

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

# **Diplomová práce**

**2021**

**Bc. Klára Koutská**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Možnosti individualizované farmakoterapie u psychiatrických  
pacientů na základě polymorfismů vybraných genů  
zodpovědných za metabolismus léčiv**

Diplomová práce

**Bc. Klára Koutská**

Školitelka: Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D.

České Budějovice 2021

Koutská K., 2021: Možnosti individualizované farmakoterapie u psychiatrických pacientů na základě polymorfismů vybraných genů zodpovědných za metabolismus léčiv [Individual pharmacotherapy possibilities based on selected gene polymorphisms responsible for drug metabolism, Mgr. Thesis, in Czech] – p. 67, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This thesis deals with problematics of individualized pharmacotherapy of psychiatric patients based on gene polymorphism detection. Thanks to gene polymorphism detection specific type of metabolism of each patient can be established. Based on this knowledge treatment can be properly adjusted to suit patient's needs by increasing or decreasing dosage. Furthermore knowledge of gene polymorphisms also contributes to the prevention of side effects often accompanying psychopharmaceutical treatment.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 14.4.2021

.....

Bc. Klára Koutská

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především vedoucí své diplomové práce Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D. za odborné vedení práce, podporu, ochotu a trpělivost při jejím vytváření. Děkuji také všem členům mé rodiny, kteří mě podporovali i v nelehkých situacích během celého studia.

## OBSAH

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | ÚVOD .....   | 1  |
| 2     | METABOLISMUS LÉČIV .....                                       | 2  |
| 3     | POLYMORFISMUS .....  | 3  |
| 3.1   | JEDNONUKLEOTIDOVÝ POLYMORFISMUS (SNP).....                     | 3  |
| 3.2   | TANDEMOVÉ REPETICE.....  | 3  |
| 3.2.1 | MIKROSATELITY .....  | 4  |
| 3.2.2 | MINISATELITY.....  | 4  |
| 3.3   | VARIABILITA POČTU KOPIÍ (CNV) .....                            | 4  |
| 4     | CYTOCHROM P450 .....   | 5  |
| 4.1   | STRUKTURA.....   | 5  |
| 4.2   | NOMENKLATURA .....   | 6  |
| 4.3   | CYP2D6.....  | 7  |
| 4.3.1 | HISTORIE.....  | 7  |
| 4.3.2 | POLYMORFISMUS .....  | 8  |
| 4.3.3 | LÉKOVÉ INTERAKCE OVLIVNĚNÉ POLYMORFISMY CYP2D6*3, *4, *5 ..... | 9  |
| 4.4   | CYP2C19 .....  | 10 |
| 4.4.1 | HISTORIE.....  | 10 |
| 4.4.2 | POLYMORFISMUS .....  | 10 |
| 4.4.3 | LÉKOVÉ INTERAKCE OVLIVNĚNÉ POLYMORFISMY CYP2C19*2 a *3 .....   | 11 |
| 4.5   | CYP2C9 .....   | 11 |
| 4.5.1 | POLYMORFISMUS .....  | 12 |
| 4.5.2 | LÉKOVÉ INTERAKCE OVLIVNĚNÉ POLYMORFISMY CYP2C9*2 a *3 .....    | 12 |
| 4.6   | CYP1A2 .....   | 13 |
| 4.6.1 | POLYMORFISMUS .....  | 13 |
| 4.6.2 | LÉKOVÉ INTERAKCE OVLIVNĚNÉ POLYMORFISMEM CYPA12 RS4646425 .    | 14 |
| 5     | KATECHOL-O-METYL TRANSFERÁZA (COMT).....                       | 14 |
| 5.1   | POLYMORFISMUS <i>COMT</i> VAL158MET .....                      | 14 |
| 5.2   | LÉKOVÉ INTERAKCE OVLIVNĚNÉ POLYMORFISMEM VAL158MET.....        | 15 |
| 6     | PSYCHICKÁ ONEMOCNĚNÍ.....                                      | 16 |
| 6.1   | DEPRESIVNÍ PORUCHA .....                                       | 16 |
| 6.1.1 | KLINICKÉ PROJEVY .....   | 16 |
| 6.1.2 | TERAPIE .....  | 17 |
| 6.2   | SCHIZOFRENIE .....   | 17 |
| 6.2.1 | KLINICKÉ PROJEVY .....   | 17 |
| 6.2.2 | TERAPIE .....  | 18 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 7      | PSYCHOFARMAKA .....  | 19 |
| 7.1    | ANTIDEPRESIVA .....  | 19 |
| 7.1.1  | PRVNÍ GENERACE.....  | 19 |
| 7.1.2  | DRUHÁ GENERACE .....   | 20 |
| 7.1.3  | TŘETÍ GENERACE .....   | 21 |
| 7.2    | ANTIPSYCHOTIKA.....  | 22 |
| 7.2.1  | PRVNÍ GENERACE (KLASICKÁ).....                                       | 23 |
| 7.2.2  | DRUHÁ GENERACE (ATYPICKÁ).....                                       | 23 |
| 8      | CÍLE PRÁCE .....   | 25 |
| 9      | MATERIÁLY A METODY.....  | 26 |
| 9.1    | ODBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU.....                                    | 26 |
| 9.1.1  | INFORMOVANÝ SOUHLAS.....   | 26 |
| 9.2    | IZOLACE DNA .....  | 26 |
| 9.2.1  | IZOLACE DNA Z BUKÁLNÍHO STĚRU .....                                  | 27 |
| 9.3    | MĚŘENÍ KONCENTRACE IZOLOVANÉ DNA .....                               | 28 |
| 10     | GENETICKÁ ANALÝZA .....  | 29 |
| 10.1   | REAL-TIME PCR.....   | 29 |
| 10.1.1 | DETEKCE <i>CYP2D6*3</i> , <i>CYP2D6*4</i> , <i>CYP2D6*5/*5</i> ..... | 29 |
| 10.1.2 | DETEKCE <i>CYP2C19*2</i> , <i>CYP2C19*3</i> .....                    | 30 |
| 10.1.3 | DETEKCE <i>CYP2C9*2</i> , <i>CYP2C9*3</i> .....                      | 31 |
| 10.1.4 | DETEKCE <i>CYP1A2 (rs4646425)</i> .....                              | 32 |
| 10.2   | PCR RFLP.....  | 33 |
| 10.2.1 | GELOVÁ ELEKTROFORÉZA.....  | 35 |
| 10.2.2 | SEKVENACE .....  | 35 |
| 11     | VÝSLEDKY.....  | 37 |
| 11.1   | <i>CYP2D6</i> .....  | 37 |
| 11.2   | <i>CYP2C19</i> .....   | 38 |
| 11.3   | <i>CYP2C9</i> .....  | 39 |
| 11.4   | <i>CYP1A2</i> .....  | 41 |
| 11.5   | COMT .....   | 42 |
| 11.6   | POPULAČNÍ STUDIE .....   | 43 |
| 11.7   | PACIENTI.....  | 45 |
| 12     | DISKUZE .....  | 51 |
| 13     | ZÁVĚR.....   | 56 |
| 14     | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....                                      | 57 |

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- CNS – centrální nervová soustava
- CNV – copy number variations
- COMT – katechol-O-methyltransferáza
- CYP – cytochrom P450
- DMSO – dimethylsulfoxid
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- EM – extenzivní metabolizátor
- EPS – extrapyramidové nežádoucí reakce
- FDA – Food and Drug Administration
- IM – intermediární/normální metabolizátor
- IMAO – inhibitory monoaminoxidázy
- MARTA – multiacting receptor-targeted antagonist
- NK – negativní kontrola
- OCD – obsedantně kompulzivní porucha
- PCR – polymerase chain reaction
- PharmGKB – The Pharmacogenomics Knowledgebase
- PK – pozitivní kontrola
- PM – pomalý metabolizátor
- PTSD – posttraumatická stresová porucha
- RFLP – restriction fragment length polymorphism
- rs – reference SNP
- SNP – single-nucleotide polymorphism
- SNRI – serotonin–norepinephrine reuptake inhibitor
- SSRI – selective serotonin reuptake inhibitors
- TCA – tricyklická antidepresiva
- UM – ultrarychlý metabolizátory
- WT – wild type

# 1 ÚVOD

Duševní onemocnění představují značný zdravotní problém jak na individuální, tak na socioekonomické úrovni. To je částečně způsobeno neoptimálními možnostmi léčby. Současné psychotropní léky, včetně antidepresiv, antipsychotik a stabilizátorů nálady, jsou účinné pouze u malé skupiny pacientů nebo vyvolávají pouze částečnou odpověď a jsou často spojeny s oslabujícími vedlejšími účinky, které odrazují od dodržování léčby (Corponi et al., 2018).

Nežádoucí reakce na léky obecně způsobují přibližně 7 % všech hospitalizací (u osob nad 70 let to činí 30 %). Hlavním dnes známým faktorem pro interindividuální rozdíly v odpovědi na léky je variabilní farmakokinetika, která je způsobena hlavně rozdíly v aktivitě enzymů cytochromu P450 podílejících se na metabolismu klinicky používaných léků (Ingelman-Sundberg a Sim, 2010).

Farmakogenetika, věda věnující se identifikaci genů ovlivňujících odpověď na farmakoterapii, zažila v 50. letech průlom zjištěním, že variabilita v oxidaci debrisoquinu (lék na hypertenzi) ukazuje na dědičné vzorce. Objev byl následován identifikací souvisejících genetických variant v genu kódujícím enzym cytochromu P450 (CYP) 2D6 (Arranz a Kapur, 2008).

Polymorfní povaha genů CYP do značné míry ovlivňuje individuální reakci na léky a jejich nežádoucí účinky. Tato genetická variabilita zahrnuje CNV (copy number variations), missense mutace, inserce, delece a mutace ovlivňující genovou expresi a aktivitu (Ingelman-Sundberg et al., 2007). Na základě genových polymorfismů rozlišujeme: pomalé metabolizátory (PM), intermediární metabolizátory (IM), extenzivní metabolizátory (EM) a ultrarychlé metabolizátory (UM).



## 2 METABOLISMUS LÉČIV

Metabolismus je definován jako proces přeměny chemických látek z jedné chemické skupiny na druhou pomocí funkčního enzymu. Primárním účelem metabolismu je vylučování endogenních a/nebo exogenních molekul z těla. Metabolismus léčiva obvykle vede k tvorbě hydrofilní (ve vodě rozpustné) sloučeniny, která se snadno vylučuje. Léky (obvykle malé molekuly) jsou řazeny mezi xenobiotika, látky organismu cizí. Několik endogenních molekul (steroidy a hormony) se však také využívají k léčbě a jsou označovány pojmem léčiva (Almazroo et al., 2017). Enzymatická funkce v některých případech zahrnuje přeměnu léčiv z farmakologicky neaktivních (proléčiva) na aktivní formy. Farmakologicky neaktivní proléčiva mají obměněnou strukturu čímž překonávají problémy s absorpcí a poté jsou metabolickou transformací převáděny na aktivní formy léčiv (Elliot et al., 2020).

Metabolismus (biotransformace) probíhá převážně v játrech, ale také v ledvinách či plicích. Nejčastěji je biotransformace dělena na 2 fáze. Během první fáze biotransformace dochází ke změně struktury léčiva (především oxidací, ale i redukcí a hydrolýzou) zavedením polární funkční skupiny do lipofilní sloučeniny. První fáze biotransformace se účastní enzymy cytochromu P450. Produkty první fáze biotransformace mohou být vyloučeny v tomto stavu nebo dále postupují do druhé fáze, kde dochází ke konjugaci s endogenními substráty za vzniku hydrofilních sloučenin, což způsobuje lepší rozpustnost látky ve vodě a tím snazší eliminaci (Benedetti et al., 2009).

### **3 POLYMORFISMUS**

Jako polymorfismus je označován stav, kdy v populaci pro určití znak existují minimálně dvě alely (varianty), přičemž frekvence výskytu každé alely musí být vyšší nebo rovna 1 %. V případě frekvence nižší než 1 % se jedná o mutaci, nikoli o polymorfismus. Nejběžnější polymorfismy jsou potenciální regulační polymorfismy umístěné v nekódujících oblastech, včetně promotorových/upstreamových, downstreamových a intronových oblastí, které mohou ovlivnit transkripci (Chorley et al., 2008). Genové polymorfismy mohou být důsledkem náhodných procesů anebo mohou být způsobeny vnějšími činiteli, jako jsou viry nebo UV záření, ty však častěji nazýváme mutace. Polymorfismy vznikají primárně prostřednictvím nových změn v genetickém materiálu tzn., mutací. Mutace může být způsobena záměnou jednoho typu nukleotidu za jiný, inzercí, delecí nebo přeskupením nukleotidu. V případě, že se mutace rozšíří na více než 1 % populace mluvíme o polymorfismu. Takto vzniklý polymorfismus je přirozeně děděn z rodiče na potomka. Obecně jsou rozlišovány 3 typy DNA polymorfismů: bodové polymorfismy (SNP), tandemové repetice a variabilita počtu kopií (CNV) (Ismail a Essawi, 2012). Pro účely této diplomové práce jsou nejdůležitější jednonukleotidové polymorfismy.

#### **3.1 JEDNONUKLEOTIDOVÝ POLYMORFISMUS (SNP)**

Jednonukleotidový polymorfismus nebo také SNP (single nucleotide polymorphism) je jednonukleotidová změna ve složení sekvence DNA, přičemž se tyto změny ve většině genomů obvykle vyskytují s frekvencí jedna na každých 300 – 1 000 párů bází (bp) (Aitken et al., 2004). Vzhledem k faktu, že 99,9 % lidského genomu je v rámci populace identických, SNP způsobují rozdíly mezi jednotlivci a vytvářejí variabilitu na úrovni 0,01 % (Liu, 2007). Mutační mechanismy spočívají buď v tranzici purinu za purin ( $A \leftrightarrow G$ ) nebo pyrimidinu za pyrimidin ( $C \leftrightarrow G$ ), nebo transverzí purinu za pyrimidin a naopak pyrimidinu za purin ( $A \leftrightarrow C$ ,  $A \leftrightarrow T$ ,  $G \leftrightarrow C$ ,  $G \leftrightarrow T$ ) (Vignal et al., 2002).

