

Genetický polymorfismus cytochromu *CYP2C9* v české populaci

Buzková H., Pechandová K., Slanař O., Perlík F.

Oddělení klinické farmakologie, 1. LF UK, Praha

SOUHRN

Cíl studie: Cílem práce je popsat frekvenci výskytu variantních alel genu enzymu *CYP2C9* v české populaci. *CYP2C9*, jeden z enzymů cytochromu P450, metabolizuje přibližně 16 % běžně užívaných léčiv, genetický polymorfismus jeho genu může ovlivňovat míru schopnosti odbourávat své substráty, a být proto vysvětlením pro variabilní odpověď pacientů na léčbu.

Materiál a metody: 254 zdravých, nepříbuzných dobrovolníků bylo po podepsání informovaného souhlasu zařazeno do studie. Z leukocytární DNA byl stanoven výskyt variantních alel *CYP2C9*2* a *CYP2C9*3* metodou PCR-RFLP.

Výsledky: 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. Zastoupení genotypů heterozygotů je následující: *CYP2C9*1/*2* - 20,1 %; *CYP2C9*1/*3* - 9,8 %; *CYP2C9*2/*3* - 0,4 %. Pět subjektů (2,0 %) klasifikujeme jako variantní homozygoty *CYP2C9*2/*2*, 0,8 % jako homozygoty *CYP2C9*3/*3*.

Závěr: Frekvence výskytu variantních alel genu *CYP2C9* v české populaci je podobná ostatním kavkazským populacím. **Klíčová slova:** *CYP2C9*, cytochrom P450, česká populace, polymorfismus, farmakogenetika.

SUMMARY

Buzková H., Pechandová K., Slanař O., Perlík F.: Genetic polymorphisms of cytochrome *CYP2C9* in the Czech population

Objective: The aim of this study was to investigate the frequency of functionally important variant alleles of *CYP2C9* gene through the Czech population.

Setting: Clinical Pharmacology Unit, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic.

Methods: 254 unrelated, healthy volunteers were enrolled in the study after giving written consent. Leucocyte DNA was analysed to detect the presence of *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3* variant alleles by PCR-RFLP.

Results: The variant allelic frequencies in our population are 81.9%, 12.2% and 5.9%, for *CYP2C9*1*, *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*, respectively. The distribution of variant alleles complies to the Hardy-Weinberg equilibrium. Prevalence of heterozygous genotypes is as follow: *CYP2C9*1/*2* – 20.1%; *CYP2C9*1/*3* – 9.8%; *CYP2C9*2/*3* – 0.4%. Five subjects (2.0%) are classified as a *CYP2C9*2/*2* homozygous, 0.8% as a *CYP2C9*3/*3* homozygous.

Conclusions: The frequencies of functional variant alleles of *CYP2C9* in the Czech population are in concordance with the other Caucasians population.

Keywords: *CYP2C9*, cytochrome P450, Czech population, polymorphism, pharmacogenetics.

Úvod

Již více než padesát let je známo, že genetická výbava jedince může přispívat k interindividuální variabilitě farmakoterapeutické odpovědi. Obor farmakogenetiky se vyvíjí v závislosti na průběžném mapování lidského genomu, vyhledávání jednotlivých, zatím především bodových, mutací a na popisu souvislostí mezi variabilitou v sekvenci DNA a klinickou odpovědí na léčbu.

Enzym *CYP2C9* je polypeptid o 490 aminokyselinách, jehož relativní množství v lidských játrech je kolem 20 % ze všech enzymů cytochromu P450 [1]. Gen kódující *CYP2C9* protein je lokalizován na chromozomu 10 (10q24) a má 9 exonů. Zatím bylo popsáno 30 bodových polymorfismů v genu *CYP2C9* (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm>).

