

Posudek doktorandské práce „Četnost vybraných genetických polymorfizmů cytochromu P450 v české populaci a vliv genotypu CYP2C9 na hypolipidemické působení fluvastatinu“ předložené PharmDr. Helenou Buzkovou

Doktorandka předložila soupis publikací, je prvou autorkou dvou prací v časopisech s IF (hodnota IF 1,699 a 1,333) a tří prací v neimpaktovaných časopisech. Všechny práce se zabývají tématem dizertace a jsou přiloženy v doktorandské práci. Kvalita publikací je výborná. Dále je doktorandka spoluautorkou čtyř prací v časopisech s IF a jednoho v časopisu neimpaktovaném. Tyto práce mají volnější vztah k dizertační práci. Citační ohlas podle Web of Science byl vysoký, práce staršího data publikovány 30krát, nejvýznamnější publikace je z tohoto roku. V českém písemnictví patří již nyní práce o frekvenci polymorfizmů metabolických a transportních systémů v české populaci k základním zdrojům informace.

Vlastní doktorandská práce má 53 stran (46 stran textu + 7 stran literárních odkazů) a pět příloh vlastních časopiseckých prací impaktovaných časopisech. Odborná úroveň doktorandské práce, obvyklé členění, didaktická a literární kvalita, stejně, jako logický úsudek a závěry jsou na dobré úrovni.

Tématem práce je polymorfismus v biotransformaci léčiv. V první části se autorka věnuje určení výskytu polymorfizmů základních izoenzymů CYP v české populaci a v druhé části určení farmakologického dopadu těchto polymorfizmů na úrovni oxidázy CYP2C9, konkrétně vliv genotypu substrátu CYP2C9 – fluvastatinu na pokles hladiny LDL-cholesterolu u nemocných s dyslipidemií.

Prvá část je věnována výskytu jednotlivých funkčně variantních alel metabolicky důležitějších izoenzymů CYP s klinicky významným polymorfizmem, konkrétně analýza genotypů CYP2D6, CYP2C9 a CYP2C19. K analýze byla užitá metoda polymerázové řetězové reakce s následnou analýzou délky restričních fragmentů (PCR-RFLP) u zdravých dobrovolníků české populace.

Na úrovni oxidázy CYP2D6 byla sledována prevalence alel se sníženou aktivitou enzymu, tj. CYP2D6*3, *4, *5 a *6 a výskyt polymorfizmu spojeného s vyšší aktivitou při multiplikaci běžné plně funkční alely *1. Nalezena frekvence výskytu pomalých metabolizátorů bez funkční alely (6,7%), velmi rychlých s multiplikací alel (3,6%) i extenzivních metabolizátorů s alespoň jednou funkční alelou na úrovni frekvence v ostatních evropských subpopulacích.

Podobná shoda s ostatními indoevropskými subpopulacemi byla zjištěna i při stanovení genotypu obou dalších izoenzymů. V případě oxidázy CYP2C9 sledovány funkčně defektní alely 2C9*2 a 2C9*3 a funkčně plně aktivní alela 2C9*1. Frekvence výskytu jejich kombinací s mírně sníženou aktivitou (genotypy CYP2C9*1/*3, *2/*2 a *2/*3) byla 12,2% a s výrazně sníženou aktivitou (homozygotní genotyp *3/*3) byla 0,8%.

U oxidázy CYP2C19 byla sledována prevalence genotypů *1/*1 s plnou aktivitou, prevalence genotypů *1/*2 s mírně sníženou aktivitou a prevalence genotypů *2/*2 s nízkou aktivitou. Pro nízkou frekvenci výskytu v evropské populaci nesledovány genotypy s alelou 2C19*3. Frekvence výskytu alel s nízkou a s mírně sníženou aktivitou byla 1,4% a 22,5. Genotyp s plnou aktivitou izoenzymu měly tři čtvrtiny

populace. Údaj o výskytu zvýšeně aktivní alely (tzv. gain-of-function) 2C19*17 není zmíněn, pravděpodobně nestanovován.

