

**Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**Četnost vybraných genetických polymorfismů cytochromu P450
v české populaci a vliv genotypu CYP2C9 na hypolipidemické
působení fluvastatinu**

**Frequency of selected genetic polymorphisms of cytochrome P450 in the Czech
population and the influence of CYP2C9 genotype on the hypolipidemic effect
of fluvastatin**

Helena Buzková

2012

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor:

Farmakologie a toxikologie

Předseda oborové rady:

prof. MUDr. Sixtus Hynie, DrSc.

Školící pracoviště:

1. LF UK

Farmakologický ústav

Albertov 4, Praha 2, 128 00

Školitel:

prof. MUDr. František Perlík, DrSc.

Konzultant:

doc. MUDr. Ondřej Slanař, Ph.D.

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

Obsah

Seznam zkratk.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
1. Úvod.....	6
2. Cíle práce.....	7
3. Metody.....	7
3.1) Analýza genotypu české populace.....	7
3.2) Vliv bodových polymorfismů CYP2C9 na působení fluvastatinu.....	8
4. Výsledky.....	8
4.1) Analýza genotypu české populace.....	8
4.2) Vliv bodových polymorfismů CYP2C9 na působení fluvastatinu.....	14
5. Diskuze.....	16
6. Závěry.....	21
7. Použitá literatura.....	22
Seznam publikací.....	24

Seznam zkratk

AUC	plocha pod křivkou (Area Under the Curve)
AST	aspartátaminotransferáza
ALT	alaninaminotransferáza
ALP	alkalická fosfatáza
CYP	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EM	extenzivní metabolizátor
FRET	specifické fluorescenční sondy (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
G-SDR	doporučené dávky podle genotypu (Genotype - Specific Dose Recommendation)
GMT	gamaglutamyltransferáza
HDL-C	lipoproteiny o vysoké hustotě (High Density Lipoprotein - Cholesterol)
HMG-CoA	3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl koenzym - A reductáza
ht	heterozygot
IM	intermediární metabolizátor (Intermediate Metabolizer)
LDL-C	lipoproteiny o nízké hustotě (Low Density Lipoprotein - Cholesterol)
PCR	polymerasová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PM	pomalý metabolizátor (Poor Metabolizer)
RFLP	analýza délky restričních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RM	rychlý metabolizátor (Rapid Metabolizer)
RT-PCR	PCR v reálném čase (Real Time PCR)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (Single Nucleotide Polymorphism)
TG	triglyceridy
TC	celkový cholesterol (Total Cholesterol)
UM	ultrarychlý metabolizátor (Ultrarapid Metabolizer)
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice, Praha
V (v/v)	variantní alela (homozygot pro variantní alely)
v/wt	heterozygot
wt (wt/wt)	alela bez přítomnosti polymorfismů, tzv. wild-type (homozygot pro alely bez přítomnosti polymorfismů)

Abstrakt

Četnost vybraných genetických polymorfismů cytochromu P450 v české populaci a vliv genotypu CYP2C9 na hypolipidemické působení fluvastatinu

Úvod: Jedním z hlavních faktorů geneticky podmíněné variability v odpovědi organismu na podané léčivo je rozdílná katalytická aktivita enzymů metabolizujících léčiva, způsobená zejména genetickými polymorfismy enzymů rodiny cytochromu P450. Předkládaná disertační práce zpracovává toto téma ve dvou navazujících okruzích a to formou komentáře k vlastním originálním publikacím. Cílem první části práce je stanovit frekvenci výskytu funkčně významných variantních alel tří základních isoenzymů cytochromu P450: CYP2D6, CYP2C9 a CYP2C19 v české populaci, predikovat prevalence fenotypu pomalých metabolizátorů a výsledky porovnat s údaji z jiných populací. Druhá část je zaměřena na studium vlivu CYP2C9 genotypu na hypolipidemický účinek fluvastatinu u hypercholesterolemických pacientů.

Metody: Genotypizace polymorfismů byla provedena metodou PCR-RFLP. Frekvence výskytu alel CYP2D6*1, *6, *5, *4, *3 a duplikace genu byla stanovena u 233 zdravých dobrovolníků, CYP2C9*1, *2, *3 u 254 subjektů a CYP2C19*1, *2, *3 u 218 subjektů. Do prospektivní studie bez intervencí do standardních postupů hypolipidemické léčby fluvastatinem bylo zařazeno 87 pacientů z toho 48 pacientů užívalo fluvastatin v monoterapii. Biochemická a klinická data byla shromažďována před a 12 týdnů po nasazení terapie fluvastatinem (80mg/den).

Výsledky a závěry: Fenotyp pomalého metabolizátora CYP2D6 lze predikovat u 6,7% české populace a asi 2% české populace můžeme řadit mezi pomalé metabolizátory substrátů CYP2C19 a CYP2C9. Frekvence sledovaných funkčně variantních alel CYP2D6, CYP2C9 a CYP2C19 a predikovaných fenotypů české populace je shodná s ostatními bělošskými populacemi. Hypolipidemický účinek fluvastatinu závisí mimo jiné také na genotypu CYP2C9. Genotyp CYP2C9*1/*3 je asociován s výraznějším snížením LDL-cholesterolu (39,95% u*1/*3 oproti redukci o 22,35% u *1/*1 a 29,92% u *1/*2 genotypu) a obdobný trend lze pozorovat i u snížení celkového cholesterolu. Ve skupině pacientů se bohužel nevyskytl variantní homozygot *3/*3, který by posílil statistickou významnost této závislosti.

Závěrem lze konstatovat, že zavedením a optimalizací metodik, a stanovením frekvence výskytu základních polymorfismů isoenzymů CYP, které dle literárních zdrojů metabolizují přes 40 % podávaných farmak, jsme poskytli referenční rámec pro následný výzkum v poli klinických aplikací a podpořili snahy o zavedení individualizované farmakoterapie.

Klíčová slova: cytochrom P450, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, jednonukleotidový bodový polymorfismus, česká populace, individualizovaná farmakoterapie, fluvastatin, hypercholesterolemie

Abstract

Frequency of selected genetic polymorphisms of cytochrome P450 in the Czech population and the influence of CYP2C9 genotype on the hypolipidemic effect of fluvastatin

Introduction: One of the main factors of genetically determined variability in response of humans to administered drugs are differences in catalytic activity of metabolizing enzymes, which are caused mainly by genetic polymorphisms in cytochrom P450 family enzymes. This thesis consists of two parts and it is presented as a commentary to the original papers. The first aim was to investigate the frequency of functionally important variant alleles of three main isoenzymes of cytochrome P450 gene: CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, throughout the Czech population, predict the prevalence of poor metabolizer phenotypes, and then to compare the results to the data from other populations. Secondly, we analysed the correlation between the CYP2C9 genotype and cholesterol-lowering effect of fluvastatin in human hypercholesterolemic patients.