Bodový polymorfismus (single nucleotide polymorphism SNP) označovaný jako *CYP2C9*2* kóduje změnu argininu za cystein (R144C), *CYP2C9*3* způsobuje substituci isoleucinu za leucin na pozici 359 (I359L) ve výsledné aminokyselinové sekvenci. Tyto dvě změny jsou nejběžnější SNP s funkční následkem. *In vitro* studie prokazují, že katalytická aktivita enzymu

vzniklého přepisem *CYP2C9*3* nebo **2* varianty je snížena. *In vivo* se tato variabilita projevuje změnami ve farmakokinetice jednotlivých substrátů enzymu *CYP2C9*. Jedná se především o snížení clearance v porovnání s přirozenou wild-type alelou *CYP2C9*1*. Pacienti homozygotní pro variantní alelu, tzv. pomalí metabolizátoři (PM), jsou vystaveni vyšším koncentracím léčiv. *CYP2C9* katalyzuje oxidativní biotransformaci u více než 16 % běžně užívaných léčiv [2]. Typický substrát cytochromu 2C9 je popisován jako slabá lipofilní kyselina. Spektrum substrátů je velmi široké a zahrnuje léčiva ze skupin perorálních antikoagulantů: warfarin a deriváty kumarolů; nesteroidních antiflogistik: diklofenak, ibuprofen, indometacin, piroxicam, celecoxib; perorálních antidiabetik: tolbutamid a glipizid, rosiglitazon; antagonistů receptoru pro angiotensin II: losartan, irbesartan, candesartan; kličkové diuretikum torasemid; inhibitor HMG-CoA reductázy fluvastatin, dále tamoxifen, fluoxetin, amitriptylin, fenytoin a mnoho dalších.

Výskyt jednotlivých variantních alel se liší podle rasové příslušnosti jedince. Alely *CYP2C9*2* a *CYP2C9*3* mají největší výskyt u bílé populace, frekvence výskytu se uvádí v rozmezí 8–14 % a 4–16 %,

u populace afro-americké 4 % a 2 % a u Asiátů se setkáváme pouze s 3% výskytem variantní alely *CYP2C9*3* [2, 3]. Nukleotidová záměna thyminu za cytosin na pozici 1076 (*CYP2C9*4*) má téměř mizivý výskyt ve všech populacích. Některé další variantní alely, jako např. *CYP2C9*5*, *CYP2C9*6*, *CYP2C9*8*, *CYP2C9*11*, byly detekovány především u afro-americké populace (frekvence výskytu 1,8 %, méně než 1 %, 8% a 2,7 %) [4].

Zaměřili jsme se na genotypizaci zdravých dobrovolníků s cílem popsat distribuci dvou hlavních variantních alel *CYP2C9* v české populaci a porovnat ji s výskytem v ostatních populacích.

Metodika

Do studie byla zařazena skupina zdravých dobrovolníků z řad studentů vysokých škol. Tvořilo ji 254 navzájem nepříbuzných jedinců české národnosti (160 žen a 94 mužů). Vzorky krve byly odebrány po podepsání informovaného souhlasu všech jedinců. Izolace leukocytární DNA byla provedena kitem na izolaci DNA – QIAmp Blood Mini Kitu (Qiagen, USA).

Genotypizace byla provedena modifikovanou metodou PCR-RFLP podle Aynacioglu et al. [5, 6]. V metodách jsme upravili režim PCR cyklů a složení reakčních směsí. Úpravy v jednotlivých krocích cyklu pro *CYP2C9*2*: po počáteční elongaci (94 °C, 2 min) proběhlo 35 cyklů denaturace (94 °C, 30 s), nasedání primerů (62 °C, 45 s) a prodlužování DNA řetězce (72 °C, 60 s); konečná syntéza řetězce probíhala 420 s při teplotě 72 °C na přístroji MyCycler (BioRad, USA): Reakční směs o celkovém objemu 25 µl obsahovala 1,5 µg genomické DNA, 0,2 µmol/l primerů (2CL1: 5'-CAC TGG CTG AAA GAG CTA ACA GAG-3' a 2CR1: 5'-GTG ATA TGG AGT AGG GTC ACC CAC-3), 10xPCR Pufr (Fermentas, Lithuania), 0,2 mmol/l dNTPs (Fermentas, Lithuania), 1,2 mmol/l MgCl₂ (Fermentas, Lithuania) a 0,75 jednotku DNA Taq Polymerázy (Top-Bio s.r.o. Praha, Czech Republic). Délka PCR produktu pro *CYP2C9*2* je 372bp.