#### **3.2 TANDEMOVÉ REPETICE**

Termín tandemové repetice se používá k popisu tandemově se opakujících sekvencí DNA, známých také jako satelitní DNA (zahrnující mikrosatelity a minisatelity). Tandemové repetice mohou zahrnovat mononukleotidy, dinukleotidy, trinukleotidy (triplety), tetranukleotidy atd. Mikrosatelity mají délku do 10 bp. Tandemové repetice se sekvencí delší než horní limit pro mikrosatelity (tj. > 10 párů bází na délku) se tedy obecně nazývají minisatelity. Mikrosatelity a minisatelity v současnosti získávají větší pozornost díky jejich

vlivu na mezidruhovou genetickou rozmanitost a možnosti jejich využití jako genetických markerů v populačně genetických studiích (Ahmed a Liang, 2012).

### **3.2.1 MIKROSATELITY**

Jak již bylo výše zmíněno, mikrosatelity jsou sekvence DNA, kde se opakuje 1–10 bp. Nacházejí v genomu prokaryot i eukaryot, přičemž v lidském genomu mohou v některých případech způsobovat vážná onemocnění (např. Huntingtonova choroba způsobena trinukleotidovou repeticí). V lidském genomu jsou nejčastější dinukleotidové a trinukleotidové repetice. Mikrosatelity se ukázaly jako nesmírně cenný nástroj pro mapování genomu mnoha organismů. Jejich využití pokrývá různé oblasti genetiky od forezní až po populační genetiku (Zane et al., 2002).

### **3.2.2 MINISATELITY**

Minisatelity jsou obvykle definovány jako tandemové repetice krátké sekvence (do 100 bp). Ačkoliv první popsání příklady mikrosatelitů byly lidského původu, podobné struktury DNA byly nalezeny v mnoha organismech včetně bakterií. Obecně platí, že většina klasických minisatelitů je bohatá na GC repetice (Jeffreys et al., 1991).

## **3.3 VARIABILITA POČTU KOPIÍ (CNV)**

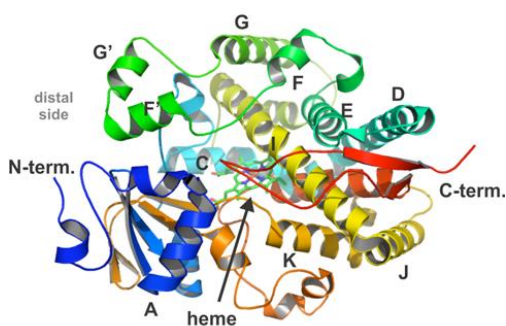
Zkratka CNV (Copy Number Variations) označuje segmenty DNA, u kterých byly pozorovány rozdíly v počtu kopií při srovnání dvou nebo více genomů. Jedná se o segment DNA, který je dlouhý 1 kb nebo více a je přítomen ve variabilním počtu kopií ve srovnání s referenčním genomem. Tato variabilita může být způsobena zisky (inzerce nebo duplikace) počtu genomických kopií nebo ztrátami (delece nebo nulové genotypy) vzhledem k určené referenční genomové sekvenci (Lee a Scherer, 2010). Takto definované změny v genomu jsou považovány za mezičlánek mezi mikroskopicky pozorovatelnými chromozomálními změnami a genetickými variantami na úrovni jednoho nukleotidu (SNP) (Zhang et al., 2009).

## 4 CYTOCHROM P450

Jako cytochromy P450 (CYP) označujeme velkou skupinu enzymů hrající klíčovou roli v odbourávání xenobiotik, v buněčném metabolismu a pro homeostázu. Jedná se o hemoproteinové enzymy, vyskytující se u živočichů, rostlin, hub a bakterií (Liu et al., 2013). V případě eukaryotických organismů se cytochromy P450 vyskytují vázané na membránu endoplazmatického retikula nebo mitochondrií, avšak u prokaryotických organismů jsou nevázané (rozpuštěné) formě. U savců se vyskytují ve všech tkáních, nejvyšší koncentrace je v játrech a tenkém střevě. Enzymy CYP P450 jsou také přítomny na vnitřních membránách mitochondrií steroidogenních tkání (kůra nadledvin, varlata, vaječníky aj.) a podílejí se zde na syntéze a degradaci endogenních steroidních hormonů. Enzymy CYP P450 navíc hrají důležitou roli v metabolismu vitamínů, oxidaci nenasycených mastných kyselin a biosyntéze cholesterolu. Byly dokumentovány i jejich specifické funkce v mozku, kde regulují endogenní agonisty receptoru GABAA, udržují homeostázu cholesterolu a eliminují retinoidy (Manikandan a Nagini, 2017).

### 4.1 STRUKTURA

CYP P450 mají ve svém aktivním místě hemovou prostetickou skupinu. Obecně je tvar CYP P450 popisován jako trojúhelníkový hranol skládající se z 12  $\alpha$  helixů a 5 antiparalelních  $\beta$  skládaných listů. Hem je uložen mezi dvěma  $\alpha$  helixy (I a L) a je situován na dně velké vnitřní kapsy, která je obklopená hydrofobními zbytky aminokyselin (Omura, 1999). Atom železa je vázán na pět dalších molekul: čtyři z nich jsou dusíky pyrrolu, které jej udržují ve vodorovné rovině, zatímco pátá skupina, atom síry z cysteinového zbytku aminokyseliny, váže železo ve svislé rovině. Tato struktura, známá jako pentakoordinovaný stav, představuje klidový stav, zatímco hexakoordinovaný stav nastává, je-li železo vázáno jiným ligandem. Tato struktura (Ferriprotoporphyrin IX) je udržována na místě pomocí vodíkových vazeb a řady aminokyselinových zbytků (400-500). Železo má zásadní význam pro katalytickou funkci enzymů CYP (Otyepka et al., 2012). Na obrázku č. 1 je znázorněna struktura CYP P450.



Obr. 1: Struktura cytochromu P450 (konkrétně CYP3A4). Převzato z (Otyepka et al., 2012).

## 4.2 NOMENKLATURA

Název P450 cytochromy získaly díky charakteristickému absorpčnímu maximu v UV-VIS spektru při 450 nm v redukovaném stavu v komplexu s oxidem uhelnatým nepodobající se jiným známým proteinům té doby. Písmeno P je pak zkratkou pro pigment, jelikož původně byly objeveny jako buněčné pigmenty. Nadrodina (superfamily) CYP zahrnuje více než 13 000 genů představujících více než 400 genových rodin zahrnujících členy napříč všemi říšemi organismů. Enzymy jsou označeny písmeny „CYP“ a arabskou číslicí označující rodinu CYP (např. CYP1, CYP2, CYP3). Poté následuje písmeno označující podrodinu (např. CYP1A) a další arabská číslice, která představuje individuální gen / izoenzym / isozym / izoformu (např. CYP1A1). Členové rodiny CYP se liší v primární struktuře (aminokyselinových sekvencích), substrátových specifitách a distribuci v tkáních. Aminokyselinové sekvence ve stejné rodině vykazují 40 % homologii, zatímco sekvence v dané subrodině jsou více než z 55 % identické (např. CYP2A6 a CYP2A7). Doposud bylo u lidí popsáno nejméně 57 různých genů CYP a 58 pseudogenů. V současnosti je známo 18 různých rodin a 44 subrodin, avšak z hlediska jaterního metabolismu xenobiotik jsou nejaktivnější cytochromy z rodiny 1, 2 a 3 (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 a 3A4). Ostatní rodiny mají důležité endogenní funkce (Daly et al., 1996).

Tab. I: Klasifikace lidských cytochromů P450 na základě hlavní substrátové třídy. Převzato z (Manikandan a Nagini, 2017)

| <b>Substrátová třída</b> | <b>CYP enzymy</b>  |
|--------------------------|--|
| Steroly                  | 1B1, 7A1, 7B1, 8B1, 11A1, 11B1, 11B2, 17A1, 19A1, 21A2, 27A1, 39A1, 46A1, 51A1 |
| Xenobiotika              | 1A1, 1A2, 2A6, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1, 3A4, 3A5, 3A7   |
| Mastné kyseliny          | 2J2, 4A11, 4B1, 4F12   |
| Eikosanoidy              | 4F2, 4F3, 4F8, 5A1, 8A1  |
| Vitamíny                 | 2R1, 24A1, 26A1, 26B1, 26C1, 27B1  |
| Neznámé                  | 2A7, 2S1, 2U1, 2W1, 3A43, 4A22, 4F11, 4F22, 4V2, 4X1, 4Z1, 20A1, 27C1          |

## 4.3 CYP2D6

V lidském genomu je kódováno mnoho enzymů cytochromu P450. Enzym CYP2D6 je bezkonkurenčně nejvíce prozkoumaný a z hlediska metabolismu léčiv je považován za nejdůležitější. Jeho aktivita se různí od úplné absence po zvýšenou. CYP2D6 metabolizuje mnoho léčiv, včetně antidepresiv a antipsychotik.

### 4.3.1 HISTORIE

V 70. letech minulého století byl u malého procenta pacientů pozorován deficientní metabolismus léků debrisoquin a spartein, což vyprovokovalo další výzkumy. Bylo zjištěno, že se tento problém týká i mnoha dalších léčiv. V roce 1984 došlo k purifikaci proteinu CYP2D6 a mapování genu, který se nachází na chromozomu 22q13. Později byl gen *CYP2D6* klonován a sekvenován, což vedlo k objevení dvou dalších genů: nefunkčního *CYP2D7P* a pseudogenu *CYP2D8P*. Jako první byly v roce 1990 identifikovány genetické varianty zodpovědné za zpomalený metabolismus. Jednalo se o alely *CYP2D6\*3* a *CYP2D6\*4*, tehdy však s jiným názvem. Díky technickému pokroku, konkrétně polymerázové řetězové reakci (PCR) a Sangerovu sekvenování, byly odhaleny další varianty genu *CYP2D6*. S očekáváním dalších objevů bylo zapotřebí systematicky označit rostoucí počet variant. V roce 1996 byl tedy popsán hvězdičkový nomenklaturní systém používaný dodnes u všech variant cytochromu P450 (Nofziger et al., 2019).

Tab. II: Hlavní polymorfní alely *CYP2D6* a jejich distribuce. Převzato z (Ingelman-Sundberg, 2005).

| Polymorfní alely | Mutace                        | Důsledek                     | Frekvence alely (%) |        |         |                    |
|------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------|--------|---------|--------------------|
|                  |                               |                              | Běloši              | Asiaté | Černoši | Etiopiané, Arabové |
| CYP2D6*2         | Duplikace genu/multiduplikace | Zvýšená aktivita enzymu      | 1-5                 | 0-2    | 2       | 10-16              |
| CYP2D6*4         | Defektní splicing             | Neaktivní enzym              | 12-21               | 1      | 2       | 1-4                |
| CYP2D6*5         | Delece genu                   | Žádný enzym                  | 2-7                 | 6      | 4       | 1-3                |
| CYP2D6*10        | P34S, S486T                   | Nestabilní enzym             | 1-2                 | 51     | 6       | 3-9                |
| CYP2D6*17        | T107I, R296C, S486T           | Změněná afinita k substrátům | 0                   | 0      | 20-35   | 3-9                |

### **4.3.2 POLYMORFISMUS**

Gen *CYP2D6* se nachází na 22. chromozomu (22q13.1), kde společně s pseudogeny *CYP2D7P* a *CYP2D8P* tvoří genový klastr CYP2D. Varianty alel *CYP2D6* lze rozdělit do kategorií, které způsobují nulovou, sníženou, normální, zvýšenou nebo kvalitativně pozměněnou katalytickou aktivitu. Jsou známy čtyři hlavní fenotypové projevy polymorfismu *CYP2D6*. Jedná se o pomalé metabolizátory (PM), intermediární metabolizátory (IM), extenzivní metabolizátory (EM) a ultrarychlé metabolizátory (UM).

#### **POMALÍ METABOLIZÁTOŘI**

Zkratka PM vychází z anglického „poor metabolizer“. Jedná se o pacienta, který nese nefunkční alely v homozygotním stavu. U pacientů, kteří jsou klasifikováni jako PM dochází k velmi pomalému rozkládání léků, což vede k akumulaci léčiva a jeho vedlejším účinkům. To také znamená, že standardní dávky určitých léků nemusí správně fungovat (Zanger a Schwab, 2013).

#### **INTERMEDIÁRNÍ METABOLIZÁTOŘI**

V případě IM se jedná o heterozygoty, nesoucí kombinaci normální a nefunkční alely. V tomto případě může zpomalený metabolismus ovlivnit rozpad léků a způsobit podobné účinky jako u PM (Zanger a Schwab, 2013).

#### **EXTENZIVNÍ METABOLIZÁTOŘI**

EM jsou považováni za standard, nesou ve svém genomu obě funkční alely a rychlost jejich metabolismu je tedy normální. Tito pacienti metabolizují léčivo normálně a je pravděpodobné, že léky budou fungovat podle plánu. Většina lidské populace jsou EM (Tamminga et al., 2003).

#### **ULTRARYCHLÍ METABOLIZÁTOŘI**

Posledním extrémem jsou UM, kdy pacienti nesou duplikované či amplifikované geny. UM metabolizují léky příliš rychle na to, aby stihly účinkovat a je tedy zapotřebí vyšší dávka léčiva (Tamminga et al., 2003).

