 60,90 ± 17,00 | ns |
| Maximální rozdíl bolesti (mm) | 30,60 ± 24,90 | 19,50 ± 2,55 | 0,023 |
| SPID (mm) | 209,33 ± 95,80 | 147,07 ± 91,38 | 0,027 |
| Celkový počet aplikovaných injekcí piritramidu | 1,67 ± 0,72 | 2,37 ± 0,89 | p < 0,01 |

Ve skupině pacientů s genotypem 2677GG bylo 80% respondentů s více než 50% úlevou od bolesti ve srovnání s výchozí hodnotou, zatímco ve skupině s variantní T alelou bylo pouze 39% respondentů ($\chi^2 = 5,83$; $p = 0,016$). Navíc celková spotřeba piritramidu, který byl aplikován na požádání, byla nižší ve srovnání s pacienty nesoucí variantní alelu T ($p = 0,008$). Stejně tak bylo v homozygotní skupině pacientů signifikantně více jedinců, vnímajících úspěšnou léčbu bolesti ve srovnání se skupinou s variantní alelou ($\chi^2 = 6,49$; $p = 0,0109$). Celkový výskyt nežádoucích účinků byl pozorován u 40% pacientů s genotypem 2677GG ve srovnání s 83% ve skupině s genotypem 2677GT/TT ($\chi^2 = 7,92$, $p = 0,005$) (Matoušková et al., 2011).

5. DISKUZE

Výsledky naší práce potvrzují vliv námi studovaných polymorfismů na farmakokinetiku i farmakodynamiku modelových opioidů.

Nejvýrazněji se projevil vliv polymorfismu CYP2D6, který ovlivnil koncentrace tramadolu i ODT. U dobrovolníků s fenotypem PM jsme zjistili vysoké sérové koncentrace mateřské látky a stopové koncentrace ODT ve srovnání s jedinci s fenotypem EM. V moči se tento rozdíl projevil pouze u koncentrací ODT. Metabolický poměr tramadolu a ODT mezi oběma fenotypy CYP2D6 byl signifikantně ovlivněn v séru i v moči. Naše výsledky jsou v souladu s nálezy dalších autorů (Pedersenem et al., 2005, Abdel – Rahman et al., 2002). V další části naší práce jsme studovali vliv obou fenotypů na koncentrace stereoizomerů ODT. U jedinců s fenotypem PM jsme na rozdíl od fenotypu EM prokázali signifikantní rozdíl mezi koncentracemi stereoizomerů ODT v séru a moči. Toto pozorování je v souladu s prací T. P. Enggaard et al., 2006 a svědčí o schopnosti stereoselektivní biotransformace enzymu CYP2D6.

Naše pilotní studie o vlivu polymorfismu MDR1 (Slanař et al., 2007) na farmakokinetiku tramadolu ukázala, že tramadol by mohl být substrátem P-glykoproteinu, zvláště pak funkčního polymorfismu C3435T. Byl shledán mírně stoupající trend u jedinců s fenotypem PM v koncentracích tramadolu v séru shodně v souvislosti se stoupajícím počtem T alel. Podobná tendence nebyla sledována u koncentrací ODT, což nasvědčuje hypotéze o vlivu polymorfismu C3435T na presystémovou eliminaci tramadolu, nikoli však o vlivu tohoto polymorfismu na následnou metabolickou přeměnu tramadolu.

Hodnocení vlivu MDR1 C3435T na koncentraci tramadolu a ODT v séru při rozdělení dobrovolníků na skupiny s genotypem 3435CC a 3435CT/TT odhalilo pouze malé rozdíly v koncentracích tramadolu i ODT, které nejsou statisticky významné. Skutečnost, že jak ve skupině 3435CC tak i ve skupině 3435CT/TT je z hlediska polymorfismu CYP2D6 shodně 50% dobrovolníků s normální funkcí tohoto enzymu a 50% dobrovolníků se sníženou funkcí CYP2D6 naznačuje, že vliv polymorfismu CYP2D6 je podstatně větší. Stejně tak koncentrace tramadolu v moči u obou skupin rozdělených podle polymorfismu MDR1 byly téměř totožné. Pravděpodobně je to

způsobeno metabolickou přeměnou tramadolu vlivem enzymu CYP2D6 v období před eliminací. Vyšší koncentrace ODT v moči u skupiny 3435CC než u skupiny 3435CT/TT potvrzuje významnou roli P-glykoproteinu v ochraně organismu a eliminaci xenobiotik.