Hlavní význam této části práce vidím v doložení stejné prevalence funkčně významných genotypů základních polymorfních metabolických systémů s prevalencí v ostatní evropské populaci. Práce sledující populační farmakokinetiku a toleranci tak je možno bez výhrad vztahovat i na českou populaci.

V druhé části práce byla sledována korelace farmakogenetické výbavy s farmakodynamickým účinkem, konkrétně *vlivu polymorfismu CYP2C9 na hypolipidemický efekt inhibitoru HMG CoA-reduktázy fluvastatinu* u nemocných léčených pro dyslipidemii. V souladu s předpokladem, nemocní s nižší aktivitou isoenzymu (typ CYP2C9*1/*3) měly výraznější pokles LDL-cholesterolu (snížení o 40%) v porovnání s plně aktivním genotypem CYP2C9*1/*1 (snížení o 22,4%). U ostatních genotypů se sníženou aktivitou biodegradačního enzymu CYP2C9 nebyl pozorován trend ke zvýšení farmakodynamického účinku při předpokládané vyšší expozici fluvastatinem. Homozygotní alela CYP2C9*3/*3 se ve sledovaném souboru nevyskytla. Platnost analýzy byla omezena relativně malými počty nemocných v podskupinách s počty 2 probandů až 9 probandů.

Celkově hodnotím práci velmi kladně, metodicky byla dobře připravena i provedena. Práce o prevalenci funkčně významných polymorfizmů isoenzymů CYP jsou již odbornou veřejností přijaty a řady prací z nich vychází. V části o významu polymorfismu CYP2C9 na hypolipidemický efekt fluvastatinu byla zjištěna zajímavá data, nicméně závěry jsou zatíženy chybou malých čísel.

Práce má též drobné nejasnosti a nedostatky. Nejasností je již výše zmíněná absence analýzy prevalence alely CYP2C9*17 se zvýšenou aktivitou (gain-of-function). Drobným nedostatkem je nevyváženost prostoru věnovanému jednotlivým isoenzymům v přehledové části práce. Oxidáze CYP2D6 je věnována výrazně větší pozornost, nežli ostatním metabolickým enzymům, zejména však velmi zajímavému enzymu CYP2C19. Nicméně tato výtku není významná a neovlivňuje celkové kladné hodnocení práce.

Na doktorandku mám otázku:

Hypolipidemický efekt statinů je, mimo jiné, ovlivněn jejich nabídkou na úrovni HMG CoA reduktázy v ve vlastním hepatocytu, tj. jejich koncentraci v místě cílového enzymu. Nabídka je významně ovlivněna aktivitou polymorfní influxní pumpy OATP1B1, která ovlivňuje přestup statinu do hepatocytu ze systémového i portálního oběhu a ovlivňuje i eliminaci statinu do žluče. Nízká aktivita pumpy či její inhibice (např. telmisartanem) může vést ke snížení koncentrace statinu na úrovni cílového enzymu se snížením hypolipidemického efektu a naopak ke zvýšení plazmatické koncentrace statinu při omezené eliminaci do žluče může být sledována akcentací nežádoucích účinků. *Jak významně ovlivní polymorfismus typu loss-of-function či inhibice aktivity transportéru OATP1B1 hypolipidemický účinek fluvastatinu?*

Závěr: Hlavní předností práce je zvládnutí farmakogenetických laboratorních metod, osvojení si exaktního experimentálního přístupu s následným získáním kvalitních výsledků s přímým dopadem na farmakologický výzkum a klinickou praxi. Způsob řešení, stejně jako metodický postup, odpovídá současnému stavu poznání a je aktuální. Práce je výborným základem pro další rozvíjení výzkumu v dané problematice. K formálnímu zpracování nemám zásadní připomínky.

Na základě předložených publikací i doktorandské práce konstatuji, že doktorandka prokázala předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci a splnila podmínky pro udělení titulu „Ph.D.“ za jménem. Schválení doktorandské práce plně doporučuji.

V Praze 30. 8. 2012

Prof. MUDr. Jan Bultas, CSc.
Farmakologický ústav 3. LF UK Praha