V současné době je známo více než 100 různých hlavních polymorfních alel *CYP2D6*. Přítomnost podobných, blízce umístěných pseudogenů nesoucích škodlivé mutace vedla například k nerovnoměrným křížovým reakcím a tvorbě mnoha variantních alel *CYP2D6*,

které nejčastěji kódují defektní genové produkty. „Aktivita“ v lokusu CYP2D je vysoká ve srovnání například s lokusem CYP2C a v důsledku toho bylo za relativně krátkou dobu vytvořeno mnoho variantních alel. Normální WT (wild type) alelou je *CYP2D6\*1*. Nejběžnější variantní alely distribuované v různých etnických skupinách jsou uvedeny v tabulce II. Mezi nejdůležitější varianty patří *CYP2D6\*2*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5*, *CYP2D6\*10*, *CYP2D6\*17* a *CYP2D6\*41* (Ingelman-Sundberg, 2005). Alely genu *CYP2D6* se v rámci lidského genomu vyskytují ve dvou kopiích, přičemž tyto alely nemusí být shodné. Vznikají pak kombinace (diplotypy), které vykazují specifickou metabolickou aktivitu. Příkladem je *CYP2D6 \*1/\*1*, který vykazuje normální metabolickou funkci a jedná se o tzv. WT nemutovaný genotyp (Nofziger et al., 2019).

V následující tabulce (Tab. III) jsou vypsány jednotlivé polymorfismy rozdělené dle typu metabolismu. V případě UM se jedná o duplikované či multiduplikované alely. Data byla získána z databáze [www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org).

Tab. III: Rozdělení polymorfních alel *CYP2D6* podle druhu metabolismu.

| Fenotyp                | Alely <i>CYP2D6</i>   |
|------------------------|---|
| EM (normální aktivita) | *1, *2, *27, *33, *34, *35, *39, *45, *46, *48, *53   |
| PM (nefunkční alely)   | *3, *4, *5, *6, *7, *8, *11, *12, *13, *15, *18, *19, *20, *21, *31, *36, *38, *40, *42, *44, *47, *51, *56, *57, *60, *62, *68, *69, *81, *92, *96, *99, *100, *101, *114, *120, *124, *129,   |
| IM (snížená aktivita)  | *9, *10, *14, *17, *29, *41, *49, *50, *54, *55, *59, *72   |
| UM (zvýšená aktivita)  | *1x2, *2x2, *2x3, *35x2, *45x2  |
| nejistý/neznámý        | *22, *23, *24, *25, *26, *28, *30, *32, *37, *43, *52, *58, *61, *63, *64, *65, *70, *71, *72, *73, *74, *75, *82, *83, *84, *85, *86, *87, *88, *89, *90, *91, *93, *94, *95, *97, *98, *102, *106, *109, *103, *104, *105, *107, *108, *110, *111, *112, *113, *115, *116, *117, *118, *119, *121, *122, *123, *125, *126, *127, *128, *130, *131, *132, *133, *134, *135, *136, *137, *138, *139 |

#### 4.3.3 LÉKOVÉ INTERAKCE OVLIVNĚNÉ POLYMORFISMY *CYP2D6\*3*, *\*4*, *\*5*

V experimentální části této práce byly vyšetřovány polymorfismy *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4* a *CYP2D6\*5*. Alela *CYP2D6\*3* je mutace posunu čtecího rámce způsobená delecí 1 bp (2637delA) v exonu 5. V případě alely *CYP2D6\*4* jde o nesprávný sestřih v důsledku přechodu 1934G→A na spojnici intronu 3 a exonu 4. Alela *CYP2D6\*5* je charakterizována delecí celého genu *CYP2D6* (Bertilsson et al., 2002). Enzym CYP2D6 ovlivňuje například metabolismus paroxetinu, risperidonu, venlafaxinu či haloperidolu.



Pacienti nesoucí alelu *CYP2D6*\*3, *CYP2D6*\*4 nebo *CYP2D6*\*5 v kombinaci s jinou nefunkční alelou nebo alelou se sníženou funkcí vykazují snížený metabolismus risperidonu ve srovnání s pacienty se dvěma alelami s normální funkcí (Lisbeth et al., 2015; Vandenberghe et al., 2015).

*CYP2D6*\*3, \*4 a \*5 jsou u lidí s depresí spojeny se zvýšeným rizikem toxicity při léčbě antidepressivy paroxetinem nebo venlafaxinem. Přítomnost zmíněných alel způsobuje zvýšenou plazmatickou koncentraci paroxetinu ve srovnání s genotypem *CYP2D6*\*1/\*1, což naznačuje horší odbourávání léčiva (Charlier et al., 2003). Dále je genotyp *CYP2D6*\*4/\*4 spojen se sníženým metabolismem haloperidolu ve srovnání s *CYP2D6*\*1/\*1 nebo \*1/\*4 (Desai et al., 2003).

Genotypy *CYP2D6* 3/\*4, \*4/\*4 a \*4/\*5 jsou v odborné literatuře zmiňovány v souvislosti se sníženým metabolismem venlafaxinu (Jornil et al., 2013). *CYP2D6*\*4/\*4 je při léčbě venlafaxinem spojen s vedlejšími účinky, jelikož pacienti s kombinací *CYP2D6*\*4/\*4 a *CYP2C19*\*2/\*2 vysazovali venlafaxin kvůli ospalosti a nevolnosti (Johnson et al., 2006).

## 4.4 CYP2C19

CYP2C19 je jaterní enzym, který je v současné klinické praxi zodpovědný za metabolismus až 10 % léčivých přípravků, mimo jiné i psychofarmak. Gen *CYP2C19* je jedním ze čtyř genů podrodiny *CYP2C*, umístěných na chromozomu 10q23.33. Sekvenční polymorfismy v tomto genu vedou převážně ke špatnému metabolismu léčiv (PM) (Blaisdell et al., 2002).

### 4.4.1 HISTORIE

V roce 1984 byla poprvé popsána defektní hydroxylace antikonvulzivního léku mefenytoin (lék potlačující epileptické záchvaty) u zdravých dobrovolníků, kde byl zjištěn nedostatečný metabolismus. Mefenytoin byl následně použit jako léčivo vedoucí k odlišení mezi normálními a pomalými metabolizátory. Na základě vědeckých studií byl zmíněný typ metabolismu důsledkem variabilní exprese genu cytochromu P450 2C19 (*CYP2C19*). Gen *CYP2C19* byl poprvé charakterizován v roce 1991. První varianta alely *CYP2C19*, která se podílí na pomalém metabolismu (*CYP2C19*\*2), byla popsána v roce 1994. Následně byly definovány další varianty a stále jsou identifikovány nové (Botton, et al., 2020).

### 4.4.2 POLYMORFISMUS

Podobně jako *CYP2D6* je gen *CYP2C19* vysoce polymorfní a v současnosti je známo 35 genových variant. Polymorfismy *CYP2C19* se objevují s různou četností v rámci jednotlivých etnických skupin. Alely se vyskytují v diplotypech a svou kombinací tvoří

specifický typ metabolismu. Za normální neboli WT alelu je považována alela *CYP2C19*\*1, která je také nejčastěji zastoupená v populaci. Ačkoli mnoho variant *CYP2C19* bylo hlášeno jako nefunkční, významným objevem ve farmakogenetice *CYP2C19* byla identifikace alely *CYP2C19*\*17, která je spojena se zvýšenou aktivitou enzymu a rychlejší clearance léčiva (Wedlund, 2000). V tabulce níže (Tab. IV) jsou vypsány jednotlivé varianty a jejich přiřazení k typu metabolismu.

Tab. IV: Rozdělení polymorfismů *CYP2C19* podle typu metabolismu.

| Fenotyp                | Alely <i>CYP2C19</i>                           |
|------------------------|--|
| EM (normální aktivita) | *1, *11, *18, *28, *38                         |
| PM (nefunkční alely)   | *2, *3, *4, *5, *6, *7, *8, *22, *35, *36, *37 |
| IM (snížená aktivita)  | *9, *10, *19, *25, *26                         |
| UM (zvýšená aktivita)  | *17  |
| nejistý/neznámý        | *12, *14, *29, *30, *31, *32, *33, *34         |

#### 4.4.3 LÉKOVÉ INTERAKCE OVLIVNĚNÉ POLYMORFISMY *CYP2C19*\*2 a \*3

V experimentální části byly vyšetřovány polymorfismy *CYP2C19*\*2 a *CYP2C19*\*3. U *CYP2C19*\*2 substituce báze C681G>A způsobila defektní sestřih a v případě *CYP2C19*\*3 substituce báze C636G>A vytváří dřívější stop kodon, což způsobí vznik zkráceného proteinu.

Enzym *CYP2C19* je relevantní pro metabolismus mnoha psychofarmak (escitalopram, venlafaxin, sertralin aj.). Alely *CYP2C19*\*2 a \*3 jsou spojeny se zvýšenou hladinou citalopramu a escitalopramu ve srovnání s *CYP2C19*\*1 (Chang et al., 2013), zapříčiňují zvýšené riziko selhání léčby escitalopramem (Jukić et al., 2018) a obecně způsobují snížené odbourávání escitalopramu (oproti \*1) (Jin et al., 2010). Polymorfnní alela *CYP2C19*\*2 způsobuje snížený metabolismus venlafaxinu (Jornil et al., 2013). Polymorfismy genu *CYP2C19* taktéž ovlivňují metabolismus sertralínu, kdy genotypy \*2/\*2 a \*2/\*3 způsobují jeho snížený metabolismus (Bråten et al., 2019).

#### 4.5 *CYP2C9*

Enzym *CYP2C9* je polypeptid čítající 490 aminokyselin, který je tvořen v játrech. Z celkového množství enzymů CYP P450 tvoří 20 %. Tento enzym je kódován genem *CYP2C9* nacházejícím se na 10. chromozomu (10q24). Gen obsahuje 9 exonů a doposud bylo popsáno 30 SNP (Buzková et al., 2007).

CYP2C9 je zodpovědný za metabolizaci širokého spektra léčiv, včetně fenytoinu, tolbutamidu, warfarinu, ibuprofenu a mnoha nesteroidních protizánětlivých léčiv (Stubbins et al., 1996). Mimo jiné se tento enzym taktéž podílí na metabolismu několika důležitých psychoaktivních látek (tetrahydrokanabinol, fluoxetin, amitriptylin, fenytoin atd.). Aktivita CYP2C9 je modulována endogenními substráty, jako je adrenalin a serotonin. O CYP2C9 se taktéž hovoří ve spojení s metabolismem melatoninu. Kromě toho byla pozorována vazba mezi genetickými polymorfismy *CYP2C9* a *CYP2C8*. Tato asociace může být důležitá zejména pro metabolismus běžných substrátů enzymů CYP2C9 a CYP2C8, jako je kyselina arachidonová, která souvisí s výskytem depresí (Llerena et al., 2003).

#### 4.5.1 POLYMORFISMUS

Stejně jako ostatní výše zmíněné enzymy, je enzym CYP2C9 silně polymorfní. Velké části objevených polymorfismů však zatím nebyla přiřazena funkce. Rozdílem oproti enzymům CYP2D6 a CYP2C19 je absence UM. Kromě *CYP2C9\*1* (WT) jsou nejčastěji se vyskytujícími alelami *CYP2C9\*2* a *CYP2C9\*3*. Polymorfní alela *CYP2C9\*2* (rs1799853) je způsobena změnou aminokyselin Arg144Cys, zatímco *CYP2C9\*3* (rs1057910) Ile359Leu (Sistonen et al., 2008). V tabulce níže (Tab. V) jsou vypsány jednotlivé polymorfismy a k nim přiřazené fenotypové projevy.

Tab. V: Rozdělení polymorfismů *CYP2C9* podle typu metabolismu.

| Fenotyp                | Alely <i>CYP2C9</i>  |
|------------------------|--|
| EM (normální aktivita) | *1, *9   |
| PM (nefunkční alely)   | *6, *15, *24, *25, *35, *39, *42, *43, *45, *52  |
| IM (snížená aktivita)  | *2, *3, *4, *5, *8, *11, *12, *13, *14, *16, *23, *26, *28, *29, *30, *31, *33, *37, *38, *44, *46, *50, *55, *58, *59, *60, *61 |
| nejistý/neznámý        | *7, *10, *17, *18, *19, *20, *21, *22, *27, *32, *34, *36, *40, *41, *47, *48, *49, *51, *53, *54, *56, *57                      |

#### 4.5.2 LÉKOVÉ INTERAKCE OVLIVNĚNÉ POLYMORFISMY *CYP2C9\*2* a *\*3*

Enzym CYP2C9 je především spojován s metabolismem ibuprofenu a warfarinu, je však součástí metabolických drah některých psychofarmak mezi nimi i olanzapinu. Pacienti s genotypy *CYP2C9\*1/\*3* a *\*2/\*3* mají zvýšenou pravděpodobnost hypotenze při léčbě olanzapinem (Cabaleiro et al., 2013). U pacientů nesoucí alely \*2 a \*3 byly naměřeny zvýšené hladiny olanzapinu ve srovnání s pacienty s alelami \*1. Zmíněné alely jsou taktéž zodpovědné za pocity závratí při užívání olanzapinu (Zubiaur et al., 2021).

## 4.6 CYP1A2

CYP1A2 je jedním z nejdůležitějších enzymů CYP v lidských játrech a tvoří asi 15 % všech enzymů cytochromu P450. Oxiduje více než 20 různých látek, včetně kofeinu, propranololu a antipsychotik clozapinu, olanzapinu nebo paroxetinu. CYP1A2 vykazuje značné interindividuální rozdíly. Enzym je indukován kouřením tabáku; aktivita enzymů je vyšší u mužů než u žen a vyšší u žen, které neužívají perorální antikoncepci, ve srovnání s těmi, které ji užívají. Kromě těchto okolností jsou interindividuální rozdíly způsobeny převážně genetickými faktory. Gen *CYP1A2* se nachází na 15. chromozomu (15q24.1) společně s *CYP1A2* a *CYP1B1*. Uvnitř genu se nachází 6 intronů a 7 exonů (Ou-Yang et al., 2000).