Interakční vliv polymorfismu CYP2D6 a MDR1 jsme hodnotili rozdělením koncentrace tramadolu a ODT v séru a moči na pět skupin EM 3435CC, EM 3435CT/TT, IM3435CC, IM 3435CT/TT a PM3435CT/TT. Protože skupina PM3435CC není v našem souboru zastoupena, porovnali jsme mezi sebou skupiny EM3435CT/TT, IM3435CT/TT a PM3435CT/TT a z pohledu MDR1 jsme porovnali mezi sebou skupiny EM+IM 3435CC proti EM+IM 3435CT/TT. Při prvním experimentu jsme opět shledali pouze signifikantní rozdíly u koncentrací tramadolu a ODT v séru a u koncentrace ODT v moči. I toto pozorování potvrzuje význam vlivu CYP2D6 během metabolismu tramadolu. Při druhém srovnání jsme našli signifikantní rozdíl v koncentracích ODT v moči, což opět potvrdilo významnou roli exprese P-glykoproteinu při renální eliminaci tramadolu.

Při řešení otázky interakčního vlivu byla použita dvoucestná ANOVA. Z výsledků vyplynulo, že koncentrace ODT v moči jsou ovlivněny převážně polymorfismem CYP2D6. Polymorfismus MDR1 C3435T ovlivňuje finální efekt, jeho vliv na signifikantní rozdíly je additivní. Lze předpokládat, že vliv polymorfismu MDR1 se uplatňuje až ve fázi po přeměně tramadolu na ODT. Koncentrace tramadolu a ODT v séru jsou ovlivněny pouze polymorfismem CYP2D6, vliv MDR1 je prakticky nepřítomen.

Vliv polymorfismu na farmakodynamiku opioidů jsme studovali u dvou modelových situací a to pomocí pupilometrického vyšetření u zdravých dobrovolníků a u nemocných s akutní pooperační bolesti. Nejprve jsme hodnotili řadu statických a dynamických pupilometrických změn s cílem výběru optimálního parametru vhodného pro detekci studovaných polymorfismů. Nejlépe se nám osvědčil rozdíl iniciálního pupilometrického parametru před podáním a po podání tramadolu. Podobně jako v předchozích studiích bylo potvrzeno, že vliv tramadolu na zornicovou reakci je závislý na polymorfismu CYP2D6. Překvapivě byl shledán vliv na tuto reakci i při rozdělení dobrovolníků podle polymorfismu MDR1. Signifikantní rozdíl mezi skupinami dobrovolníků s genotypem 3435CT/TT a 3435CC při téměř shodných

koncentracích tramadolu a ODT v séru dokládá existenci i dalších vlivů na zornicovou reakci. Vliv polymorfismu MDR1 na zornicovou reakci se projevil i při rozdělení dobrovolníků s fenotypem EM. Ve skupině EM3435CT/TT byla miotická reakce signifikantně menší než ve skupině EM3435CC. Interakční vliv polymorfismu CYP2D6 a MDR1 na zornicovou reakci potvrdila i dvoucestná ANOVA. O vlivu koncentrací tramadolu a ODT v séru vypovídají i korelace mezi těmito koncentracemi a rozdílu iniciálního pupilometrického parametru. Největší hodnoty jsou u koncentrací pravotočivého ODT v séru, kde jsme pozorovali korelace 0,42 u skupiny dobrovolníků s fenotypem EM, 0,34 u fenotypu IM a 0,32 u fenotypu PM. Toto dokládá působení ODT na zornicovou reakci. Přítomnost pravotočivého ODT působí miózu. U jedinců s fenotypem PM, u kterých je nízká až nulová koncentrace pravotočivého ODT se uplatňuje vliv tramadolu, a dochází zde k méně výrazné mióze až mydriáze. Nejvyšší koncentrace (+)-ODT u jedinců s fenotypem PM byla 3,21 ng/ml, což je hodnota nižší než nejnižší koncentrace (+)-ODT u skupiny dobrovolníků s fenotypem EM.

