

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Ústav klinické biochemie a patobiochemie

**Iveta Brabcová**

Zavedení metody na identifikaci genotypů  
asociovaných s kumarinovou antikoagulační  
terapií

**Bakalářská práce**

Praha 2011

Autor práce: Iveta Brabcová

Vedoucí práce: Ing. Karel Kotaška, Ph.D.

Oponent práce: Ing. Eva Klapková, Ph.D.

Datum obhajoby: 2011

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením Ing. Karla Kotašky, Ph.D., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Iveta Brabcová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Ing. Karlovi Kotaškovi, Ph.D. za čas a cenné rady, které mi věnoval a za způsob, jakým ke mně přistupoval. Dále děkuji Pavle Kubešové a Radce Matějové, které mi vždy velmi ochotně pomohly a poradily. Za totéž děkuji i zbylému kolektivu laboratoře klinické biochemie a patobiochemie, který mi navíc poskytnul příjemné pracovní prostředí. Dále bych chtěla poděkovat vrchní laborantce Mgr. Martině Bunešové za vstřícný přístup během celého studia a za poskytnutí možnosti měření v této laboratoři. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům, kteří mi během studia pomáhali a vždy mě podporovali a také svým spolužákům, se kterými jsme vytvořili výborný kolektiv.

## Bibliografický záznam

BRABCOVÁ, Iveta. *Zavedení metody na identifikaci genotypů asociovaných s kumarinovou antikoagulační terapií*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav klinické biochemie a patobiochemie, 2011. 61 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Karel Kotaška, Ph.D.

## Anotace

Antagonisté vitamínu K (kumariny) jsou nejrozšířenější orální antikoagulanty pro prevenci a léčbu žilního tromboembolismu, infarktu myokardu a iktu. Jejich široká interindividuální variabilita v reakci na určité dávkování způsobuje výrazné riziko komplikací nejen v počátcích terapie. Nesprávné dávkování může způsobit život ohrožující komplikace, jako je krvácení v případě předávkování nebo nedostatečnou profylaxi kvůli nedostatečné dávce. Interindividuální variabilita velikosti dávky derivátů kumarinu je podmíněna řadou faktorů jak genetických, tak vnějšího prostředí (BMI, věk, dieta a užívání dalších léků). Cílem práce je zavést metodu na identifikaci genotypů (polymorfismů v genech CYP2C9 a VKORC1) asociovaných s antikoagulační terapií. Principem metody je polymerázová řetězová reakce s reverzní hybridizací. Efekt polymorfismů CYP2C9 a VKORC1 na velikost denní dávky kumarinu (warfarinu) potřebné k udržení terapeutického rozmezí se navzájem potencuje. Pětina populace patří k vysoce rizikové skupině nosičů polymorfismu VKORC1 AA nebo VKORC1 GA a současně alespoň jedné mutace CYP2C9. Tito pacienti jsou ve vysokém riziku předávkování warfarinem, zejména v úvodu léčby. Doporučené dávkování zvoleného antikoagulantu pro konkrétního pacienta je možné získat po zadání údajů do internetového formuláře. Do formuláře je potřeba zadat základní údaje o pacientovi (věk, národnost, pohlaví, aktuální hodnota INR a výsledky testů na polymorfismy CYP2C9 a VKORC1). Na základě uvedených údajů bude vypočtena hodnota dávky pro konkrétního pacienta.

**Klíčová slova:** warfarin, farmakogenetika, PCR s reverzní hybridizací, CYP2C9, VKORC1

## Annotation

The vitamin K antagonists (coumarins) are the most common oral anticoagulants for prevention and treatment of the venous thromboembolism, myocardial infarction and stroke. Their wide interindividual variability in a dosing reaction causes high risk of complication at the start of the therapy. Wrong dosing can cause life-threatening complications including bleeding in overdosing or inadequate prophylaxis with low dose. Interindividual variability of the dose is related by both genetic factors and external environment (BMI, age, diet and using other medicaments). The aim of this work is an introduction of the method for identification of genotypes (polymorphisms in genes CYP2C9 and VKORC1) associated with the anticoagulation treatment. The principle of this method is Polymerase Chain Reaction with reverse hybridization. The effect of the polymorphism CYP2C9 and VKORC1 depend on daily coumarins dose necessary for therapeutic range is mutually potentiated. The one fifth of the population is variant carrier for high risk polymorphism VKORC1 AA or VKORC1 GA and one of the CYP2C9 variants. These patients are in a high risk for overdosing with warfarin, especially at the start of the treatment. We can get a recommended dose of anticoagulation for the specific patient when we fill in the form on the internet. It is necessary to add the demographic and clinical data of the patient (age, ethnic, sex, actual INR and results of the polymorphism CYP2C9 and VKORC1 tests. Accordingly to this data, the estimated dose for the individual patient is calculated.

**Key word:** Warfarin, farmacogenetics, PCR with reversion hybridization, CYP2C9, VKORC1

**Obsah**

<b>BIBLIOGRAFICKÝ ZÁZNAM .....</b>	<b>5</b>
<b>ANOTACE.....</b>	<b>5</b>
<b>ANNOTATION .....</b>	<b>6</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>1 TEORETICKÝ ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
1.1 FYZIOLOGIE KOAGULAČNÍHO SYSTÉMU .....	10
1.1.1 Vnější cesta koagulace .....	10
1.1.2 Vnitřní cesta koagulace .....	11
1.2 ANTIKOAGULAČNÍ LÉČBA .....	13
1.2.1 Přímá antikoagulancia .....	14
1.2.1.1 Nefrakciovaný heparin .....	14
1.2.1.2 Nízkomolekulární heparin .....	15
1.2.2 Nepřímá antikoagulancia.....	15
1.2.2.1 Warfarin.....	15
1.2.2.2 Acenokumarol a fenoprokumon.....	16
1.3 FARMAKOLOGIE A FARMAKOGENETIKA .....	17
1.3.1 Geny ovlivňující warfarinovou terapii .....	18
1.3.1.1 Gen VKORC1 .....	18
1.3.1.2 Cytochrom P450; podjednotka 2C9 .....	20
1.3.2 Warfarin a nová antikoagulancia .....	24
1.4 ZAVEDENÍ METODY NA STANOVENÍ POLYMORFISMŮ VKORC1 A CYP2C9 DO RUTINNÍ LABORATORNÍ PRAXE .....	26
1.4.1 Přehled základních metod ke stanovení mutací a polymorfismů.....	26
1.4.2 Validace a verifikace v laboratoři .....	28
1.4.3 Validace metody s použitím komerčně vyráběných diagnostických souprav s IVD a CE značkou.....	29
<b>2 CÍL PRÁCE .....</b>	<b>31</b>
<b>3 CHARAKTERISTIKA METOD .....</b>	<b>32</b>

---

3.1 REAGENČNÍ SOUPRAVA PGX TROMBO NA STANOVENÍ POLYMORFISMŮ ASOCIOVANÝCH S ANTIKOAGULAČNÍ TERAPIÍ .....	32
3.1.1 Princip metody .....	33
3.1.2 Reagencie.....	34
3.1.3 Přístrojové vybavení.....	34
3.1.4 Pracovní postup Strip Assay .....	35
3.2 ELEKTROFORÉZA .....	39
3.2.1 Princip metody .....	39
3.2.2 Reagencie.....	39
3.2.3 Přístrojové vybavení.....	39
3.2.4 Pracovní postup.....	39
<b>4 VÝSLEDKY.....</b>	<b>41</b>
4.1 STANOVENÍ GENOTYPŮ ZE STRIPŮ.....	41
4.2 VÝSLEDKY VALIDACE .....	42
<b>5 DISKUZE.....</b>	<b>44</b>
<b>6 ZÁVĚR.....</b>	<b>46</b>
<b>7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>47</b>
<b>8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>50</b>



# Úvod

Genetika za posledních 15 let zaznamenala velmi úspěšné pokroky. Od sekvenace lidského genomu, přes klonování DNA, až po mikročipy s možností detekce statisíce genů. Významným krokem je i obor farmakogenetiky. S novými cíli jistě vyvstávají i nové problémy a otázky. Například problematika fenotypové asociace s danou nemocí, multifaktoriální choroby s nezanedbatelným vlivem prostředí, ve kterém žijeme, spousty nepoznaných genů se vzájemnými interakcemi a mnoho dalšího. Dnešní čipové metody, nanotechnologie a další technicky vyspělé metody nám dávají možnosti k objevům, které zatím ani sami nedokážeme zpracovat. Ale hranice se stále posouvají a třeba jednoho dne budeme opravdu schopni „šít lidem léky na míru“ a tato metoda může být jedním mezikrokem. Už jen pro svou možnost růstu si zaslouží pozornost, a proto jsem si ji zvolila jako téma své bakalářské práce.

Umožňuje navíc multioborové zaměření. Je spjata s oborem genetickým, hematologickým a klinicko-biochemickým. Předmětem mé práce je zavedení metody na stanovení genotypu pacienta, kterému je indikována kumarinová antikoagulační terapie. Budu se zabývat dvěma důležitými geny, u nichž byla prokázána vazba s touto léčbou. Jedná se o vyšetření polymorfismů v genech VKORC1 a CYP2C9, které ovlivňují rychlost a intenzitu odpovědi na kumarinovou léčbu. Vyšetřují se 3 polymorfismy: VKORC1 -1639 G>A, CYP2C9\*2 430 C>T, CYP2C9\*3 1075 A>C. Na základě stanovení genotypových variant je možno pacientovi stanovit dávku léku, která je odvozená na základě jeho klinických a demografických parametrů – věk, etnikum, genotypové dispozice, pohlaví, váhy, výšky a dalších parametrů. Test by měl být využíván u všech pacientů se začínající léčbou deriváty kumarinu, především warfarinem, ale také acenokumarolem nebo fenoprokumonem, pro odhalení možných rizik krvácivých nebo tromboembolických komplikací spojených s jejich léčbou.

V rámci své práce se budu zabývat nejen podstatou této metody, ale také jejím zavedením do praxe. Každá metoda, která je nově zaváděná do rutinního provozu, musí projít daným postupem. Při zavedení metod genetických se zabýváme jejich validací, která zahrnuje rozdílné postupy v závislosti na typu validace (plná validace metody vyvinuté v laboratoři, validace převzaté metody nebo validace metody s použitím komerčně vyráběných diagnostických souprav IVD a CE značkou). Konkrétně se budu ve své práci zabývat posledním jmenovaným typem validace.

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Fyziologie koagulačního systému

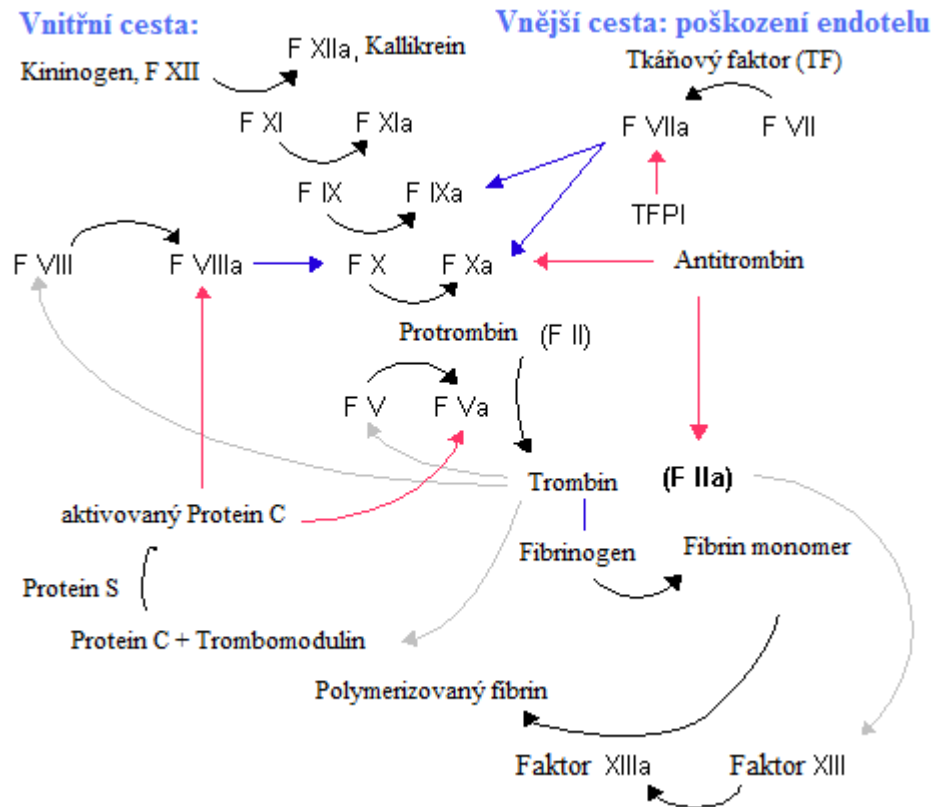
Koagulační systém je složitý enzymatický proces složený z několika po sobě jdoucích reakcí. Je prezentován rovnovážným zastoupením hemokoagulace a fibrinolýzy. Oba procesy jsou na sobě závislé a spouštějí se zároveň. Hemostáza je zahájena aktivací a agregací trombocytů na molekuly v subendoteliální oblasti po poranění cévy, kde agregované trombocyty vytvoří tzv. primární zátku a zároveň ovlivní koagulační faktory vedoucí ke vzniku pevné fibrinové sítě.

Komponenty účastníci se srážení krve se nacházejí za fyziologických podmínek v neaktivní formě. Hlavními zymogeny jsou protrombin a faktory VII, IX a X. Prokofaktory jsou faktory V, který je buď volný nebo vázaný v trombocytech, a faktor VIII, vázaný na von Willebrandův faktor. Ke kaskádové aktivaci jednotlivých faktorů dochází pomocí štěpení peptidových vazeb. „Při syntéze zymogenů v játrech dochází ke gama-karboxylaci glutamátových zbytků, které umožňují vazbu  $\text{Ca}^{2+}$  a jsou nutné pro koagulační aktivitu těchto proteinů“ [1, str. 225]. Při hojení rány pak dochází k degradaci vzniklého trombu a znovuoobnovení plného průtoku krve. Koagulační systém se může spustit dvěma různými cestami [1, str. 223; 2, str. 14].

### 1.1.1 Vnější cesta koagulace

Při poškození cévního endotelu dojde k adhezi cirkulujících trombocytů na subendoteliální struktury pomocí von Willebrandova faktoru a k sérii reakcí primární hemostázy. Z poškozeného endotelu dojde k vyplavení tkáňového faktoru (TF) do krevního oběhu. Malé množství aktivovaného faktoru VII (FVII) přítomného v cirkulující plazmě se naváže na TF a spustí sérii proteolytických reakcí vedoucích ke vzniku trombinu a následnou konverzí fibrinogenu na nerozpustný fibrin. Aktivní forma F VII (FVIIa) navázaná na TF aktivuje dva K dependentní plazmatické proteiny, faktor IX (FIX) a faktor X (FX). FIXa a FXa mají nízkou enzymovou aktivitu a ke své plné biologické aktivitě vyžadují vápenaté ionty a negativně nabitě fosfolipidy [2, str. 1627; 3, str. 614; 4, str. 135].

Obrázek 1: Koagulační kaskáda



*F V – faktor V, F Va – aktivovaná forma faktoru. Upraveno dle [5].*

### 1.1.2 Vnitřní cesta koagulace

Vnitřní cesta začíná kontaktní fází a probíhá pouze za účasti komponent nacházejících se v krevní plazmě. Na začátku dojde k aktivaci faktoru XII (FXII) a následně faktoru XI (FXI). Jeho aktivní forma (FXIa) pak vede k přeměně faktoru IX (FIX) na aktivní formu FIXa, která záhy aktivuje faktor X (FX). Vnitřní aktivací se současně spouští vnitřní fibrinolytická cesta přes urokinázu k plazminu [6, str. 14].

