

## Aspekt genetyczny różnorodności odpowiedzi na leki *Genetic aspect of variability in drug response*

**Ewa Chmara**

Zakład Farmakologii Klinicznej, Katedra Kardiologii  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

### Streszczenie

Genetyczna różnorodność jest istotnym źródłem obserwowanej zmienności w odpowiedzi na lek. Dawniej lekarze przepisywali leki tylko na podstawie badania podmiotowego i przedmiotowego. Pod koniec XX wieku terapeutyczne decyzje ułatwiały już dostarczane wyniki analiz laboratoryjnych (dane biochemiczne) oraz monitorowane stężenia leków.

Obecnie wchodzimy w erę farmakogenetyki i farmakogenomiki, które stanowią obiecujący kierunek wiedzy (narzędzie diagnostyczne) wskazujący, który z wariantów genu lub wariantów kombinacji genów ma wpływ na funkcjonalne działanie produktów leczniczych.

Osobniczy polimorfizm i odpowiedź farmakologiczna na dany lek może być oceniana metodą fenotypową lub genotypową. (*Farm Współ 2008; 1: 236-240*)

*Słowa kluczowe: farmakogenetyka, polimorfizm, fenotypowanie, genotypowanie*

### Summary

Genetic heterogeneity appears to be a significant source of variability observed in the response to drugs. A hundred years ago, the clinicians prescribed the drug only on basis of physical examination. At the end of the 20<sup>th</sup> century, therapeutic decision was greatly facilitated by laboratory support and the process of therapeutic drug monitoring. Now, we have entered a new era with pharmacogenetics and pharmacogenomics, which appear highly promising in enhancing the support to therapeutic decision-making, predicting patients who are most likely to respond best to a particular drug or in whom the drug will yield optimal effects. An individual's polymorphism and possible response to a particular drug can be assessed by a dual approach, i.e. by phenotyping or genotyping. (*Farm Współ 2008; 1: 236-240*)

*Keywords: pharmacogenetics, polymorphism, phenotyping, genotyping*

### Wstęp

Na przełomie XX i XXI powstała jako kontynuacja genetyki molekularnej - nowa dziedzina nauki - genomika, której celem było poznanie pełnych sekwencji DNA, a więc kompletnej informacji genetycznej danego organizmu. Ważnym krokiem w tej dziedzinie był Projekt Poznania Ludzkiego Genomu (ang. Human Genom Project), który zakończony w 2003 roku

dostarczył wiedzę dotyczącą kompletnej sekwencji genomu człowieka.

Projekt Poznania Ludzkiego Genomu pociągnął za sobą kolejny projekt, mianowicie nową gałąź biologii molekularnej - proteomikę - naukę o organizacji, składzie i budowie ogółu białek organizmu tzw. proteomu. Kolejną dziedziną, pochodną genetyki molekularnej, jest metabolomika, która umożliwia jeszcze głębsze i bardziej szczegółowe poznanie struktury i funkcjo-

nowania organizmów poprzez informacje o całkowitej zawartości metabolitów tzw. ludzkiego metabolonu, co będzie bardzo trudnym wyzwaniem, gdyż jest to zestaw milionów związków z różnych klas, m. in.: peptydów, aminokwasów, lipidów, węglowodanów.

Dynamicznym przejściem pomiędzy genomem, proteomem i fenotypem komórki zajmuje się transkryptomika, której zadaniem jest określenie miejsca i czasu aktywności genów, określenie ogółu cząsteczek mRNA wyprodukowanych przez ludzkie komórki.

Genetycznym aspektem różnorodności w odpowiedzi na leki zajmuje się farmakogenetyka.

## Cel farmakogenetyki

Głównym celem farmakogenetyki jest zapewnienie pomocy w podawaniu i dawkowaniu chorym takich leków, których stosowanie wywoła optymalny efekt farmakologiczny i najmniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia reakcji niepożądanych.