### 4.6.1 POLYMORFISMUS

Základní nemutovanou WT alelou je *CYP1A2\*1A*, která se vyskytuje nejčastěji. Genové variace v *CYP1A2* zahrnují hlavně variace v intronech a promotoru. Nejběžnější genová variace je *CYP1A2\*1F*, která má na svědomí zvýšenou enzymatickou aktivitu CYP1A2. Tato alela obsahuje jednu variantu, která se nachází v intronu 1. Z alel se sníženou aktivitou je nejběžnější *CYP1A2\*1C*. Tato alela vykazuje genetickou variabilitu v oblasti promotoru. Ostatní alely se sníženou nebo chybějící aktivitou se vyskytují zřídka. U řady alel (*CYP1A2\*1B*, *CYP1A2\*1D*, *CYP1A2\*1E*) nebyla pozorována žádná změna aktivity enzymu. Tyto alely jsou považovány za WT (stejně jako *CYP1A2\*1A*) (Cornelis et al., 2010).

S účinností antipsychotik je spojován polymorfismus rs4646425, který má vliv na rozdílnou odpověď pacientů na escitalopram či paroxetin (Kuo et al., 2013). Tento polymorfismus má za následek substituci bázi C↔T, což slouží taktéž k označení variant (C/T, C/C, T/T). V následující tabulce (Tab. VI) jsou vypsány jednotlivé polymorfismy rozdělené dle typu metabolismu. Data byla získána z databází [www.ebmconsult.com](http://www.ebmconsult.com) a [www.knmp.nl](http://www.knmp.nl).

Tab. VI: Rozdělení polymorfismů *CYP2C9* podle typu metabolismu.

| Fenotyp                | Alela <i>CYP1A2</i>                    |
|------------------------|--|
| EM (normální aktivita) | *1A, *1B, *1D, *1E, *14                |
| PM (nefunkční alely)   | *1K, *3, *4, *6, *7, *8, *11, *15, *16 |
| IM (snížená aktivita)  | *1C                                    |
| UM (zvýšená aktivita)  | *1F                                    |
| nejistý/neznámý        | *1J, *2, *5, *9, *10, *12, *13         |

#### **4.6.2 LÉKOVÉ INTERAKCE OVLIVĚNÉ POLYMORFISMEM CYP1A2 RS4646425**

Vyšetřovaný polymorfismus CYP1A2 rs4646425 se projevuje především vedlejšími účinky, proto na základě jednotlivých genotypů nelze přímo stanovit míru metabolismu. Alela T je ve srovnání s alelou C spojena se zvýšeným metabolismem escitalopramu, proto pacienti s genotypy C/T a T/T mohou potřebovat vyšší dávku léčiva. Dále je alela T spojena s nevolností a zvracením při léčbě escitalopramem. U alely T je navíc pozorována zvýšená únava při léčbě escitalopramem (Kuo et al., 2013).

Genotyp C/C je spojen s pomalejší odezvou při léčbě paroxetinem ve srovnání s genotypy C/T a T/T. Pacienti s alelou T mají sníženou pravděpodobnost remise při léčbě paroxetinem (Lin et al., 2010).

### **5 KATECHOL-O-METYL TRANSFERÁZA (COMT)**

Katechol-O-methyltransferáza (COMT) je enzym katalyzující přenos methylové skupiny S-adenosyl-L-methioninu na jednu z fenolických skupin katecholového substrátu v přítomnosti  $Mg^{2+}$  a podle sekvenčně uspořádaného mechanismu. COMT je převážně aktivní ve stěnách jater, ledvin a střev. *COMT* gen je lokalizován na chromozomu 22q11.1-q11.2. Jeden gen *COMT* kóduje dva oddělené enzymy, rozpustnou (S-COMT) a membránově vázanou formu (MB-COMT). Forma MB-COMT je částečně zodpovědná za blokování dopaminergní a noradrenergní synaptické neurotransmise. MB-COMT je o 50 aminokyselin delší, ale jinak identický s S-COMT. S-COMT je vysokokapacitní enzym odpovědný za eliminaci biologicky aktivních nebo toxických látek, zejména exogenních katecholů a některých hydroxylovaných metabolitů (Männistö, 1997).

#### **5.1 POLYMORFISMUS *COMT* VAL158MET**

Ve většině tkání jsou dvě délkové varianty proteinu COMT exprimovány ze dvou transkriptů mRNA, dlouhé mRNA a krátké mRNA. Dlouhá mRNA je přítomna ve všech studovaných tkáních a je schopná produkovat jak S-COMT, tak MB-COMT ze dvou různých iniciačních míst. Krátká mRNA kóduje pouze S-COMT a je přítomna ve větším množství než dlouhá mRNA ve všech studovaných tkáních kromě mozku. MB-COMT je tedy dominujícím izoenzymem v lidském mozku a S-COMT v ostatních tkáních (Lundstrom et al., 1995).

Gen *COMT* byl zkoumán jako kandidátský gen u mnoha neurologických poruch zahrnujících katecholaminergní systémy (deprese, schizofrenie aj.). Již v minulosti byla zjištěna rozdílná

aktivita genu COMT v erythrocytech a játrech. Nyní je známo, že tento rozdíl v aktivitě enzymu je způsoben substitucí aminokyselin. Změna jediného páru bází (G↔A) v exonu 4 genu *COMT*, v poloze 472 v dlouhé mRNA a v poloze 322 v krátké mRNA, vede ke změně aminokyseliny Val↔Met, v kodonu 158 MB-COMT a kodonu 108 S-COMT, což snižuje aktivitu enzymu COMT 3 až 4krát. Tento polymorfismus je také označován kódem rs4680. Tyto dvě alely se mohou v literatuře označovat jako *COMT\*H* (G; Val), která kóduje termostabilní, vysoce aktivní enzym, a *COMT\*L* (A; Met), která kóduje termolabilní enzym s nízkou aktivitou (Palmatier et al., 1999).

Pacienti, homozygotní pro valinovou formu (Val/Val), mají vysoce aktivní enzym COMT, což může mít za následek nedostatek dopaminu, vyšší práh bolesti a lepší odolnost vůči stresu. Naproti tomu genotyp Met/Met vede k hypoaktivnímu enzymu a způsobuje vyšší hladinu dopaminu v synaptické štěrbině, takoví lidé mají nižší práh bolesti a zvýšenou citlivost vůči stresu. Existují také heterozygoti Val/Met, nesoucí obě varianty enzymu. Jsou spojeny s intermediální funkcí a jsou často považovány za normální vzhledem k aktivitě enzymu (Konopka, 2014).

## **5.2 LÉKOVÉ INTERAKCE OVLIVNĚNÉ POLYMORFISMEM VAL158MET**

COMT inaktivuje noradrenalin a dopamin prostřednictvím methylové konjugace. Přestože serotonin není inaktivován touto katabolickou cestou, polymorfismus rs4680 ovlivňuje antidepressivní odpověď na fluoxetin a paroxetin (SSRI). Vyšší aktivita enzymu v tomto případě znamená horší odpověď na léčbu (Benedetti et al., 2010). Pacienti s genotypem Val/Val mohou mít sníženou odpověď na léčbu paroxetinem ve srovnání s pacienty s genotypy Met/Met nebo Val/Met (Benedetti et al., 2008). Pacienti s genotypem Val/Met trpící schizofrenií mohou mít při léčbě haloperidolem zvýšené riziko vzniku extrapyramidových symptomů ve srovnání s pacienty s genotypem Val/Val nebo Met/Met (Zivković et al., 2013). Děti s genotypem Val/Met a Met/Met mohou mít při léčbě antipsychotiky zvýšený krevní tlak ve srovnání s pacienty s genotypem Val/Val (Cote et al., 2014). Genotyp Val/Val je spojen se zvýšenou odpovědí na clozapin u lidí se schizofrenií ve srovnání s genotypy Val/Met a Met/Met. Pacienti s genotypem Val/Val zaznamenali větší zlepšení v případě pozitivních i negativních příznaků (Bosia et al., 2015).

## **6 PSYCHICKÁ ONEMOCNĚNÍ**

Psychická onemocnění představují skupinu poruch, které ovlivňují především lidské myšlení, prožívání a vztahy daného jedince. Vymežit přesně pojem psychické onemocnění je značně komplikované. Psychické zdraví, resp. jeho porucha jsou pojmy kulturně a časově podmíněné. WHO stanovila definici psychického zdraví v roce 1946 jako „stav pohody, ve kterém si každý jedinec uvědomuje svůj vlastní potenciál, zvládá běžný životní stres, může produktivně a plodně pracovat přispívat své komunitě“. Nejedná se tedy pouze o absenci nemoci či poruchy. Psychické onemocnění by se tedy dalo považovat za nedostatek psychického zdraví. Podle současného pojetí se na vzniku duševních chorob podílejí tři faktory – biologické, psychologické a sociální. U různých onemocnění v různém poměru a vzájemně se prolínají (Galderisi et al., 2015).

### **6.1 DEPRESIVNÍ PORUCHA**

Depresivní porucha neboli deprese je vysilující onemocnění charakterizované depresivní náladou, ztrátou zájmů, zhoršenou kognitivní funkcí a vegetativními příznaky, jako je narušený spánek nebo chuť k jídlu. Depresivní porucha se vyskytuje asi dvakrát častěji u žen než u mužů a postihuje jednoho ze šesti dospělých za celý život. Dědičnost depresivní poruchy se odhaduje na přibližně 35 %. (Otte et al., 2016).

#### **6.1.1 KLINICKÉ PROJEVY**

Za účelem diagnostiky depresivní poruchy je stěžejní, aby pacient vykazoval pět (nebo více) z následujících symptomů:

1. Depresivní nálada.
2. Výrazně snížený zájem nebo potěšení ze všech (nebo téměř ze všech) činností.
3. Značné ubývání nebo naopak přibývání na váze (změna chuti k jídlu).
4. Insomnie nebo hypersomnie (nespavost, přílišná spavost).
5. Psychomotorická agitace nebo retardace (agitace = neklid, bezúčelné pohyby; retardace = neschopnost pohybu).
6. Únava nebo ztráta energie.
7. Pocity bezcennosti a viny.
8. Nerozhodnost, neschopnost se soustředit.
9. Opakované myšlenky na smrt, pokus o sebevraždu.

Jako další diagnostická metoda je také využívána Beckova stupnice pro hodnocení deprese, vycházející ze série otázek. Na základě odpovědí je poté lékařem vyhodnocována závažnost deprese a je stanovena odpovídající terapie (Beck et al., 1961).

### **6.1.2 TERAPIE**

Při léčbě středně těžké až těžké deprese se doporučuje farmakoterapie a psychoterapie (kombinovaná léčba). Pokud je deprese mírná až středně těžká, pacient je motivován k práci na psychologických/interpersonálních problémech je zvolena psychoterapie (Robinson et al., 2004). Pro léčbu deprese je dostupných více než 40 skupin antidepresiv, které mají různé mechanismy účinku a farmakokinetické parametry. Farmakoterapie má 3 fáze – akutní, udržovací a preventivní. V lékárně lze zakoupit antidepresiva bez předpisu (Persen, Ataralgin aj.) či antidepresiva na přírodní bázi jako jsou tablety obsahující třezalku. Na předpis lze získat antidepresiva I., II., a III. generace, které budou blíže rozebírány v kapitole 7 Psychofarmaka (Fava and Kendler, 2000).

## **6.2 SCHIZOFRENIE**

Schizofrenie je jedním z nejzávažnějších psychiatrických problémů. Jedná se o velmi častou psychickou poruchu postihující 1 % světové populace. Pacienti, u kterých se rozvine schizofrenie, velmi trpí. Přibližně 10 % z nich spáchá sebevraždu. Léčba dostupná od konce 90. let toto utrpení značně snižuje, ale přibližně 2/3 z těch, u kterých se rozvine schizofrenie, vyžadují veřejnou pomoc ze strany sociálního zabezpečení. Většina lidí se schizofrenií, se nedokáže ani nemůže vrátit do práce nebo do školy a vykazuje minimální sociální interakce (Andreasen, 2000).

### **6.2.1 KLINICKÉ PROJEVY**

Schizofrenie zhoršuje schopnost kreativně a nápaditě myslet, mít úzké sociální vztahy s jinými lidmi, používat jazyk k jasnému vyjadřování myšlenek nebo prožívat a vyjadřovat emoce, jako je láska a strach. Lidé se schizofrenií jsou mučeni dotěrnými komplikacemi, jako je slyšení hlasů nebo vírou, že jsou pronásledováni nebo zraňováni okolním prostředím či mimozemskými silami. Žádný jediný konkrétní znak nebo symptom nedefinuje schizofrenii. Je definována skutečností, že lidé trpící schizofrenií, pociťují abnormality v mnoha různých oblastech duševních činností (Arieti, 1971).

V roce 1973 stanovilo WHO 10 základních klinických projevů schizofrenie, které se v různém poměru projevovaly u pacientů. Jedná se o tyto příznaky bludy, nevhodné a neobvyklé chování, halucinace, hrubá psychomotorická porucha, sociální vyčlenění, poruchy myšlení,



ochromující strach, afektivní poruchy, depersonalizace a zanedbávání vlastní osoby (WHO, 1973). Tyto faktory byly lehce upraveny a pro diagnostiku je dnes používán podobný seznam projevů, přičemž schizofrenie je diagnostikována při přítomnosti alespoň dvou z nich.

1. Přetrvávající bludy.
2. Přetrvávající halucinace (nejčastěji sluchové, ale i v jakékoli smyslové modalitě).
3. Neuspořádané myšlení (např. tangenciální myšlení, volné asociace, irelevantní řeč)
4. Negativní příznaky (afektivní zploštění, nelogičnost, nemluvnost, avolice, asociálnost a anhedonie)
5. Neuspořádané chování (v jakékoli formě cílené činnosti, např. nepředvídatelné nebo nevhodné emoční reakce, bezúčelné nebo bizarní chování).
6. Psychomotorické poruchy (pohybový neklid, ztuhlost či ztráta artikulované řeči) (Gaebel and Zielasek, 2015).