Faktor X (FX) je společný pro obě cesty koagulace. Jeho aktivní forma (FXa) zahajuje přeměnu protrombinu (FII) na trombin (FIIa) za spoluúčasti faktoru V (FV). Trombin následně štěpí fibrinogen za vzniku fibrinopeptidů na fibrin monomery, které následně polymerizují. Trombin také aktivuje faktor XIII (FXIII), který je nutný

ke stabilizaci fibrinové sítě a zároveň zpětnou vazbou aktivuje FVIII a FV, čímž urychluje sám svůj vlastní vznik. [2, str. 1627; 3, str. 614; 4, str. 135]. Všechny proteiny účastníci se hemokoagulace a fibrinolýzy jsou dále uvedeny v tabulce č. 1.

**Tabulka č. 1: Proteiny asociované s hemokoagulací a fibrinolýzou**

Jméno	Zkratka	Lokalizace genu	Velikost genu(Kbp)	Počet exonů	OMIM	Hlavní funkce
<b>Faktor XI</b>	FXI	4q35	25,9	15	264900	Aktivuje FIX
<b>Faktor XIII (A řetězec)</b>	FXIII	6p25	177,8	15	134570	Stabilizuje fibrinovou síť
<b>Faktor XIII (B řetězec)</b>	FXIII	1q31	28	12	134580	Stabilizuje FXIII A
<b>Fibrinogen (α řetězec)</b>	FGN	4q32	7,8	6	134820	Mechanicky stabilizuje sraženinu
<b>Fibrinogen (β řetězec)</b>	FGN	4q32	9,8	8	134830	Mechanicky stabilizuje sraženinu
<b>Fibrinogen (γ řetězec)</b>	FGN	4q32	23,6	10	134850	Mechanicky stabilizuje sraženinu
<b>von Willebrandův faktor</b>	VWF	12p13	176	52	193400	Adheze buněk a nosič FVIII
<b>Protein C</b>	PC	2q14.2	10,8	9	176860	Inaktivuje FV a FVIIIa
<b>Protein S</b>	PS	3q11.2	101,9	15	176880	Inaktivuje FV a FVIIIa
<b>Antitrombin</b>	AT	1q23	21	9	107300	Inhibuje trombin, FIX,FX, FXI
<b>Plazminogen</b>	PLG	6q27	51,1	14	173350	Rozpouští sraženinu ve vyhojené ráně
<b>Tkáňový aktivátor plazminogenu</b>	TPA	8p11.1	32,7	14	173370	Plazmatický aktivátor plazminogenu
<b>Plazminogenem aktivovaný inhibitor typ 1</b>	PAI-1	7q22	12,3	9	173360	Inhibitor TPA
<b>Alfa 2 antiplazmin</b>	α2-AP	17p13	13,3	9	262850	Inhibitor plazminu
<b>Trombinem aktiv.inhib. FGN</b>	TAFI	13q14	52,4	11	603101	Inhibitor fibrinolýzy

OMIM = (*Online Mendelian Inheritance in Man*) online mendelovská dědičnost u člověka, FXI – faktor XI, FXIII – faktor XIII. FGN – fibrinogen, VWF – von Willebrandův faktor, PC – protein C, PS – protein S, AT – antitrombin, PLG – plazminogen, TPA – Tkáňový inhibitor plazminogenu, PAI-1-

*Plazminogenem aktivovaný inhibitor typ 1,  $\alpha$ 2-AP – alfa 2 antiplazmin, TAFI – trombinem aktivovaný inhibitor fibrinogenu. Upraveno dle [7, str. 216].*

## 1.2 Antikoagulační léčba

V intaktních cévách nedochází ke koagulaci ani k aktivaci trombocytů. Tato skutečnost je zajištěna díky regulačním mechanismům, z nichž některé jsou ovlivnitelné podáváním léků. Mezi nejdůležitější patří antitrombin III a protein C.

Antitrombin III (AT III) je inhibitor plazmatických proteáz. Vyvazuje především trombin, jak je již patrné z jeho názvu, ale také faktory IXa, Xa a VIIa. Tato vyvazovací schopnost může být pomocí heparinu zesílena až 1000x. Podání heparinu nebo AT III (již převedeného heparinem na aktivní inhibitor) okamžitě brání koagulaci vyvázáním enzymů uvolněných z míst vzniku trombu.

Protein C v aktivní formě dokáže vyvazovat kofaktory – FVa a FVIIIa, čímž dojde ke zpomalení krevního srážení. Jeho kofaktorem je protein S, přičemž oba jsou závislé na vitamínu K.

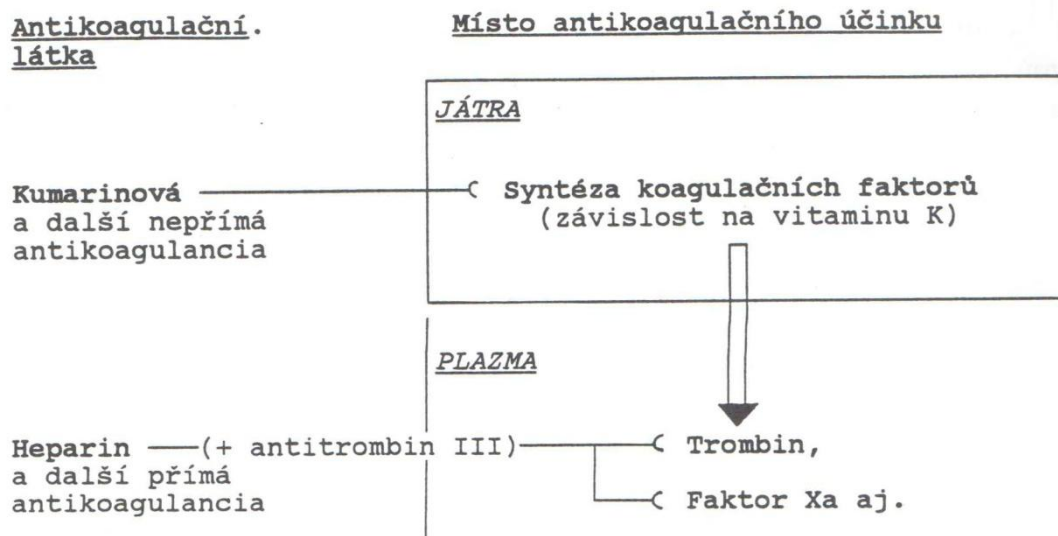
V závislosti na možnostech zásahu do kaskády krevního srážení můžeme rozlišovat různé léky:

- Antikoagulační léky - ovlivňují tvorbu a účinky koagulačních faktorů,
- Protidestičkové léky - inhibují funkci krevních destiček,
- Trombolytické - rozpouští již vzniklý trombus.

Dále se budeme zabývat skupinou antikoagulačních léčiv.

Antikoagulancia jsou léčiva, která zabraňují patologickému srážení krve. K jejich indikaci dochází při léčbě žilních (vzácněji i tepenných) trombóz, embolických komplikací nebo při pooperační prevenci vzniku trombu. Jejich účinek je striktně protektivní - již vzniklý trombus tyto léky neovlivní. Antikoagulační léky blokují tvorbu nebo účinek plazmatických faktorů, čímž se naruší koagulační kaskáda a nedojde k závěrečnému vzniku fibrinové sítě, která dává základ pro vznik trombu. Proces srážení krve je ovlivňován na různých úrovních a různými mechanismy v závislosti na použitém léku [1, str. 223].

Obr. 2: Místa zásahu přímých a nepřímých antikoagulancií



Faktor Xa – aktivní forma faktoru X. Převzato z [1, str. 231].

### 1.2.1 Přímá antikoagulancia

Mezi nejznámější přímé antikoagulancium se řadí heparin. Jedná se o přirozený glykosaminoglykan získaný ze zvířecích sliznic a jiných tkáních na něj bohatých (hovězí plíce nebo vepřové sliznice). Fyziologicky je tvořen žírnými buňkami a v praxi jsou běžně užívané 2 formy:

1. nefrakcionovaný heparin
2. nízkomolekulární heparin

#### 1.2.1.1 Nefrakcionovaný heparin

Nefrakcionovaný heparin (UFH - Unfractionated heparin) má po intravenózní aplikaci poločas asi 1-2 hodiny a odbourává se především heparinázou v játrech. Působí jako antagonist trombinu – zabraňuje přeměně fibrinogenu na fibrin. Tento antikoagulační efekt je umožněn vazbou na antitrombin III (AT III) – přirozený inhibitor serinových proteáz. Vazba UFH na antitrombin III ovlivňuje všechny serinové proteázy, tzn. všechny faktory krevního srážení mimo kofaktorů, k nimž náleží FV a FVII [6, str. 15].

### 1.2.1.2 Nízkomolekulární heparin

Nízkomolekulární heparin (LMWH - Low Molecular Weight Heparin) je získáván depolymerací a frakcionací nativního heparinu. Inhibice koagulačního systému probíhá vazbou přes AT III, i když nyní je známo, že 70-80% látky působí prostřednictvím mechanismů nezávislých na AT III. Heparin zasahuje jak do vnější, tak do vnitřní cesty koagulace, což bylo zjištěno prostřednictvím zvyšující se hladiny tkáňového inhibitoru. Výhodou frakcionovaného heparinu je menší variabilita ve srovnání s UFH, díky níž má sníženou vazbu na plazmatické proteiny, endotel a monocyty. Má více než 90% biologickou dostupnost při podkožním podání, delší poločas, což umožňuje méně častou aplikaci. Frakcionovaný heparin je eliminován převážně renální cestou. Léčbu navíc není třeba monitorovat (kromě obézních pacientů s renálním selháním) [6, str. 16].

## 1.2.2 Nepřímá antikoagulancia

Mezi nepřímá antikoagulancia patří zejména warfarin, acenokumaron a fenoprokumon. Chemickým základem antagonistů vitamínu K je molekula kumarinu. Od dvou molekul kumarinu se odvozují dikumariny, resp. dikumaroly, které mají (spolu s některými dalšími deriváty kumarinu – tzv. cyklokumariny a některými monokumariny) výrazné antikoagulační účinky, tj. zpomalují průběh hemokoagulačních pochodů [8, str. 227].

### 1.2.2.1 Warfarin

Warfarin patří mezi nejčastěji podávaná antikoagulancia a jeho podání má význam pro prevenci cévní mozkové příhody při fibrilaci síní. Cévní mozková příhoda je nejvíce obávanou komplikací fibrilace síní. Současný výskyt fibrilace síní a cévní mozkové příhody je popsán u 3-5 milionů lidí v USA s předpokládanou prevalencí u 12-15 milionů lidí starších 40 let [9, str. 2370; 10, str. 119]. Riziko výskytu cévní mozkové příhody se odhaduje na základě stanovených rizikových faktorů. Nejznámější je skóre CHADS<sub>2</sub>. C = (Congestive heart failure) městnavé srdeční selhání, H = (Hypertension) hypertenze, A = (Age) stáří nad 75 let, D = Diabetes mellitus, S<sub>2</sub> = (prior Stroke) iktus nebo ischemická choroba v dřívějším věku [11, str. 2864].

Terapeutické podávání warfarinu výrazným způsobem redukuje riziko cévní mozkové příhody až o 64% [12, str. 857]. Terapie warfarinem je doporučena pro střední až vysoké riziko cévní mozkové příhody, pro nízké riziko je doporučena terapie aspirinem [13, str. 546S]. Warfarin však vyžaduje přesné a intenzivně sledované určení dávkování a komunikaci s pacientem pro docílení optimální terapie. Pokud k tomu nedojde, je pacient ohrožen vysokým rizikem krvácení nebo vzniku trombózy [14, str. 160S]. Terapie warfarinem má při nesprávném dávkování vážné nežádoucí účinky často vedoucí až k hospitalizaci pacienta [15, str. 755]. Časté komplikace spojené s nedostatečným stanovením koncentrace léku a nesprávné dávkování jsou hlavními faktory vedoucími k nedostatečnému využívání warfarinu u pacientů s fibrilací síní, kteří jsou kandidáti pro tuto terapii [16, str. 41].

Léčba probíhá podáváním racemické směsi warfarinu (S-warfarin představuje 70% účinnosti, R-warfarin zbylých 30%). S-warfarin a R-warfarin jsou optické izomery. Metabolismus a antikoagulační aktivita warfarinu jsou ovlivňovány celou řadou genů. Klíčovou roli hrají dva geny, jejichž polymorfismy výrazně ovlivňují individuální senzitivitu k tomuto léku. Gen CYP2C9, nesoucí informaci pro izoenzymy cytochromu p450, ovlivňuje biotransformaci S-warfarinu. Druhý gen VKORC1 nese informaci pro enzym vitamin K-epoxid reduktázu (cílový enzym blokován warfarinem). VKORC1 je nezbytný pro regeneraci vitamínu K [17, str. 1445; 18, str. 135; 19, str. 2329; 20, str. 2].

#### 1.2.2.2 Acenokumarol a fenoprokumon

Acenokumarol a fenoprokumon jsou mono-kumarinové deriváty warfarinu. Léčba probíhá stejně jako u warfarinu pomocí racemické směsi, ve které jsou R(+) a S(-) enantiomery. Zatímco fenoprokumon má 2 – 5x účinnější S-enantiomer, acenokumarol má silnější R-enantiomer [21, str. 1607]. Acenokumaron má relativně krátký poločas (2 – 8 hodin) v porovnání s warfarinem (30 – 45 hodin) a fenoprokumonom (156 – 172 hodin) [22, str. 1227]. Geny CYP3A4 a CYP2C9 se podílejí na expresi enzymů odpovědných za hydroxylaci fenoprokumonu, a proto polymorfismus CYP2C9 genu méně ovlivňuje antikoagulační léčbu fenoprokumonom, než warfarinem [23, str. 173]. Díky této skutečnosti, může být používán jako alternativní léčivo u lidí s polymorfismem CYP2C9\*2 nebo CYP2C9\*3. Fenoprokumon je eliminován jak ledvinami, tak játry [24, str. 846; 25, str. 19]. Přestože



je fenprokumon méně závislý na polymorfismu CYP2C9, znamená přítomnost tohoto polymorfismu podobně jako u warfarinu zvýšené riziko krvácení. Přítomnost haplotypu A polymorfismu VKORC1 představuje zvýšené riziko hyperkoagulace při léčbě acenokumarolem a riziko silného krvácení u léčby fenprokumonom [26, str. 558; 27].

### 1.3 *Farmakologie a farmakogenetika*

Hlavním zájmem v biomedicínském výzkumu je nyní hledání genů, které by mohly být použity k hodnocení nástupu, progresu a závažnosti onemocnění. Některé geny nejsou nutně kauzální, ale mohou být markery, které pomohou upřesnit diagnózu a odhad rizika [28, str. 2335]. Objevování genů zodpovědných za nemoci může být obtížné z mnoha důvodů. Některé nemoci mají obtížně zjistitelné fenotypové znaky, mohou být heterogenní a často jsou velmi ovlivněny životním prostředím. U některých navíc nejsou známy přesné anatomické léze nebo je obtížný odběr vzorku. V některých případech může být pro pacienta odběr biologického vzorku velmi zatěžující [29, str. 276]. Ale i přes všechna tato úskalí představuje v současnosti farmakogenetika významnou roli v klinické praxi. Jednou z významných oblastí uplatnění farmakogenetiky je monitorování antikoagulační terapie.