Methods: Genotypes were determined by PCR–RFLP. The presence of alleles CYP2D6*1, *6, *5, *4, *3, and gene duplication was analysed in 233 healthy volunteers, CYP2C9*1, *2 and*3 in 254 subjects and CYP2C19*1, *2 and *2 in 218 subjects. Eighty seven patients on fluvastatin therapy, and 48 patients on monotherapy were enrolled in the prospective fluvastatin study without any interventions to standard procedures of hypolipidemic treatment. Biochemical and clinical data were collected before the initiation of fluvastatin treatment (80 mg/day) and 12 weeks later.

Results and conclusions: There are 6.7% of CYP2D6 poor metabolizers and about 2% of CYP2C19 and CYP2C9 poor metabolizers in the Czech population. The frequencies of the most important functional variant alleles of CYP2D6, CYP2C9 and CYP2C19 and their predicted phenotypes in the Czech population are in concordance with other Caucasian populations. The hypolipidemic effect of fluvastatin was found to be partly influenced by CYP2C9 genotype. Subjects with the CYP2C9*1/*3 genotype achieved a greater reduction in plasma levels of LDL-cholesterol than subjects with CYP2C9*1/*1 or *1/*2 genotypes (39.95% vs. 22.35% or 29.92% respectively), and similar trend was observed in reduction of total cholesterol levels. However, due to rare occurrence of the *3/*3 genotype it was impossible to report a definitive genotype-effect association.

In conclusion, by implementing the genotyping methods and by detemining the frequency of occurrence of the main genetic polymorphisms in CYP isoenzymes, which were reported to account for the metabolism of 40% of administered drugs, we have laid basis for future research into the clinical applications and the development of individualized pharmacotherapy.

Keywords: cytochrome P450, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, single nucleotide polymorphism, pharmacogenetics, Czech population, individualized pharmacotherapy, fluvastatin, hypercholesterolemia

1. Úvod

Cytochrom P450 je jedním z hlavních enzymových komplexů, který se účastní I. fáze biotransformace léčiv u člověka. Aktivita jednotlivých isoenzymů je podmíněna genetickými a epigenetickými faktory. Podle katalytické kapacity se v populaci rozlišují především okrajové skupiny pomalých a rychlých až velmi rychlých metabolizátorů, kteří mohou po podání stejné terapeutické dávky léčiva vykazovat rozdíly v plazmatických koncentracích aktivních forem léčiv a případně v terapeutických odpovědích. Tato geneticky podmíněná variabilita aktivity metabolických cest je daná polymorfismem v genech cytochromu P450 a je jedním z hlavních studovaných faktorů způsobující interindividuální variabilitu lékové odpovědi. Sledováním těchto geneticky určených odchylek se zabýváme z důvodů možné predikce aktivity enzymatického systému, což tvoří základ pro snahy o individualizovanou a optimalizovanou farmakoterapii.

Nadrodinu cytochromů P450 tvoří 51 rodin, ze kterých jsou pouze první tři CYP1, CYP2 a CYP3 zodpovědné za metabolismus léčiv a xenobiotik. Obzvláště polymorfní alely isoenzymů CYP2D6, CYP2C9 a CYP2C19, způsobující variabilitu lékové odpovědi, mají výrazný klinický dopad. Uvádí se, že společně katalyzují přeměnu až 40 % běžně užívaných léčiv. V závislosti na rasové příslušnosti se frekvence výskytu jednotlivých funkčně významných variantních alel a fenotypu pomalého metabolizátora liší. Znalost frekvence výskytu variantních alel v cílové populaci je, vedle rozsáhlých klinických studií na smíšené populaci a znalosti farmakokinetických odlišností mezi různými genotypy/fenotypy u zdravých dobrovolníků i pacientů, jednou z podmínek odhadu doporučených terapeutických dávek léčiv podle genotypu (G-SDR - Genotype-Specific Dose Recommendation) (Meisel, 2003). V první části disertační práce proto studuji frekvenci výskytu vybraných variantních alel genu CYP2D6, CYP2C9 a CYP2C19 v české populaci a výsledky porovnávám s literárními údaji z ostatních populací se zaměřením na populace evropské.

Polymorfní isoenzym CYP2C9 představuje majoritní metabolickou cestu odbourávání fluvastatinu. Tato metabolická cesta, při které jsou formovány tři metabolity: 5-hydroxyfluvastatin, 6-hydroxyfluvastatin a N-desisopropylfluvastatin, reprezentuje podle *in vitro* studií 50-80% celkové clearance léčiva. Závislost farmakokinetických parametrů fluvastatinu na polymorfismu CYP2C9 byla popsána po jednorázové dávce (40 mg racemátu fluvastatinu) u zdravých dobrovolníků (Kirchheiner et al., 2003). Alelická varianta CYP2C9*3 (Ile359Leu) vyskytující se v bělošské populaci s frekvencí 8-13% vedla u homozygotů k trojnásobnému zvýšení AUC a c_{max} obou enantiomerů fluvastatinu po

jednorázovém podání. Přítomnost alely CYP2C9*2 (Arg144Cys) neovlivnila farmakokinetiku fluvastatinu. V této krátkodobé studii se zdravými dobrovolníky nedosáhly rozdíly v hypolipidemizujícím efektu fluvastatinu u genotypově rozlišených skupin statistické významnosti. Vlivu CYP2C9 genotypu na hypolipidemický účinek fluvastatinu u hypercholesterolemických pacientů zatím není stanoven. Nás zajímalo, zda variantní alely *3 ovlivňují účinek, míru účinku, případně vznik a výskyt nežádoucích reakcí u hypercholesterolemických pacientů, kterým je tento inhibitor HMCoA reduktázy běžně a dlouhodobě podáván.

2. Cíle práce

- 1) Analýza genotypu české populace, cílem této části práce je stanovit frekvenci výskytu vybraných variantních alel v genech kódujících enzymy I. fáze biotransformace léčiv
 - a. CYP2D6
 - b. CYP2C9
 - c. CYP2C19
- 2) Studium vlivu bodových polymorfismů CYP2C9 na působení fluvastatinu
 - a. určit alelické frekvence CYP2C9*1, CYP2C9*2 a CYP2C9*3 ve skupině hypercholesterolemických pacientů
 - b. posoudit vliv CYP2C9 variantních alel na hypolipidemický účinek fluvastatinu
 - c. sledovat výskyt a charakter nežádoucích účinků fluvastatinu u genotypově rozdílných skupin léčených pacientů

3. Metody

3.1) Analýza genotypu české populace

Po podepsání informovaného souhlasu byly od mladých zdravých a nepříbuzných dobrovolníků české národnosti odebrány krevní vzorky pro izolaci DNA. Při zavadění metodik jsem vzorky analyzovala hybridizační mikročipovou metodou AmpliChip CYP450 GeneChip, nebo metodou FRET značených sond na přístroji Light cycler.