K namnožení amplikonu *CYP2C9*3* o velikosti 137 párů bazí jsme použili 2 µmol/l primerů C5 (5' - AGG AAG AGA TTG AAC GTG TGA-3') a 6A (5' -TGC ATG GGG CAG GCT GGT GGG GAG AAG GCC AA-3), 1,5 mmol/l MgCl₂ a dále shodně 10xPCR Pufr, 0,2

mmol/l dNTPs, a 0,75 jednotku DNA Taq Polymerázy do celkovém objemu 25 µl reakční směsi. Podmínky PCR reakce pro *CYP2C9*3* byly upraveny následovně: 2 minuty při 94 °C, 35 cyklů – 30 s při 94 °C, 20 s při 57 °C a 60 s při 72 °C, 7 minut při 68 °C.

Produkty PCR byly inkubovány s restrikními enzymy Cfr 13I (Fermentas, Lithuania) pro *CYP2C9*2* (velikost restrikních fragmentů pro variantní alelu: 253 a 119 párů bazí) a Sty I (Fermentas, Lithuania) pro *CYP2C9*3* (velikost restrikních fragmentů pro variantní alelu: 104 a 33 párů bazí) při teplotě 37 °C po dobu 16 hodin. Velikost restrikních fragmentů byla stanovena elektroforézou na 3% agarosovém gelu. Elektroforéza probíhala při 120 V po dobu 80 minut. Metody byly verifikovány na standardních vzorcích o známém genotypu, které jsme získali z Institutu klinické farmakologie v Berlíně. V každém PCR cyklu jsme používali pozitivní i negativní kontrolu.

Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí programu Microsoft Excel 9.0 (Microsoft, USA) a Statgraphics Plus 3.1 (StatPoint, Inc., USA). Předpokládané genotypové frekvence byly vypočítány podle Hardy-Weinbergova vztahu: ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$). Prevalenci genotypů jsme porovnali χ^2 testem, a doplnili 95% hladinu spolehlivosti, na které platí nulová hypotéza, že mezi pozorovanými a předpokládanými genotypovými frekvencemi neexistuje rozdíl.

Výsledky

Frekvence výskytu variantní alely *CYP2C9*2* ve skupině zdravých nepříbuzných dobrovolníků z české populace byla stanovena na 12,2 % a pro *CYP2C9*3* na 5,9 %. Pozorované i předpokládané genotypové frekvence uvádí tabulka 1.

U 170 dobrovolníků (66,93 %) z celkových 254 jsme nenašli ani jednu variantní alelu pro gen *CYP2C9*, jedná se tedy o homozygoty s nepozměněnou aktivitou biotransformačního enzymu, zbylých 33,07 % jedinců má pozměněnou enzymovou aktivitu. Ve skupině je 51 subjektů s genotypem heterozygota *CYP2C9*1/*2* a 25 subjektů s genotypem **1/*3*.

Ani jednu plně funkční alelu nemělo 9 dobrovolníků, z toho jeden variantně heterozygotní subjekt s genotypem *CYP2C9*2/*3* (0,39 %) a ostatní homozygoté. Pět subjektů (1,97 %) klasifikujeme jako vari-

Table 1. Frequency of *CYP2C9* variant alleles in a sample of the Czech population

CYP2C9 alleles	Genotype	No of subjects	Observed genotype frequencies [%]	Allele frequencies [%]	Predicted genotype frequencies [%]	% (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

Table 2. Prevalence of the *CYP2C9* genotypes [4]

CYP2C9 genotype	Enzyme activity	No of subjects	%	95% CI	Genotype frequency in population [%]		
					Caucasians	Asians	African-Americans
*1/*1	normal	170	66.9	61.14-72.71	65.3	96.5	87.0
*1/*2	minor reduction	51	20.1	15.15-25.00	20.4	0	8.7
*1/*3	moderately reduced	25	9.8	6.18-13.51	11.6	3.5	4.3
*2/*2	moderately reduced	5	2.0	0.26-3.67	0.9	0	0
*2/*3	moderately reduced	1	0.4	0.00-1.16	1.4	0	0
*3/*3	very low	2	0.8	0.00-1.87	0.4	0	0

antní homozygoty *CYP2C9**2/*2, 0,79% jako variantní homozygoty s nukleotidovou záměnou adeninu za cytosin na pozici 1075 v obou alelách (*CYP2C9**3/*3) (tab. 2).