Význam farmakogenetických faktorů ovlivňujících antikoagulační terapii je popsán např. ve studii Voora a kol. [30], kde autoři studie prospektivně testovali dávkování warfarinu u 48 pacientů po chirurgických operacích v závislosti na polymorfismech genu CYP2C9 spolu s negenetickými variantami. Hlavním sledovaným kritériem bylo dosažení terapeutické hladiny INR bez signifikantního zpoždění. Autoři navrhli výpočet dávky warfarinu na základě matematické rovnice, která zahrnovala následující parametry: pohlaví, věk, rasu, tělesný povrch, naměřené INR, genotyp a přítomnost amiodaronu a/nebo statinu. Ve zmíněné studii byla hodnocena ekvivalentní účinnost mezi CYP2C9 zdravým homozygotem a přenašečem. Z výsledků vyplývá, že analýza genotypových variant CYP2C9 je nedostačující, neboť u řady pacientů docházelo k předávkování (hodnota INR>4), a že je tedy nezbytné výzkum rozšířit o vyšetření dalších genetických variant [30, str. 137]. Podrobněji se příslušnými studiemi vyšetřování genu CYP2C9 zabýváme v kapitole 1.3.2.1.

Velkým problémem řady genetických studií sledujících genetické asociace s dávkováním warfarinu je značná farmakodynamická variabilita, která byla popsána převážně u genu VKORC1. Dvě studie autorů Li a kol. [31, 32] dokumentovaly

možnosti použití genu VKORC1 ve warfarinové terapii a vývoj polymorfismů genu VKORC1 s charakteristickým faktorem warfarinové rezistence. Několik následujících studií [33-39] se zabývá korelací polymorfismů VKORC1 s warfarinovou terapií. Studie prokázaly, že genotypy VKORC1 a CYP2C9 spolu s ostatními negenetickými predispozicemi představují více než 50 % patientské variability ovlivňující každodenní warfarinovou terapii [36, str. 262; 38, str. 2329]. Z výsledků těchto studií je zřejmé, že polymorfismus v genu VKORC1 vykazuje větší variabilitu než varianty genu CYP2C9 [39, str. 2285; 40, str. 687].

### 1.3.1 Geny ovlivňující warfarinovou terapii

#### 1.3.1.1 Gen VKORC1

Gen VKORC1 kóduje podjednotku 1 komplexu vitamin K epoxid reduktázy. Vitamin-K epoxid reduktáza je malý transmembránový protein endoplazmatického retikula, který hraje důležitou roli v metabolismu vitaminu K a je cílovým proteinem při warfarinové léčbě [41, str. 19308]. Gen je kódován 163 aminokyselinami. Pomocí Northern blottingu byl analyzován ve fetální a dospělé lidské tkáni samotný 1kb transkript, který nepodléhal alternativnímu sestřihu. Významnější exprese byla nalezena u fetálních a dospělých jater, ve fetálním srdci, ledvinách, plicích a v srdci a pankreatu dospělých. Pomocí imunofluorescence byla prokázána exprese genu VKORC1 v endoplazmatickém retikulu [42, str. 541].

Studie publikované Riederem a kol. [43] ukazují významnou populační a etnickou závislost na expresi genu VKORC1 v africké, americké a asijsko-americké populaci. Byly identifikovány 2 haplotypy genu A a B a pro oba haplotypy byla stanovena dávka warfarinu. Haplotyp A – nízká dávka, haplotyp B – vysoká dávka (tabulka č. 2).

**Tabulka č. 2: Dávka warfarinu v závislosti na kombinaci haplotypu genu VKORC1.**

Haplotypy	Kombinace genotypů	Dávka warfarinu[mg/den]
A	AA	2,7
	AB	4,9
B	BB	6,2

Vytvořeno dle [43].

Haplotypy skupiny A a B vysvětlily přibližně 25% rozptylu v dávkování. Hladina mRNA nesoucí informaci genu VKORC1 se měnila podle kombinací haplotypu. Z toho lze odvodit, že tato reakce organismu na dávku warfarinu je regulována na transkripční úrovni [43, str. 2285]. VKORC1 má na léčbu větší dopad než gen CYP2C9, který vysvětluje 12% rozptylu [44, str. 262].

„Poslední výzkumy ukazují, že mutace 1639G→A v promotorové oblasti genu, známá u evropské populace, redukuje expresi VKORC1 v játrech a tím snižuje potřebnou dávku warfarinu. Přítomnost polymorfismu 6853 G→C predikuje nižší dávku warfarinu u chronicky léčených pacientů. U asijské a kavkazské populace byla prokázána vzájemná korelace těchto variant. Naopak jiné mutace s chybným smyslem genu VKORC1 predikují rezistenci na warfarin (viz tabulka 3)“ [45; str. 125].

Rost a kol (2009) sekvenovali gen VKORC1 u více než 250 krys a myši ze 4 různých kontinentů, které byly na warfarinové terapii. Identifikovali 18 nových a 5 již publikovaných mutací s chybným smyslem a osm neutrálních sekvenčních variant (Tabulka č. 3). Mutageneze cDNA genu VKORC1 a jejich rekombinantní exprese odhalila, že tyto mutace snižují aktivitu genu ve srovnání s „wild typem“ [46].

**Tabulka č. 3: Přehled mutací v genu VKORC1 u potkanů, myši a lidí předikujících rezistenci na warfarin**

<b>Potkan /Rattus norvegicus/</b>	<b>NCBI</b>	<b>Myš laboratorní /Mus musculus/ myš západoevropská /Mus domesticus/</b>	<b>Člověk moudrý /homo sapiens/</b>	<b>Reference</b>
Arg12Arg	107794658	-	-	[46]
Ala26Thr	107794660	Ala26Ser	-	[46]
-	-	-	<b>Val29Leu</b>	[47]
Arg33Pro	107794661	-	-	[46][48]
Arg35Pro	107794662	-	-	[46][49]
-	-	Glu37Gly	-	[46]
-	-	-	<b>Val45Ala</b>	[47]
-	-	-	<b>Arg58Gly</b>	[47]
Trp59Arg	107794665	-	-	[46]
-	-	-	<b>Val66Met</b>	[50]
Leu120Gln	10794674	-	-	[49]
Leu128Gln	10794675	Leu128Ser	<b>Leu128Arg</b>	[47][49]
Tyr139Phe	107794677	-	-	[49][51]
Tyr139Cys	107794678	Tyr139Cys	-	[47][49]
Tyr139Ser	107794679	Tyr139Ser	-	[49]

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) – Národní centrum pro biotechnologické informace, Arg – arginin, Ala – alanin, Thr – Threonin, Ser – serin, Pro – prolin, Glu – kyselina glutamová, Gly – glycin, Trp – Tryptofan, Leu – Leucin, Gln – Glutamin, Tyr – Tyrozin, Phe – fenylalanin, Cys – cystein, Val – Valin, Met – metionin. Upraveno dle [46].

### 1.3.1.2 Cytochrom P450; podjednotka 2C9

Cytochromy P450 se vyskytují u různých organismů, od bakterií až po rostliny a živočichy. Patří mezi hemoproteiny, vzniklé ještě před rozdělením vývojových větví eukaryot a prokaryot [52, str. 572]. Cytochromy P450 jsou terminálními enzymy systému tzv. oxidáz se smíšenou funkcí. Jsou lokalizovány v membráně hladkého endoplazmatického retikula a jsou hlavní složkou při metabolismu cizorodých látek. V menší míře je také nalezneme v membráně mitochondrií, kde se podílí na biosyntéze steroidů. [53, str. 611; 54, str. 229]. Ačkoli se jednotlivé formy cytochromů P450 značně liší, jejich složení aminokyselin v okolí hemu zůstává stejné. Pro všechny cytochromy P450 je typický porfyrinový skelet a hydrofobní charakter jejich substrátů.

Cytochromy P450 jsou schopny katalyzovat velmi široké spektrum reakcí. Kromě hydroxylace substrátu katalyzují cytochromy P450 také například deaminace, dealkylace, dehydrogenace, dehydratace, epoxidaci, oxidativní i reduktivní dehalogenace a oxidativní štěpení C-C vazby [53, 55, str. 2841]. Gen CYP2C9 je jeden z mnoha CYP2C genů lokalizovaných v 500 kb úseku proximální části 10q24 [56].

### Polymorfismy v genu CYP2C9

Záměna argininu za cystein na pozici 144 je známá jako polymorfismus CYP2C9\*2. Tato varianta vede ke snížené schopnosti metabolizovat warfarin a zvýšenému riziku krvácení. Polymorfismus CYP2C9 je jednou z hlavních izoform cytochromu P450, která se podílí na metabolismu léků [57, str. 582].

Rozsáhlá interindividuální variabilita odpovědi na dávku warfarinu způsobuje obtížnost dávkování v rozmezí 0,5 – 60 mg. Asymetrický uhlík C9 v molekule warfarinu dává možnost vzniku 2 enantiomerním formám: R-warfarinu a S-warfarinu, které jsou metabolizovány odlišně. Při podání racemátu (opticky neaktivní směs se stejným obsahem pravotočivé i levotočivé formy téže látky) má S-warfarin asi 3x větší účinnost než R-warfarin. CYP2C9 je hlavní enzym, který katalyzuje přeměnu S-warfarinu na neaktivní 6-hydroxy a 7-hydroxy metabolity, zatímco oxidační metabolismus R-warfarinu je katalyzován hlavně podjednotkami CYP1A2 a CYP3A4.

Kromě „wild“ typu alely CYP2C9\*1, u níž nacházíme bodovou mutaci genu, rozeznáváme 2 alelické varianty. CYP2C9\*2, kde cystein nahrazuje arginin na pozici 144 a CYP2C9\*3, kde leucin nahrazuje izoleucin na pozici 359. Obě alelické varianty mají *in vitro* postiženou hydroxylaci S-warfarinu. Varianta CYP2C9\*3 má velmi malou efektivitu (5% efektivitu enzymu „wild“ typu), zatímco varianta CYP2C9\*2 ukazuje kolem 12% efektivitu „wild“ typu. Rozdíl v efektivitě variant může být vysvětlen substitucí aminokyselin, které mění interakci enzymu s cytochromem P450 oxidoreduktázou. Tato skutečnost ukazuje na důležitost variant CYP2C9\*2 a CYP2C9\*3, které souvisí s výrazně nižšími terapeutickými dávkami warfarinu na rozdíl od tzv. „wild“ typu izoenzymu CYP2C9\*1 [58, str. 717].

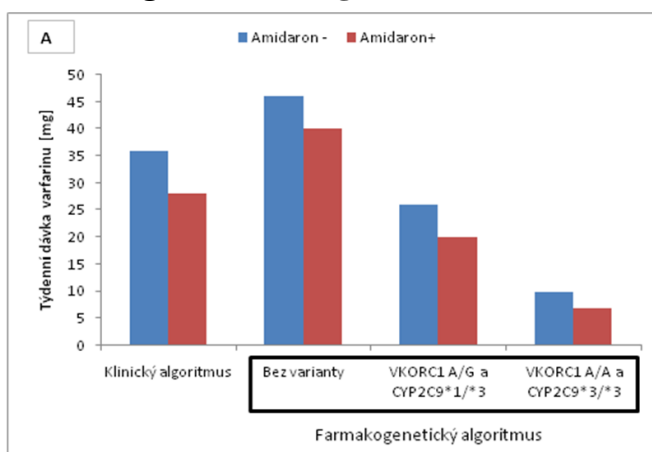
CYP2C9 má strukturu krystalu, jak v nenavázané formě, tak ve formě komplexu s antikoagulačním lékem. Struktura charakterizuje interakce mezi CYP2C9 a warfarinem a odhaluje nová vazebná místa. Mechanismus navázání warfarinu ukazuje, že CYP2C9 může během reakce podléhat allosterickým mechanismům. Nově

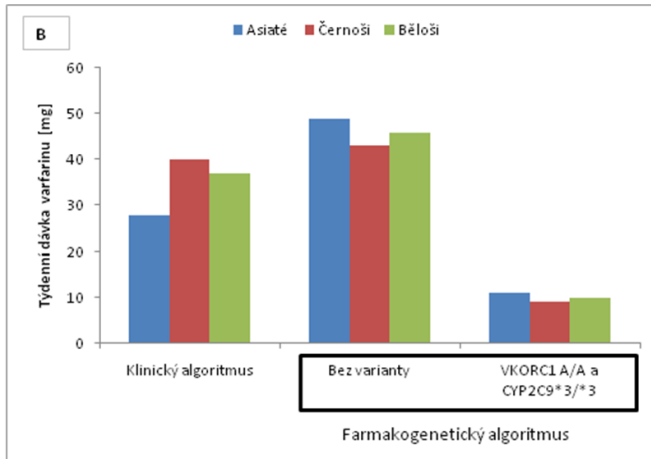
objevená vazebná místa také ukazují, že CYP2C9 může najednou navázat více ligandů a tím poskytnout možné vysvětlení interakce léků [59, str. 464].

Polymorfismy CYP2C9\*2 a CYP2C9\*3 jsou významným způsobem asociovány s dávkou warfarinu a krvácivými stavy. V bělošské populaci jsou tyto polymorfismy zastoupeny významněji než v populaci asijské. V metaanalýze autorů Sandersona et al [60] zahrnující 2775 pacientů bylo zjištěno 12,2% nosičů alely CYP2C9\*2 a 7,9% nosičů alely CYP2C9\*3. Tyto varianty potřebují k udržení cílového INR nižší dávku warfarinu. CYP2C9\*2 o 17% nižší a CYP2C9\*3 až o 37% nižší než homozygoti „wild“ typu (CYP2C9\*1). „Varianta CYP2C9\*3 vede i ke zvýšené senzitivitě vůči acenokumarolu a varianty CYP2C9\*2,\*3 vůči fenprokumonu, i když krvácivých komplikací bylo zaznamenáno více jen u varianty CYP2C9\*3. Varianta CYP2C9\*11 se vyskytuje u cca 1% kavkazské a afroamerické populace“ [20].

Na základě závěrů Mezinárodního konsorcia farmakogenetiky warfarinu (2009) byly zjištěny signifikantní rozdíly v algoritmu pro určení farmakogenetické dávky warfarinu v závislosti na genotypech VKORC1 a CYP2C9. U pacientů, kteří potřebovali dávku  $\leq 21$  mg warfarinu/týden byl významněji zastoupen polymorfismus VKORC1 než CYP2C9 (49,4% vs 33,3%,  $P < 0,001$ ). Podobný rozdíl ve frekvencích polymorfismů byl nalezen i u pacientů s dávkou  $\geq 49$  mg warfarinu/týden ( 24,8% vs 7,2%,  $P < 0,001$ ), (obrázek č. 3). Z výsledků je zřejmé, že použití farmakogenetických algoritmů pro odhad počáteční dávky warfarinu dává výsledky, které lépe korelují s požadovanou stabilní terapeutickou dávkou než ty, které byly odvozeny na základě klinického algoritmu [61] (obrázek č. 4).