Schizofrenie může mít chronický nebo epizodický průběh. Chronická schizofrenie se postupně zhoršuje a vede až k reziduální schizofrenii. Epizodická schizofrenie naopak střídá bezpříznakové období s psychotickými krizemi (atakami). Příznaky se dělí na pozitivní a negativní. Pozitivními příznaky se rozumí halucinace, bludy, inkoherece myšlení, výrazný neklid či nesouvislá stavba řeči. Negativními příznaky jsou naopak apatie, myšlenkové zchudnutí, afektivní zploštění a neschopnost prožívat radost (anhedonie) (Martínková et al., 2007).

### **6.2.2 TERAPIE**

Schizofrenie vyžaduje celoživotní léčbu, a to i po odeznění příznaků. Léčba psychofarmaky ve spojení s psychosociální terapií může pomoci zmírnit její nepříznivé projevy. V krajních případech je nutná hospitalizace. Léčba je obvykle vedena zkušeným psychiatrem. Léčebný tým může také zahrnovat psychologa, sociálního pracovníka, psychiatrickou sestru a případně vedoucího koordinátora takto komplexní péče. Přístup celého týmu je důležitý a je umožněn na specializovaných klinikách se zkušenostmi s léčbou schizofrenie (Miyamoto et al., 2012). Základním přístupem léčby schizofrenie je léčba antipsychotiky, přičemž cílem této léčby je účinně zvládat příznaky při nejnižší možné dávce. Psychiatr může v průběhu času vyzkoušet různé léky, různé dávky nebo kombinace léků a dávek, proto aby dosáhl požadovaného výsledku. Mohou také pomoci jiné typy léků, jako jsou antidepresiva nebo léky proti úzkosti. Protože léky na schizofrenii často způsobují vedlejší účinky, lidé se schizofrenií se zdráhají je užívat. Ochota spolupracovat při léčbě může také ovlivnit výběr léku (Barnes, 2011).

## **7 PSYCHOFARMAKA**

Pojmem psychofarmaka jsou nazývány látky, které způsobují změnu psychického stavu pacienta. Účinky psychofarmak spočívají především v utlumení duševních onemocnění či v potlačení agresivity, cílem jiných je léčba neuróz či úzkostných stavů. Některá další psychofarmaka slouží jako stabilizátor nálady a stimulují aktivitu CNS. Léčba psychofarmaky však zůstává pouze symptomatická, nelze jimi vyléčit příčinu psychického onemocnění. Avšak díky psychofarmakům dochází k zásadnímu zlepšení kvality života pacientů a tím jejich možného návratu do normálního života (Vinař, 2012). V dnešní době se psychofarmaka rozdělují do pěti základních skupin: antidepresiva, antipsychotika, anxiolytika, hypnotika a stabilizátory nálad (Caraci et al., 2017). V následujících kapitolách budou popsány nejdůležitější kategorie, a to antidepresiva a antipsychotika.

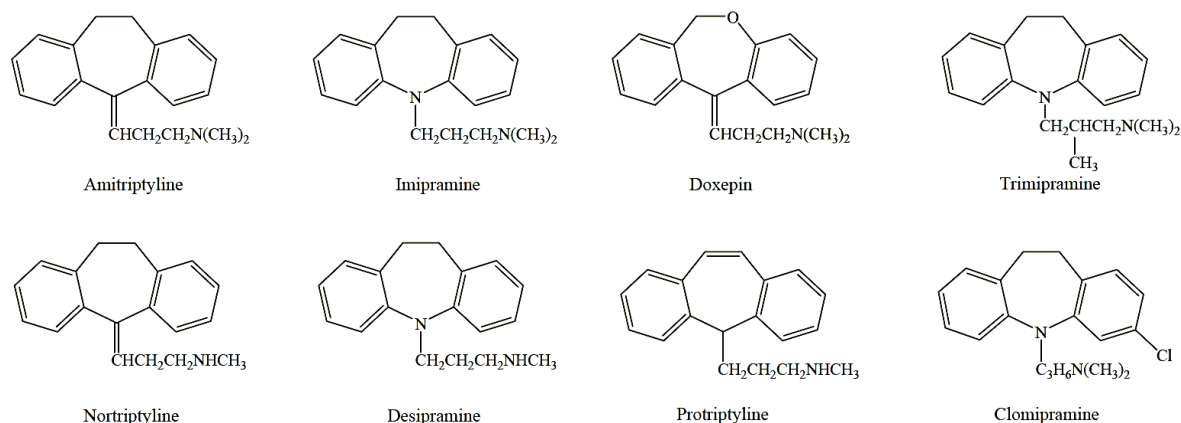
### **7.1 ANTIDEPRESIVA**

Antidepresiva, jak název napovídá, jsou léky používané k léčbě deprese a jsou hojně používanými terapeutickými látkami. Není to však jejich jediná funkce. Mimo depresi účinkují taktéž na úzkostné poruchy, kam se řadí obsedantně kompulzivní porucha (OCD), posttraumatická stresová porucha (PTSD), sociální fóbie aj. (Fujáková and Kopeček, 2012). U antidepresiv byly taktéž zjištěny analgetické účinky, čehož je využíváno zejména u léčby chronické bolesti. Analgetického účinku lze dosáhnout zhruba polovičními dávkami antidepresiv (Micó et al., 2006). Antidepresiva jsou často charakterizována na základě doby jejich vývoje: antidepresiva první generace, antidepresiva druhé generace a antidepresiva třetí generace. Všechna antidepresiva se dobře vstřebávají a dosahují maximálních sérových koncentrací během 2–12 hodin. Obecně jsou tato léčiva do velké míry metabolizována izoenzymy CYP P450 na demetylované a hydroxylované metabolity (Anderson, 2020).

#### **7.1.1 PRVNÍ GENERACE ANTIDEPRESIV**

První generace antidepresiv neboli nejstarší antidepresiva zahrnovala tricyklická antidepresiva (TCA) a inhibitory monoaminoxidázy (IMAO). Antidepresiva první generace jsou spojena s větší toxicitou. TCA inhibují v různé míře zpětné vychytávání noradrenalinu, dopaminu nebo serotoninu a IMAO blokují jejich metabolismus. Oba mechanismy produkují zvýšené množství neurotransmiteru v synapsích. TCA mají mnoho dalších farmakologických účinků, které zjevně nepřispívají k jejich terapeutickému účinku, ale přispívají k významným vedlejším účinkům těchto léčiv. Mezi tyto interakce patří blokáda  $\alpha 1$  adrenoreceptorů (hypotenze, závratě a sedace), histaminových receptorů H1 (přírůstek hmotnosti a sedace)

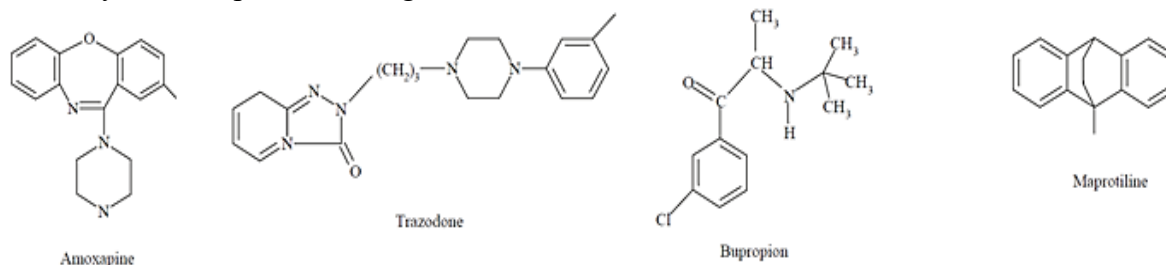
a muskarinových receptorů M1 (sucho v ústech, rozmazané vidění, zácpa a zadržování moči). Sinusová tachykardie a poškození krátkodobé paměti mohou být také důsledkem blokády M1 receptorů (Anderson, 2020). Na obrázku níže (Obr. 2) jsou zobrazeny nejčastější zástupci TCA.



Obr. 2: Struktura trycyklických antidepresiv. Převzato z (Anderson, 2020)

### 7.1.2 DRUHÁ GENERACE ANTIDEPRESIV

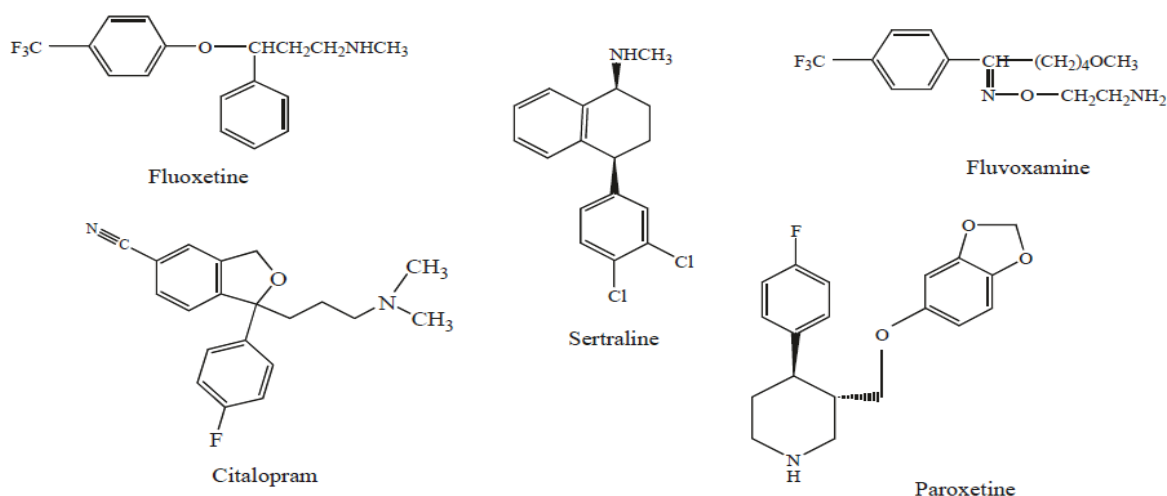
Antidepresiva druhé generace, vyvinutá po první generaci trycyklických a monoaminoxidázových léčiv, se stala preferovanou volbou díky lepší snášenlivosti, nižšímu riziku letality a podobné účinnosti ve srovnání s antidepresivy první generace (Gartlehner and Gaynes, 2009). Do této kategorie jsou často řazeny selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI), inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu (SNRI) a další sloučeniny s různými mechanismy účinku. Všechna antidepresiva druhé generace jsou metabolizována v játrech enzymatickým systémem CYP P450 (Spina et al., 2008). Na obrázku níže (Obr. 3) jsou zobrazeny chemické struktury některých antidepresiv druhé generace.



Obr. 3: Struktura některých antidepresiv druhé generace. Převzato z (Anderson, 2020).

### 7.1.2.1 Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI)

SSRI se staly nejrozšířenější skupinou antidepresiv. Kromě inhibice zpětného vychytávání serotoninu interagují s řadou serotoninových receptorů. Význam těchto interakcí není zcela objasněn. Tyto léky postrádají hlavní adrenergní, antihistaminické a anticholinergní vedlejší účinky TCA, jsou obecně mnohem lépe snášeny a jsou bezpečnější. Přestože jsou SSRI ve srovnání s jinými antidepresivy vysoce tolerovatelné, jsou spojeny s řadou nežádoucích účinků jako je úzkost, poruchy spánku, sexuální dysfunkce a nespavost. Do této skupiny patří citalopram, escitalopram, fluoxetin, fluvoxamin, paroxetin, sertralin (Yuet et al., 2019). Na následujícím obrázku (Obr. 4) jsou zobrazeny příklady SSRI.



Obr. 4: Struktura selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI). Převzato z (Anderson, 2020)

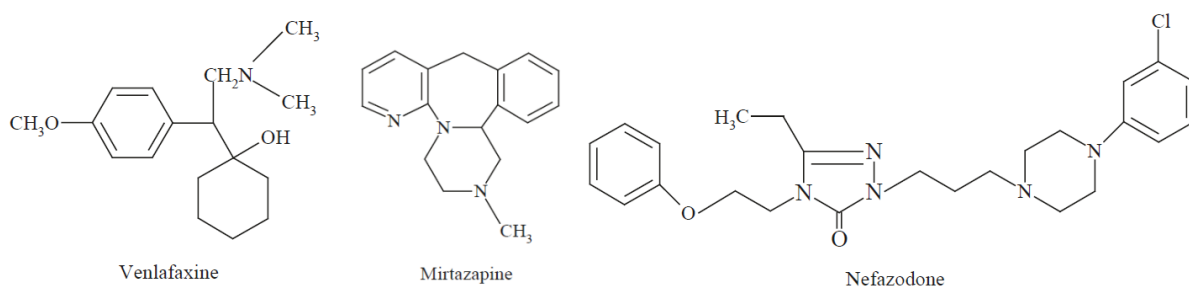
### ESCITALOPRAM

Escitalopram (Cipralex®, Lexapro™) je aktivní S-enantiomer citalopramu. Jedná se o vysoce selektivní inhibitor proteinu transportujícího serotonin. Má rychlý nástup antidepresivní aktivity a je účinnou a obecně dobře tolerovanou léčbou středně závažné až závažné depresivní poruchy. Souhrnné analýzy z databáze klinických studií naznačují, že escitalopram je z dlouhodobého hlediska účinnější než citalopram (Murdoch and Keam, 2012).