Testovali jsme validitu miotické reakce po podání tramadolu pro geneticky potvrzenou skupinu EM ve srovnání s PM. Mióza, vyvolaná μ - účinkem aktivního metabolitu tramadolu, má pro detekci EM přibližně 90% senzitivitu, což znamená, že nezachytí přibližně 10 % jedinců této skupiny. Test má ale malou specifitu, pouze asi 67%, to znamená nižší citlivost na správné odhalení negativních výsledků u pomalých metabolizátorů. Obdobně jsme hodnotili vliv polymorfismu MDR1 a zjistili jsme senzitivitu 83,3% pro detekci jedinců s genotypem 3435CC, specifita tohoto vyšetření je 37,8%.

Variabilitu účinku opioidů jsme hodnotili u středně těžké akutní pooperační bolesti u nemocných operovaných na III. chirurgické klinice 1. LF UK a FN Motol. V pilotní studii jsme analyzovali analgetický efekt a nežádoucí účinky nejčastěji používaných léčiv, nesteroidního analgetika diklofenaku a opioidního analgetika piritramidu. U pacientů, kterým byl jako první podán piritramid, došlo k lepšímu analgetickému účinku a snížení nutnosti podání následných dávek analgetik. Nejčastěji používaná následná terapie byla založena na kombinaci diklofenaku a piritramidu, což je v souladu s doporučením (Dhillon, 2010). V dalším klinickém hodnocení jsme studovali vliv polymorfismu MDR1 a CYP2D6). Pacientům s genotypem 2677GG bylo v průběhu pooperačního období na jejich žádost podáno menší množství piritramidu, přesto u nich byla prokázána větší úleva od iniciální bolesti i vyšší součet rozdílu intenzity bolesti a

více pacientů vnímajících léčbu bolesti pozitivně. Průměrné hodnoty rozdílu VAS po dobu 24 hodin po operaci byla také nižší ve srovnání s jedinci s variantní alely v genu. Otázkou zůstává, zda tyto výsledky vznikly v důsledku zvýšené koncentrace piritramidu v místě účinku. Nižší spotřeba piritramidu u pacientů s genotypem 2677GG pravděpodobně vedla ke snížení frekvence nežádoucích účinků ve srovnání s pacienty s variantní alelou. U piritramidu nejsou zatím známy žádné konkrétní informace o jeho úloze jako substrátu P-glykoproteinu. Avšak u dalších opioidů jako je např. morfin, loperamid nebo fentanyl bylo již tato substrátová specifita prokázána (Fujita et al., 2010). Námi zjištěný výrazně lepší analgetický účinek u skupiny pacientů s fenotypem EM v porovnání s pacienty s fenotypem PM potvrzuje vliv polymorfismu CYP2D6, je v souladu s výsledky dalších autorů (Lötsch et al., 2009, Kleine-Brueggeneay et al., 2010, Leppert et al., 2011).

Celkový výskyt nežádoucích účinků byl nejvyšší u skupiny pacientů s fenotypem PM, signifikantní rozdíl však nebyl prokázán. Příčinou může být malý počet pacientů s fenotypem PM.

6. ZÁVĚR

Interindividuální variabilita opioidního účinku je ovlivněna rozdíly v koncentracích tramadolu a jeho aktivního metabolitu u dobrovolníků. Uplatňují se farmakogeneticky podmíněné rozdíly v metabolismu vyvolané polymorfismem genu CYP2D6 a modifikující působení efluxního transportéru P-glykoproteinu při vstřebání i eliminaci léčiva.

Nejvýznamnější výsledky dokumentující dominantní vliv polymorfismu CYP2D6 na farmakokinetiku tramadolu lze shrnout v těchto bodech:

- Polymorfismu CYP2D6 lze spolehlivě fenotypovat zejména z poměru koncentrací pravotočivého ODT a pravotočivého tramadolu v séru 2,5 hodiny po podání léčiva
- Polymorfismu CYP2D6 lze spolehlivě fenotypovat ze součtu koncentrací pravotočivého a levotočivého ODT ze sběru moče za 2,5 hodiny po podání léčiva

- Polymorfismus MDR1 lze spolehlivě fenotypovat ze součtu koncentrací pravotočivého a levotočivého ODT ze sběru moče za 2,5 hodiny po podání léčiva
- Vliv polymorfismu MDR1 ve vztahu k polymorfismu CYP2D6 na farmakokinetiku tramadolu je minoritní a má vliv pouze u dobrovolníků s fenotypem PM