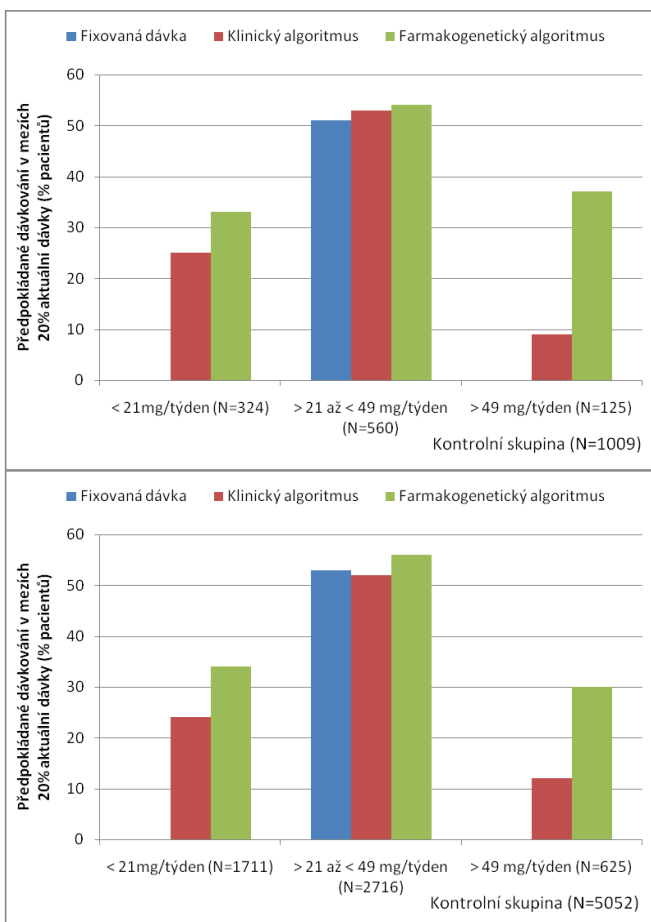
**Obrázek č. 3: Srovnání predikované dávky warfarinu dle klinického a farmakogenetického algoritmu.**





Panel A ukazuje srovnání založené na genotypu a (ne)užívání Amidaronu.  
Panel B ukazuje srovnání na základě rasy a genotypu.  
Upraveno dle [61].

**Obrázek č. 4: Procento pacientů s odhadnutou dávkou v mezích 20% dávky aktuální, odvozené farmakogenetickým algoritmem, klinickým algoritmem a fixovanou dávkou (35mg/týden).**

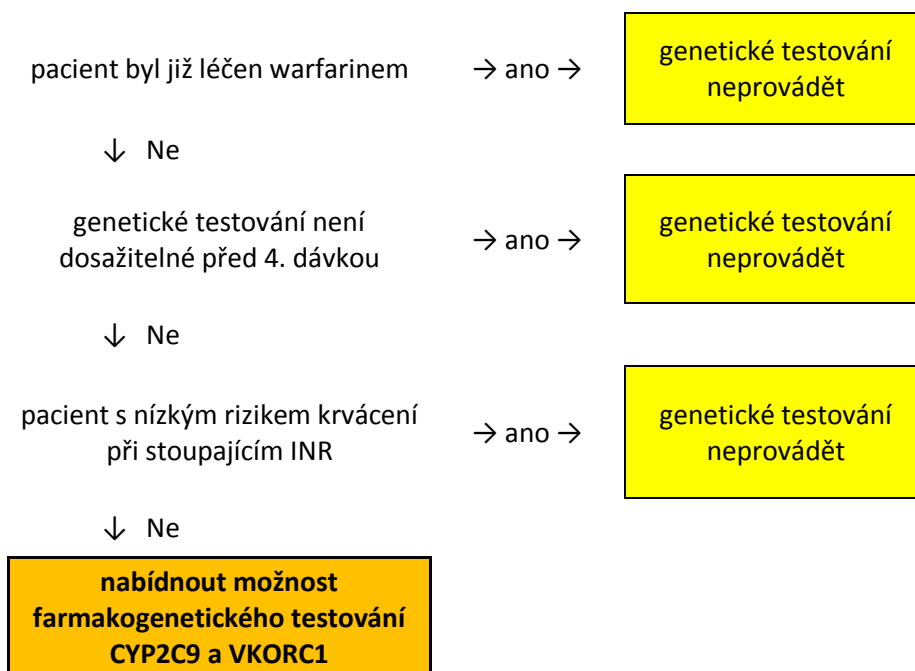


$N$  = počet pacientů. Upraveno dle [61].

### 1.3.2 Warfarin a nová antikoagulancia

„V posledních letech proběhla celá řada randomizovaných prospektivních studií. Jedna z posledních [62, str. 2563] vedla k závěru, že ani znalost farmakogenetiky nepřinese významný rozdíl v poměru mezi krvácivými a tromboembolickými komplikacemi. Částečně proti této zkušenosti stojí studie Caracaova, která prokázala (na relativně malém vzorku 191 respondentů) závislost mezi farmakogenetikou a farmakokinetikou – dosažení terapeutického rozmezí, optimálního INR a udržení optimálního léčebného rozmezí bez krvácivých komplikací [63, str. 460]. I ve světle těchto nejednoznačných výsledků vyvíjejí komerční firmy stále nová diagnostika ke stanovení jednotlivých izoenzymů. FDA (Food and Drug Administration) nejenže vydává licence těmto firmám, ale doporučuje, aby v příbalových letácích byly informace o tom, že cytochromální izoenzymy CYP2C9\*2 a CYP2C9\*3 znamenají zvýšené riziko krvácivých komplikací. Také závěry 8. Konference amerických plicních lékařů (American College of Chest Physicians) se věnují léčbě warfarinem. Na základě dosud známých skutečností nedoporučují před zahájením léčby warfarinem rutinní farmakogenetické testování (stupeň doporučení 2C) [64]. I přesto vydali američtí autoři Doporučení farmakogenetického testování (obrázek č. 8)“ [45].

**Obrázek č. 7: Americké doporučení farmakogenetického testování**



Převzato z [45, str. 127].



V návaznosti na výše uvedené skutečnosti stojí za zmínku nová antikoagulancia, která působí jako antagonisté aktivovaného faktoru X (fXa) nebo trombinu. Jejich vlastnosti jsou shrnuty v tabulce č. 4. Nové léky dosahují maximálního efektu v několika hodinách, mají předvídatelnou odpověď na dávku, minimální interakce s jídlem a léky a nevyžadují monitorování. Tyto léky jsou zatím v USA v III fázi testování. Warfarin je široce užívaný levný lék, oproti němu jsou nové léky výrazně dražší, to ale není jediné negativum. Tato léčiva mají krátký poločas, což může být problém z důvodu častějšího užívání. Navíc iktus nemá plíživé příznaky, ale je rozpoznán teprve, až když k němu dojde. Proto může být warfarin výhodnější, především u starších lidí, kteří mohou mít problémy s pravidelností užívání léku [65, str. 221 – 226].

**Tabulka č. 4: Vlastnosti nových antikoagulačních léků v porovnání s warfarinem**

	Warfarin	Rivaroxaban	Apixaban	Dabigatran Etexilate
Cíl účinku	VKORC1	Faktor Xa	Faktor Xa	Thrombin
Biologická dostupnost	> 95%	> 80%	> 50%	~ 6%
T (max)	72 - 96 h	2,5 - 4 h	3 h	2 h
Poločas	40 h	5-9h zdravý, 9-13 starší	8-15h	14-17h
Monitorování	INR	není nutné	není nutné	není nutné
MTB a eliminace	CYP2C9, 3A4, 1A2	CYP3A4; 66% ledvinami, 33% játry	CYP3A4 75% játry, 25% ledvinami	80% ledvinami, 20% játry
Léková interakce	CYP2C9, 3A4, 1A2	silný CYP3A4 inhibitor a P-gp inhibitor	silný CYP3A4 inhibitor a P-gp inhibitor	P-gp inhibitor

*T (max)* – maximální plazmatické hladiny; *h* – hodiny, *P-gp* – P-glykoprotein

*Upraveno dle [65, str. 222]*

## 1.4 Zavedení metody na stanovení polymorfismů VKORC1 a CYP2C9 do rutinní laboratorní praxe

### 1.4.1 Přehled základních metod ke stanovení mutací a polymorfismů

Polymorfismy a mutace (variabilní sekvence DNA v daném lokusu) můžeme detekovat pomocí různých metod. Metody na molekulární úrovni využívají tzv. DNA markerů, které ukazují rozdíly v genetické informaci mezi analyzovanými vzorky. Jejich výhodou je možnost získání materiálu DNA z živé i mrtvé tkáně, stabilita molekuly a malé množství potřebné k analýze.

Příkladem metody je například RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – polymorfismus restrikčních fragmentů), která využívá restrikčních míst v daném polymorfismu. Pokud v polymorfní sekvenci leží místo cílové pro restrikční endonukleázu, dojde k rozdělení na dva fragmenty následně detekovatelné elektroforézou. Pokud je daný polymorfismus navíc ve vazbě s genem, jehož mutovaná alela způsobuje genetické onemocnění, je možno tímto způsobem identifikovat postižené osoby v dané rodině. Toto je základem nepřímé DNA diagnostiky [66, str. 187].

Pokud hledáme určitou sekvenci v genomové DNA rozštěpené restrikční endonukleázou, nejdříve tuto směs fragmentů pustíme na gelovou elektroforézu. DNA poté z gelu „obtiskneme“ na membránu pomocí metody Southernova blottingu. Tato metoda využívá kapilárního vztlínání. Přenosový pufr je denaturační, takže na membráně máme jednořetězcovou DNA (ssDNA – Single Stranded DNA), která je připravena k hybridizaci se sondou.

Metoda Northern blotting je analogií Southernova blottingu. Využívá se k identifikaci molekul mRNA. Protože mRNA představuje pouhých 3 – 5% veškeré RNA, je třeba ji ze směsi vyizolovat například pomocí afinitní chromatografie. Analogický postup pro přenos proteinů z gelu na membránu byl nazván Western Blotting [66, str. 159].

Další metodou je polymerázová řetězová reakce (PCR – Polymerase Chain Reaction), která je založena na enzymatické amplifikaci vybraného úseku DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích [67, str. 487]. Modifikací PCR vznikla metoda reverzní polymerázové reakce (RT-PCR – Reverse Transcription PCR).

U této metody se nejdříve pomocí reverzní transkriptázy přepíše genetická informace z RNA do cDNA, která je následně amplifikována.

Polymorfni tandemové repetice můžeme zjistit pomocí fingerprintingu, využívající multilokusové sondy.

Metoda jednovláknového konformačního polymorfismu (SSPC – Single-Strand Conformation Polymorphism) je jednoduchý způsob k detekci mutací typu záměny jedné baze. Je založena na poznatku, že sdDNA v nativním (nedeneturačním) polyakrylamidovém gelu (PAAG) má rozdílný typ migrace v závislosti na sekundární struktuře (konformace). Záměna baze způsobí změnu konformace a následně rozdílnou pohyblivost [68, str. 874].

Metoda denaturující gradientové gelové elektroforézy (DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) je založena na migraci dvouřetězcové DNA (dsDNA – double stranded DNA) přes PAAG s obsahem lineárně se zvyšující koncentrace denaturačního činidla [69, str. 83].

Možností jak odhalit mutaci či polymorfismus může být samozřejmě i sekvenování, tato metoda je však velmi nákladná. Základní sekvenování je metodou Sangerovou, kdy denaturovanou DNA smícháme s amplifikačním mixem obohaceným o dideoxynukleotidy, které ukončují syntézu vlákna. Reakce probíhá na různých vláknech paralelně a dochází k zastavení na různých úrovních. Každý dideoxynukleotid má svou fluorescenční barvu v závislosti na typu baze, kterou nese, která se poté odečítá při průchodu kapilární elektroforézou. Po následné detekci nám vznikne elektroforeogram. Metodou sekvenování nové generace je 454. U této metody dochází k ligaci denaturovaných fragmentů DNA na partikule, které se poté vkládají do reakční směsi spolu s olejem. Vznikne emulze, ve které proběhne tzv. emulzní PCR, a která se rozetře na pikrotitrační destičku, kde se v každé jamce zachytí jedna kulička. Dochází k pyrosekvenaci a detekci záblesků vedených světlovodiči do detektoru [70, str. 38].

V poslední době je diskutováno využití nanotechnologií založených na DNA čípech. Příkladem můžou být pasivní biočipy, kdy krátké neoznačené sondy, které prezentují jednotlivé geny, jsou naneseny na předem vymezené pracovní plošky v mřížce na speciálně upravené sklo nebo membránu. Na čípech aplikujeme fluorescenčně značenou směs vyšetřované a normální DNA a hybridizační signály se poté snímají skenerem. Využívat se dají i aktivní čipy, kde každá pracovní ploška je vodivě spojena se zdrojem napětí a měřicím přístrojem. Navázání DNA se projeví změnou napětí. Výhodou těchto čipů je, že se dají opakovaně použít [66, str. 177].

Pro detekci polymorfismů genů VKORC1 a CYP2C9 jsme zavedli metodu PCR s reverzní hybridizací na stripech. Výhodou této metody je detekce více významných polymorfismů pro jeden vzorek na jednom stripu. V rámci zavedení metody do rutinního provozu je metodu nutné validovat.

#### 1.4.2 Validace a verifikace v laboratoři

Validace a verifikace v laboratoři jsou prováděny na základě Doporučení ČSKB o validaci a verifikaci analytických metod v klinických laboratořích ze dne 16. 11. 2004, [71] s přihlédnutím k doplňku Validace a verifikace molekulárně biologických metod založených na analýze extrahumánního genomu ze dne... [72]. Rozsah validačních a verifikačních charakteristik se liší dle charakteru metod.

Validaci definuje mezinárodní metrologický slovník [73] jako ověřování, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití. Slovník managementu kvality [74] charakterizuje validaci jako potvrzení získané prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky ne specifické zamýšlení použití nebo specifickou aplikaci byly splněny. Samotný proces validace se v laboratoři provádí pouze u metod vypracovaných pracovníkem laboratoře (in house metody) nebo u metod modifikovaných.

Verifikace je poskytnutí důkazu o tom, že daná metoda splňuje specifické požadavky v dané laboratoři, ve které je prováděna. O verifikaci se mluví v souvislosti s výrobky uvedenými na trh v souladu se zásadami Direktivy IVD 98P79 EC. Dodržováním požadavků Směrnice IVD 98P79 EC a aplikací této směrnice do Nařízení vlády české republiky č. NV453/2005 Sb [75, str. 207], je zajištěno správné používání IVD MD *in vitro* diagnostických lékařských zařízení, analytických měřících přístrojů a jejich příslušenství (činidel, kalibrátorů, kontrolních materiálů a diagnostických souprav) v rutinním laboratorním provozu a je zaručena vysoká úroveň ochrany pacientů i laboratorního personálu).

Vzhledem k tomu, že se v naší práci zabýváme zavedením metody využívající komerčně vyráběnou soupravu s IVD CE značkou, která se řídí zásadami Direktivy IVD 98P79 EC, provádíme pouze verifikaci metody.

V rámci zavedení metody do provozu jsme jako verifikační charakteristiky metody zvolili opakovatelnost, reprodukovatelnost a robustnost [76].

### Opakovatelnost

„Opakovatelnost je charakterizována jako míra těsnosti souhlasu mezi výsledky posloupnosti nezávislých měření stejného vzorku analytu provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Opakovatelnost je vlastností metody, ne výsledku. Podmínky opakovatelnosti jsou ty, při nichž se nezávislé výsledky zkoušek získají toutéž metodou, na identických zkoušených jednotkách, v téže laboratoři, týž operátorem, za použití téhož vybavení, během krátkého časového rozmezí“ [77]. Opakovatelnost lze tedy definovat jako přesnost za podmínek opakovatelnosti [78].

### Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost je těsnost souhlasu mezi výsledky měření stejného analytu ve vzorku/vzorcích stejného materiálu, kdy jsou jednotlivá měření prováděna za různých podmínek (experimentátor, přístroj, místo, podmínky, čas), avšak stejnou metodou [77]. „Reprodukovatelnost lze tedy vyjádřit jako přesnost za podmínek reprodukovatelnosti“ [78].