Diskuse

Cílem naší práce bylo popsat frekvenci výskytu hlavních variantních alel *CYP2C9* v české populaci a získat tak základní data, která jsou nezbytná pro naplánování terapeutických nebo farmakoekonomických studií. Prevalence sledovaných variantních alel *CYP2C9* je v české populaci 18,1%. V rozložení *CYP2C9* alel, stejně jako v prevalenci pomalých metabolizátorů, se čes-

ká populace statisticky neodlišuje od ostatních evropských populací. Distribucí vzácných alel a alel specifických pro afro-americké populace jsme se nezabývali. Vzhledem ke shodě v distribuce *CYP2C9**2 a *3 mezi českou a evropskými populacemi [7–13] lze uvažovat i o shodné distribuci alel minoritních. Tabulka 3 shrnuje data získaná genotypizací (především nejužívanější metodou PCR-RFLP) souborů zdravých dobrovolníků z etnicky popsanych skupin.

Pokud je léčivo biodegradováno enzymem *CYP2C9*, pak je u jedinců s genetickou predispozicí pro sníženou enzymovou aktivitu tendence ke kumulaci léčiva. Pozměněná farmakokinetika byla popsána např. u warfarinu, po jehož podání byl pozorován u pomalých metabolizátorů výraznější antikoagulační efekt ve srovnání

Table 3. Distribution of *CYP2C9* alleles among various populations; arrange according to descendent prevalence of *CYP2C9**2 allele frequency

Nationality	No of subjects	Allele frequencies [%]			References
		CYP2C9*1	CYP2C9*2	CYP2C9*3	
Croats	200	74.0	16.5	9.5	[7]
Spanish	102	74.0	16.0	10.0	[8]
French	151	77.0	15.0	8.0	[9]
British	100	79.0	12.5	8.5	[10]
Czech	254	81.9	12.2	5.9	
Swedish	1468	83.0	11.0	6.6	[11]
Italian	157	80.0	11.0	9.0	[12]
Turkish	218	79.4	10.6	10.0	[5]
Russians	290	-	10.5	6.7	[13]
Ethiopian	150	94.0	4.0	2.0	[14]
African-Americans			1.0	0.5	[15]
Chinese Shanghia	394	96.3	0.1	3.6	[9]
Chinese Taiwanese			-	2.6	[15]

s pacienty bez deficitu *CYP2C9* [16, 17]. Korelace mezi přítomností funkčních variant a výskytem krvácivých komplikací léčby warfarinem byla opakovaně sledována [18]. Rovněž farmakokinetika celecoxibu je závislá na aktivitě *CYP2C9*. Homozygoté *CYP2C9**3/*3 mají až dvakrát sníženou celkovou clearance oproti wild-type jedincům nebo *CYP2C9**2/*2 homozygotům. Teoreticky by bylo možné u pomalých metabolizátorů očekávat vyšší incidenci nebo závažnost nežádoucích účinků anebo větší analgetický účinek celecoxibu, ale prozatím nebyly publikovány klinické studie, jejichž výsledky by tuto teorii dokázaly potvrdit nebo vyvrátit [19, 20]. Podobné vztahy genotypem ovlivněných plazmatických koncentrací substrátů *CYP2C9* jsou známe např. i u fluvastatinu [21] a dalších látek, u kterých je také potřeba vyjasnit vztah s klinickým efektem léčby. Pozorované farmakokinetické změny u léčiv – substrátů *CYP2C9* vedou ke snaze o individualizaci terapie pomocí korekce dávkování podle genotypu pacienta. Tyto úpravy dávkování jsou prozatím podloženy farmakokinetickými daty získanými v relativně malých souborech subjektů. Před implementací těchto farmakogenetických postupů do rutinní praxe bude nutné jejich přínos potvrdit věrohodnými klinickými studiemi a ekonomickou náročnost posoudit farmakoekonomickou rozvahou. Výsledky naší studie mohou být využity pro plánování terapeutických nebo farmakoekonomických studií i při rozhodování o léčebné strategii u vybraných pacientů.