Metodou PCR-RFLP (polymerasová řetězová reakce s následnou analýzou délky restričních fragmentů) jsem u 223 zdravých dobrovolníků stanovila genotyp pro duplikaci

genu CYP2D6, jeho delecí (*5) a variantní alely CYP2D6*3, *4, *6; u 254 subjektů jsem stanovila výskyt variantních alel CYP2C9 *2, *3 a u 218 subjektů výskyt CYP2C19 *2, *3. Tímto jsem zmapovala výskyt variantních alel tří nejdůležitějších isoenzymů cytochromu P450 v české populaci, výsledky jsem porovnála s publikovanými údaji z ostatních etnicky či národnostně definovaných populací. Protokol studie byl schválen Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

3.2) Vliv bodových polymorfismů CYP2C9 na působení fluvastatinu

Do navazující prospektivní studie bez intervencí do standardních postupů hypolipidemické léčby fluvastatinem, kdy jsme úzce spolupracovali s interními klinikami VFN, bylo zařazeno 87 pacientů, z toho 48 pacientů užívalo fluvastatin v monoterapii. Do studie nebyli zařazeni pacienti, kteří měli v anamnéze diabetes mellitus, jaterní onemocnění nebo jiná onemocnění ovlivňující metabolické funkce, předchozí léčbu fluvastatinem, souběžnou terapii inhibitory nebo induktory CYP2C9, imunosupresivní terapii, prokázané nádorové onemocnění, chirurgický zákrok zažívacího traktu ovlivňující absorpci, těhostenství, kojení nebo alkoholismus. Pacienti zařazení do studie užívali 80 mg fluvastatinu denně (Lescol XL, Novartis s.r.o.). Biochemická a klinická data byla shromažďována před a 12 týdnů po nasazení terapie fluvastatinem. Pro hodnocení hypolipidemického efektu léčby fluvastatinem jsem využila rutinní biochemická vyšetření (stanovení kreatinokinázy, elektrolytů, ALT, AST, GMT, ALP, hladin lipidů, LDL, TC, TG, HDL), která byla provedena v biochemické laboratoři VFN a analýzu lékařské dokumentace. Genotyp byl stanoven metodou PCR-RFLP. Protokol studie byl schválen Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. K vytvoření databází a statistickému zpracování výsledků byly využity programy Microsoft Excel, a Statgraphics 3.1 (StatPoint, Inc, USA).

4. Výsledky

4.1) Analýza genotypu české populace

V prvním tematickém okruhu této práce jsme se věnovali analýze genotypu zdravých dobrovolníků především z řad studentů 1. lékařské fakulty UK. Uvádí se, že CYP2D6 se podílí na biotransformaci až 25% běžně užívaných léčiv, CYP2C9 na 16% a množství identifikovaných substrátů CYP2C19 se také rozrůstá, proto jsme se v naší analýze zaměřili na tyto isoenzymy. Pomocí PCR-RFLP jsme sledovali nejčastější bodové mutace těchto

isoenzymů. V případech, kde nebyla nalezena jedna ze sledovaných variantních alel jsme vzorek označili za wild-type (*1). Toto zjednodušení se vzhledem k minimální četnosti alternativních variantních alel dá považovat za zanedbatelné; např. se uvádí, že k identifikaci 97,9% pomalých metabolizátorů CYP2D6 stačí testovat variantní alely *3, *4, *5, a*6 (Gaedigk, Gotschall et al. 1999). Výsledky této části se dají shrnout následovně:

1a) **Frekvence výskytu CYP2D6** byla stanovena u 233 nepříbuzných zdravých dobrovolníků:

- Pozorované genotypové frekvence se shodují s předpokládanými genotypovými frekvencemi podle rovnice Hardy-Weinbergovy rovnováhy, což ilustruje jejich normální distribuci v české populaci.
- Frekvence výskytu CYP2D6*1, CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5, CYP2D6*6 a CYP2D6*MxN alel je ve shodě s literárními údaji o výskytu variantních alel v ostatních evropských populacích (viz Tab. 1, 2).
- V české populaci je možno očekávat 6,7% prevalenci pomalých metabolizátorů substrátů CYP2D6. Frekvence výskytu pomalých metabolizátorů se také statisticky neodlišuje od ostatních bělošských populací.
- V české populaci se vyskytuje 3,6 % ultrarychlých metabolizátorů substrátů CYP2D6 (viz Tab. 3).

Tab. 1: Rozložení CYP2D6 alelických variant napříč evropskými populacemi

CYP2D6 variantní alely		*MxN	*3	*4	*5	*6	Ref
Molekulární důsledek		Duplikace genu	Posun čtecího rámce 2549A>del	Chybný překlad 1846G>A	Genová delece	Posun čtecího rámce 1707T>del	
Funkční následek		Zvýšení enzymové aktivity	Snížení enzymové aktivity	Snížení enzymové aktivity	Snížení enzymové aktivity	Snížení enzymové aktivity	
Alelická frekvence (%)	Bělošská populace	1-5	2-3	12-21	2-7	1	(Ingelman-Sundberg 2004)
	Evropané	-	3,4	19,4	2,6	1,3	(Shimizu, Ochiai et al. 2003)
	Chorvaté (200)	-	2,7	14,0	1,0	1,5	(Bozina, Granic et al. 2003)
	Finové (122)	-	5,7	11,1	3,3	-	(Hirvonen, Husgafvel-Pursiainen et al. 1993)
	Francouzi (171)	2,9	2,0	14,9	2,3	-	(Laforest, Wikman et al. 2000)
	Holandřané (765)	-	1,8	18,4	-	0,4	(Tamminga, Wemer et al. 2001)
	Němci (589)	1,9	2,0	20,7	2,0	0,9	(Sachse, Brockmoller et al. 1997)
	Norové (118)	-	1,3	20,0	1,2	-	(Tefre, Daly et al. 1994)
	Poláci (300)	-	1,3	23,0	-	-	(Niewinski, Orzechowska-Juzwenko et al. 2002)
	Španělé (105)	4,3	0,9	13,8	3,3	0,9	(Menoyo, Del Rio et al. 2005)
	Švédové (128)	-	1,4	24,4	4,3	0,9	(Yamada, Dahl et al. 1998)
	Rusové (290)	1,7	1,0	18,2	2,4	1,2	(Gaikovitch, Cascorbi et al. 2003)
Češi (223)	3,1	1,1	22,9	3,1	0,2		

Tab. 2: Frekvence CYP2D6 variantních alel ve vzorku české populace

CYP2D6 alely	Počet alel	Alelová frekvence (%)	95%CI
MxN	14	3,1	1,5-4,75
*3	5	1,1	0,1-2,1
*4	102	22,9	19,0-26,8
*5	14	3,1	1,5-4,75
*6	1	0,2	0,1-0,66
Celkový počet variantních alel	136	30,5	26,2-34,8
*1 –wt	310	69,5	65,2-73,7
Celkem	446	100,0	