### Robustnost

Robustnost je schopnost metody poskytovat přijatelné výsledky měření i v případě, že dojde k malým odchylkám od měřicího postupu či složení vzorku. Udává spolehlivost metody při běžném používání [77].

### **1.4.3 Validace metody s použitím komerčně vyráběných diagnostických souprav s IVD a CE značkou**

V případě použití těchto souprav je dovoleno provést pouze zkrácenou validaci, tedy verifikaci, k ověření, že souprava vykazuje stejné parametry při práci v laboratoři, jaké jsou uvedeny výrobcem.

Manipulace s touto soupravou však podléhá přesně specifikovaným pravidlům. Diagnostická souprava se musí používat pouze podle návodu a pro účely deklarované výrobcem. Postup verifikace je v tomto případě stejný jako Validace převzaté metody.

Zkrácená validace (verifikace) musí splňovat následující parametry. Musí být určeny parametry přesnosti, a to opakovatelnost, která je testována vzájemným porovnáním v jedné sérii v jednom dni nejlépe jedním pracovníkem (je doporučeno

testovat jeden vzorek šestkrát) a reprodukovatelnost, která se ověřuje vzájemným porovnáním mezi různými sériemi (opět je doporučeno prověřit šestkrát na jednom vzorku). Dále je třeba stanovit systém vnitřní kontroly kvality a jeho dodržování. Stanovení robustnosti je ověřování metody vůči případným odchylkám způsobeným použitím např. jiné polymerázy, jiného termocykleru či jiných komponent [76, str. 59].

U verifikace těchto souprav je uvedeno i externí hodnocení kvality molekulárně biologických metod. Dle přílohy II Doplnku k doporučení výboru České společnosti klinické biochemie o validaci a verifikaci analytických metod v klinických laboratořích ze dne 16. 11. 2004 [72] bude po zavedení do rutinního laboratorního provozu metoda zařazena do systému externí kontroly kvality.

V rámci zavedení nové metody se zavedly i nové žádanky na toto vyšetření (obrázek č. 6).

### Obrázek č. 6: Žádanka na vyšetření polymorfismů VKORC1 a CYP2C9

<b>Žádanka o vyšetření polymorfismů genů VKORC1 a CYP2C9</b> Ústav klinické biochemie a patobiochemie 2, LF UK a FN Motol V ÚVALU 84, PRAHA 5, 2 - G, telefon: 22443 5313, poštovní pošta 5313, 5330 Přednosta: Prof. MUDr. R. Průša, CSc.		<b>Laboratorní číslo:</b> <b>Celkový počet požadavků:</b>	
		Kód náhrady: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
<b>Materiál:</b> Plná krev			
<input type="checkbox"/> <b>PGX Thrombo Strip Assay – PCR s reverzní hybridizací</b>			
Vyšetření polymorfismů VKORC1 a CYP2C9			
<b>ODDĚLENÍ:</b>		<b>Telefon:</b>	
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
ČÍSLO POJIŠTĚNCE		POJIŠTOVNA	
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		Rodné číslo (pokud se liší od čísla pojištění)	
PŘÍJMENÍ		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
JMÉNO		Odbornost	
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		Diagnóza	
IČZ		Datum	
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		Jmenovka a podpis lékaře	
FN Motol 132a		Doczka s.r.l. s.r.o., Neražovická 72, 266 01 Běláry, tel.: 311672186, 311672276, fax: 311671267	

## 2 Cíl práce

Cílem práce bylo na základě ověření základních verifikačních parametrů metody (opakovatelnost, reprodukovatelnost a robustnost) zavést metodu na identifikaci genotypů asociovaných s antikoagulační terapií do rutinního laboratorního provozu.

### 3 Charakteristika metod

#### 3.1 Reagenční souprava PGX Trombo na stanovení polymorfismů asociovaných s antikoagulační terapií

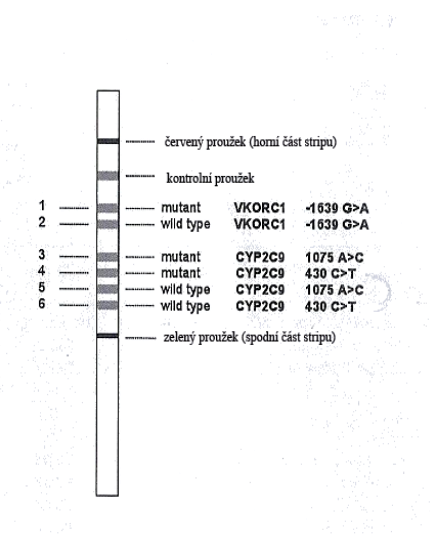
K vyšetření mutací a polymorfismů monitorujících antikoagulační terapii jsme zvolili komerční soupravu PGX thrombo Strip Assay od výrobce ViennaLab Diagnostics. Podrobná specifikace diagnostické soupravy je v tabulce č. 5.

**Tabulka č. 5: Specifikace diagnostické soupravy PGX thrombo Strip Assay od výrobce ViennaLab Diagnostics**

Katalogové číslo	Název	Balení	Dodavatel	Výrobce
4-730 TP05B	PGX Trombo Strip Assay SuperTaq DNA polymeráza	20 stripů 500 j (1000 jednotek)	PentaGen s.r.o PentaGen s.r.o	ViennaLab ViennaLab

Pomocí této metody se vyšetřují polymorfismy genů VKORC1 a CYP2C9. V genu VKORC1 se vyšetřuje polymorfismus -1639 G>A a v genu CYP2C9 polymorfismy 430 C>T (CYP2C9\*2) a 1075 A>C (CYP2C9\*3), (obrázek č. 7). Interpretace výsledků ze stripu je popsána v kapitole 4.1 Stanovení genotypů ze stripu.

**Obrázek č. 7: Vyšetřované polymorfismy na stripu**



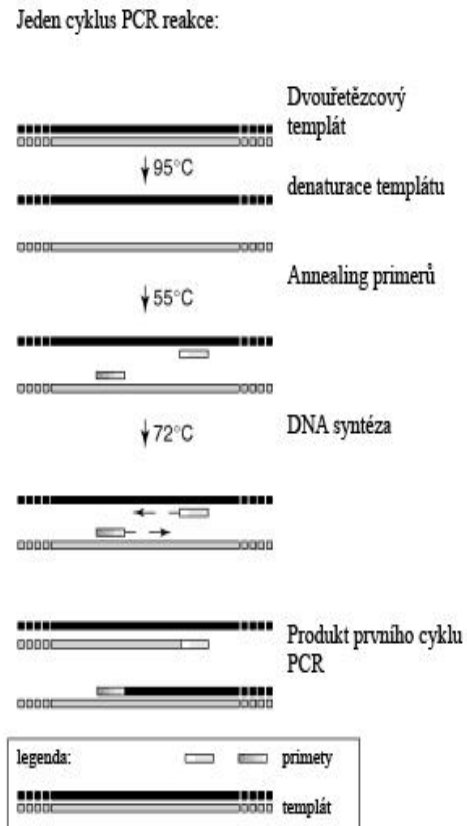
Zelený a červený proužek – pro orientaci stripu  
Kontrolní proužek – proužek pro kontrolu konjugace a barvení,  
červený a zelený proužek pro orientaci. (zbytečně, je dvakrát)



### 3.1.1 Princip metody

Principem metody je polymerázová řetězová reakce s reverzní hybridizací na reagenční stripě s enzymatickou detekcí. Cílem PCR je namnožení vybraných úseků DNA do mnoha kopií, které po následné hybridizaci dokážeme lépe vizualizovat vzhledem k jejich množství. Prvním krokem PCR je denaturace dsDNA při teplotě 95°C, čímž dojde k separaci na dvě ssDNA. Dalším krokem je tzv. annealing, kdy dojde k hybridizaci primerů na komplementární místa na ssDNA. Primery jsou úseky několika desítek nukleotidů, které jsou navrženy tak, aby hybridizovaly s určitými sekvencemi a vymezily místo genu, které nás zajímá. Tento krok probíhá za teploty kolem 55°C, ale tato teplota je variabilní v závislosti na použitých primerech. Posledním krokem je denaturace probíhající při 72°C. Při tomto kroku se dosyntetizovává DNA pomocí termostabilní DNA polymerázy. Ta „skládá“ řetězec z jednotlivých nukleotidů podle komplementarity k templátu. Výsledkem jednoho cyklu PCR jsou dvě zcela identické dsDNA (obrázek č. 7). PCR probíhá v několika cyklech, kdy do následujícího cyklu vstupují vždy všechny produkty z cyklu předchozího. Množství kopií nám tedy exponenciálně roste podle vzorce  $2^n$ , kdy  $n$  je počet cyklů. Na stripech je nahybridizovaná sonda, která odpovídá sekvenci hledaného polymorfismu. Amplifikační produkt se zdenaturuje, aby se z dsDNA získala ssDNA, která je schopná komplementární vazby a pak už dochází k hybridaci, která je následně enzymaticky detekována [ 78, str. 1–23 ].

**Obrázek č. 8:**  
**Cyklus PCR**



*Upraveno dle [83].*

### 3.1.2 Reagencie

Všechny potřebné reagenty potřebné k provedení jednotlivých kroků (izolace DNA, amplifikace, hybridizace a detekce) jsou dodávány v jedné reagenční soupravě od výrobce s výjimkou DNA polymerázy, která je dodávána zvlášť.

**Obrázek č. 9: Testovací strip**

1. Lysis solution – lyzační roztok - 50 ml
2. Gen<sup>X</sup>Tract Resin – před každým použitím je nutné jej resuspendovat
3. Amplifikační mix (žluté víčko) – připraven k použití, obsahuje 0,05% Azid sodný ( $\text{NaN}_3$ )
4. Taq Diluční pufr (průhledné víčko)- diluční pufr na přípravu správné koncentrace Taq DNA polymerázy - obsahuje 0,05%  $\text{NaN}_3$
5. DNAT (modré víčko) – obsahuje 1,6% NaOH (R36/38)
6. Hybridizační vaničky
7. Testovací proužky (stripy), (obrázek č. 8)
8. Hybridizační pufr – připraven k použití
9. Promývací roztok (Wash Solution A) – bílé víčko
10. Roztok konjugátu - obsahuje 0,05%  $\text{NaN}_3$  a komplex streptavidin-alkalická fosfatáza
11. Promývací roztok (Wash Solution B) - obsahuje 0,05%  $\text{NaN}_3$
12. Barvicí roztok (Color developer- obsahuje tetrazoliovou modř (NBT – Nitro Blue Tetrazolium) a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát (BCIP)



### 3.1.3 Přístrojové vybavení

Přesně nastavitelné mikropipety 1  $\mu\text{l}$  - 10  $\mu\text{l}$  a 10  $\mu\text{l}$  - 1000  $\mu\text{l}$

Orbitální třepačka (PST450 HL, Biosan)

Vyhřívaný termoblok (Multiblock Lab Line)

Biohazardní box EBSCO Airstream Class II

Termocykler GeneQ thermal Cycler (Hangzhou Bioer Technology)

Termocykler PTC100 (MJ Research)

Centrifuga ALC 4214 (ALC International s r. o)

Centrifuga Varifuge 3.0 (Heareus)[79]

Spotřební materiál, který je zapotřebí k zavedení této metody zahrnuje 0,2 ml PCR zkumavky (typ v závislosti na použitém termocykleru), špičky (typ v závislosti na objemu pipetu), buničina.

### 3.1.4 Pracovní postup Strip Assay

#### Odběr biologického materiálu

Čerstvá krev na izolaci DNA se odebere do zkumavky s EDTA nebo citrátem. Ke stanovení lze použít i zmražená krev odebraná do zkumavky EDTA nebo citrátem. Nesmí se použít krev s přídavkem heparinu. Krev by neměla být skladována déle než 3 dny při pokojové teplotě nebo 1 týden při 2 – 8°C. Použitá krev by neměla být zmrazena déle než 1 rok a více než třikrát opakovaně zmražená a opět rozmražená. Vzorky krve před vlastní izolací vytemperujeme na pokojovou teplotu a promícháme převrácením zkumavky.

Pracovní postup zahrnuje pět základních kroků, kterými se budeme podrobněji zabývat. Jedná se o izolaci, amplifikaci, hybridizaci a promývání, barvení a detekci.

#### Izolace DNA

Izolaci DNA se zahájí vytemperováním příslušných reagensů (Lysis solution a GEN<sup>X</sup>TRACT) na pokojovou teplotu. Do 1,5 ml mikrozkušavky se šroubovacím víčkem se napipetuje 100 µl krve a přidá se 1 ml Lysis Solution. Opětovným převrácením se obsah mikrozkušavky promíchá. Po 15 minutové inkubaci při pokojové teplotě se zkumavky centrifugují 5 min při 3000 rpm (cca 1000 x g). Po odsátí 1 ml supernatantu se přidá 1 ml lyzačního pufu (Lysis Solution). Po opětovném promíchání následuje centrifugace po dobu 5 min při 12000 rpm (cca 12,000 x g). Po odsátí supernatantu se k 50 µl viditelného měkkého peletu přidá

200  $\mu$ l resuspendované pryskyřice GEN<sup>X</sup>TRACT a směs se inkubuje 20 minut při 56°C. Po protřepání po dobu 10 sekund následuje 10 minutová inkubace při 98°C a opakované protřepání po dobu 10 sekund. Poté následuje poslední centrifugace 5 minut při 12000 rpm. Výsledný supernatant ochlazený na teplotu 0 – 4°C obsahuje DNA templát vhodný pro okamžité použití v PCR. Pro další uchování je nutné přepipetovat supernatant do čisté zkumavky a uskladnit ho (při 2 – 8°C až týden) nebo zmražený při -20°C.

### **Amplifikace**

Amplifikace začíná naředěním pracovní koncentrace (0,2 U/ $\mu$ l) Taq DNA Polymerázy v Taq Dilučním pufru (čiré víčko). Pro každý vzorek se připraví jedna PCR zkumavka, která se umístí na led. Do každé zkumavky se napipetuje 15  $\mu$ l Amplifikačního mixu, který se skládá z: 5  $\mu$ l naředěné Taq DNA Polymerázy (tj. 1 U) a 5  $\mu$ l vyzolované DNA. Pokud není DNA vyzolována izolačním dle izolačního protokolu navrženého výrobcem reagenční soupravy, doporučuje se použít DNA s koncentrací 5 – 40  $\mu$ g/ml (= 25 – 200 ng DNA na reakci). Zkumavky se pevně uzavřou a předejde se termocykler na 94°C. Po vložení reakčních zkumavek do termocykleru se spustí amplifikační reakce skládající se z následujících kroků:

Pre-PCR: 94°C/2 min

Vlastní reakce PCR: 94°C/15 s – 58°C/30 s – 72°C/30 s (celkem 35 cyklů)

Amplifikační produkty se vloží na led nebo se uchovávají při 2 – 8°C pro další použití. Je možné analyzovat produkty prostřednictvím elektroforézy v 2 – 3% agarózovém gelu. Délky fragmentů se nachází v příslušném originálním manuálu.

