

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce



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

**MUDr. Olga Matoušková**

**2011**

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

**Obor:**

Farmakologie a toxikologie

**Předseda oborové rady:**

prof. MUDr. Sixtus Hynie, DrSc.

**Školící pracoviště:**

Farmakologický ústav 1. LF UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

**Školitel:**

prof. František Perlík, DrSc.

**Konzultant:**

doc. MUDr. Ondřej Slanař, Ph. D.

Dizertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## **Obsah:**

1. Abstrakt v českém jazyce.....	4
2. Abstract in English.....	5
3. Úvod.....	6
4. Hypotézy a cíle práce.....	9
5. Soubor a metodika.....	9
6. Výsledky.....	13
7. Diskuze.....	21
8. Závěr.....	24
9. Použitá literatura.....	26
10. Odborné publikace autora.....	29
11. Seznam použitých zkratk.....	30

## **1. 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

## **2. Abstract in English**

**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

### **3. Úvod**

Dizertační práce se převážně opírá o soubor prací uvedených v přehledu publikací. Popisuje vliv genetické dispozice 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.

Důvodem pro provádění výzkumu v této oblasti je skutečnost, že opioidy jsou pro svojí vysokou analgetickou účinnost velmi často podávaným léčivem. Tramadol je představitelem tzv. atypických opioidních analgetik s afinitou k  $\mu$ -,  $\delta$ - a  $\kappa$ -opioidních receptorů s vyšší afinitou k  $\mu$ -receptorům, používá se k léčbě střední až středně těžké bolesti. (Lincová et al., 2007). Piritramid má analgetické účinky srovnatelné s morfinem, ale působí déle. Vyznačuje se centrálním analgetickým účinkem. Klinickými studii byl potvrzen rychlý nástup účinku. Výskyt nežádoucích účinků je nižší než u morfinu. Po intramuskulárním podání je dosaženo vrcholové plazmatické hladiny po 15 minutách. 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. Cytochrom P450 se dělí na rodiny (40% shoda sekvencí), podrodiny (55% shoda) a na konkrétní enzymy. V lidském genomu se doposud podařilo identifikovat 64 genů pro různé izoformy CYP. 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 izoform zapojených do metabolismu xenobiotik. Výše zmíněný 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 O – desmethyltramadol (ODT) je farmakologicky aktivní. Enzym odpovědný za O-demetylaci 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. Sérové koncentrace (+)-ODT u pomalých metabolizátorů (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 rychlých metabolizátorů (fenotyp 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. Signifikantní rozdíl v závislosti na fenotypu CYP2D6 byl pozorován i u koncentrací tramadolu a ODT v moči (Halling et al.). Nicméně opioidní léčba s sebou může nést celou řadu závažných nežádoucích účinků (Leštianský 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 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  $\mu$ -opioidních receptorů (Freye et al., 2000, Knaggs et al., 2004).

Dalším z polymorfismů ovlivňující farmakokinetiku opioidů je MDR1 gen, kódující P-glykoprotein, který je zodpovědný za eliminaci mnoha léků a xenobiotik (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. Molekulární mechanismus funkce P-glykoproteinu, není stále ještě přesně jasný, ačkoli existuje řada teorií a modelů o funkci P-glykoproteinu. 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 exkreční funkcí – v kanalikulární membráně hepatocytů, na apikální straně epitelových buněk žlučových kanálků a renálního proximálního tubulu. 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). 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.

#### **4. Hypotézy a cíle 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.

Hypotéza 1: Polymorfismu CYP2D6 a MDR1 lze spolehlivě fenotypovat z hodnot koncentrací tramadolu a jeho metabolitu v séru a moči 2,5 hodiny po podání léčiva.

Hypotéza 2: Polymorfismu CYP2D6 a MDR1 lze spolehlivě fenotypovat z rozdílu hodnot pupilometrických parametrů před a po podání léčiva.

Hypotéza 3: Analgetický účinek piritramidu a výskyt nežádoucích účinků u pacientů s akutní pooperační bolestí je modifikován polymorfismem genů CYP2D6 a MDR1.

#### **5. Soubor a metodika**

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. Studie byly realizovány po souhlasu Etické komise VFN v Praze nebo Etické komise FN Motol a po podepsání informovaných souhlasů. Byly provedeny v souladu s Helsinskou deklarácí.