Změny velikosti pupily lze využít jako bioindikátor centrálního působení tramadolu i pro farmakokineticko-farmakodynamické studie:

- Vliv polymorfismu CYP2D6 lze spolehlivě fenotypovat na základě rozdílů následujících pupilometrických parametrů – INIT, MIN, FINAL a TTM
- Nejvýznamnější parametr pro detekci jedinců s fenotypem EM byl parametr INIT
- Vliv polymorfismu MDR lze fenotypovat na základě rozdílu pupilometrického parametru INIT
- Polymorfismu MDR1 má na výsledky pupilometrického měření additivní vliv
- Koncentrace pravotočivého ODT nejvýrazněji ovlivňuje velikost zornicové reakce

Variabilita působení piritramidu u akutní pooperační bolesti se projevila:

- Lepší analgetickým účinkem u skupiny pacientů s fenotypem EM v porovnání s pacienty s fenotypem IM a PM
- Nesignifikantně zvýšeným výskytem nežádoucích účinků u nemocných s fenotypem PM
- Nemocní s genotypem 2677GG měli lepší analgetický účinek v porovnání s pacienty s variantní alelou
- Nemocní s genotypem 2677GG měli signifikantně nižší výskyt nežádoucích účinků v porovnání s pacienty s variantní alelou

7. LITERATURA

Abdel-Rahman SM, Leeder JS, Wilson JT, Gaedigk A, Gotschall RR, Medve R, Liao S, Spielberg SP, Kearns GL (2002) Concordance between tramadol and dextromethorphan parent/metabolite ratios: the influence of CYP2D6 and non-CYP2D6 pathways on biotransformation. *J Clin Pharmacol.* 42: 24-9.

Adámek S, Matoušková O, Pafko P, Slanař O, Perlík F (2010) The role of diclofenac and piritramide in the management of acute postoperative pain in hernioplasty. *Bratisl Lek Listy.* 111: 616-8.

Baer KJ, Boettger MK, Till S, Dolicek J, Sauer H. (2005) Lateralization of pupillary light reflex parameters. *Clin Neurophysiol.* 4: 790-798.

Bellusci CP, Rocco CA, Aulicino PC, Mecikovsky D, Bologna R, Sen L, Mangano A (2010) MDR1 3435T and 1236T alleles delay disease progression to pediatric AIDS but have no effect on HIV-1 vertical transmission. *AIDS.* 24: 833-40.

Boettcher M, Heinig R, Wensing G, Kuhlmann J. (2005) Pupil reaction: a valid sensitive clinical biomarker for 5-HT compounds. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 3: 246.

Boev AN, Fountas KN, Karampelas I, Boev C, Machinis TG, Feltes C, Okosun I, Dimopoulos V, Troup C. (2005) Quantitative pupillometry: normative data in healthy pediatric volunteers. *J Neurosurg.* 6 Suppl :496-500.

Bultas J (2010) Pharmacogenetics in cardiovascular diseases therapy-treatment according guidelines or according the individual requirement ? *Čas. Lék. Česk.* 149: 476-81.

Buzková H, Pechandová K, Slanař O, Perlík F (2008) Frequency of single nucleotide polymorphisms of CYP2D6 in the Czech population. *Cell Biochem Funct.* 26: 76-81.

Campa D, Gioia A, Tomei A, Poli P, Barale R (2008) Association of ABCB1/MDR1 and OPRM1 gene polymorphisms with morphine pain relief. *Clin Pharmacol Ther.* 83: 559-66.

Collart L, Luthy C, Favario-Constantin C, Dayer P. (1993) Duality of the analgesic effect of tramadol in humans. *Schweiz Med Wochenschr.* 47: 2241-2243.

Coulbault L, Beaussier M, Verstuyft C, Weickmans H, Dubert L, Tregouet D, Descot C, Parc Y, Lienhart A, Jaillon P, Becquemont L (2006) Environmental and genetic factors associated with morphine response in the postoperative period. *Clin Pharmacol Ther.* 79: 316-24.

Dhillon S (2010) Tramadol/paracetamol fixed-dose combination: a review of its use in the management of moderate to severe pain. *Clin Drug Investig.* 30:711-38.