### **Hybridizace**

Před provedením vlastní hybridizace se nastaví vodní hladina zhruba do ½ výšky promývacího korýtka. Vyhřeje se lázeň přesně na 45°C ( $\pm$ 0,5°C) a teplota se zkontroluj kalibrovaným teploměrem. Vytemperuje se Hybridization Buffer a Wash Solution A na 45°C. Testovací proužky, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B a Color Developer se nechají vytemperovat při pokojové teplotě. Připraví se promývací korýtka a vyjme se jeden proužek pro každý vzorek pomocí čisté pinzety. Proužků se dotýká

pouze v rukavicích. Proužky se označí obyčejnou tužkou na okraji. Do spodní části korýtky se napipetuje vždy 10  $\mu$ l DNAT (modré víčko) a 10  $\mu$ l PCR produktu vždy přímo do kapky DNAT. Vzniklý roztok se promíchá a po promíchání zůstává modrý. Nechá se 5 min inkubovat při pokojové teplotě, potom se přidá do každého sloupce korýtky 1 ml Hybridization Buffer (předehřátého na 45°C). Jemně se korýtkem zamíchá a modrá barva zmizí. Proužky se vloží do příslušného sloupce korýtky s označením červenou čárkou nahoru a úplně se ponoří. Inkubuje se 30 min při 45°C na třepané platformě vodní lázně. Nastaví se střední frekvenci třepání (cca 50rpm), aby se tekutina pohybovala, ale nestříkala ven. Vodní lázeň se uzavře víkem, aby byla teplota stabilní. Po skončení inkubace se odsaje hybridizační roztok vakuovou odsávacíčkou a okamžitě se pokračuje. Proužky se nenechají nikdy během celé procedury oschnout.

### **Promývání**

Následuje vlastní promývání, kdy se přidá 1 ml Wash Solution A (předehřátého na 45°C) a stripy se krátce opláchnou (10 s). Odsaje se tekutina vakuovou odsávacíčkou a znovu se přidá 1 ml Wash Solution A (45°C). Inkubuje se 15 min při 45°C v třepané lázni. Poslední dva kroky (přidání Wash Solution A a inkubaci) se znovu zopakují a přistoupí se k vlastnímu barvení.

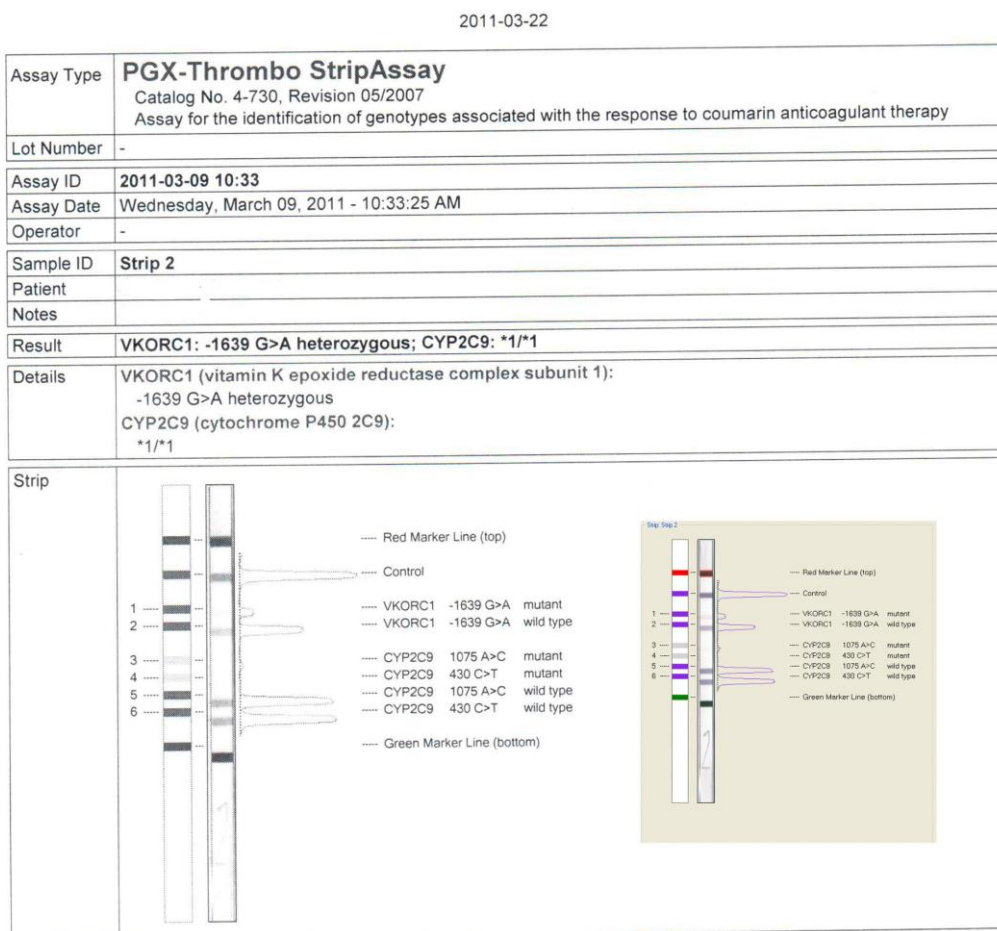
### **Barvení**

1 ml Conjugate Solution se přidá ke stripům a začne 15 min inkubace při pokojové teplotě na lineární nebo orbitální třepačce. Tekutina se odsaje vakuovou odsávacíčkou a přidá se 1 ml Wash Solution B. Stripy se opláchnou, odsaje se tekutina a opět se přidá 1ml Wash Solution B. Inkubace probíhá 5 min při pokojové teplotě na lineární nebo orbitální třepačce. Znovu se odsaje tekutina vakuovou odsávacíčkou a přidá se 1 ml Wash Solution B. Zopakuje se inkubace z předešlého kroku a opět se tekutina odsaje. Nyní se přidá 1 ml Color Developer a inkubuje se 15 min při pokojové teplotě ve tmě na třepačce. Při pozitivní reakci se vytvoří purpurové proužky. Několikrát se proužky opláchnou destilovanou vodou a usuší se ve tmě na filtračním papíru. Proužky se nikdy nevystavují intenzivnímu světelnému záření [79].

## Detekce

Fragmenty hybridizované na reagenčních stripech se vyhodnotí pomocí software Strip Assay Evaluator verze 2.0 a vyšší, dodávaného výrobcem soupravy (obrázek č. 10).

**Obrázek č. 10: Výsledkový list a záznam hodnoceného stripu ze softwaru Strip Assay Evaluator verze 2.0**



### 3.2 Elektroforéza

Metodu elektroforézy jsme si zvolili jako doplňkovou pro kontrolu čistoty izolace DNA a amplifikace vzorku.

#### 3.2.1 Princip metody

Principem metody je dělení látek bílkovinné povahy (v našem případě nukleových kyselin) na základě jejich odlišné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli v závislosti na velikosti nukleové kyseliny, která je negativně nabitá a pohybuje se proto směrem od katody k anodě [80].

#### 3.2.2 Reagencie

1. 2% agaróza v 1x TBE pufru (0,04 M Tris-kyselina octová, 0,001 M EDTA)
2. Zásobní elektrodový pufr 10x TBE (0,4 M Tris-kyselina octová, 0,01 M EDTA, pH 8,0)
3. 10% Ethidium bromid
4. DNA marker (200 – 1500 bp)
5. nanášecí pufr (0,125% bromfenolová modř) [82]

Spotřební materiál: mikrozkušavky 1,5 ml (eppenforfky), špičky, buničina.

#### 3.2.3 Přístrojové vybavení

Přesně nastavitelné mikropipety 1  $\mu$ l - 10  $\mu$ l a 10  $\mu$ l - 1000  $\mu$ l

Horizontální elektroforetická komůrka

Zdroj napětí

UV transluminátor

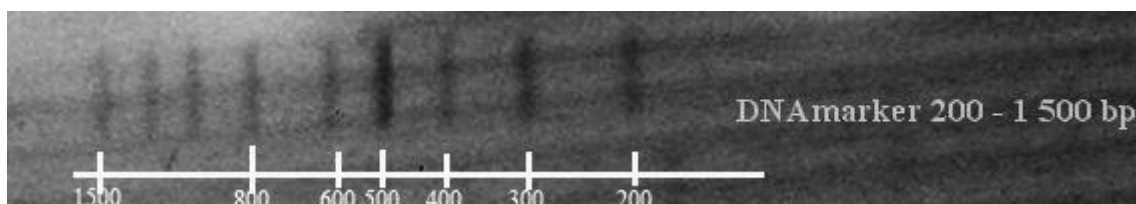
#### 3.2.4 Pracovní postup

Připraví se 100ml 2% roztoku agarózy v 1x TBE pufru. Navážené množství agarózy (2 g) se důkladně rozvaří v pufru, aby vznikl úplně čirý roztok. Přidá se 1  $\mu$ l ethidiumbromidu a dobře promíchá. (Pozor! Pracuje se v ochranných rukavicích, ethidium bromid je mutagen a karcinogen!). Roztok agarózy se nechá zchladit na 60°C,

a potom se nalije do připravené vaničky s vloženým hřebínkem tak, aby se vytvořil gel o výšce asi 0,5 – 0,8 cm. Pomocí malé plastové pipety se odstraní vzduchové bubliny a gel se nechá asi 15 min tuhnout. Po dokonalém ztuhnutí gelu se opatrně vytáhne hřebínek a gel se vloží do elektroforetické komůrky naplněné TBE pufrům. Gel musí být umístěn tak, aby jamky pro nanášení vzorků byly blíže ke katodě a to proto, že DNA při elektroforéze migruje směrem k anodě. Celý gel se musí převrstvit asi 2 – 5 mm pufru. Vzorky pro elektroforézu se připraví smícháním 5  $\mu$ l vzorku DNA se 3  $\mu$ l nanášecího pufru. Do jamky by mělo být naneseno více jak 10 ng DNA. Vzorky se nanáší opatrně pomocí mikropipety tak, aby nedošlo k rozlítí vzorku mimo jamku. Po nanesení všech vzorků se uzavře komůrka a připojí se ke zdroji elektrického napětí a nastavíme napětí 60 V, tzn. 1 – 5 V/cm gelu. Při správném zapojení se na elektrodách generují bublinky jako produkt elektrolýzy vody a během několika minut začne bromfenolová modř migrovat z jamek směrem k anodě. Elektroforéza se nechá běžet asi 30 min a zastaví se v době, kdy bromfenolová modř urazí 2/3 dráhy. Zdroj elektrického napětí se vypne a odpojí se kabely. Gel se opatrně vyjme, omyje destilovanou vodou a prohlédneme pomocí UV transluminátoru [82].

Kontrola kvality této metody se provádí pomocí použití DNA markeru. Přítomností fragmentů je kontrolována elektroforéza v agarózovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu (1  $\mu$ g/ml). Při vizualizaci fragmentů v UV světle je patrné 9 fragmentů DNA (200, 300, 400, **500**, 600, 800, 1000, 1200 a 1500 pb). Fragment o velikosti 500 bp je ve dvojnásobném množství (obrázek č. 11).

**Obrázek č. 11: DNA marker 200-1500 pb**





## 4 Výsledky

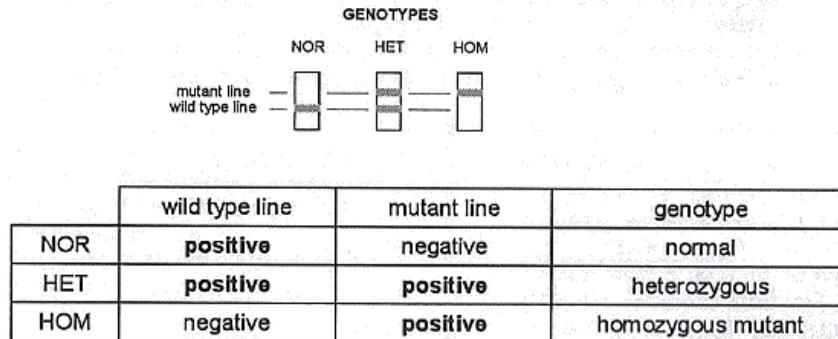
### 4.1 Stanovení genotypů

Genotyp testovaného vzorku se určuje pomocí přiloženého listu. Testované stripy se umístí do navržených polí podle namalovaného schématu. Červený proužek na stripu je nahoře a zelený dole, poté se stripy přelepí lepicí páskou.

Pozitivní reakce na horním kontrolním řádku indikuje správnou funkci roztoku konjugátu a barvicího roztoku. Tento proužek by měl být vždy vybarven pozitivně.

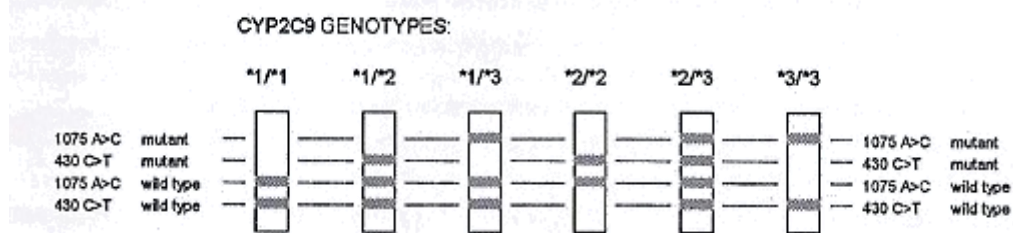
Pro každý polymorfismus jsou na stripu 2 proužky (mutant a „wild“ type). Na základě kombinací jejich vybarvení se uručí, zda je pacient pro daný polymorfismus homozygot nebo heterozygot. Poslední variantou je homozygot, který není nosičem daného polymorfismu (obrázek č. 12). Pro výsledné vyhodnocení není důležitá intenzita zabarvení signálu ale přítomnost signálu.

Obrázek č. 12: Hodnocení genotypu



Hodnocení genotypů u polymorfismu genu CYP2C9 a jejich varianty jsou znázorněny v obrázku č. 13.

Obrázek č. 13: Hodnocení CYP2C9 genotypu



## 4.2 Výsledky validace

Při zavádění metody na detekci polymorfismů v genech CYP2C9 a VKORC1 jsme verifikovali následující parametry – reprodukovatelnost, opakovatelnost a robustnost.

Přesnost za podmínek reprodukovatelnosti byla testována na 6 patientských a 1 kontrolním vzorku opakovaně ve 3 na sobě nezávislých stanoveních. U všech 6 pacientů jsme našli ve 3 nezávislých sériích shodný genotyp. U kontrolního vzorku jsme našli shodný genotyp v prvním a třetím stanovení. V druhém stanovení se nepodařilo kontrolní vzorek vyhodnotit (Tabulka č. 5).

**Tabulka č. 5: Reprodukovatelnost**

datum měření	5.11. 2010	4.1. 2011	9.3. 2011	5.11. 2010	4.1. 2011	9.3. 2011	5.11. 2010	4.1. 2011	9.3. 2011	Výsledky měření	
	VKORC1 -1639 G>A			CYP2C9 1075 A>C			CYP2C9 430 C>T			výsledný genotyp VKORC1	výsledný genotyp CYP2C9
Pac. č. 1	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	homozygot „wild“ typu	*1/*1
Pac. č. 2	M/N	M/N	M/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	heterozygot	*1/*1
Pac. č. 3	N/N	N/N	N/N	M/N	M/N	M/N	M/N	M/N	M/N	homozygot „wild“ typu	*2/*3
Pac. č. 4	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	homozygot „wild“ typu	*1/*1
Pac. č. 5	M/N	M/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	heterozygot	*1/*1
Pac. č. 6	N/N	N/N	0	N/N	N/N	0	N/N	N/N	0	homozygot „wild“ typu	*1/*1
Kontrolní vzorek	M/N	0	M/N	N/N	0	N/N	N/N	0	N/N	heterozygot	*1/*1

*M/M – homozygot, M/N-heterozygot, N/N – homozygot wild typu  
0 - nevyhodnoceno*

Opakovatelnost byla testována na jednom patientském vzorku a jednom kontrolním vzorku stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě a za stejných podmínek. Ve všech 7 případech byl stanoven shodný genotyp u patientského a kontrolního vzorku. Výsledky opakovatelnosti jsou shrnuty v tabulce č. 6.