*1 –wt - wild-type, nebyla přítomna žádná z testovaných variantních alel; MxN – duplikace genu

Tab. 3: Prevalence CYP2D6 genotypů a predikované fenotypy v české populaci

Predikovaný fenotyp	Genotyp CYP2D6 alely		Počet osob (celkem 223)	Relativní frekvence %	95%CI
PM	*4*4		8	3,6	1,9-5,3
		MxN	1	0,4	0,0-1,0
		*5	3	1,3	0,3-2,4
	*4*3		1	0,4	0,2-1,1
	*4*6		1	0,4	0,2-1,1
	*4*5		1	0,4	0,2-1,1
het-EM	*1*3		4	1,8	0,6-3,0
	*1*4		70	31,4	27,1-35,7
	*1*5		10	4,5	2,6-6,4
hom-EM	*1*1		111	49,8	45,1-54,4
UM	MxN		8	3,6	1,9-5,3
Np	MxN *4		5	2,2	0,9-3,6

PM - pomalí metabolizátoři; het-EM - heterozygotní extenzivní metabolizátoři; hom-EM - homozygotní extenzivní metabolizátoři; UM - ultra-rychlí metabolizátoři; np - fenotyp nepredikován; MxN – duplikace genu

1b) **Frekvence výskytu CYP2C9** byla stanovena u 254 zdravých, nepříbuzných dobrovolníků:

- Frekvence výskytu CYP2C9*1, CYP2C9*2 a CYP2C9*3 alel v české populaci je 81,9 %, 12,2 % a 5,9 %. Jejich distribuce odpovídá Hardy-Weinbergově rovnováze (viz Tab. 5).
- Zastoupení genotypů heterozygotů je 20,1 %; u CYP2C9*1/ *2; 9,8 % u CYP2C9*1/*3; 0,4 % u CYP2C9*2/*3. Pět subjektů (2,0 %) klasifikujeme jako variantní homozygoty CYP2C9*2/*2, dva subjekty (0,8 %) jako homozygoty CYP2C9*3/*3 (viz Tab. 6).
- Frekvence výskytu variantních alel genu CYP2C9 v české populaci je srovnatelná s ostatními bělošskými populacemi (viz Tab. 4).

Tab. 4: Rozložení CYP2C9 alelických variant napříč populacemi; seřazeno podle klesající frekvence výskytu variantní alely CYP2C9*2

Národnost	Počet zdravých dobrovolníků	Alelická frekvence (%)			
		CYP2C9*1	CYP2C9*2	CYP2C9*3	Reference
Chorvaté	200	74	16,5	9,5	(Bozina, Granic et al. 2003)
Španělé	102	74	16	10	(Dorado, Berecz et al. 2003)
Francouzi	151	77	15	8	(Yang, Morin et al. 2003)
Britové	100	79	12,5	8,5	(Stubbins, Harries et al. 1996)
Švédové	1468	83	11	6,6	(Yasar, Lundgren et al. 2002)
Italové	157	80	11	9	(Scordo, Aklillu et al. 2001; Scordo, Caputi et al. 2004)
Turci	218	79,4	10,6	10	(Aynacioglu, Brockmoller et al. 1999)
Rusové	290	-	10,5	6,7	(Gaikovitch, Cascorbi et al. 2003)
Etiopané	150	94	4	2	(Scordo, Aklillu et al. 2001)
Afro-američané	-	-	1	0,5	(Sullivan-Klose, Ghanayem et al. 1996)
Číňani, Shanghia	394	96,3	0,1	3,6	(Yang, Morin et al. 2003)

Čiňani, Taiwan			-	2,6	(Sullivan-Klose, Ghanayem et al. 1996)
----------------	--	--	---	-----	--

Tab. 5: Frekvence CYP2C9 variantních alel ve vzorku české populace

CYP2C9 alely	Genotyp	Počet osob	Genotypová frekvence (%)	Alelová frekvence (%)	Predikovaná genotypová frekvence (%)	95%CI
CYP2C9* 2	wt	197	77,56	87,79	77,08	72,43 - 82,69
	ht	52	20,47	-	21,43	15,51-25,43
	v	5	1,97	12,20	1,49	0,26 - 3,68
CYP2C9* 3	wt	226	88,97	94,09	88,53	85,13 - 92,83
	ht	26	10,24	-	11,11	6,51 - 13,96
	v	2	0,79	5,90	0 0,35	0,0 – 1,87

wt – wild-type (homozygot); ht – heterozygot; v – variantní homozygot

Tab. 6: Prevalence CYP2C9 genotypů ve vzorku české populace

CYP2C9 genotyp	Enzymová aktivita	Počet osob	Relativní frekvence %	95% CI
*1/*1	Normální	170	66,9	61,14 - 72,71
*1/*2	Nepatrné snížení	51	20,1	15,15 - 25,00
*1/*3	Mírné snížení	25	9,8	6,18 - 13,51
*2/*2	Mírné snížení	5	2,0	0,26 - 3,67
*2/*3	Mírné snížení	1	0,4	0,00 - 1,16
*3/*3	Velmi nízká	2	0,8	0,00 - 1,87

1c) **Frekvence výskytu CYP2C19** byla stanovena u 218 zdravých, nepříbuzných dobrovolníků

- Frekvence výskytu variantní alely CYP2C19*2 v české populaci je 13,0 %, variantní alela CYP2C19*3 se v české populaci stejně jako v ostatních bělošských populacích téměř nevyskytuje.
- Necelá 2% české populace lze označit za pomalé metabolizátory substrátů isoenzymu CYP2C19 (viz Tab. 7).

Tab. 7: Prevalence CYP2C19 genotypů a predikované fenotypy v české populaci

Predikovaný fenotyp	CYP2C19 alely Genotyp	Počet osob	Relativní frekvence %	95%CI
PM	*2/*2	3	1,4	0,31-3,73
IM	*1/*2	49	22,5	16,51- 26,44
EM	*1/*1	166	76,1	71,34-81,97

PM - pomalí metabolizátoři; IM - intermediární metabolizátoři; EM - rychlí metabolizátoři

4.2) Vliv bodových polymorfismů CYP2C9 na působení fluvastatinu

V návaznosti na první tematický okruh - studii frekvencí výskytu isoenzymů CYP450 jsem se v druhé části práce soustředila na vliv genotypu CYP2C9 na terapeutický efekt fluvastatinu, léčiva statinové řady pro terapii hypercholesterolemie. Je známo, že odpověď pacientů na statiny obecně vykazuje interindividuální variabilitu (Sever, Dahlof et al. 2003) (Superko, Momary et al. 2012) etc. Fluvastatin je metabolizován převážně prostřednictvím CYP2C9 a bylo ukázáno, že polymorfismus CYP2C9 koreluje s farmakokinetikou fluvastatinu (Kirchheiner, Kudlicz et al. 2003). Dochází ke zvýšení plazmatických koncentrací nezmetabolizovaného fluvastatinu až trojnásobně u jedinců s genotypem CYP2C9*3/*3 oproti jedincům bez variantních alel v genotypu. V literatuře ovšem nebyla popsána studie korelace mezi genotypem CYP2C9 a terapeutickou odpovědí u hypercholesterolemických pacientů, na kterou jsme se ve své studii zaměřili.