Enggaard TP, Poulsen L, Arendt-Nielsen L, Brøsen K, Ossig J, Sindrup SH (2006) The analgesic effect of tramadol after intravenous injection in healthy volunteers in relation to CYP2D6. *Anesth Analg.* 102: 146-50.

- Fliegert F, Kurth B, Göhler K (2005) The effects of tramadol on static and dynamic pupillometry in healthy subjects--the relationship between pharmacodynamics, pharmacokinetics and CYP2D6 metaboliser status. *Eur J Clin Pharmacol.* 61: 257-66.
- Freye E, Latasch L (2000) Effects of tramadol and tilidine/naloxone on oral-caecal transit and pupillary light reflex. *Arzneimittelforschung.* 50: 24-30.
- Fujita K, Ando Y, Yamamoto W, Miya T, Endo H, Sunakawa Y, Araki K, Kodama K, Nagashima F, Ichikawa W, Narabayashi M, Akiyama Y, Kawara K, Shiomi M, Ogata H, Iwasa H, Okazaki Y, Hirose T, Sasaki Y (2010) Association of UGT2B7 and ABCB1 genotypes with morphine-induced adverse drug reactions in Japanese patients with cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 65: 251-8.
- Ghodse AH, Greaves JL, Lynch D. (1999) Evaluation of the opioid addiction test in an out-patient drug dependency unit. *Br J Psychiatry.* 175: 158-62.
- Green H, Söderkvist P, Rosenberg P, Horvath G, Peterson C (2008) ABCB1 G1199A polymorphism and ovarian cancer response to paclitaxel. *J Pharm Sci.* 97: 2045-8.
- Halling J, Weihe P, Brosen K (2008) CYP2D6 polymorphism in relation to tramadol metabolism: a study of faroese patients. *Ther Drug Monit.* 30: 271-5.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johné A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 3473-8.
- <http://www.cypalleles.ki.se/>, 10. 2. 2011.
- Chytil L, Matoušková O, Černá O, Pokorná P, Vobruba V, Perlík F, Slanař O (2010) Enantiomeric determination of tramadol and O-desmethyltramadol in human plasma by fast liquid chromatographic technique coupled with mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 878: 481-6.
- Chytil L, Štícha M, Matoušková O, Perlík F, Slanař O (2009) Enantiomeric determination of tramadol and O-desmethyltramadol in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 877: 1937-42.
- Johansson I, Ingelman-Sundberg M (2011) Genetic polymorphism and toxicology-with emphasis on cytochrome p450. *Toxicol Sci.* 120: 1-13.
- Juřica J, Barteček R, Zendulka O, Kašpárek T, Žourková A, Šulcová A (2010) Stanovení fenotypu CYP2D6 dextrometorfanovým testem ze séra psychiatrických pacientů. *Psychiatrie* 14 Suppl 1: 42-43.
- Kleine-Brueggene M, Musshoff F, Stuber F, Stamer UM (2010) Pharmacogenetics in palliative care. *Forensic Sci Int.* 203:63-70.
- Klepstad P, Dale O, Skorpen F, Borchgrevink PC, Kaasa S (2005) Genetic variability and clinical efficacy of morphine. *Acta Anaesthesiol Scand.* 49: 902-8.