Robustnost byla testována stanovením jednoho patientského vzorku a jednoho kontrolního vzorku o známém genotypu ns dvou různých termocyklerech (PTC 100 MJ Research) a GeneQ BIOER). Ve všech případech byl na obou termocyklerech stanoven shodný genotyp u patientského i kontrolního vzorku. Výsledky stanovení robustnosti jsou shrnuty v tabulce č. 6.

**Tabulka č. 6: Opakovatelnost a robustnost**

datum měření	30. 3. 2011			Výsledky měření		Robustnost
	VKORC1 -1639 G>A	CYP2C9 1075 A>C	CYP2C9 430 C>T	výsledný genotyp VKORC1	výsledný genotyp CYP2C9	Termocykler
Pac. č. 7	M/N	M/N	M/N	heterozygot	*2/*3	PTC100
Pac. č. 7	M/N	M/N	M/N	heterozygot	*2/*3	PTC100
Pac. č. 7	M/N	M/N	M/N	heterozygot	*2/*3	PTC100
Pac. č. 7	M/N	M/N	M/N	heterozygot	*2/*3	PTC100
Pac. č. 7	M/N	M/N	M/N	heterozygot	*2/*3	PTC100
Pac. č. 7	M/N	M/N	M/N	heterozygot	*2/*3	PTC100
Pac. č. 7	M/N	M/N	M/N	heterozygot	*2/*3	PTC100
Kontrolní vzorek	M/N	N/N	N/N	heterozygot	*1/*1	PTC100
Pac. č. 7	M/N	M/N	M/N	heterozygot	*2/*3	GeneQ
Pac. č. 7	M/N	M/N	M/N	heterozygot	*2/*3	GeneQ
Pac. č. 7	M/N	M/N	M/N	heterozygot	*2/*3	GeneQ
Pac. č. 7	M/N	M/N	M/N	heterozygot	*2/*3	GeneQ
Pac. č. 7	M/N	M/N	M/N	heterozygot	*2/*3	GeneQ
Pac. č. 7	M/N	M/N	M/N	heterozygot	*2/*3	GeneQ
Pac. č. 7	M/N	M/N	M/N	heterozygot	*2/*3	GeneQ
Kontrolní vzorek	M/N	N/N	N/N	heterozygot	*1/*1	GeneQ

*M/M – homozygot, M/N-heterozygot, N/N – normal*

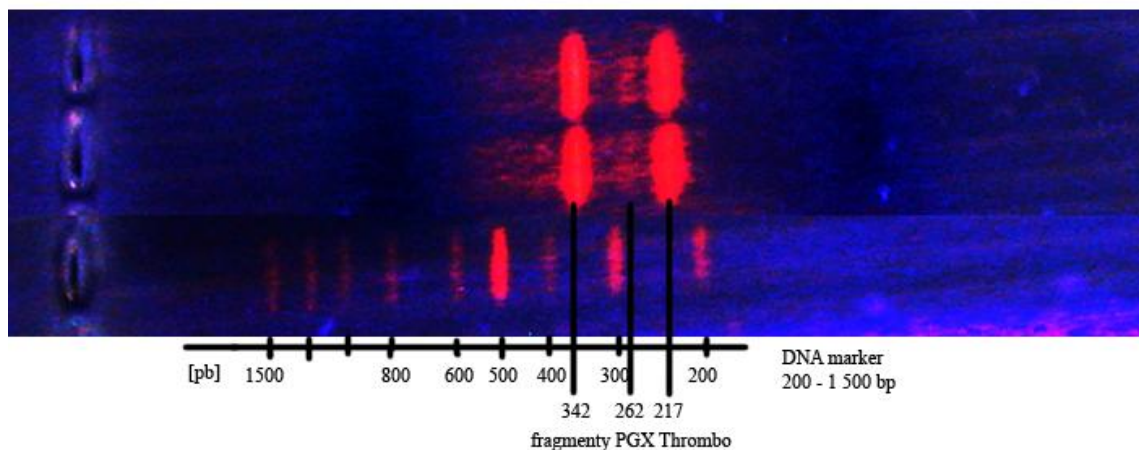
## 5 Diskuze

V rámci verifikace nové farmakogenetické metody jsme ověřovali tři parametry, reprodukovatelnost, robustnost a opakovatelnost. Ověření parametrů jsme prováděli na sedmi vzorcích pacientů a jednom kontrolním vzorku o známém genotypu, který byl ve všech analýzách použit jako vnitřní kontrola stanovení. Ve všech analýzách s výjimkou jedné analýzy při verifikaci robustnosti byl stanoven stejný genotyp kontrolního vzorku. Ověření robustnosti probíhalo ve třech na sobě nezávislých analýzách ve dnech 5. 11. 2010, 4. 1. 2011 a 9. 3. 2011. Při druhé analýze nebylo možné vyhodnotit kontrolní vzorek z důvodu nevybarvení stripu v oblastech charakteristických pro jednotlivé analyzované fragmenty (obrázek č. 14). Vzhledem k tomu, že kontrolní proužek reagenčního stripu, který charakterizuje správnou funkci konjugátu a vyvíjecího roztoku byl zabarven (obrázek č. 14), bylo možné vyloučit chybu při barvení a vyhodnocování hybridizačního stripu. Abychom vyloučili chybu při izolaci DNA kontrolního vzorku nebo při amplifikaci, byl kontrolní vzorek analyzován elektroforézou v 2% agarózovém gelu barveném etidymbromidem (obrázek č. 15).

**Obrázek č. 14: Nevybarvený kontrolní strip**



**Obrázek č. 15: Elektroforéza na 2% agarózovém gelu barveném etidymbromidem**



Elektroforéza prokázala přítomnost fragmentů o délkách 342, 262 a 217 bp odpovídajících jednotlivým variantám. Na základě výsledků elektroforézy tedy lze usoudit, že pravděpodobně došlo k chybě při hybridizaci na reagenční strip.

I přes tento chybný výsledek však lze na základě zhodnocení výsledků verifikačních parametrů shoda ve všech výsledcích opakovatelnosti i robustnosti považovat metodu za vylisovanou a je možné ji uvolnit do rutinního laboratorního procesu.

Polymorfismy je možné vyšetřovat řadou metod zahrnujících široké spektrum postupů od RFLP až po sekvenaci, které již byly zmíněny v kapitole 1.4.1. Naším cílem bylo najít a zavést do laboratorního provozu metodu, která je jednoduchá, ekonomicky výhodná, dostupná, praktická, reprodukovatelná a dostatečně specifická. PGX Thrombo StripAssay tyto požadavky splňuje. Časová náročnost této metody je vzhledem ke své výpovědní hodnotě nízká. Metodu lze provádět během jednoho dne, nebo je možné provádět metodu ve dvou dnech, kdy se v prvním dni provede izolace DNA s amplifikací a druhý den hybridizace s následnou detekcí. Velkou výhodou zvolené metody je možnost vyšetření 3 polymorfismů ovlivňující warfarinovou terapii na jednom stripu. Pokud bychom chtěli používat metodu RFLP, museli bychom amplifikační produkt vystavit působení 3 různých restrikčních enzymů, čímž by se zvýšila jak ekonomická a časová náročnost, tak i nárok na množství amplifikačního produktu. Zkušenosti s typem této metody od příslušné firmy jsme měli již díky vyšetření polymorfismů asociovaných s onemocněním kardiovaskulárního systému. Velkou výhodou je možnost vyhodnocení stripů pomocí vyhodnocovacího softwaru dodávaného výrobcem soupravy. I při softwarovém vyhodnocení nemusí dojít k úplnému vyhodnocení reagenčního stripu. Velmi záleží zejména na správné kvalitě scanování. Proto je nutné provádět i následný vizuální odečet výsledků přímo ze stripu, aby se zabránilo nesprávné identifikaci. Nehodnotí se intenzita zabarvení signálu, ale jeho přítomnost. Výsledky po vizuálním odečtení je možno v softwaru editovat a tím zaznamenat jejich správnou interpretaci.

## **6 Závěr**

Na základě výsledků verifikace opakovatelnosti, reprodukovatelnosti a robustnosti lze prokázat, že metodu PGX Trombo Strip assay založenou na polymerázové řetězové reakci s reverzní hybridizací je možné zavést do rutinního laboratorního provozu. Zavedení metody do laboratorního provozu umožní rozšířit spektrum důležitých laboratorních analýz týkajících se monitorování antikoagulační terapie.

## 7 Seznam použitých zkratk

A	Adenin
Ala	Alanin
Arg	Arginin
AT	Antitrombin
AT III	Antitrombin III
$\alpha$ 2-AP	Alfa 2 antiplazmin
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
C	Cytosin
cDNA	Copy deoxyribonukleová kyselina
CYP1A2	Cytochrom P450, třída 1, podtřída A
CYP2C9	Cytochrom P450, třída 2, podtřída C, polypeptid 9
CYP2C9*2	Cytochrom P450, třída 2, podtřída C, polypeptid 9 polymorfismus typu 2
CYP2C9*3	Cytochrom P450, třída 2, podtřída C, polypeptid 9 polymorfismus typu 3
CYP3A4	Cytochrom P450, třída 3, podtřída A, polypeptid 4
Cys	Cystein
ČSKB	Česká společnost klinické biochemie
DGGE	<u>D</u> enaturing <u>G</u> radient <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis, denaturující gradientová gelová elektroforéza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	<u>D</u> ouble <u>S</u> tranded <u>D</u> N <u>A</u> , dvouřetězcová DNA
EDTA	kyselinu ethylendiamintetraoctová
FDA	<u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dministration, Správa kontroly potravin a léčiv
FGN	Fibrinogen
FII	Faktor II
FIIa	Aktivovaný faktor II
FV	Faktor V
FVa	Aktivovaný faktor V
FVII	Faktor VII
FVIIa	Aktivovaný faktor VII
FVIII	Faktor VIII

---

FVIIIa	Aktivovaný faktor VIII
FIX	Faktor IX
FIXa	Aktivovaný faktor IX
FX	Faktor X
FXa	Aktivovaný faktor X
FXI	Faktor XI
FXIa	Aktivovaný faktor XI
FXIII	Faktor XIII
FXIIIa	Aktivovaný faktor XIII
G	Guanin
Gln	Glutamin
Glu	Kyselina glutamová
Gly	Glycin
CHADS2	<u>C</u> ongestive heart failure, <u>H</u> ypertension, <u>A</u> ge, <u>D</u> iabetes mellitus, prior Stroke - městnavá porucha srdce, hypertenze, stáří, diabetes mellitus, ictus
INR	<u>I</u> nternational <u>n</u> ormalized <u>r</u> atio, mezinárodní normalizovaný poměr
IVD MD	<u>I</u> n <u>v</u> itro <u>d</u> iagnostic <u>M</u> edical <u>D</u> evice
Leu	Leucin
LMWH	<u>L</u> ow <u>M</u> olecular <u>W</u> eight <u>H</u> eparin, frakcionovaný nízkomolekulární heparin
Met	Metionin
mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> ibonucleotid <u>A</u> cid, messengerová ribonukleová kyselina
NBT	<u>N</u> itro <u>B</u> lue <u>T</u> etrazolium, tetrazoliová modř
NCBI	<u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <b>te</b> chnology <u>I</u> nformation, Národní centrum pro biotechnologické informace
OMIM	<u>O</u> nline <u>M</u> endelian <u>I</u> nheritance in <u>M</u> an, online mendelovská dědičnost u člověka
P	Pravděpodobnost
PAAG	Polyakrylamidový gel
PAI-1	Plazminogenem aktivovaný inhibitor typ 1
PC	Protein C
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction, polymerázový řetězová reakce
pH	<u>P</u> otential of <u>H</u> ydrogen, vodíkový potenciál
Phe	<u>P</u> henylalanin, fenylalanin



---

PLG	Plazminogen
Pro	Prolin
PS	Protein S
RFLP	<u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism, polymorfismus restrikčních fragmentů
RT-PCR	<u>R</u> everse <u>T</u> ranscription PCR, reverzní polymerázový reakce
Ser	Serin
SNP	<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism, jednonukleotidové polymorfismy
SOP	Standardní operační postup
ssDNA	<u>S</u> ingle <u>S</u> tranded <u>D</u> N <u>A</u> , jednořetězcová DNA
T	Thymin
TAFI	Trombinem aktivovaný inhibitor fibrinogenu.
TBE pufr	<u>T</u> ris base, <u>B</u> oric acid and <u>E</u> DTA, tris baze, kyselina boritá a EDTA
TF	Tkáňový faktor
Thr	Threonin
TPA	Tkáňový inhibitor plazminogenu
Trp	Tryptofan
Tyr	Tyrozín
U	Uracil
UFH	<u>U</u> nfractionated <u>h</u> eparin, nefrakciovaný heparin
USA	<u>U</u> nited <u>S</u> tates of <u>A</u> merica, spojené státy americké
UV	<u>U</u> ltraviolet, ultrafialové
Val	Valin
VKORC1	Komplex vitamínu K epoxid reduktázy, podjednotka 1
VWF	Von Willebrandův faktor

## 8 Seznam použité literatury

- 1 HYNIE, Sixtus. *Speciální farmakologie Díl IV. : Látky ovlivňující kardiiovaskulární systém*. Vyd. 1. Praha : Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum 2000, 2000. 290 s. ISBN 80-7184-448-9.
- 2 DAHLBÄCK B. (2000) Blood coagulation. *Lancet*, 355, 1627–1332. ISSN 1473-5733.
- 3 DAHLBÄCK B, STENFLO J. (2000) The protein C anticoagulant system. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW et al. (eds) *The Molecular Basis of Blood Diseases*, 3rd edn. Philadelphia: W.B. Saunders, pp. 614–656.
- 4 ESMONT CT. (1992) The protein C anticoagulant pathway. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 12, 135–145.
- 5 *Wikimedia commons* [online]. 2010-02-14 20:03 (UTC) [cit. 2011-03-25]. Coagulation deutsch. Dostupné z WWW: <[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Coagulation\\_deutsch.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Coagulation_deutsch.svg)>.
- 6 CHLUMSKÝ, Jaromír, et al. *Antikoagulační léčba*. Vyd. 1. Praha : Grada Publishing, 2005. 220 s. ISBN 80-247-9061-0.
- 7 KUMAR, Dhavendra. *Genomics and Clinical medicine*. Vyd. 1. Madison Avenue, New York : Oxford Univesity Press, Inc., c2008. 651 s. ISBN 978-0-19-518813-4.
- 8 DUCHOŇ, Jiří, et al. *Lékařská chemie a biochemie : Učebnice pro lékařské fakulty*. Vyd. 1. Praha : Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n.p., 1985. 716 s. cnb000012197.