Sledovali jsme alelické frekvence u hyperlipidemických pacientů a provedli jejich korelaci s léčebným efektem na základě sledování biochemických parametrů. Výsledky mohou být shrnuty následovně:

2a) Alelická frekvence CYP2C9 u hypercholesterolemických pacientů

(87 osob) byla stanovena následovně: CYP2C9*1 = 84,5 %, CYP2C9*2 = 5,7% a CYP2C9*3 = 9,8%.

- Frekvence výskytu variantních alel genu CYP2C9 je u zdravých (viz také část 4.1b) a hypercholesterolemických jedinců srovnatelná.

2b) Hypolipidemický účinek fluvastatinu (monoterapie) – byl sledován u 48 pacientů:

- Pacienti s genotypem CYP2C9*1/*3 vykazují největší procentuální redukcii LDL-C v porovnání s ostatními genotypy 39,95% u CYP2C9*1/*3; 22,35%

u CYP2C9*1/*1 a 29,92% u CYP2C9*1/*2. Procentuální redukce celkového cholesterolu (CH) u pacientů s CYP2C9*1/*3 genotypem byla také mírně vyšší než u ostatních genotypů: 28,56% u CYP2C9*1/*3 vs. 20,16% pro CYP2C9*1/*1 a 25,00% pro CYP2C9*1/*2 genotyp. Naproti tomu u dvou variantně heterozygotních pacientů (CYP2C9*2/*3) tento trend nebyl vyjádřen (pokles LDL-C 20,29%, pokles CH 14,8%). Ve skupině pacientů se bohužel nevyskytl jediný variantní homozygot, který by mohl zdůraznit statistickou významnost této závislosti. Fluvastatinem snížená hladina TG kolísala okolo 28% u všech genotypově rozlišených skupin a stejně tak jsme nepozorovali genotypově závislou změnu v HDL koncentracích (viz Tab. 8).

2c) Frekvence, charakteristika ani závažnost **výskytu nežádoucích účinků spojených s užíváním fluvastatinu** nebyla v genotypově charakterizovaných skupinách pacientů odlišná od dat uvedených v SPC přípravku.

Tab. 8: Plazmatické koncentrace LDL cholesterolu (LDL-C), celkového cholesterolu (TC) a triglyceridů (TG) před (BL-baseline) a 12 týdnů po (FU –follow-up) nasazení léčby fluvastatinem ve vztahu k CYP2C9 genotypu u 48 pacientů.

Plazmatické koncentrace jsou uváděny v mmol / l, a jsou reprezentovány jako průměr ± SD. P-hladina významnosti poklesu koncentrací byla * P <0,05, nebo ** p <0,001. Procentuální pokles (hypolipidemický efekt) byl vypočítán následovně:

$$\% = 100 - \left(\frac{\sum_n \frac{FU}{n}}{\sum_n \frac{BL}{n}} * 100 \right); \text{ kde } n = \text{počet pacientů v podskupině.}$$

		CYP2C9 genotyp	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*3	all
		Počet pacientů	(n=33)	(n=9)	(n=4)	(n=2)	(n=48)
LDL-C	BL	3,83 ±	4,09 ±	3,17 ±	4,51 ±	3.86 ±	
		0,98	0,89	0,55	0,06	0.95	
	FU	2,98 ±	2,87 ±	1,91 ±	3,60 ±	2.89 ±	
		0,73	0,63	1,10	0,90	0.82	
	%	22,35**	29,92**	39,95*	20,29	24.96**	
Počet pacientů pod/nad thresholdem 3,4 mmol/l		29/4	8/2	4/0	1/1	42/6	
TC	BL	6,60 ±	6,53 ±	6,13 ±	6,89 ±	6.56 ±	
		1,23	1,04	1,51	0,33	1.21	
	FU	5,27 ±	4,89 ±	4,38 ±	5,87 ±	5.15 ±	
		0,95	0,81	0,86	0,64	0.96	
	%	20,16**	25,00**	28,56	14,80	21.48**	

Počet pacientů pod/nad thresholdem 5,2 mmol/l		16/17	8/1	4/0	1/1	29/19
TG	BL	2,43 ± 1,97	2,08 ± 0,53	2,23 ± 0,89	2,16 ± 0,41	2.34 ±1.68
	FU	1,73 ± 1,48	1,48 ± 0,47	1,60 ± 0,82	1,77 ± 0,53	1.68 ± 1.28
	%	28,79 **	28,53*	28,25	18,10	28.12**
Počet pacientů pod/nad thresholdem 1,69 mmol/l		19/14	5/4	3/1	1/1	28/20

5. Diskuze

Výsledky předkládané disertační práce jsou *in extenso* diskutovány v příložených a recenzovaných článcích; zde uvádím jejich shrnutí. V prvním tematickém okruhu práce jsme se věnovali analýze genotypu cytochromu P450 u zdravých dobrovolníků především z řad studentů 1. lékařské fakulty UK. Výběr sledovaných isoenzymů cytochromu P450 (CYP) jsme zvolili dle jejich významu při biotransformacích xenobiotik. Vzhledem k rozrůstající se škále známých substrátů, specifitě isoenzymů CYP a četnosti polymorfismů jsme vybrali varianty 2D6, 2C9 a 2C19. Uvádí se, že CYP2D6 se podílí na biotransformaci až 25% běžně užívaných léčiv, CYP2C9 na 16%, a množství identifikovaných substrátů CYP2C19 se také rozrůstá. Zaměřili jsme se na nejčastější bodové mutace hlavních isoenzymů a výskyt jejich polymorfismů v populaci.

Metody mapování genetických polymorfismů použité v této práci byly optimalizovány pro použití v klinické praxi, tj. aby byly levné, rychlé a spolehlivé. Z těchto důvodů jsme zvolili metodu PCR-RFLP, která spočívá v detekci jednonuklidových polymorfismů (SNP), čili bodových mutací (záměn) v DNA. Specifické restrikční endonukleázy štěpí amplifikovaný PCR produkt v blízkém okolí místa s bodovou mutací. Po elektroforetické separaci na gelu lze detekovat polymorfismus uvnitř sekvencí, které se jinak v počtu bazí příliš neliší.