### 7.1.3 TŘETÍ GENERACE ANTIDEPRESIV

Antidepresiva třetí generace jsou skupinou léků heterogenního účinku založených na zdokonalení účinku látek první a druhé generace. Oproti předchozím generacím by měly být tyto antidepresiva účinnější, s rychlejším nástupem účinku a celkově jsou považovány za bezpečnější (Olver et al., 2001). Oproti starším generacím antidepresiv je však cena za léčbu těmito antidepresivy podstatně vyšší (Montgomery et al., 2005). Mezi tyto

antidepresiva patří venlafaxin, reboxetin, nefazodon a mirtazapin. Příklady antidepresiv třetí generace jsou zobrazeny na následujícím obrázku (Obr. 5).



Obr. 5: Struktura antidepresiv třetí generace. Převzato z (Anderson, 2020).

## 7.2 ANTIPSYCHOTIKA

Antipsychotika nebo také neuroleptika jsou léky určené k léčbě a terapii psychóz, tedy onemocnění spojené s poruchami vnímání (halucinace) a myšlení (bludy). Nejčastěji jsou antipsychotika dělena do dvou skupin a označují se jako klasická (konvenční, typická) a atypická antipsychotika (Tandon, 2011). V tabulce níže (Tab. VII) jsou jednotlivá antipsychotika rozdělena do kategorií podle účinku.

Tab. VII: Rozdělení antipsychotik na základě generace a účinku.

|                         |  |                |
|-------------------------|--|----------------|
| Klasická antipsychotika | Sedativní  | Chlorpromazin  |
|                         |  | Levomepromazin |
|                         |  | Zuclopenthixol |
|                         | Incizivní  | Flupentixol    |
|                         |  | Haloperidol    |
|                         |  | Melperon       |
| Atypická antipsychotika | Serotonin-dopaminoví antagonisté (SDA)                           | Asenapin       |
|                         |  | Iloperidon     |
|                         |  | Lurasidon      |
|                         |  | Paliperidon    |
|                         |  | Risperidon     |
|                         |  | Sertindol      |
|                         | Multireceptoroví antagonisté (MARTA)                             | Klozapin       |
|                         |  | Olanzapin      |
|                         |  | Quetiapin      |
|                         |  | Ziprasidon     |
|                         |  | Zotepin        |
|                         | Selektivní antagonisté D <sub>2</sub> a D <sub>3</sub> receptorů | Amisulprid     |
|                         |  | Sulpirid       |
|                         |  | Tiaprid        |
|                         | Parciální agonisté D receptorů                                   | Aripiprazol    |

Dvojí dělení antipsychotik je dáno časovým obdobím, receptorovým profilem a výskytem extrapyramidových nežádoucích reakcí (EPS). Extrapyramidový systém je součástí CNS a má na svědomí hybnost a držení těla. Patří sem bazální ganglia a jejich spoje, kmenová jádra aj. Zkratka EPS označuje soubor nežádoucích účinků, odvíjejících se od extrapyramidového systému. EPS lze rozdělit na akutní neboli časné (parkinsonský syndrom, akatizie, dystonie) a tardivní neboli pozdní (dyskineze, tardivní dystonie, tardivní akatizie) (Pierre, 2005).

### **7.2.1 PRVNÍ GENERACE ANTIPSYCHOTIK (KLASICKÁ)**

Antipsychotika první generace byla hojně používána od roku 1952, kdy byl na trh uveden Chlorpromazin. Účinek léčiv patřící do této skupiny lze rozdělit na dvě kategorie – sedativní (hypnotická) antipsychotika a incizivní antipsychotika. U incizivních antipsychotik jsou výraznější EPS, mají ale silný antipsychotický účinek. Obecně se klasická antipsychotika projevují silnějšími EPS než antidepressiva atypická (Kameníková et al., 2015).

Mechanismem účinku klasických antipsychotik je blokování receptorů a tlumení účinků neurotransmiterů CNS. Konkrétně se jedná o antagonismus dopaminových a serotoninových receptorů. Antagonistické působení se v případě antipsychotik první generace vztahuje i na receptory pro histamin, noradrenalin či acetylcholin, avšak v tomto případě se jedná spíše o negativní efekty. Antipsychotický účinek je především dán afinitou k D<sub>2</sub> receptorům. Antipsychotikum se váže na D<sub>2</sub> receptory a zabraňuje tak vazbě endogenního dopaminu. S rostoucí afinitou roste i antipsychotický účinek léčiva. Vzhledem k nízké selektivitě způsobují klasická antipsychotika řadu nežádoucích vedlejších účinků, což je způsobeno blokadou různých receptorů (Lieberman, et al., 2003). Příklady jednotlivých antipsychotik jsou vypsány v tabulce výše (Tab. VII).

Antipsychotika první generace jsou oproti lékům druhé generace výhodnější v oblasti nákladů. Obecně jsou obvykle cenově 10 až 20krát nižší než atypická antipsychotika. V současnosti je nízká cena hlavní důvod, proč někteří lékaři volí pro léčbu klasická antipsychotika. Zejména se jedná o rozvojové země s omezenými zdroji pro zdravotní péči. Světová zdravotnická organizace z těchto důvodů povoluje tři z těchto léků (chlorpromazin, fluphenazin a haloperidol) (Jibson et al., 2011).

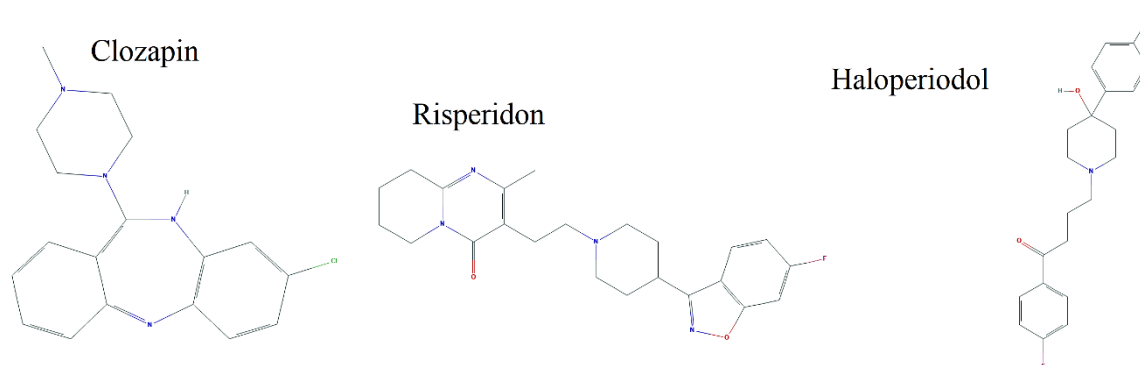
### **7.2.2 DRUHÁ GENERACE ANTIPSYCHOTIK (ATYPICKÁ)**

Charakteristickou vlastností antipsychotik druhé generace je nižší riziko extrapyramidových vedlejších účinků, které byly prominentní u první generace antipsychotik. Kromě nepohodlí

a úzkosti způsobených pacientům mohou EPS přispívat ke špatnému dodržování dávkování a špatnému výsledku léčby. Bylo ale zjištěno, že atypická antipsychotika mají také problematické vedlejší účinky, zejména přírůstek hmotnosti. Profily vedlejších účinků jednotlivých léků se však liší. Tyto léky se také liší svou farmakokinetikou a dostupnými formami (tablety, injekce aj.). Výběr antipsychotika tedy vyžaduje zvážení jeho výhod a nevýhod se zohledněním individuálních klinických okolností. Atypická antidepresiva efektivně potlačují jak pozitivní, tak negativní projevy. Jejich účinnost je pozorována i u pacientů, u kterých nezabírala antipsychotika první generace (Conley and Kelly, 2005).

Antipsychotika druhé generace se v současnosti rozdělují dle farmakodynamického (receptorového) profilu na selektivní dopaminové antagonisty, multireceptorové antagonisty (MARTA – multiacting receptor-targeted antagonist), serotonin-dopaminové antagonisty a parciální antagonisty D<sub>2</sub> receptorů (v některých publikacích uváděné samostatně jako antipsychotika třetí generace) (Herink, 2004).

Selektivní antagonisté dopaminových receptorů (D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>) působí méně na ostatní receptorové systémy. Pro zajištění antidepresivní účinnosti stačí nízká dávka, vyšší dávka blokuje postsynapticky dopaminové receptory a působí antipsychoticky. Serotonin-dopaminoví antagonisté zajišťují blokádu serotonergních, dopaminergních a adrenergických receptorů. Multireceptoroví (MARTA) antagonisté blokují dopaminové, serotoninové, muskarinové a histaminové receptory. Parciální agonisté D receptorů (dopaminoví dualisté) agonizují presynaptické a antagonizují postsynaptické D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> receptory. Parciálně agonizují serotoninové 5A a antagonizují serotoninové 5A receptory (Racková and Janů, 2008).



Obr. 6: Příklady antipsychotik. Získáno z [www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

## 8 CÍLE PRÁCE

- I. Vypracovat rešerši týkající se psychických onemocnění, léčiv na tyto onemocnění působící a popsat genové polymorfismy, jež mají na medikaci vliv.
- II. Vybrat vhodné metody k detekci těchto polymorfismů a osvojit si základy správné laboratorní praxe.
- III. Zpracovat výsledky genetických analýz a porovnat zjištěné genotypové frekvence v našem souboru s jinými dostupnými populačními studii.
- IV. Vyhodnotit vliv individuálního typu metabolismu na průběh léčby spolu s možným výskytem nežádoucích účinků léčby
- V. Vyvodit odpovídající závěry



## **9 MATERIÁLY A METODY**

Praktická část této diplomové práce probíhala v laboratoři GENLABS s.r.o. pod odborným dohledem Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D.

### **9.1 ODBĚR BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU**

Odběr biologického materiálu ve formě bukálního stěru byl prováděn osobně pacientem pomocí odběrového kitu Isohelix™ DNA/RNA Buccal Swab SK-2S. Sada obsahuje odběrový tampon a 2 ml odběrové zkumavky. Pacient obdržel instrukce společně s odběrovou sadou. Pro zajištění dostatečné kvality odebraného vzorku bylo zapotřebí splnit celou řadu kritérií. Bylo nezbytné, aby pacient odebral vzorek nalačno, neprovedl ústní hygienu a hodinu před vlastním odběrem pil pouze čistou vodu. Pacient musí s odběrovým tamponem manipulovat obezřetně, aby se nedotkl jiného povrchu než bukální sliznice a nekontaminoval vzorek. Je podstatné, aby odběr probíhal nepřetržitě alespoň 1 minutu. Bukální sliznice vystýlá ústní dutinu, její stěr je ideální provádět z vnitřních stran tváří a rtů. Po provedení odběru pacient vložil odběrový tampon do přiložené zkumavky.

#### **9.1.1 INFORMOVANÝ SOUHLAS**

Pro provedení genetického vyšetření bylo nezbytné, aby pacient podepsal souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením. Pacient dostal formulář společně s žádankou a odběrovou sadou pro bukální stěr. V rámci formuláře pacient vyjadřoval porozumění s důvodem vyšetření a s požadavky na skladování vzorku (likvidace či archivace). Podepsaný informovaný souhlas je uschován v laboratoři.

### **9.2 IZOLACE DNA**

Výchozím bodem v molekulární genetice je izolace DNA. Proces izolace zahrnuje 3 kroky: homogenizace tkání a lyze buněk (rozvolnění DNA, RNA), extrakce organickými rozpouštědly (zbavení se proteinů atp.), srážení etanolem (zbavení se přebytečných solí a krátkých NK). K homogenizaci (rozmělnění) tkání lze využít homogenizátor, sonikátor nebo detergenty. Při lýze buněk dojde k porušení buněčné membrány a uvolnění DNA. Během lýze se často přidávají látky, jako je detergent, aby se chemicky rozrušily buněčné membrány na bázi lipidů – což pomáhá uvolňovat DNA z jadra a buňky. DNA musí být poté oddělena od ostatních buněčných molekul, jako je RNA a proteiny. Proto se enzymy, jako je RNáza a Proteináza K, často přidávají během nebo po lýze, aby degradovaly RNA a proteiny. Navíc se k oddělení DNA od proteinu běžně používají organická rozpouštědla, jako je fenol a chloroform. Typicky se vzorek vortexuje s fenol-chloroformem a poté centrifuguje, aby

se oddělila vodná a organická fáze ve zkumavce. Vodná fáze obsahující DNA nahoře může být poté odpipetována a zanechává po sobě protein v organické fázi. Soli se často přidávají během extrakce DNA, aby stabilizovaly DNA a pomohly ji vysrážet z roztoku. Standardní metodou srážení DNA je přidání alkoholu, jako je ethanol nebo isopropanol. To způsobí, že DNA vytvoří v alkoholovém roztoku sraženinu. Vzorek se poté odstředí v centrifuze, což způsobí, že se sraženina DNA koncentruje na dně zkumavky jako peleta. Následně dojde k odstranění kapaliny, dalšímu promytí v alkoholu (70% ethanol) a dalšímu odstředění v centrifuze při maximálních otáčkách. Po závěrečném promytí je peleta vysušena a resuspendována v hydrofilním pufru, vytváří se vodný roztok purifikované DNA (Tan and Yiap, 2009). Pro účely této diplomové práce byla DNA izolována za použití silikonové membrány.

### **9.2.1 IZOLACE DNA Z BUKÁLNÍHO STĚRU**

Izolaci DNA předcházela příprava sestávající se z popsání 1,5 ml zkumavky příslušným LIČ (laboratorní identifikační číslo), které bylo přiděleno vzorku a žadance při přijetí. Následovalo temperování suché lázně (TDB-120, Dry block thermostat, BioSan) na 56°C. K samotné izolaci DNA z leukocytů periferní krve byl použit komerční kit GeneAll Exgene™ Clinic SV Mini. Součástí kitu byly mini kolonky typu G, sběrné zkumavky, BL pufr, BW pufr, TW pufr, AE pufr a proteináza K.