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

Pilotní studie se zúčastnilo 21 zdravých nepříbuzných dobrovolníků. Dobrý zdravotní stav byl potvrzen fyzikálním vyšetřením a rutinním laboratorním vyšetřením jater a ledvin. Měsíc před vyšetřením neužívali dobrovolníci žádné léky. 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.

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

Druhé studie se celkem zúčastnilo 69 zdravých nepříbuzných dobrovolníků. 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/m<sup>2</sup>. Dobrý zdravotní stav byl potvrzen fyzikálním vyšetřením a rutinním laboratorním vyšetřením jater a ledvin. Měsíc před vyšetřením neužívali dobrovolníci žádné léky. 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.

## **5.3. 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 vizuální analogové škály (VAS) před

podáním před podáním a jednu hodinu po podání léku proti bolesti. 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.

#### **5.4. 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. 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. 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 bolesti 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).

### **5.5. Metodika genetického vyšetření, chirálního stanovení tramadolu a ODT v séru a moči a hodnocení farmakodynamického efektu léků**

Izolace DNA probíhala podle postupu kitu DNA – QIAmp Blood Mini Kitu pomocí QIAGEN protézy a 96% vychlazeného etanolu po odběru vzorku periferní žilní krve. Genotypizace CYP2D6 a MDR1 jsme stanovili pomocí PCR – RFLP analýzy, ke stanovení koncentrace tramadolu a jeho metabolitu jsme použili plynovou a kapalinovou chromatografii (Chytil et. al., 2009). Farmakodynamický efekt tramadolu jsme hodnotili pomocí pupilometrického měření, z hodnot pupilometrických parametrů INIT (iniciální pupilometrický parametr), MIN (minimální pupilometrický parametr), FINAL (finální pupilometrický parametr), RA (reflexní amplituda), CV (konstrikční rychlost) a TTM (time to minimum) naměřených před a po podání léku byly vypočteny rozdíly, které jsme dále statisticky hodnotili (Matoušková, et. al., 2010). Analgetický efekt piritramidu byl hodnocen pomocí VAS od 0 do 100mm (0 – žádná bolest, 10 – nesnesitelná nejhorší bolest).

### **5. 6. 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  $\chi^2$  – testu. Interakční vliv polymorfismu CYP2D6 a MDR1 C3435T popisuje parametr  $R^2$ , který byl získán použitím dvoucestné ANOVY.

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

$SS_{\text{effect}}$  – součet čtverců efektu od průměrů skupin

$SS_{\text{error}}$  – 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  $\chi^2$  – test pro srovnání počtu respondentů a non-responderů. Rozdíly byly považovány za statisticky významné při  $p < 0,05$ .

## **6. Výsledky**

### **6.1. 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. ( $p = ns$ ). Vliv polymorfismu G2677T/A na koncentrace tramadolu a ODT nebyl prokázán.

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

Rozdíly mezi skupinami rozdělených podle polymorfismu CYP2D6 byly v séru 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  $[+]-T+[+]-T$  ( $p = 4,1 \cdot 10^{-8}$ ). Tabulka 1 shrnuje průměrné hodnoty koncentrací tramadolu, ODT a vzájemných poměrů rozdělených podle polymorfismu CYP2D6.

Tab. 1 Koncentrace tramadolu a ODT v séru (průměr ± SD) 2,5 hodiny po podání

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

\* signifikantní rozdíl mezi slupinami EM, IM a PM

Tab. 2 Koncentrace tramadolu a ODT ze sběru moče (průměr ± SD) 2,5 hodiny po podání