- 9 GO AS, HYLEK EM, PHILLIPS KA, et al. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors In Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA*. 2001;285:2370-2375. ISSN 1538-3598.
- 10 MIYSAKA Y, BARNES ME, GERSH BJ, et al. Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation*. 2006;114:119-125. ISSN 0009-7322.
- 11 GAGE BF, WATERMAN AD, SHANNON W, BOECHLER M, RICH MW, RADFORD MJ. Validation of clinical classification schemes for predicting stroke: results from the National Registry of Atrial Fibrillation. *JAMA*. 2001;285:2864-2870. ISSN 1538-3598
- 12 HART RG, PEARCE LA, AGUILAR MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med*. 2007;146:857-867.
- 13 SINGER DE, ALBERS GW, DALEN JE, et al. Antithrombotic therapy in atrial fibrillation. ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2008;133:546S-592S. ISSN 1931-3543
- 14 ANSELL J, HIRSH J, HYLEK E, JACOBSON A, CROWTHER M, PALARETI G. The pharmacology and management of the vitamin K antagonists: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2008;133:160S-198S.
- 15 BUDNITZ DS, SHEHAB N, KEGLER SR, RICHARDS CL. Medication use leading to emergency department visits for adverse drug events in older adults. *Ann Intern Med*. 2007;147:755-765. ISSN 1539-3704.
- 16 AREPALLY G, BAUER KA, BHATT DL, et al. The use of antithrombotic therapies in the prevention and treatment of arterial and venous thrombosis. *Crit*

- Path Cardiol.* 2010;9:41-48.ISSN 1477-0962.
- 17 THACKER, S. M., GRICE, G.R., MILIGAN P.E., GAGE B.F. Dosing antikoagulant therapy with kumarin drugs: is genotyping clinically useful?Yes. *J. of Thrombosis and Haemostasis*, 2008, 6, p. 1445-1449.
- 18 BODIN, L., VERSTUYFT, C., TREGOUET, D. A. et al. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K-epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinant of acenocoumarol sensitivity. *Blood*, 2005, 106, p. 135-141. ISSN 1528-0020.
- 19 SCONSE, E. A., KHAN, T. I., ŠIBNE, H. A., AVERY, P. et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirement: proposal for a new dosing regimen. *Blood*, 2005, 106, p. 2329-2333. ISSN 1528-0020.
- 20 KESSLER, P. Farmakogenetika warfarinu. Doporučení pro klinickou praxi. Vydáno 16.3.2006 u příležitosti konání XII. Pařížkových dní.
- 21 LEWIS, R.J., TRAGER, W.F., CHAN, K.K., BRECKENRIDGE, A., ORME, M., ROLAND, M. & SCHARY, W. (1974). Warfarin. Stereochemical aspects of its metabolism and the interaction with phenylbutazone. *J. clin. Invest.*, 53, 1607-1617. ISSN 0021-9738.
- 22 M. UFER, "Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol," *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 44, no. 12, pp. 1227–1246, 2005. ISSN 0312-5963.
- 23 M.UFER, J. O. SVENSSON, K.W. KRAUSZ, H. V. GELBOIN, A. RANE, and G. TYBRING, "Identification of cytochromes P450 2C9 and 3A4 as the major catalysts of phenprocoumon hydroxylation in vitro," *European Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 60, no. 3, pp. 173–182, 2004. ISSN 1432-1041.

- 24 M. UFER, B. KAMMERER, R. KAHLICH et al., “Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2C9 causing reduced phenprocoumon (S)-7-hydroxylation in vitro and in vivo,” *Xenobiotica*, vol. 34, no. 9, pp. 847–859, 2004. ISSN 0049-8254.
- 25 J. KIRCHHEINER, M. UFER, E.-C. WALTER et al., “Effects of CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetics of R- And S-phenprocoumon in healthy volunteers,” *Pharmacogenetics*, vol. 14, no. 1, pp. 19–26, 2004. ISSN 1473-561X.
- 26 M. K. KOVAC, A. R. MASLAC, L. B. RAKICEVIC et al., “The c. – 1639G > A polymorphism of the VKORC1 gene in Serbian population: retrospective study of the variability in response to oral anticoagulant therapy,” *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, vol. 21, no. 6, pp. 558–563, 2010. ISSN 1473-5733.
- 27 P. H. REITSMA, J. F. VAN DER HEIJDEN, A. P. GROOT, F. R. ROSENDAAL, and H. R. BÜLLER, “A C1173T dimorphism in the VKORC1 gene determines coumarin sensitivity and bleeding risk,” *PLoS Medicine*, vol. 2, no. 10, article no. e312, 2005. ISSN 1549-1676.
- 28 VASAN RS. Biomarkers of cardiovascular disease: Molecular basis and practical considerations. *Circulation* 2006;113: 2335-2362. ISSN 0009-7322.
- 29 DZAU, Victor J.; LIEW, Choong-Chin. *Cardiovascular Genetics and Genomics for the cardiologist*. Vyd. 1. Austria : Blackwell Publishing, 2007. 276 s. ISBN 978-1-4051-3394-4.
- 30 VOORA D, EBY C, LINDER MW et al. Prospective dosing of warfarin used on cytochrome P-450 2C9 genotype. *Thromb Haemost* 2005; 93:700-705. ISSN 0340-6245.
- 31 Li T, CHANG CY, Jin DY, Lin PJ, KHYOROVA A, STAFFORD DW. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 2004;

- 427:541-544. ISSN 0028-0836.
- 32 ROST S, FREGIN A, IVASKEVICIUS V *et al.* Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004; 427: 537-541. ISSN 0028-0836.
- 33 D'ANDREA G, D'AMBROSIO RL, Di PERNA P *et al.* A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 2005; 105: 645-649. ISSN 1528-0020.
- 34 HARRINGTON DJ, UNDERWOOD S, MORSE C, SHEARER MJ, TUDDEMHAM EG, MUMFORD AD. Pharmacodynamic resistance to warfarin associated with a Val66Met substitution in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. *Thromb Haemost* 2005; 93 23-26. ISSN 0340-6245.
- 35 PELZ HJ, ROST S, HUNERBERG M *et al.* The genetic basis of resistance to anticoagulation in rodents. *Genetics* 2005;170 1839-1847. ISSN 1943-2631.
- 36 WADELIUS M, CHEN LY, DOWNES K *et al.* Common VKORC1 and GGCX polymorphism associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J* 2005; 5:262-270. ISSN 1473-1150.
- 37 YUAN HY, Chen JJ, Lee MT *et al.* A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1745-1751. ISSN 1460-2083.
- 38 SCONCE EA, KHAN TI, WYNNE HA *et al.* The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 2005; 106: 2329-2333. ISSN 1528-0020.
- 39 RIEDER MJ, REINER AP, GARGE BF *et al.* Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 2005; 352: 2285-2293.

- 40 VEENSTRA DL, You JH, RIEDER MJ *et al.* Association of vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) variants with warfarin dose in a Hong Kong Chinese patient population. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15: 687-691. ISSN 1744-6880
- 41 CHU, P.-H., HUANG, T.-Y., WILLIAMS, J., STAFFORD, D. W. Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH(2). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 19308-19313, 2007. (Not available in PubMed).
- 42 LI, T., Chang, C.-Y., JIN, D.-Y., LIN, P.-J., KHVOROVA, A., STAFFORD, D. W. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427: 541-544, 2004. [PubMed: 14765195]. ISSN 0028-0836.
- 43 RIEDER, M. J., REINER, A. P., GAGE, B. F., NICKERSON, D. A., EBY, C. S., MCLEOD, H. L., BLOUGH, D. K., THUMMEL, K. E., VEENSTRA, D. L., RETIIE, A. E. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *New Eng. J. Med.* 352: 2285-2293, 2005. [PubMed: 15930419].
- 44 WADELIUS, M., CHEN, L. Y., DOWNES, K., GHORI, J., HUNT, S., ERIKSSON, N., WWALLERMAN, O., MELHUS, H., WADELIUS, C., BENTLEY, D., DELOUKAS, P. Common VKORC1 and GGCC polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J.* 5: 262-270, 2005. [PubMed: 15883587].
- 45 Klinická biochemie a metabolismus : Časopis české společnosti klinické biochemie a společnosti lékařské genetiky. In *Farmakogenetika a farmakokinetika warfarinu*. Vyd. 1. Praha : Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, 2009. s. 208. ISSN 1210-7921.
- 46 ROST S *et al.*, Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice--a response to 50 years of selection pressure by warfarin. *BMC Genet.* 2009 Feb 6 ;10:4. [PubMed: 19200363]. ISSN 1471-2156.

- 47 ROST S et al., Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*. 2004 Feb 5 ;427(6974):537-41. ISSN 0028-0836.
- 48 MACNICOLL AD, GILL JE. Revised methodology for a blood clotting response test for identification of warfarin-resistant Norway rats (*Rattus norvegicus*) Eur Plant Protect Org Bull. 1993;23:701–707.
- 49 PELZ HJ, ROST S et Al., The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics*. 2005 Aug ;170(4):1839-47. Epub 2005 May 6. ISSN 1943-2631.
- 50 STUART A. Scott et al Pharmacodynamic resistance to warfarin associated with a Val66Met substitution in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. *Thromb Haemost*. 2005 Jan ;93(1):23-6. ISSN 0340-6245.
- 51 LAUSSER R et al., Warfarin resistance in a French strain of rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2005 ;19(6):379-85.
- 52 NELSON DR, STRBOEL HW. Evolution of cytochrome-P-450 proteins. *Mol. Biol. Evol*. 1987; 4: 572-593.ISSN 1537-1719.
- 53 GUENGERICH FP. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol*. 2001; 14: 611-650. ISSN 0893-228X.
- 54 STIBOROVA M, HUDEČEK J, HODEK P, FREI E. Vyznam cytochromů P450 pro lidske zdraví. *Chem. Listy* 1999; 93: 229-237. ISSN 0009-2778.
- 55 SONO M, ROACH MP, COULTER ED, DAWSON JH. Heme-Containing Oxygenases. *Chem. Rev.* (Washington, DC, U. S.) 1996; 96: 2841-2887.
- 56 KOHN, M. H., PELZ, H.-J. A gene-anchored map position of the rat warfarin-resistance locus, *Rw*, and its orthologs in mice and humans. *Blood* 96: 1996-



- 1998, 2000. [PubMed: 10961907]). ISSN 1528-0020.
- 57 ROSS, K. A., BIGHAM, A. W., EDWARDS, M., GOZDZIK, A., SUAREZ-KURTZ, G., PARRA, E. J. Worldwide allele frequency distribution of four polymorphisms associated with warfarin dose requirements. *J. Hum. Genet.* 55: 582-589, 2010. [PubMed: 20555338]. ISSN 0021-5074.
- 58 AITHAL, G. P., DAY, C. P., KESTEVEN, P. J. L., DALY, A. K. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 353: 717-719, 1999. [PubMed: 10073515].
- 59 WILLIAMS, P. A., COSME, J., WARD, A., AANGOVE, H. C., VINKOVIC, D. M., JHOTI, H. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* 424: 464-468, 2003. [PubMed: 12861225]. ISSN 0028-0836.
- 60 SANDERSON S, EMERY J, HIGGINS J: CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGenet systematic review and meta-analysis. *Genet Med.* 2005 Feb;7(2):97-104. ISSN 1530-0366.
- 61 International Warfarin Pharmacogenetics Consortium KLEIN TE et al., Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *New Eng. J. Med.* 360: 753-764, 2009. [PubMed: 19228618]).
- 62 ANDERSON, J. L., HORNE B. D., STEVENS, S. M., GROVE, A. S. et al. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation*, 2007, 116, p. 2563–2570. ISSN 0009-7322.
- 63 CARACAO, Y., BLOTNIC, S., MUSZKAT, M. CYP2C9 genotype guided warfarin prescribing enhances the efficiency and safety of anticoagulation: a prospective randomized controlled study. *Clin.Pharmacol. Ther.*, 2008, 83, p.

460–470. ISSN 1532-6353.

- 64 HIRSH, J., GUYATT, G., ALBERS, G. W., HARRINGTON, R., SCHUEMANN, H. J. Executive Summary. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. (8th Edition). Chest, 2008, 133, p. 71S–109S.
- 65 ANSELL J., Warfarin versus new agents: interpreting the data. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010 ;2010:221-8.
- 66 KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Vyd. 1. Brno : Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Vinařská 6, 2007. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.
- 67 SAIKI R.K., GEFFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., Horn G.T., Mullis K.B., a Erlich H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA-polymerase. *Science* 239: 487-491. ISSN 1095-9203.
- 68 ORITA, M., Y. SUZUKI, T. SEKIYA, and K. HAYASHI. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879. ISSN 0888-7543.
- 69 FODDE, R. and LOSEKOOT, M. (1994), Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Human Mutation*, 3: 83–94. doi: 10.1002/humu.1380030202. ISSN 1059-7794.
- 70 SKŘÍTECKÁ, Marie. *Možnosti využití molekulárně biologických metod v historické a prehistorické antropologii* [online]. Brno, 2006. 55 s. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita v Brně. Dostupné z WWW: <[http://is.muni.cz/th/100979/prif\\_b/bakalarska\\_prace\\_2006.pdf](http://is.muni.cz/th/100979/prif_b/bakalarska_prace_2006.pdf)>.
- 71 B. FRIEDECKÝ, L. ŠPRONGL, J. KRATOCHVÍL a Z. PLZÁK, Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. Vyd 2. Praha, ČSKB ČLS JEP, 11/2010. [cit. 2011-04-25] Dostupné z:

[www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--validace-a-verifikace-metod](http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--validace-a-verifikace-metod).

- 72 B. FRIEDECKÝ a kol. Validace a verifikace molekulárně biologických metod založených na analýze extrahumánního genomu, doplněk k doporučení. Praha, schváleno ČSKB 2/2006. [cit. 2011-04-25] Dostupné z: <<http://www.cskb.cz/res/file/kbm/kbm-2006-14-2-118-124.pdf>>.
- 73 TNI 01 0115:2009. Mezinárodní metrologický slovník - Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM).
- 74 SN EN ISO 9000:2006. Systémy managementu kvality. Základy, zásady, slovník.
- 75 Klinická biochemie a metabolismus : Časopis české společnosti klinické biochemie a společnosti lékařské genetiky. *Směrnice Rady IVD 98/79/ES (Directive 98/79 EC) a kvalita analytických procesů*. Vyd. 1. Praha : Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, 2005. s. 207. Dostupné z: <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/KBM20054-207.pdf>
- 76 Klinická biochemie a metabolismus : Časopis české společnosti klinické biochemie a společnosti lékařské genetiky. *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích*. Vyd. 1. Praha : Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, 2011. s. 36.
- 77 BRDIČKA, R., et al. Analytická validace metod molekulární genetiky určených pro analýzu lidského genomu : Analytická validace metod molekulární genetiky určených pro analýzu lidského genomu. In *Klinická biochemie a metabolismus : časopis české společnosti klinické biochemie a společnosti lékařské genetiky* [online]. Praha : Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, 2007 [cit. 2011-04-05]. Dostupné z WWW: <[http://www.eurogentest.org/web/files/public/unit5/KBM0701\\_SLG\\_58.pdf](http://www.eurogentest.org/web/files/public/unit5/KBM0701_SLG_58.pdf)>.

- 78 BAREK, J. et al. Metrologická terminologie v chemii. *Chem. Listy*, 2000, 94, s. 39–444. ISSN 0009-2770.
- 79 Michael MCPHERSON & Simon MOLLER, *PCR second edition*. Vyd. 2. New York : Národní Taylor&Franci Group, Madison Avenue 270, 2006. 279 s. ISBN 0-203-00267-9.
- 80 Standardní operační postup - metodický č. VSOPM\_8ÚKBP\_218/2011-1  
Vyšetření polymorfizmů v genech CYP2C9 a VKORC1
- 81 ČERMÁKOVÁ, Marta, et al. *Klinická biochemie 2.díl*. Vyd. 1. Brno : Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Vinařská 6, 2005. 164 s. ISBN 80-7013-424-0.
- 82 KÁŠ J., KODÍČEK M., VALENTOVÁ O.: *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006. Str. 152. ISBN 80-7080-586-2