Z principu PCR-RFLP vyplývají také některá jeho omezení, vyvstávající především při zavádění a optimalizaci této metodiky: je nutný počáteční screening pro nalezení kombinací jednotlivých amplifikovatelných úseků a restrikčních endonukleáz a pravděpodobnost odhalení SNP polymorfismu v nově studované sekvenci je malá. Nevýhodou metodiky PCR-RFLP, která přetrvává v rutinním použití, je větší spotřeba

endonukleáz. Moderní molekulárně diagnostické metody, které zmíněnými nedostatky PCR-RFLP netrpí, mohou být automatizovány, šetří čas a objemy reagensů, avšak nikoli náklady. Jsou tedy pro běžnou diagnostickou praxi stále příliš drahé a my jsme je použili jen výjimečně k optimalizaci, ověření výsledků, proměření standardů atp. PCR-RFLP tedy pro své výhody - relativně levná, jednoduchá, nenáročná a robustní metoda s dobře reprodukovatelným výsledkem umožňující analýzu velkého množství vzorků vyžadujících pouze malé množství DNA - zůstává fungující a spolehlivou metodou pro stanovení genotypu v klinickém využití. Například pro individualizaci farmakoterapie azathioprinem, který je odbouráván thiopurin-S-methyl transferázou (TPMT), se určení genotypu metodou PCR-RFLP v klinické praxi běžně a standardně používá (Slanar, Bortlik et al. 2008) (Chouchana, Narjoz et al. 2012).

U všech tří sledovaných isoenzymů cytochromu P450 jsme stanovili výskyt polymorfismů v české populaci, přičemž jsme nepozorovali zásadní statisticky významné odlišnosti v alelických frekvencích ani v predikovaných frekvencích fenotypu v porovnání s ostatními evropskými populacemi. V případě CYP2D6 se procentuální zastoupení genotypů spojených s fenotypem „pomalých metabolizátorů“ v Evropě snižuje jižním směrem. Nedávno publikované údaje z maďarské populace, které popisují výskyt pomalých metabolizátorů CYP2D6 o frekvenci 8,3% (Rideg, Haber et al. 2011), jsou v souladu s naší hypotézou.

Výsledky z prvního tematického okruhu nám poskytly dostatečné znalostní zázemí pro studium vlivu farmakogenetických faktorů a případné možnosti individualizace farmakoterapie v některé z mnoha možných klinických aplikací. Potvrzení skutečnosti, že frekvence sledovaných funkčně variantních alel CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 a predikovaných fenotypů české populace je shodná s ostatními bělošskými populacemi je důležitá pro možnost predikování účinnosti farmakoterapie z různých klinických studií prováděných se smíšenými či jinými populacemi. V druhé části práce jsme se zaměřili na studium vlivu bodových polymorfismů isoenzymu CYP2C9 na působení fluvastatinu - jednoho ze statinových farmak pro terapii hypercholesterolemie. Fluvastatin jako léčivo vhodné ke sledování byl vybrán s ohledem na několik zásadních důvodů: je přednostně (z 50-80%) metabolizován isoenzymem CYP2C9, jehož polymorfismus včetně četností jednotlivých variantních alel je popsán jak v evropských populacích, tak díky naší práci i v české populaci, a dále byla publikována studie prokazující vliv alely CYP2C9*3 na farmakokinetiku fluvastatinu. Navíc je fluvastatin podáván přímo v aktivní formě, jeho metabolity postrádají farmakologickou aktivitu a jeho očekávaný terapeutický efekt i

případné nežádoucí účinky jsou zřetelné a jasně definované. Naším cílem bylo zjistit, zda existuje korelace mezi genotypem CYP2C9 a odpovědí na léčbu fluvastatinem, a jestli je možné tuto korelaci využít pro optimalizaci/individualizaci farmakoterapie fluvastatinem, případně upřednostnění některé ze skupin pacientů s variantní alelou, nebo popsat jiný korelát.

V českém zdravotnictví byl v době studie dostupný pouze přípravek Lescol indikovaný především k léčbě dyslipidemií dospělých pacientů s primární hypercholesterolemií nebo smíšenou dyslipidemií, kdy dietní režim nebo jiná nefarmakologická léčba není dostačující. Pacienti zařazení do naší retrospektivní neintervenci studie užívali Lescol XL (Novartis s.r.o.), 80 mg fluvastatinu v matrixové tabletě, která zajistí prodloužené uvolňování účinné látky po dobu 8-12 h (Asberg and Holdaas 2004).

Analýza ukázala, že polymorfismus CYP2C9 byl stejný u hyperlipidemických i u zdravých subjektů a celková průměrná účinnost terapie fluvastatinem i výskyt vedlejších účinků v naší studii byly srovnatelné s informacemi v SPC Lescolu XL.

Prokázali jsme vyšší terapeutický pokles hladin LDL-cholesterolu u nosičů alely CYP2C9*3 (která je spojena s fenotypem pomalého metabolizátora) ukazující jakousi souvislost mezi genotypem CYP2C9 a odpovědí pacientů na léčbu. Podobný trend ovšem nebyl patrný u dvou nalezených variantních heterozygotů CYP2C9*2/*3. U homozygotů *3/*3, u kterých bychom obdobný efekt očekávali teoreticky ještě markantněji, jsme trend nemohli potvrdit, vzhledem k nízké frekvenci výskytu tohoto genotypu a našemu relativně malému souboru subjektů se tento genotyp ve skupině sledovaných pacientů vůbec nevyskytl. Výsledky poukazují na komplexní povahu problému a ilustrují obecnější princip, a to, že může být obtížné vysvětlit variabilitu účinku léčiva (v našem případě fluvastatinu) pomocí polymorfismu jednoho metabolického enzymu i v případě, že se u daného léčiva jedná o majoritní metabolický enzym.

Mechanismy určující farmakokinetiku léčiv jsou multifaktoriální, a tak jsou odpovědi vysvětlující variabilitu účinku statinů hledány i na úrovni transportních systémů podílejících se na absorpci, distribuci a vylučování. Mezi takové, které jsou v souvislosti se statiny často diskutovány, patří například geny kódující OATPs (organic anion-transporting polypeptides) jako třeba OATP1B1 (Couvert, Giral et al. 2008; König 2011) nebo SLCO1B1 (Niemi, Pasanen et al. 2006), dipeptidový transportér PEPT, transportér organických kationtů OCT či ATP dependentní transportér MDR-1 (Bogman, Peyer et al. 2001). Spektrum genů, které ovlivňují farmakodynamiku statinů, je ještě širší: náleží zde