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

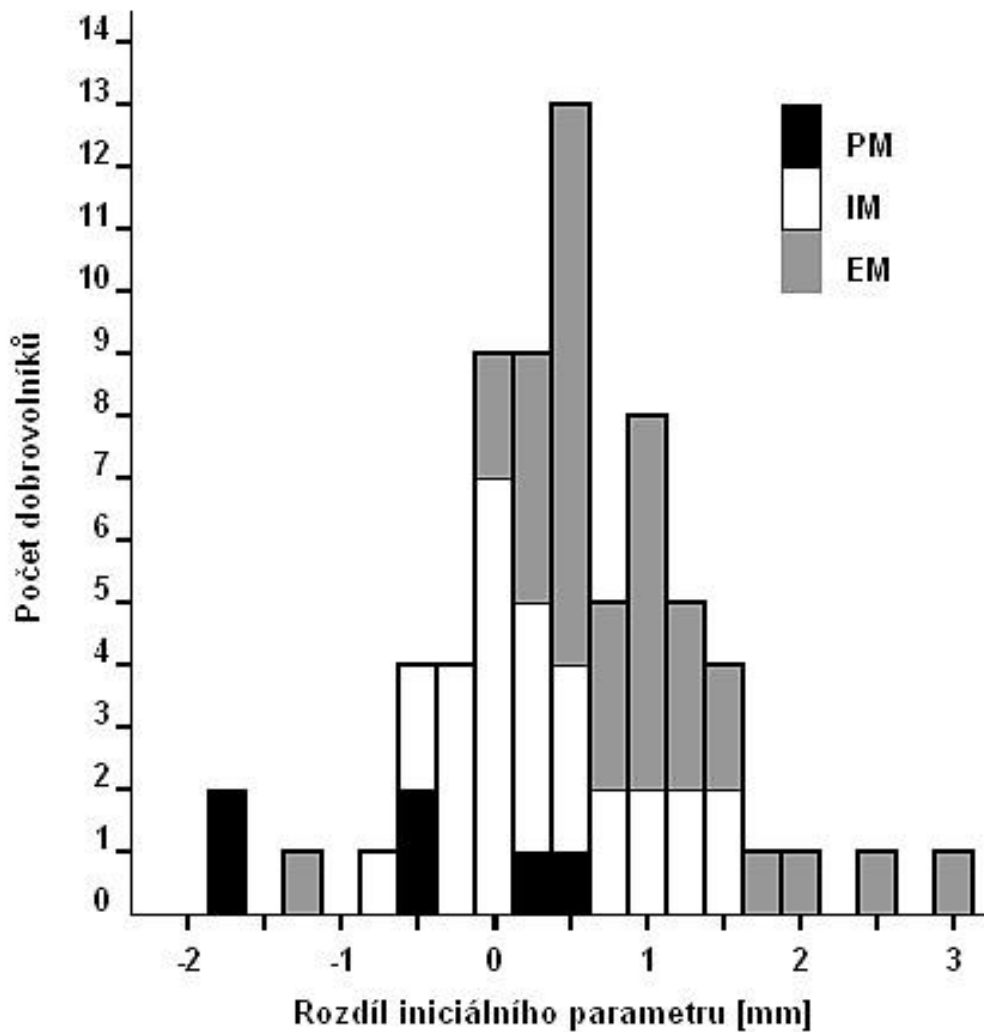
\* signifikantní rozdíl mezi slupinami EM, IM a PM

Rozdíly mezi skupinami rozdělených podle polymorfismu CYP2D6 byly v moči signifikantní u většiny hodnot koncentrací i jejich vzájemných poměrů. Vysoce statisticky významně se tento polymorfismus projevil u součtu [+] -ODT + [-] -ODT ( $p = 0,5 \cdot 10^{-8}$ ). Tabulka 2 shrnuje průměrné hodnoty koncentrací tramadolu, ODT a vzájemných poměrů rozdělených podle polymorfismu CYP2D6.

Vliv polymorfismu MDR na koncentraci tramadolu a ODT v séru se prakticky neprojevil, zatímco 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 ( $p = 0,016$ ). Vysoce statisticky významně se tento polymorfismus projevil u součtu [+] -ODT + [-] -ODT ( $p = 0,016$ ). Interakční vliv polymorfismu CYP2D6 a MDR1 hodnocený pomocí dvoucestné ANOVY se projevil u koncentrací ODT v moči, zde má polymorfismus genu MDR1 modifikující vliv na výslednou koncentraci metabolitu.

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 ( $\chi^2 = 15,58$ ;  $p = 0,0004$ ). Podání tramadolu jedincům s fenotypem EM vyvolalo signifikantní pokles jak parametru INIT tak i dynamických pupilometrických parametrů s výjimkou parametru RA a CV, toto dokazuje význam pupilometrického vyšetření pro stanovení fenotypu genu CYP2D6. Obrázek 1 znázorňuje signifikantní rozdíly velikosti iniciálního průměru zornice před a po podání tramadolu v závislosti na fenotypu jedince.

Obr. 1 Histogram rozdílů iniciálních parametrů v závislosti na fenotypu CYP2D6, kladné hodnoty popisují míru miotické reakce, záporné hodnoty popisují míru mydriatické reakce



Dalším cílem naší práce bylo zhodnocení vlivu polymorfismu MDR1 C3435T (exon 26) na zornicovou reakci i jednotlivé pupilometrické parametry. Tento



polymorfismus se projevil u rozdílu hodnot parametru INIT, u jedinců s genotypem 3435CT/TT jsme pozorovali signifikantně méně výraznou miotickou reakci.