Cechami farmakogenetycznymi są dowolnie mierzalne lub dostrzegalne cechy związane z lekiem jak np.: aktywność enzymatyczna, stężenia leków i/lub metabolitów w płynach ustrojowych, zmiany ciśnienia krwi lub stężenia lipidów, indukowane lekiem szlaki ekspresji genów. Ponieważ większość cech farmakogenetycznych ma raczej charakter wielogenowy należy zidentyfikować te geny oraz ich polimorfizmy, które wpływają na różnorodność odpowiedzi na lek. Indywidualny polimorfizm (różnorodność odpowiedzi na lek) może być oceniany poprzez stosowane od dawna techniki fenotypowania lub wciąż udoskonalane techniki genotypowania.

Genotypowanie wykorzystuje DNA wyizolowane z dowolnych somatycznych komórek diploidalnych,

zazwyczaj z krwinek białych lub komórek policzkowych. Pomiary farmakogenetyczne mają przewagę nad pomiarami fenotypowymi, gdyż te ostatnie mogą być uzależnione od czynników pozagenetycznych (Tabela 1). W odróżnieniu od testów fenotypowania, genotypowanie wystarczy przeprowadzić tylko raz, ponieważ sekwencja DNA jest generalnie niezmienna w czasie życia osobniczego.

Poszczególni ludzie różnią się pomiędzy sobą przeciętnie 300-1000 nukleotydów, z szacunkową całkowitą liczbą 3,2 miliona pojedynczych polimorfizmów nukleotydowych (SNPs – single nucleotide polymorphisms) w genomie. Substytucje pojedynczych par zasad, które występują w populacji z częstotliwością 1% lub więcej zwane są polimorfizmami pojedynczych nukleotydów (SNPs) i w ludzkim genomie występują przeciętnie w ilości 1 SNP na kilkaset do kilku tysięcy par zasad, w zależności od regionu genu [7,8].

Analizowane są również haplotypy - alleliczne formy ściśle ze sobą sprzężonych genów, które znacząco uprawdopodobniają wyniki badań diagnostycznych.

Polimorfizm genów związanych z farmakokinetyką leku w poszczególnych enzymach i transporterach, wpływa na stężenie leku i jest główną determinantą terapeutycznej lub niepożądanego odpowiedzi na lek.

Dotychczas poznano szereg mutacji odpowiedzialnych za:

- procesy transportu substancji endo- i egzogennych przez bariery biologiczne,
- metabolizmu leków (procesy biotransformacji I i II fazy),
- procesy farmakodynamiczne (zmiana działania receptorów farmakologicznych, kanałów jonowych, transporterów neuroprzekazników).

Istotnym zadaniem badań farmakogenetycznych

Tabela 1. Czynniki wpływające na występowanie potencjalnych różnic w farmakokinetyce i farmakodynamicie leków

Czynniki genetyczne	Czynniki niegenetyczne
Enzymy metabolizujące leki Miejsca uchwytu leków (receptory, kanały jonowe) Transportery leków (białka transportowe): MDR*, MRP* Choroby genetyczne Enzymy naprawiające DNA	Wiek, płeć, masa ciała, ciąża, infekcja, choroba, leki towarzyszące, zmienność dobową i sezonową, suplementy diety, dieta, czynność układu sercowo-naczyniowego, czynność przewodu pokarmowego, czynność układu immunologicznego, czynność wątroby, czynność nerek, czynność płuc, stres, spożycie alkoholu, palenie tytoniu, zanieczyszczenie środowiska

MDR\* (ang. *Multidrug Resistance*) – oporność wielolekowa (związana z glikoproteiną P)

MRP\* (ang. *Multidrug Resistance – Associated Proteins*) – oporność wielolekowa związana z białkami [1,2]

Tabela 2. Internetowe bazy danych dotyczących ludzkich wariantów genetycznych

Nazwa bazy danych	URL (adresy internetowe)	Zawartość
Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base	www.pharmgkb.org	Dane genotypowe i fenotypowe w powiązaniu z odpowiedzią farmakologiczną na lek
Gen-Bank: Single Nucleotide Polymorphism (SNP)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=snp	Mutacje punktowe, lokalizacja, częstość występowania
Gen-Bank OMIM: On Online Mendelian Inheritance In Man	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM	Katalog genów i zaburzeń genetycznych
Gen-Bank: Gene	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene	Sekwencje genów (intronów i eksonów), dane fenotypowe
Gen-Bank: Nucleotide	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide	Sekwencje nukleotydowe różnych fragmentów genomu ludzkiego i innych gatunków
Human Genome Variation Database	www.hgvbase.cgb.ki.se	Mutacje, powiązania genotyp/fenotyp, haplotypy
Human Gene Mutation Database	www.hgmd.org	Mutacje/SNPs, powiązanie z fenotypem

jest więc zidentyfikowanie polimorfizmów genetycznych tzw. genów kandydujących, które są przyczyną terapeutycznych i/lub niepożądanych odpowiedzi na lek [9].