geny ovlivňující biogenezi a funkci HMG-CoA reduktázy jako takové (Chasman, Posada et al. 2004), geny pro LDL receptor (Salazar, Hirata et al. 2000), apolipoprotein B (APO-B) nebo apolipoprotein E (APO-E) (Maggo 2011). V souvislosti s fluvastatinem byl v tomto ohledu navíc sledován CETP (cholesterol-ester transfer protein) (Bercovich, Friedlander et al. 2006) a SREBF-1 (sterol regulatory element-binding factor 1) (Salek, Lutucuta et al. 2002). Diskuse podrobností ohledně všech těchto genů budou bez komplexních haplotypových studií a analýz s dostatečným množstvím pacientů prokazující statistickou robustnost a významnost, které by kombinovaly všechny sledované varianty, zůstat pouze na teoretické úrovni. Pro naše účely konstatujeme, že různou měrou ovlivňují farmakokinetiku i farmakodynamiku léčiv, mohou geneticky interagovat a ve svém účinku se vzájemně ovlivňovat. V současné době se velmi dynamicky rozvíjí metodiky statistické, matematické a datové analýzy zaměřené právě na problematiku velkého množství variabilních vstupních dat a jejich interpretací (Wu, Tong et al. 2011) (Rodin, Gogoshin et al. 2011). Takto zaměřené přístupy, metodiky a koncepty jsou jistě nedílnou součástí budoucích farmakogenetických studií. Z hlediska biotransformací je potřeba také připomenout, že spektra substrátů se mohou překrývat, jednotlivé metabolizující enzymy mohou být aktuálně indukované nebo inhibované a pro danou látku může existovat více alternativních metabolických cest. Toto vše v souhrnu dělá interpretaci farmakologického efektu na pozadí farmakogenetické analýzy obtížnou.

Výsledky naší farmakogenetické studie jsou ovlivněny také variabilitou samotného souboru pacientů z „běžné - ambulantní“ hypercholesterolemické populace: např. přesnost údajů o jejich životním stylu a prostředí je založena na subjektivním popisu (silný kuřák/kuřák/nekuřák, dodržování dietních opatření, užívání doplňků stravy souběžně s léčbou, pohybová aktivita atd.) a může být rozdílná. Při úpravě dietního režimu byly popsány gendrově-závislé rozdíly ve snížení cholesterolu (Weggemans, Zock et al. 1999); v literatuře se proto také široce diskutuje obdobná, na pohlaví či věku závislá, účinnost statinů pro snížení LDL-cholesterolu (Sotaniemi, Arranto et al. 1997). Posledně zmíněné faktory by pro naši studii neměly být zásadní, jelikož bylo jinými autory zjištěno, že po podání 20 mg fluvastatinu nebyl pozorován statisticky významný věkově závislý rozdíl ve farmakokinetice fluvastatinu (sledovány byly hodnoty AUC, C_{max}, T_{max}) u hypercholesterolemických pacientů obou pohlaví (Garcia, Reinoso et al. 2003).

Závěrem lze říci, že snahy o individualizaci farmakoterapie vyžadují komplexní přístup s použitím moderních technologií genotypizace a statistických nástrojů pro analýzu

vícefaktoriálních dat ze studií s početnými skupinami pacientů. V tomto schématu je námi použitý redukcionistický přístup, kdy sledujeme izolovaně jednotlivý faktor vybraný na základě logického rozboru problému, zcela opodstatněný. Ovšem jeho výsledky je třeba posuzovat z širší perspektivy a před implementací navržených farmakogenetických postupů do rutinní praxe bude nutné jejich přínos potvrdit věrohodnými klinickými studiemi a ekonomickou náročnost posoudit farmakoekonomickou rozvahou.

Výsledky našich studií o frekvenci výskytu jednotlivých variantních alel nejvýznamnějších isoenzymů cytochromu P450 vytvářejí základ pro následné práce vedoucí k plánování terapeutických nebo farmakoekonomických studií a napomáhají rozhodovacím postupům s cílem posoudit, optimalizovat a doporučit léčebné strategie vybraným pacientům.

6. Závěry

Předmětem této disertační práce byla analýza genotypu tří isoenzymů cytochromu P450 (CYP2D6, CYP2C9 a CYP2C19) v české populaci následovaná studiem vlivu bodových polymorfismů CYP2C9 na hypolipidemizující účinek fluvastatinu u hypercholesterolemických pacientů.

Výsledky této práce lze shrnout následovně:

- Frekvence sledovaných funkčně variantních alel CYP2D6 (*3, *4, *5, *6 a multiplikace), CYP2C9 (*2,*3) a CYP2C19 (*2, *3) je shodná s ostatními bělošskými populacemi.
- Frekvence predikovaných fenotypů v české populaci nevykazuje zásadní odlišnosti od predikovaných či stanovených fenotypů ostatních evropských národů. Lze proto předpokládat extrapolovatelnost dat účinnosti a bezpečnosti z evropských populací na populaci českou. Fenotyp pomalého metabolizátora CYP2D6 lze predikovat u 6,7% české populace a asi 2% české populace můžeme řadit mezi pomalé metabolizátory substrátů CYP2C19 a CYP2C9.
- Česká populace zdravých dobrovolníků i hypercholesterolemických pacientů je genotypově dobře definována a může být použita jako srovnávací skupina pro další farmakogenetické studie sledující účinnost i bezpečnost farmakoterapie.
- Hypolipidemický účinek fluvastatinu je variabilní mimo jiné také v závislosti na genotypu CYP2C9 jednotlivce.
- Přestože ve studii nebyl přítomen homozygotní pacient *3/*3, který by posílil statistickou významnost studie, sledujeme zřetelný trend. Výsledky naznačují, že přítomnost alely CYP2C9*3 koreluje s výraznějším procentuálním snížením LDL-cholesterolu.

Závěrem lze konstatovat, že zavedením a optimalizací metodik a stanovením frekvence výskytu základních polymorfismů isoenzymů, které dle literárních zdrojů metabolizují přes 40 % podávaných farmak, jsme poskytli referenční rámec pro následný výzkum v poli klinických aplikací a podpořili jsme snahy o zavedení individualizované farmakoterapie.