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. Statistickým hodnocením při použití dvoucestné ANOVY jsme pozorovali additivní vliv polymorfismu MDR1 na výsledky pupilometrického měření.

### **6. 3. Opioidní analgezie v současné pooperační léčbě bolesti - pilotní klinická studie**

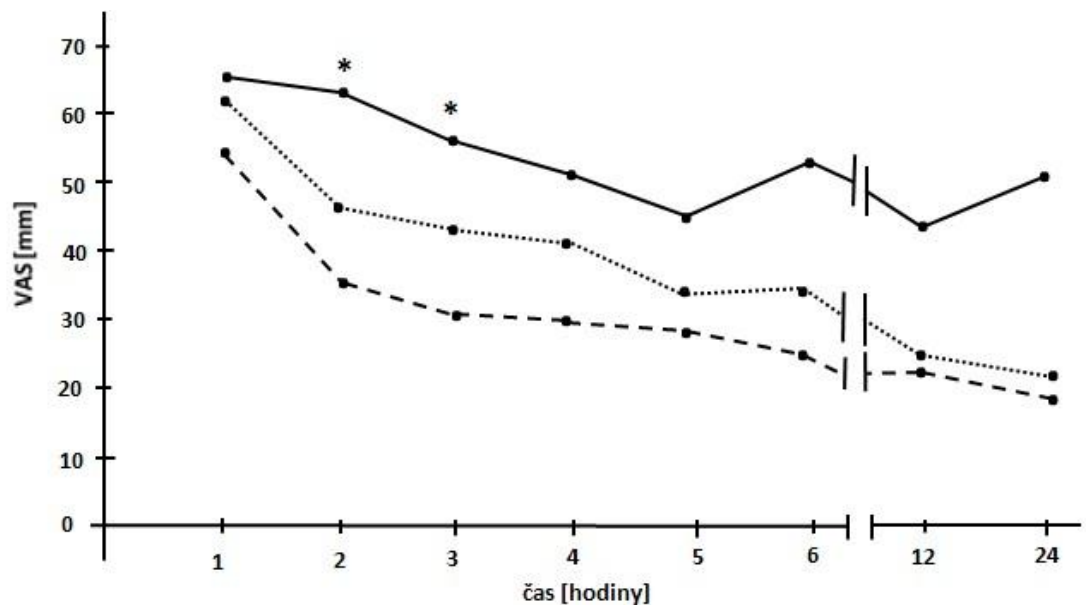
U všech pacientů zařazených do naší pilotní klinické práce byla operace provedena bez výraznějších komplikací. Nepozorovali jsme žádné významné rozdíly mezi oběma skupinami pacientů, týkající se demografických údajů, délky operace nebo trvání anestezie. Úleva od bolesti byla výrazně zvýšena u pacientů, kterým byl jako první 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. 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 následnou aplikací piritramidu, nebo diklofenaku.

### **6.4. 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. 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, s fenotypem PM 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 2).

Obr. 2 Průměrná intenzita bolesti v jednotlivých časových intervalech u skupiny pacientů s fenotypem EM (přerušovaná čára), IM (tečkovaná čára) a PM (plná čára)