Istnieje już kilka baz danych, które zawierają informacje o polimorfizmach i mutacjach ludzkich genów, które pozwalają klinicytom i farmaceutom na dostęp do informacji farmakogenetycznych. Poniżej przedstawiono krótką, przykładową listę internetowych baz danych dostępnych w sieci internetowej. Niektóre z nich zawierają dane zarówno fenotypowe, jak i genotypowe (Tabela 2).

## Złożoność dawkowania

Z uwagi na powszechność występowania funkcjonalnie istotnych polimorfizmów odpowiedzi na lek, złożoność dawkowania najprawdopodobniej znacząco wzrośnie. Dawkowanie większości leków jest obecnie populacyjną średnią wartością dawki leku, która modyfikowana jest przy współistnieniu niewydolności nerek czy wątroby.

Pacjenci często przyjmują jednocześnie kilka środków leczniczych, a liczne schematy terapeutyczne dla jednego schorzenia obejmują dużą liczbę leków. Nawet, jeśli dla każdego leku występowałby tylko jeden polimorfizm (który należy rozważyć w kontekście dawkowania), to i tak skala złożoności tego problemu jest bardzo duża. W kontekście interakcji leków i wpływu

stanów chorobowych zidentyfikowane muszą być istotne kowariancje. W polipragmazji taka sytuacja przekłada się na dużą ilość możliwych kombinacji leków i w konsekwencji wymusza poniekąd konieczność zindywidualizowanego dawkowania.

Dzięki farmakogenetyce zidentyfikowane są funkcjonalnie ważne geny i ich polimorfizmy, które wskażą, czy indywidualizacja dawkowania może poprawić wyleczalność oraz zmniejszyć liczbę krótko- i długoterminowych działań niepożądanych.

Pomimo, że potencjalna użyteczność farmakogenetyki w optymalizacji terapii lekowej jest duża (istnieje wiele udokumentowanych przykładów znaczących wpływów polimorfizmów na losy leków w organizmie), to powszechność rutynowego stosowania przez lekarzy dawek w oparciu o testy genetyczne jest wciąż zbyt mała. Pełne wyjaśnienie genetycznych podstaw różnorodności odpowiedzi na leki będzie w niedalekiej przyszłości fundamentalnym elementem diagnostyki medycznej i wytyczną do wyboru leku i jego dawkowania.

Pełna integracja genotypowania i terapii będzie wymagała wysokich standardów technologii genotypowania i stosowania niezawodnych testów farmakogenetycznych, zaletą których jest to, że w ciągu życia pacjenta wystarczające jest ich jednorazowe przeprowadzenie.

## Nowoczesne metody genetyczne

Przełomowym momentem w badaniach farmakogenetycznych było wprowadzenie do technik genetycznych łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*), która opiera się na metodzie powielania specyficznych fragmentów DNA, odkrytej przez Kary'ego Mullis'a w 1980 roku [3]. Odmianą tego nagrodzonego w 1993 roku nagrodą Nobla odkrycia, jest technika PCR w czasie rzeczywistym (ang. Real-time PCR) [2, 5]. Technika ta dzięki niezwyklej czułości staje się obecnie jedną z najpopularniejszych metod używanych do jednoczesnego namnażania i monitorowania ilości powstającego produktu DNA. Podczas reakcji powstające cząsteczki DNA są oznaczane ilościowo po każdym cyklu namnażania, czyli w czasie rzeczywistym. Chociaż technika real-time PCR jest stosunkowo młoda, to znalazła już szerokie zastosowanie w diagnostyce i badaniach naukowych. Jest ona również źródłem wysokospecyficznych pomiarów ilościowych produktów transkrypcji genów. Dzięki temu możliwe są badania ekspresji genów i ich zmian w czasie, odpowiedzi tkanek i kultur komórkowych na podanie środka farmakologicznego, progresji różnicowania komórek oraz odpowiedzi na zmiany warunków środowiska. Urządzenia te są równocześnie przystosowane do współpracy z wieloma sondami oligonukleotydowymi.