7. Použitá literatura

- Asberg, A. and H. Holdaas (2004). "Fluvastatin and fluvastatin extended release: a clinical and safety profile." Expert Rev Cardiovasc Ther **2**(5): 641-652.
- Aynacioglu, A. S., J. Brockmoller, et al. (1999). "Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin." Br J Clin Pharmacol **48**(3): 409-415.
- Bozina, N., P. Granic, et al. (2003). "Genetic polymorphisms of cytochromes P450: CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian population." Croat Med J **44**(4): 425-428.
- Dorado, P., R. Berecz, et al. (2003). "CYP2C9 genotypes and diclofenac metabolism in Spanish healthy volunteers." Eur J Clin Pharmacol **59**(3): 221-225.
- Gaedigk, A., R. R. Gotschall, et al. (1999). "Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data." Pharmacogenetics **9**(6): 669-682.
- Gaikovitch, E. A., I. Cascorbi, et al. (2003). "Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population." Eur J Clin Pharmacol **59**(4): 303-312.
- Hirvonen, A., K. Husgafvel-Pursiainen, et al. (1993). "PCR-based CYP2D6 genotyping for Finnish lung cancer patients." Pharmacogenetics **3**(1): 19-27.
- Chasman, D. I., D. Posada, et al. (2004). "Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction." JAMA **291**(23): 2821-2827.
- Chouchana, L., C. Narjoz, et al. (2012). "TPMT status determination: The simplest is the most effective?" J Crohns Colitis.
- Ingelman-Sundberg, M. (2004). "Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **369**(1): 89-104.
- Kirchheiner, J., D. Kudlicz, et al. (2003). "Influence of CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetics and cholesterol-lowering activity of (-)-3S,5R-fluvastatin and (+)-3R,5S-fluvastatin in healthy volunteers." Clin Pharmacol Ther **74**(2): 186-194.
- Laforest, L., H. Wikman, et al. (2000). "CYP2D6 gene polymorphism in caucasian smokers: lung cancer susceptibility and phenotype-genotype relationships." Eur J Cancer **36**(14): 1825-1832.
- Maggo, S. (2011). "Research highlights. SNPs affecting efficacy and safety of statin therapy." Pharmacogenomics **12**(6): 773-778.
- Menoyo, A., E. Del Rio, et al. (2005). "Characterization of variant alleles of cytochrome CYP2D6 in a Spanish population." Cell Biochem Funct.
- Niewinski, P., K. Orzechowska-Juzwenko, et al. (2002). "CYP2D6 extensive, intermediate, and poor phenotypes and genotypes in a Polish population." Eur J Clin Pharmacol **58**(8): 533-535.
- Rideg, O., A. Haber, et al. (2011). "Pilot study for the characterization of pharmacogenetically relevant CYP2D6, CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms in the Hungarian population." Cell Biochem Funct **29**(7): 562-568.
- Rodin, A. S., G. Gogoshin, et al. (2011). "Systems biology data analysis methodology in pharmacogenomics." Pharmacogenomics **12**(9): 1349-1360.
- Sachse, C., J. Brockmoller, et al. (1997). "Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences." Am J Hum Genet **60**(2): 284-295.

- Scordo, M. G., E. Aklillu, et al. (2001). "Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in a Caucasian and a black African population." Br J Clin Pharmacol **52**(4): 447-450.
- Scordo, M. G., A. P. Caputi, et al. (2004). "Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population." Pharmacol Res **50**(2): 195-200.
- Sever, P. S., B. Dahlof, et al. (2003). "Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial." Lancet **361**(9364): 1149-1158.
- Shimizu, T., H. Ochiai, et al. (2003). "Bioinformatics Research on Inter-racial Difference in Drug Metabolism I. Analysis on Frequencies of Mutant Alleles and Poor Metabolizers on CYP2D6 and CYP2C19." Drug Metab Pharmacokinet **18**(1): 48-70.
- Slanar, O., M. Bortlik, et al. (2008). "Polymorphisms of the TPMT gene in the Czech healthy population and patients with inflammatory bowel disease." Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids **27**(6): 835-838.
- Stubbins, M. J., L. W. Harries, et al. (1996). "Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus." Pharmacogenetics **6**(5): 429-439.
- Sullivan-Klose, T. H., B. I. Ghanayem, et al. (1996). "The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism." Pharmacogenetics **6**(4): 341-349.
- Superko, H. R., K. M. Momary, et al. (2012). "Statins personalized." Med Clin North Am **96**(1): 123-139.
- Tamminga, W. J., J. Wemer, et al. (2001). "The prevalence of CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in a population of healthy Dutch volunteers." Eur J Clin Pharmacol **57**(10): 717-722.
- Tefre, T., A. K. Daly, et al. (1994). "Genotyping of the CYP2D6 gene in Norwegian lung cancer patients and controls." Pharmacogenetics **4**(2): 47-57.
- Wu, R., C. Tong, et al. (2011). "A conceptual framework for pharmacodynamic genome-wide association studies in pharmacogenomics." Drug Discov Today **16**(19-20): 884-890.
- Yamada, H., M. L. Dahl, et al. (1998). "CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in an elderly Swedish population." Eur J Clin Pharmacol **54**(6): 479-481.
- Yang, J. Q., S. Morin, et al. (2003). "Frequency of cytochrome P450 2C9 allelic variants in the Chinese and French populations." Fundam Clin Pharmacol **17**(3): 373-376.
- Yasar, U., S. Lundgren, et al. (2002). "Linkage between the CYP2C8 and CYP2C9 genetic polymorphisms." Biochem Biophys Res Commun **299**(1): 25-28.

Seznam publikací

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace s IF:

Buzková H., Pechandová K., Danzig V., Vařeka T., Perlík F., Žák A., Slanař O.: Lipid-lowering effect of fluvastatin in relation to cytochrome P450 2C9 variant alleles frequently distributed in the Czech population. *Med Sci Monitor*, Vol 18, No 7, **2012**. **IF** = 1,699 (2010)

Buzková H., Pechandová K., Slanař O., Perlík F.: Frequency of single nucleotide polymorphisms of CYP2D6 in the Czech population. *Cell Biochem Funct* **2008**; 26(1): 76–81. **IF** = 1,333 (2008)

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace bez IF:

Buzková H., Pechandová K., Slanař O., Perlík F.: Genetický polymorfismus cytochromu CYP2C9 v české populaci. *Klin. Biochem Metab.* 15 (36), **2007**, No. 2; p.102-105.

Buzková H., Pechandová K., Slanař O., Perlík F.: Genetic Polymorphism of Cytochrome P450 and Methods for its Determination. *Prague Medical Report / Vol. 107*, **2006** No. 4, p. 383–393.

Slanař O., Draždřáková M., Babiárová K., Pechandová K., Buzková H., Perlík F., Zima T.: Genotypizace cytochromu P450 2D6 a 2C19. *Čas. Lék. čes.*, **2007**, 146, pp. 708–711.

Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace s IF:

Pechandová K., Buzková H., Matoušková O., Perlík F., Slanař O.: Genetic polymorphism of CYP2C8 in the Czech Republic – *Genet Test Mol Biomarkers*. **2012** Feb 7 (Epub ahead of print- PMID:22313047). **IF** = 1.654 (2010)

Pechandová K., Buzková H., Slanař O., Perlík F.: Polymorphisms of the MDR1 Gene in the Czech Population. *Folia Biologica (Praha)* 52, 184-189, **2006**. **IF** = 0,387 (2006)

Slanař O., Buzková H., Pechandová K., Marek J., Perlík F.: Frequency of TPMT functional polymorphisms in the Czech population. *Chem. Listy* 101, s 73-310, **2007**. **IF** = 0,683 (2007)

Slanař O., Bortlík M., Buzková H., Donoval R., Pechandová K., Šebesta I., Lukáš M., Perlík F.: Polymorphisms of the TPMT gene in the Czech healthy population and patients with inflammatory bowel disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. **2008** Jun;27(6):835-8. **IF** = 0,571 (2008)

Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace bez IF:

Pechandová K., Buzková H., Slanař O., Perlík F.: Efluxní transmembránový transportér – P-glykoprotein. *Klin. Biochem. Metab.*, 14 (35), **2006**, No. 4; p. 196–201.