Literatura

- Inoue, K., Yamazaki, H., Imiya, K. et al. Relationship between *CYP2C9* and *2C19* genotypes and tolbutamide methyl hydroxylation and *S*-mephenytoin 4'-hydroxylation activities in livers of Japanese and Caucasian populations. *Pharmacogenetics*, 1997, 7, 2, p. 103–113.
- Schwarz, U. I. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human *CYP2C9* gene. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2003, 33, Suppl 2, p. 23–30.
- Goldstein, J. A. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human *CYP2C* subfamily. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2001, 52, 4, p. 349–355.
- Kirchheiner, J., Brockmoller, J. Clinical consequences of cytochrome P450 *2C9* polymorphisms. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2005, 77, 1, p. 1–16.
- Aynacioglu, A. S., Brockmoller, J., Bauer, S. et al. Frequency of cytochrome P450 *CYP2C9* variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1999, 48, 3, p. 409–415.
- Freytag, G. *Die Bedeutung genetischer Polymorphismen im Enzym Cytochrom P450 2C9 für Pharmakokinetik und Wirkungen der Nichtsteroidalen Antiphlogistika Diclofenac und Ibuprofen*. Berlin : Medizinischen Fakultät der Charite, 34 s.
- Bozina, N., Granic, P., Lalic, Z. et al. Genetic polymorphisms of cytochromes P450: *CYP2C9*, *CYP2C19*, and *CYP2D6* in Croatian population. *Croat. Med. J.*, 2003, 44, 4, p. 425–428.
- Dorado, P., Berecz, R., Norberto, M. J. et al. *CYP2C9* genotypes and diclofenac metabolism in Spanish healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2003, 59, 3, p. 221–225.
- Yang, J. Q., Morin, S., Verstuyft, C. et al. Frequency of cytochrome P450 *2C9* allelic variants in the Chinese and French populations. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2003, 17, 3, p. 373–376.
- Stubbins, M. J., Harries, L. W., Smith, G., Tarbit, M. H., Wolf, C. R. Genetic analysis of the human cytochrome P450 *CYP2C9* locus. *Pharmacogenetics*, 1996, 6, 5, p. 429–439.
- Yasar, U., Lundgren, S., Eliasson, E. et al. Linkage between the *CYP2C8* and *CYP2C9* genetic polymorphisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 299, 1, p. 25–28.
- Scordo, M. G., Caputi, A. P., D'Arrigo, C., Fava, G., Spina, E. Allele and genotype frequencies of *CYP2C9*, *CYP2C19* and *CYP2D6* in an Italian population. *Pharmacol. Res.*, 2004, 50, 2, p. 195–200.
- Gaikovitch, E. A., Cascorbi, I., Mrozikiewicz, P. M. et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP1A1*, *NAT2* and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2003, 59, 4, p. 303–312.
- Scordo, M. G., Aklillu, E., Yasar, U. et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450 *2C9* in a Caucasian and a black African population. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2001, 52, 4, p. 447–450.
- Sullivan-Klose, T. H., Ghanayem, B. I., Bell, D. A. et al. The role of the *CYP2C9*-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics*, 1996, 6, 4, p. 341–349.
- Wood, A. J. Racial differences in the response to drugs – pointers to genetic differences. *N. Engl. J. Med.*, 2001, 344, 18, p. 1394–1396.
- Aithal, G. P., Day, C. P., Kesteven, P. J., Daly, A. K. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 *CYP2C9* with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet*, 1999, 353, 9154, p. 717–719.
- Higashi, M. K., Veenstra, D. L., Kondo, L. M. et al. Association between *CYP2C9* genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *Jama*, 2002, 287, 13, p. 1690–1698.
- Kirchheiner, J., Stormer, E., Meisel, C., et al. Influence of *CYP2C9* genetic polymorphisms on pharmacokinetics of celecoxib and its metabolites. *Pharmacogenetics*, 2003, 13, 8, p. 473–480.
- Rodrigues, A. D. Impact of *CYP2C9* genotype on pharmacokinetics: are all cyclooxygenase inhibitors the same? *Drug Metab. Dispos.*, 2005, 33, 11, p. 1567–1575.
- Kirchheiner, J., Kudlicz, D., Meisel, C. et al. 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.*, 2003, 74, 2, p. 186–194.

Práce byla podpořena grantem GA UK 18/C/2005.

Do redakce došlo 19. 12. 2006.

Adresa pro korespondenci:
PharmDr. Helena Buzková
Farmakologický ústav 1. LF UK
Albertov 4
128 00 Praha 2
e-mail: hbuzk@lf1.cuni.cz