Při izolaci bylo postupováno dle pokynů výrobce. Do zkumavky s odběrovým tamponem bylo napipetováno 40 µl proteinázy K a 400 µl BL pufru. Takto vzniklá směs byla promíchána pomocí vortexu a inkubována při 10 min při 56 °C v suché lázni. Po inkubaci bylo přidáno 400 µl absolutního ethanolu. Zkumavka byla vortexována (Microspin FV-2400; BioSan) v pulzech a centrifugována. Směs byla následně přenesena na popsanou kolonku. Následovala centrifugace 1 min při 8 600 rpm. Obsah kolonky byl centrifugován do sběrné zkumavky, která byla poté nahrazena novou. Na kolonku bylo nanášeno 600 µl BW pufru a opět byla centrifugována 1 min při 8 600 rpm a vyměněna sběrná zkumavka. Po tomto kroku následovalo přidání 700 µl TW pufru a opětovná centrifugace. Před elucí bylo nutné centrifugovat prázdnou kolonku 1 min při nejvyšších otáčkách (13 000 rpm) za účelem odstranění zbytkového promývacího pufru. Na závěr byla provedena eluce. Kolonka byla umístěna do popsané 1,5 ml zkumavky. Na střed filtru kolonky bylo nanášeno 50 µl AE pufru a proběhla 5 min inkubace v suché lázni. Po inkubaci byl vzorek centrifugován 1 min při 13 000 rpm. Tento krok byl opakován znovu, avšak oproti protokolu od výrobce se osvědčilo

místo nových 50  $\mu\text{l}$  AE pufru napipetovat na kolonku získaný supernatant. Tím bylo docíleno vyšší koncentrace DNA. Použité reagentie jsou uvedeny v tabulce níže (Tab. VIII).

Tab. VIII: Objem reagentií použitých pro jednu izolaci DNA z bukálního stěru.

| Reagentie       | Objem ( $\mu\text{l}$ ) |
|-----------------|-------------------------|
| Proteináza K    | 40                      |
| BL pufr         | 400                     |
| Ethanol (100 %) | 400                     |
| BW pufr         | 600                     |
| TW pufr         | 700                     |
| AE pufr         | 50                      |

### 9.3 MĚŘENÍ KONCENTRACE IZOLOVANÉ DNA

Po každé izolaci bylo nutné ověřit úspěšnost izolace změřením získané koncentrace DNA. Měření probíhalo na přístroji Quibit Fluorometr 2.0, (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific). Pro měření byl použit AccuGreen Broad Range dsDNA Quantitation Kit a speciální 0,5 ml mikrozkušavky (Qubit Assay Tubes, Invitrogen). Zkušavky byly opatřeny čísly korespondující s LIČ vzorku. Pro měření byl použit kvantifikační roztok (AccuGreen<sup>TM</sup> Quantitation Solution).

Vlastnímu měření předcházela kalibrace přístroje. Nejprve bylo nezbytné, aby standardy a kvantifikační roztok byly vytemperované na pokojovou teplotu. Jednalo se o AccuGreen<sup>TM</sup> Standard 1 s koncentrací 0 ng/ $\mu\text{l}$  a AccuGreen<sup>TM</sup> Standard 2 s koncentrací 100 ng/ $\mu\text{l}$ . Přístroj byl kalibrován směsí 190  $\mu\text{l}$  kvantifikačního roztoku a 10  $\mu\text{l}$  jednotlivých standardů. Po kalibraci následovalo měření koncentrace vzorků. Měření předcházelo smíchání 198  $\mu\text{l}$  kvantifikačního roztoku a 2  $\mu\text{l}$  izolované DNA. Tato směs byla vortexována, centrifugována a ponechána 2 minuty při pokojové teplotě. Zkušavka s roztokem byla vložena do přístroje, který zobrazil hodnotu koncentrace, která byla následně zaznamenána.

## 10 GENETICKÁ ANALÝZA

Izolovaná DNA byla vyšetřována metodou Real-time PCR a PCR-RFLP. Pro analýzu byly zvoleny polymorfismy *CYP2D6*\*3, *CYP2D6*\*4, *CYP2D6*\*5/\*5, *CYP2C19*\*2, *CYP2C19*\*3, *CYP2C9*\*2, *CYP2C9*\*3, *CYP1A2* (*rs4646425*) a *COMT* (*rs4680*).

### 10.1 REAL-TIME PCR

Většina polymorfismů byla vyšetřována metodou real-time PCR (taktéž qPCR). Real-time PCR byla použita pro detekci polymorfismů v genech pro cytochrom P450. Metoda byla prováděna na přístroji Roche Diagnostics LightCycler® 2.0. Metoda real-time PCR je založena na klasické PCR, avšak v tomto případě je kontinuálně zaznamenáváno množství amplifikované DNA, a to pro každý cyklus. Kvantifikace amplifikovaného PCR produktu je založena na principu měření fluorescence, jelikož jsou použity fluorescenčně značené oligonucleotidové sondy. Jednotlivé genotypy jsou detekovány pomocí melting-curve analýzy.

#### 10.1.1 DETEKCE *CYP2D6*\*3, *CYP2D6*\*4, *CYP2D6*\*5/\*5

Pro detekci polymorfismů genu *CYP2D6* byl použit detekční kit LightMix® Kit for the detection of CYP 2D6 alleles \*3, \*4 and \*5/\*5 CE-IVD (Cat.-No. 40 0305 32, TIB MOLBIOL, GmbH) společně s LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Cat.-No. 03 003 248 001, Roche Diagnostics GmbH). V první řadě bylo nutné rozpustit lyofilizované reagensie (sondy a primery) smícháním obsahu zkumavky s 66 µl PCR vody. Dále proběhlo rozpuštění lyofilizované kontrolní DNA smícháním 160 µl PCR vody, což proběhlo pro všechny tři kontroly (wild type, \*3 a \*4 homozygot, \*1/\*3 a \*1/\*4 heterozygot) stejným způsobem dle doporučení výrobce.

Samotná příprava reakčního master mixu probíhala v dekontaminovaném laminárním boxu dle pokynů uvedených výrobcem. Pro namíchání master mixu byla použita popsaná 1,5 ml zkumavka. Na jednu reakci bylo zapotřebí 15 µl reakčního mixu. Objem master mixu musel odpovídat počtu testovaných vzorků, tří pozitivních kontrol a jedné negativní kontrole, přičemž maximální kapacita přístroje LightCycler 2.0 je 32 reakcí. Jednotlivé reagensie a použité objemy pro jednu reakci jsou uvedeny v následující tabulce IX.

Tab. IX: Komponenty master mixu pro real-time PCR detekci *CYP2D6*\*3, *CYP2D6*\*4, *CYP2D6*\*5.

| Komponenty                    | Objem (μl) |
|-------------------------------|------------|
| PCR voda                      | 8,2        |
| Roztok 25mM Mg <sup>2+</sup>  | 1,6        |
| Reagent Mix (primery a sondy) | 2          |
| Roche Master mix              | 2          |
| DMSO                          | 1,2        |

Master mix byl rozpipetován po 15 μl do jednotlivých skleněných kapilár (LightCycler® Capillaries, 20 μl), které byly umístěny v chlazených kovových adaptérech. Do každé kapiláry bylo přidáno 5 μl testované DNA nebo PCR vody (NK) nebo kontrolní DNA (PK). Kapiláry byly poté zavíčkované a spolu s adaptéry krátce centrifugovány. Poté byly kapiláry vyjmuty z adaptéru a umístěny do karuselu, který se vkládá do LightCycleru 2.0. Pro provedení reakce by použit konkrétní PCR profil doporučený výrobcem diagnostického kitu (Tab. X).

Protokol se skládá ze čtyř kroků: denaturace vzorku a aktivace enzymu, PCR amplifikace cílové DNA, analýzy křivky tání a chlazení reakce.

Tab. X: Podmínky amplifikace u real-time PCR detekce *CYP2D6*\*3, *CYP2D6*\*4, *CYP2D6*\*5/\*5.

| Krok programu                 | Denaturace | Amplifikace   |            |          | Melting     |          |             | Chlazení |
|-------------------------------|------------|---------------|------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|
| Parametr                      |            |               |            |          |             |          |             |          |
| Mód analýzy                   | žádný      | kvantifikační |            |          | křivka tání |          |             | žádný    |
| Počet cyklů                   | 1          | 45            |            |          | 1           |          |             | 1        |
| Cílová teplota [°C]           | 95         | 95            | 60         | 72       | 95          | 40       | 85          | 40       |
| Doba extenze                  | 00:10:00   | 00:00:05      | 00:00:10   | 00:00:15 | 00:00:20    | 00:00:20 | 00:00:00    | 00:00:30 |
| Rychlost změny teploty [°C/s] | 20         | 20            | 20         | 20       | 20          | 20       | 0,2         | 20       |
| Akviziční mód                 | žádný      | žádný         | jednotlivý | žádný    | žádný       | žádný    | kontinuální | žádný    |

### 10.1.2 DETEKCE *CYP2C19*\*2, *CYP2C19*\*3

Pro detekci polymorfismů v genu *CYP2C19* byl použit detekční kit LightMix® Kit Cytochrome P450 2C19 alleles \*2 and \*3 CE-IVD (Cat.-No. 40 0304 32, TIB MOLBIOL, GmbH) společně s LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Cat.-No. 03 003 248 001, Roche Diagnostics GmbH). Příprava reakcí se do značné míry podobala detekci polymorfismu v genu *CYP2D6*, avšak v tomto případě bylo použito více pozitivních kontrol

(pro *CYP2C19\*2*: *CYP2C19\*1/\*1* wild type, *CYP2C19\*2/\*2* mutovaný homozygot *CYP2C19\*1/\*2* heterozygot kontrola, pro *CYP2C19\*3*: *CYP2C19\*1/\*1* wild type, *CYP2C19\*3/\*3* mutovaný homozygot, *CYP2C19\*1/\*3* heterozygot). V tabulce XI jsou uvedeny objemy jednotlivých reagensů dle doporučení výrobce (Tab. XI)

Tab. XI: Komponenty master mixu pro real-time PCR detekci *CYP2C19\*2* a *CYP2C19\*3*.

| Komponenty                    | Objem (μl) |
|-------------------------------|------------|
| PCR voda                      | 9,4        |
| Roztok 25mM Mg <sup>2+</sup>  | 1,6        |
| Reagent Mix (primery a sondy) | 2          |
| Roche Master mix              | 2          |
| <b>Celkem</b>                 | <b>15</b>  |

Master mix byl opět rozpipetován po 15 μl a k němu bylo přidáno 5 μl vzorku, PCR vody či pozitivní kontroly. Pro analýzu v LightCycleru 2.0 byl použit reakční profil uvedený v Tab. XII.

Tab. XII: Podmínky amplifikace u real-time PCR detekce *CYP2C19\*2* a *CYP2C19\*3*.

| Krok programu                        | Denaturace | Amplifikace   |            |          | Melting     |          |             | Chlazení |
|--------------------------------------|------------|---------------|------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|
| <b>Parametr</b>                      |            |               |            |          |             |          |             |          |
| <b>Mód analýzy</b>                   | žádný      | kvantifikační |            |          | křivka tání |          |             | žádný    |
| <b>Počet cyklů</b>                   | 1          | 45            |            |          | 1           |          |             | 1        |
| <b>Cílová teplota [°C]</b>           | 95         | 95            | 60         | 72       | 95          | 40       | 85          | 40       |
| <b>Doba extenze</b>                  | 00:10:00   | 00:00:05      | 00:00:10   | 00:00:15 | 00:00:20    | 00:00:20 | 00:00:00    | 00:00:30 |
| <b>Rychlost změny teploty [°C/s]</b> | 20         | 20            | 20         | 20       | 20          | 20       | 0,2         | 20       |
| <b>Akviziční mód</b>                 | žádný      | žádný         | jednotlivý | žádný    | žádný       | žádný    | kontinuální | žádný    |

### 10.1.3 DETEKCE *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*

Detekce polymorfismů *CYP2C9\*2* a *CYP2C9\*3* byla provedena pomocí LightMix® Kit Cytochrome P450 2C9 alleles \*2 and \*3 CE-IVD (Cat.-No. 40 0298 32, TIB MOLBIOL, GmbH) společně s LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Cat.-No. 03 003 248 001, Roche Diagnostics GmbH). Stejně jako u předchozího kitu bylo i zde použito šest pozitivních kontrol (pro *CYP2C9\*2*: *CYP2C9\*1/\*1* wild type, *CYP2C9\*2/\*2* mutovaný homozygot *CYP2C9\*1/\*2* heterozygot; pro *CYP2C9\*3*: *CYP2C9\*1/\*1* wild type, *CYP2C9\*3/\*3* mutovaný homozygot, *CYP2C9\*1/\*3* heterozygot). Oproti předchozím zmíněným kitům se tento liší v objemech použitých reagensů (Tab. XIII).

Tab. XIII: Komponenty master mixu pro real-time PCR detekci *CYP2C9\*2* a *CYP2C9\*3*.

| Komponenty                    | Objem (μl) |
|-------------------------------|------------|
| PCR voda                      | 9,8        |
| Roztok 25mM Mg <sup>2+</sup>  | 1,2        |
| Reagent Mix (primery a sondy) | 2          |
| Roche Master mix              | 2          |
| <b>Celkem</b>                 | <b>15</b>  |

Master mix byl rozpipetován po 15 μl s následným přidáním 5 μl DNA vzorku, pozitivní kontroly nebo PCR vody. Dle reakčního profilu uvedeného v tabulce č. XIV proběhla analýza v přístroji LightCycler 2.0.