Najnowsze technologie pomiarowe winny więc łączyć w sobie cechy umożliwiające bardzo krótki czas trwania pomiaru oraz możliwość detekcji kilku produktów reakcji jednocześnie.

Wymogi te spełniają obecnie między m. in. tzw. mikromacierze DNA (chipy, czujniki DNA), które aktualnie są używane w celach naukowych, głównie w ośrodkach badawczych.

Za ich pomocą możemy dowiedzieć się, jakie geny zawierają badane fragmenty DNA („wizytówki” genetyczne człowieka) oraz, co jest również bardzo istotne, sprawdzić intensywność ekspresji poszczególnych genów tworząc profile **ekspresji genów**.

W przyszłości Chipy DNA umożliwią zarówno bardziej precyzyjne identyfikowanie chorób, jak i pozwolą dostosować terapię do specyficznej wrażliwości

pacjenta na poszczególne leki, czyli staną się jednym z narzędzi służących do zindywidualizowanej terapii [6].

## Technologie bioinformatyczne

Olbrzymia ilość informacji generowanych przez ośrodki badawcze oraz konieczność współdzielenia się wynikami badań biomedycznych zrodziła pomysł utworzenia jednego z największych projektów IT, (ang. *Informatic Technology*) – tzw. ogólnosiwiatowej sieci i zbioru aplikacji, które mają pomóc w szybszym opracowaniu nowych leków i metod leczenia. Amerykański National Cancer Institute (NCI) rozpoczął jeden z największych projektów IT w historii badań biomedycznych - Cancer Biomedical Informatics Grid (caBIG) - jako przykład nowego modelu prowadzenia badań naukowych. Następny projekt ma być zorientowany na choroby układu krążenia. Obecnie trwają również prace nad stworzeniem aplikacji dedykowanej badaniom klinicznym nowych produktów leczniczych.

W ramach Unii Europejskiej w styczniu 2006 roku uruchomiono projekt Advancing Clinico-Genomic Clinical Trials on Cancer (ACGT), którego założenia w dużej części pokrywają się z inicjatywą caBIG. Celem tych projektów jest poprawienie współpracy pomiędzy naukowcami oraz umożliwienie efektywnego dzielenia się informacjami. Polskie grupy naukowe i informatyczne biorą obecnie udział w kilku projektach międzynarodowych, poświęconych gridom komputerowym, finansowanym przez Komisję Europejską.

Pozostaje mieć tylko nadzieje, że skutkiem nowych technologii bioinformatycznych będzie szybka i pełna integracja danych biomedycznych, co umożliwi standaryzację badań wykonywanych przez różne placówki w kraju i na świecie.

Adres do korespondencji:

Ewa Chmara

Zakład Farmakologii Klinicznej Katedry Kardiologii  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego  
ul. Długa 1/2, 61-848 Poznań

Tel.: (+48 22) 627 39 86

E-mail: echmara@op.pl

**Piśmiennictwo**

1. Nasiłowska B. Geny oporności na leki. *Postępy Nauk Medycznych* 2003; 3-4: 99-105.
2. Prandota J. Genetyczne warianty białkowych transporterów leków. *Farmakogenetyka*. Wrocław: Wydawnictwo Urban&Partner; 2003.
3. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262: 5661.
4. Kubista M, Andrade J M, Bengtsson M i wsp. The Real Time Polymerase Chain Reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006; 27: 95-125.
5. Bustin SA. Quantitation of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Enol* 2002; 29: 2339.
6. Mirowski M, Bartkowiak J. Mikroprocesory DNA w badaniach biomedycznych. *Postępy Biochemii* 2000; 4(41): 272.
7. Sachidanandam R i wsp. A map of human genome sequence variation containing 1.42 milion single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409: 928-33.
8. Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA i wsp. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science* 2001; 293: 489-93.
9. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Opinion: Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 391-7.