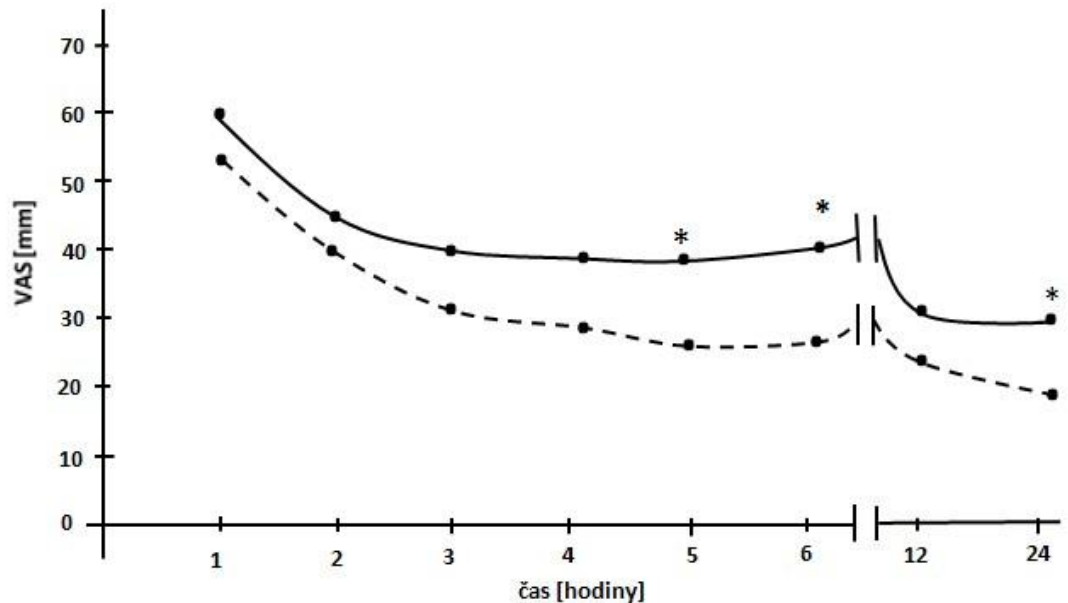


\*Signifikantní rozdíl ( $p < 0.05$ )

Výraznější pokles intenzity bolesti byl u skupiny s fenotypem EM. Hodnoty se významně liší mezi skupinami 2. a 3. hodinu po operaci. U hodnot SPID byly shledány signifikantní rozdíly, EM = 185,52 mm ( $\pm 93,51$ ), IM = 140,71 mm ( $\pm 84,71$ ), PM = 37,50 mm ( $\pm 20,61$ ),  $p < 0,01$ . Podobně byl jedincům s fenotypem EM podán signifikantně nižší počet injekcí než jedincům s fenotypem PM, 1,89 ( $\pm 0,93$ ) resp. 3,30 ( $\pm 0,81$ ),  $p < 0,01$ . 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%. ( $\chi^2 = 12,61$ ;  $p = 0,018$ ). Celkový výskyt nežádoucích účinků byl nejvyšší u skupiny dobrovolníků s fenotypem PM, rozdíl mezi fenotypovými skupinami však nebyl signifikantní. 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 3). 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, 209,33mm ( $\pm 95,80$ ) resp. 147,07mm ( $\pm 91,38$ ),  $p = 0,027$ . Navíc celková spotřeba piritramid byla nižší u jedinců s genotypem 2677GG ve srovnání s pacienty nesoucí variantní alelu T, 1,67 ( $\pm 0,72$ ) resp. 2,37 ( $\pm 0,89$ ),  $p < 0,01$ .

Obr. 3 Průměrná intenzita bolesti v jednotlivých časových intervalech u skupiny pacientů s genotypem 2677GG (přerušovaná čára) a genotypem 2677TT a 2677GT (plná čára)



\*Signifikantní rozdíl ( $p < 0.05$ )

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 ( $\chi^2 = 5,83$ ;  $p = 0,016$ ). 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).

## **7. 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  $\mu$  - 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-Brueggeney 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.

## **8. 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

## **9. Použitá 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.

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

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.

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.

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, John 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.

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.

- 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.
- 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.
- 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.
- Leštianský B, Hakl M (2010) Strategie opioidni léčby. *Paliativna medicina a liečba bolesti* 3 č. 3: 94-98.
- 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.
- 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 léčiv. *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.
- Nielsen AG, Pedersen RS, Noehr-Jensen L, Damkier P, Brosen 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.
- 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.
- Ross JR, Riley J, Taetgemeyer 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, Hoeft A, Stuber F (2003) Impact of CYP2D6 genotype on postoperative tramadol analgesia. *Pain.* 105: 231-8.
- 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.

## **10. Odborné publikace autora**

### **Publikace in extenso, které jsou podkladem dizertace s impact factorem :**

1. Matoušková, O., Slanař, O., Chytil, L., Perlík, F. (2010) Pupilometry 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., 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)**
3. 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**
4. 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**
5. 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**

### **bez IF:**

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

### **Publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertace s IF**

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. 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)**

### **bez IF**

1. 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
2. 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

## **11. Seznam použitých zkratk**

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

IM - středně rychlí metabolizátoři – jedinci se sníženou metabolickou aktivitou

INIT - iniciální pupilometrický parametr

MDR1 - multidrug resistance protein 1 – transportér

MIN - minimální pupilometrický parametr

ODT - O-desmetyltramadol

PCR - polymerázová řetězová reakce

PM - pomalí metabolizátoři - jedinci s deficitní metabolickou aktivitou

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

TTM - time to minimum, čas k dosažení minimálního parametru