- Knaggs RD, Crighton IM, Cobby TF, Fletcher AJ, Hobbs GJ (2004) The pupillary effects of intravenous morphine, codeine, and tramadol in volunteers. *Anesth Analg.* 99: 108-12.
- Kummer O, Hammann F, Moser C, Schaller O, Drewe J, Krähenbühl S (2011) Effect of the inhibition of CYP3A4 or CYP2D6 on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxycodone. *Eur J Clin Pharmacol.* 67: 63-71.
- Lanier RK, Umbricht A, Harrison JA, Nuwayser ES, Bigelow GE. (2007) Evaluation of a transdermal buprenorphine formulation in opioid detoxification. *Addiction.* 10: 1648-1656.
- Leppert W, Mikolajczak P (2011) Analgesic effects and assays of controlled-release tramadol and o-desmethyltramadol in cancer patients with pain. *Curr Pharm Biotechnol.* 12: 306-12.
- Leštianský B, Hakl M (2010) Strategie opioidní léčby. *Paliativna medicina a liečba bolesti* 3 č. 3: 94-98.
- Lincová D, Farghali H (ed) (2007) *Základní a aplikovaná farmakologie.* 2. vyd. Praha: Galén, 672 stran.
- Lötsch J, Geisslinger G, Tegeder I (2009) Genetic modulation of the pharmacological treatment of pain. *Pharmacol Ther.* 124: 168-84.
- Matoušková O, Slanař O, Adámková J, Pafko P, Perlík F, Adámek S (2011) Impact of MDR1 genetic polymorphisms on postoperative piritramide analgesia. *Bratisl Lek Listy.* Přijato k tisku.
- Matoušková O, Slanař O, Chytil L, Perlík F (2010) Pupillometrie jako bioindikátor účinku lečiv. *Čas Lek Česk* 149: 66–68.
- Matoušková O, Slanař O, Chytil L, Perlík F (2011) Pupillometry in healthy volunteers as a biomarker of tramadol efficacy. *J Clin Pharm Ther.* 36: 513-7.
- Mičuda S, Mundlová L, Anzenbacherová E, Anzenbacher P, Chládek J, Fuksa L, Martínková J (2004) Inhibitory effects of memantine on human cytochrome P450 activities: prediction of in vivo drug interactions. *Eur J Clin Pharmacol.* 60: 583-589.
- Murillo R, Crucilla C, Schmittner J, Hotchkiss E, Pickworth WB (2004) Pupillometry in the detection of concomitant drug use in opioid-maintained patients. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 4: 271-5.
- Noehr-Jensen L, Zwisler ST, Larsen F, Sindrup SH, Damkier P, Nielsen F, Broesen K. (2009) Impact of CYP2C19 phenotypes on escitalopram metabolism and an evaluation of pupillometry as a serotonergic biomarker. *Eur J Clin Pharmacol.* 9: 887-94.
- Nielsen AG, Pedersen RS, Noehr-Jensen L, Damkier P, Broesen K (2010) Two separate dose-dependent effects of paroxetine: mydriasis and inhibition of tramadol's O-demethylation via CYP2D6. *Eur J Clin Pharmacol.* 66: 655-60.
- Pechandová K, Buzková H, Slanař O, Perlík F (2006) Polymorphisms of the MDR1 gene in the Czech population. *Folia Biol (Praha).* 52: 184-9.

- Pedersen RS, Damkier P, Brosen K (2005) Tramadol as a new probe for cytochrome P450 2D6 phenotyping: a population study. *Clin Pharmacol Ther.* 77: 458-67.
- Penna G, Allegra A, Alonci A, Aguenouz M, Garufi A, Cannavò A, Gerace D, Alibrandi A, Musolino C (2010) MDR-1 polymorphisms (G2677T and C3435T) in B-chronic lymphocytic leukemia: an impact on susceptibility and prognosis. *Med Oncol.* Přijato k tisku.
- Poulsen L, Arendt-Nielsen L, Brøsen K, Sindrup SH (1996) The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther.* 60: 636-44.
- Rauers NI, Stüber F, Lee EH, Musshoff F, Fimmers R, Barann M, Stamer UM (2010) Antagonistic effects of ondansetron and tramadol? A randomized placebo and active drug controlled study. *J Pain.* 11: 1274-81.
- Rokyta R, Kršiak M, Kozák J (ed) (2006) *Bolest.* Praha: Tigris, 684 stran.
- Ross JR, Riley J, Taegtmeyer AB, Sato H, Gretton S, du Bois RM, Welsh KI (2008) Genetic variation and response to morphine in cancer patients: catechol-O-methyltransferase and multidrug resistance-1 gene polymorphisms are associated with central side effects. *Cancer.* 112: 1390-403.
- Slanař O, Perlík F (2004) CYP2D6 polymorphism and miotic effects of tramadol in healthy volunteers. *Drug Metabolism Reviews.* 36: 114.
- Slanař O, Urban M, Perlík F (2005) Infrared pupillometry measured by digital photography. *Cas Lek Cesk.* 144:273-6.
- Slanař O, Nobilis M, Květina J, Idle JR, Perlík F (2006) CYP2D6 polymorphism, tramadol pharmacokinetics and pupillary response. *Eur J Clin Pharmacol.* 62:75-6.
- Slanař O, Nobilis M, Květina J, Mikoviny R, Zima T, Idle JR, Perlík F (2007) Miotic action of tramadol is determined by CYP2D6 genotype. *Physiol Res.* 56: 129-136.
- Slanař O, Nobilis M, Květina J, Matoušková O, Idle JR, Perlík F (2007) Pharmacokinetics of tramadol is affected by MDR1 polymorphism C3435T. *Eur J Clin Pharmacol.* 63:419-21.
- Stamer UM, Lehnen K, Höthker F, Bayerer B, Wolf S, Hoefl A, Stuber F (2003) Impact of CYP2D6 genotype on postoperative tramadol analgesia. *Pain.* 105: 231-8.
- Taylor WR, Chen JW, Meltzer H, Gennarelli TA, Kelbch C, Knowlton S, Richardson J, Lutch MJ, Farin A, Hulst KN, Marshall LF. (2003) Quantitative pupillometry, a new technology: normative data and preliminary observations in patients with acute head injury. Technical note. *J Neurosurg.* 1: 205-213.
- Thompson SJ, Koszdin K, Bernards CM (2000) Opiate-induced analgesia is increased and prolonged in mice lacking P-glycoprotein. *Anesthesiology.* 92: 1392-9.
- Wandel C, Kim R, Wood M, Wood A (2002) Interaction of morphine, fentanyl, sufentanil, alfentanil, and loperamide with the efflux drug transporter P-glycoprotein. *Anesthesiology.* 96: 913-20.

8. SEZNAM PŘÍLOH

1. Matoušková, O., Slanař, O., Chytil, L., Perlík, F. (2010) Pupillometry in healthy volunteers as a biomarker of tramadol efficacy. *J Clin Pharm Ther.* 36: 513-7.
2. Matoušková, O., Slanař, O., Chytil, L., Perlík, F. (2010) Pupilometrie jako bioindikátor účinku léčiv. *Čas Lék Česk* 149: 66–68.
3. Matoušková, O., Slanař, O., Adámková, J., Pafko, P., Perlík, F., Adámek, S. (2011) Impact of MDR1 genetic polymorphisms on postoperative piritramide analgesia. *Bratisl Lek Listy*. Přijato k tisku.
4. Adámek, S., Matoušková, O., Pafko, P., Slanař, O., Perlík, F. (2010) The role of diclofenac and piritramide in the management of acute postoperative pain in hernioplasty: a retrospective study. *Bratisl Lek Listy* 111: 616 – 618.
5. Chytil, L., Štícha, M., Matoušková, O., Perlík, F., Slanař, O. (2009) Enantiomeric determination of tramadol and O-desmethyltramadol in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877: 1937 – 1942.
6. Slanař, O., Nobilis, M., Květina, J., Matoušková, O., Idle, JR., Perlík, F. (2007) Pharmacokinetics of tramadol is affected by MDR1 polymorphism C3435T *Europ J Clin Pharmacol* 63: 419 – 421.

PŘÍLOHA 1

Matoušková, O., Slanař, O., Chytil, L., Perlík, F. (2010) Pupillometry in healthy volunteers as a biomarker of tramadol efficacy. *J Clin Pharm Ther.* 36: 513-7.

PŘÍLOHA 2

Matoušková, O., Slanař, O., Chytil, L., Perlík, F. (2010) Pupilometrie jako bioindikátor účinku léčiv. *Čas Lék Česk* 149: 66–68.

PŘÍLOHA 3

Matoušková, O., Slanař, O., Adámková, J., Pafko, P., Perlík, F., Adámek, S. (2011)
Impact of MDR1 genetic polymorphisms on postoperative piritramide analgesia. *Bratisl
Lek Listy*. Přijato k tisku.

PŘÍLOHA 4

Adámek, S., Matoušková, O., Paľko, P., Slanař, O., Perlík, F. (2010) The role of diclofenac and piritramide in the management of acute postoperative pain in hernioplasty: a retrospective study. *Bratisl Lek Listy* 111: 616 – 618.

PŘÍLOHA 5

Chtil, L., Štícha, M., Matoušková, O., Perlík, F., Slanař, O. (2009) Enantiomeric determination of tramadol and O-desmethyltramadol in human urine by gas chromatography - mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877: 1937 – 1942.

PŘÍLOHA 6

Slanař, O., Nobilis, M., Květina, J., Matoušková, O., Idle, JR., Perlík, F. (2007)
Pharmacokinetics of tramadol is affected by MDR1 polymorphism C3435T *Europ J
Clin Pharmacol* 63: 419 – 421.