Tab. XIV: Podmínky amplifikace u real-time PCR detekce *CYP2C9\*2* a *CYP2C9\*3*.

| Krok programu                        | Denaturace | Amplifikace   |            |          | Melting     |          |             | Chlazení |
|--------------------------------------|------------|---------------|------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|
| <b>Parametr</b>                      |            |               |            |          |             |          |             |          |
| <b>Mód analýzy</b>                   | žádný      | kvantifikační |            |          | křivka tání |          |             | žádný    |
| <b>Počet cyklů</b>                   | 1          | 45            |            |          | 1           |          |             | 1        |
| <b>Cílová teplota [°C]</b>           | 95         | 95            | 60         | 72       | 95          | 40       | 85          | 40       |
| <b>Doba extenze</b>                  | 00:10:00   | 00:00:05      | 00:00:10   | 00:00:15 | 00:00:20    | 00:00:20 | 00:00:00    | 00:00:30 |
| <b>Rychlost změny teploty [°C/s]</b> | 20         | 20            | 20         | 20       | 20          | 20       | 0,2         | 20       |
| <b>Akviziční mód</b>                 | žádný      | žádný         | jednotlivý | žádný    | žádný       | žádný    | kontinuální | žádný    |

#### 10.1.4 DETEKCE *CYP1A2* (*rs4646425*)

Pro detekci polymorfismu *rs4646425 CYP1A2* byl využit komerční kit LightSNiP *rs4646425 CYP1A2* (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany) navržený přímo pro tento konkrétní polymorfismus. Společně s tím byl použit i LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Cat.-No. 03 003 248 001, Roche Diagnostics GmbH). Pro real-time PCR byl taktéž použit LightCycler® 2.0. Reagencie použité pro analýzu polymorfismu *rs4646425* jsou v Tab. XV.

Tab. XV: Komponenty master mixu pro real-time PCR detekci *CYP1A2 rs4646425*.

| Komponenty                    | Objem (μl)  |
|-------------------------------|-------------|
| PCR voda                      | 14,4 – 10,4 |
| Reagent Mix (primery a sondy) | 1           |
| FastStart DNA Master          | 2           |
| Roztok 25mM MgCl <sub>2</sub> | 1,6         |

V případě tohoto kitu se přidávaný objem vzorku odvíjel od jeho získané koncentrace, v případě nízké koncentrace bylo použito 5  $\mu$ l a naopak v případě vysoké koncentrace byl použit 1  $\mu$ l vzorku. Na základě toho se i měnilo množství PCR vody přidávané do master mixu. Pro každou reakci byl výsledný objem 20  $\mu$ l. Součástí kitu nebyly pozitivní kontroly, byla tedy použita pouze NK. Reakce probíhaly ve skleněných kapilárách (LightCycler® Capillaries, 20  $\mu$ l). V přístroji LightCycler 2.0 byl posléze naprogramován specifický reakční profil uvedený v tabulce XVI.

Tab. XVI: Reakční profil Real-time PCR pro detekci *CYP1A2 rs4646425*.

| Krok programu                 | Denaturace | Amplifikace   |            |          | Melting     |          |             | Chlazení |
|-------------------------------|------------|---------------|------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|
| Parametr                      |            |               |            |          |             |          |             |          |
| Mód analýzy                   | žádný      | kvantifikační |            |          | křivka tání |          |             | žádný    |
| Počet cyklů                   | 1          | 45            |            |          | 1           |          |             | 1        |
| Segment                       | 1          | 1             | 2          | 3        | 1           | 2        | 3           | 1        |
| Cílová teplota [°C]           | 95         | 95            | 60         | 72       | 95          | 40       | 85          | 40       |
| Doba extenze                  | 00:10:00   | 00:00:10      | 00:00:10   | 00:00:15 | 00:00:20    | 00:00:20 | 00:00:00    | 00:00:30 |
| Rychlost změny teploty [°C/s] | 20         | 20            | 20         | 20       | 20          | 20       | 0,2         | 20       |
| Akviziční mód                 | žádný      | žádný         | jednotlivý | žádný    | žádný       | žádný    | kontinuální | žádný    |

## 10.2 PCR RFLP

PCR RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) je metoda zahrnující vícero kroků. Prvním krokem je provedení PCR amplifikace genového fragmentu, který v sobě nese konkrétní polymorfismus. Fragment je ohraničen specifickými primery. V dalším kroku je provedena gelová elektroforéza, kde je zviditelněn získaný PCR produkt, ten je následně štěpen prostřednictvím konkrétního restrikčního enzymu. Restrikční fragmenty jsou vizualizovány opět pomocí gelové elektroforézy. Různá délka restrikčních fragmentů odpovídá jednotlivým variantám genu. Metoda PCR RFLP byla využita pro detekci Val158Met polymorfismu v genu *COMT*.

Pro tuto metodu byly využity specifické primery převzaty z práce (Tahara et al., 2009), které umožnily amplifikovat produkt o velikosti 217 bp. Sekvence forward primeru byla 5'-TCGTGGACGCCGTGATTCAGG-3' a sekvence reverse primeru 5'-AGGTCTGACAACGGGTCAGGC-3' (Tahara et al., 2009). Primery v kvalitě Standard 5 OD (40nmol) byly syntetizovány prostřednictvím komerční služby firmou ELISABETH PHARMACON, spol. s.r.o. Master mix pro PCR RFLP byl namíchan do 1,5 ml mikrozkušavky v chladícím stojanu v laminárním boxu, který byl před prací



dekontaminován. Reagencie použité pro jednu reakci jsou uvedeny v Tab. XVII. Objem master mixu byl přizpůsoben počtu vzorků, dvěma PK a jedné NK. Výsledný objem jedné reakce po přidání 2  $\mu$ l DNA izolátu byl 50  $\mu$ l.

Tab. XVII: Jednotlivé komponenty použité pro jednu reakci.

| Komponenty                              | Objem ( $\mu$ l) |
|---|------------------|
| PCR voda                                | 34,3             |
| MyTaq <sup>TM</sup> Red Reaction Buffer | 10               |
| MyTaq <sup>TM</sup> DNA polymeráza      | 0,2              |
| DMSO                                    | 2,5              |
| Forward primer                          | 0,5              |
| Reverse primer                          | 0,5              |
| <b>Celkem</b>                           | <b>48</b>        |

Po namíchání byl master mix rozpipetován po 48  $\mu$ l do řádně popsaných PCR mikrokumavek a k master mixu byl přidán DNA izolát. V případě pozitivních kontrol byly přidány vždy 2  $\mu$ l vzorku se známou variantou genu COMT (Val/Val a Val/Met). Pro negativní kontrolu byla přidána PCR voda. Amplifikace probíhala v přístroji Labnet MultiGene<sup>TM</sup> Gradient Thermal Cycler TC9600 a byl použit PCR profil uvedený v tabulce XVIII.

Tab. XVIII: Profil reakce PCR RFLP pro detekci *COMT Val158Met*.

|                            | Počáteční denaturace | Denaturace | Anealing | Extenze  | Terminální extenze |
|----------------------------|----------------------|------------|----------|----------|--------------------|
| <b>Počet cyklů</b>         | 1                    | 32         | 32       | 32       | 1                  |
| <b>Cílová teplota [°C]</b> | 95                   | 95         | 55       | 72       | 72                 |
| <b>Čas</b>                 | 00:05:00             | 00:00:30   | 00:00:30 | 00:01:00 | 0:10:00            |

Po proběhnutí amplifikace byly jednotlivé PCR produkty naneseny na agarózový gel, aby byla zjištěna přítomnost PCR produktů (postup je popsán v kapitole 9.2.1 Gelová elektroforéza).

Dalším krokem bylo restriční štěpení pomocí restričního enzymu *NlaIII* (10U/  $\mu$ l) (Thermo Scientific). Ke zbytku (45  $\mu$ l) PCR produktu bylo přidáno 4,5  $\mu$ l 10x pufru G a 1  $\mu$ l (10U) restričního enzymu. To bylo provedeno pro všechny PCR produkty. Výsledná směs se nechala 60 minut inkubovat při 37 °C v termostatu (Dry Block Thermostat TDB-120, BioSan) a poté byla provedena elektroforéza (viz. 10.2.1 Gelová elektroforéza). Restričním štěpením

byly získány následující produkty: 136 bp a 81 bp u homozygota Val/Val, 136 bp, 96 bp, 81 bp a 40 bp u heterozygota (Val/Met), 96 bp, 81 bp a 40 bp u homozygota Met/Met.

V několika případech nebylo možné odečíst výsledky restričního štěpení z gelové elektroforézy, a proto byly vyšetřeny sekvenací (viz. 10.2.2 Sekvence).

### 10.2.1 GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Po amplifikaci proběhla vizualizace PCR produktů pomocí gelové elektroforézy. Přítomnost PCR produktů byla ověřována na 4 % agarózovém gelu, který byl připraven smícháním čtyř 0,5 g agarových tablet (FastGene) a 50 ml 1x TBE pufru (ThermoScientific). Po úplném rozpuštění tablet byl roztok pufru zahříván v mikrovlnné troubě za účelem vytvoření tekutého gelu. Následně bylo do tekutého gelu přidáno 15 µl fluorescenčního barviva (Midori Green Advanced DNA Stain). Gel byl posléze nalit do elektroforetické formy s hřebeny. Ztuhlý gel byl přesunut do elektroforetické vany (Mupid® One Electrophoresis System) obsahující roztok 1x TBE.

Pro možnost odečtení velikosti PCR produktů bylo do jamek na gelu přidáno 5 µl hmotnostního markeru (FastGene® 100bp DNA Ladder H3 RTU, Nippon Genetics), 5 µl každého vzorku, 5 µl každé pozitivní kontroly, 5 µl negativní kontroly. Samotná elektroforéza probíhala 10–15 minut při 135 V. Jakmile skončila elektroforéza, byl gel přesunut na UV dokumentační systém, kde byl gel vyfocen a foto gelu bylo uloženo nejprve na SD kartu a pak do PC. Následně mohl být výsledek PCR reakce vyhodnocen.

Po restričním štěpení byly vzorky nanášeny na 4 % agarózový gel po 20 µl. Elektroforéza probíhala po dobu 25 až 45 minut při 135 V. Gel byl opět přesunut na gel UV dokumentační zařízení, vyfocen, foto gelu uloženo na SD paměťovou kartu a uloženo v PC. Výsledky RFLP byly vyhodnoceny vzhledem k použitému hmotnostnímu markeru.

### 10.2.2 SEKVENACE

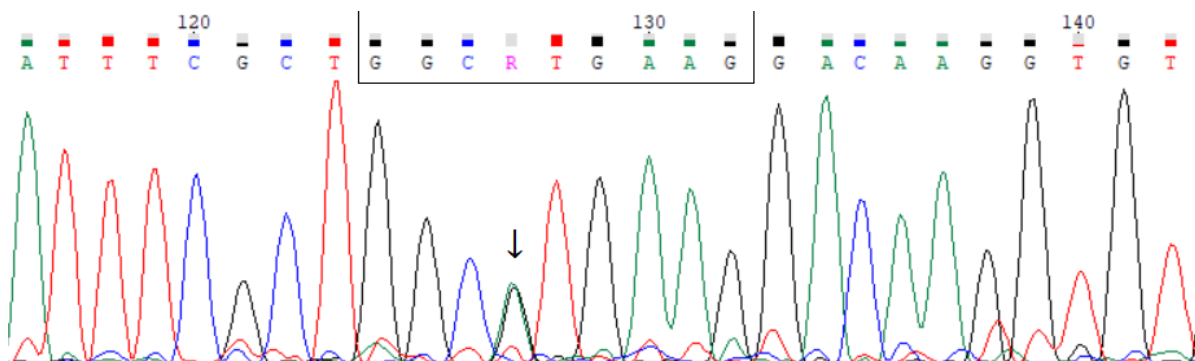
U čtyř vzorků nebylo možné při analýze genu *COMT* správně odečíst výsledek restričního štěpení. Z toho důvodu byly neštěpené PCR produkty zaslány firmě SeqMe s.r.o., která poskytuje komplexní služby v oblasti DNA sekvenování a Real-Time PCR. Zasláné vzorky byly podrobeny Sangerovu sekvenování, konkrétně byl použit balíček StandardSeq využívající standardní sekvenační protokol pro běžné templáty – plazmidy a PCR produkty.

Před zasláním vzorku bylo nutné přečistit PCR produkt. Přečistění proběhlo enzymaticky pomocí SAP-Exo kitu (Jena Bioscience GmbH). Reakční mix enzymů obsahuje dva

hydrolytické enzymy, rekombinantní alkalickou fosfatázu (rSAP) a exonukleázu I (Exo I). Kombinace těchto enzymů zajišťuje úplnou defosforylaci dNTP a degradaci zbytkových primerů. Ve 200 µl mikrozkušavce bylo smícháno 5 µl PCR produktu a 2 µl SAP-Exo mixu, směs byla promíchána a inkubována dle doporučení výrobce 10 min při 37 °C a poté inaktivována 10 min při 80 °C.

Po přečištění byla připravena 10 µl směs pro odeslání na sekvenaci. Do 200 µl mikrozkušavky bylo napipetováno 2 µl (50 ng) přečištěného PCR produktu, 0,5 µl forward primeru a 7,5 µl vody (aqua purificata). Směs byla důkladně promíchána. Mikrozkušavky byly řádně popsány, vloženy do obálky společně s objednávkovým formulářem a odeslány na adresu společnosti SeqMe.

Výsledky sekvenace byly analyzovány v programu Chromas, kde byla vyhledána specifická sekvence obklopující hledanou variantu. V tomto případě se jednalo o sekvenci GGCGTGAAG, jelikož byl hledán triplet GTG (případně ATG) obklopený tripletami GGC a AAG. Na obrázku níže je ukázka výsledku sekvenace, kde je vidět Val/Met genotyp. Šipkou je označena konkrétní pozice a v černém rámečku je vyznačena obklopující sekvence.



Obr. 7: Výsledek sekvenace ukazující na přítomnost Val/Met genotypu.

Níže je uvedena amplifikovaná sekvence genu *COMT* dlouhá 217 bp použitá pro sekvenaci. Červeně je znázorněn příslušný polymorfismus, žlutě pak obklopující sekvence. Zeleně je vyznačen forward primer a modře reverse primer.

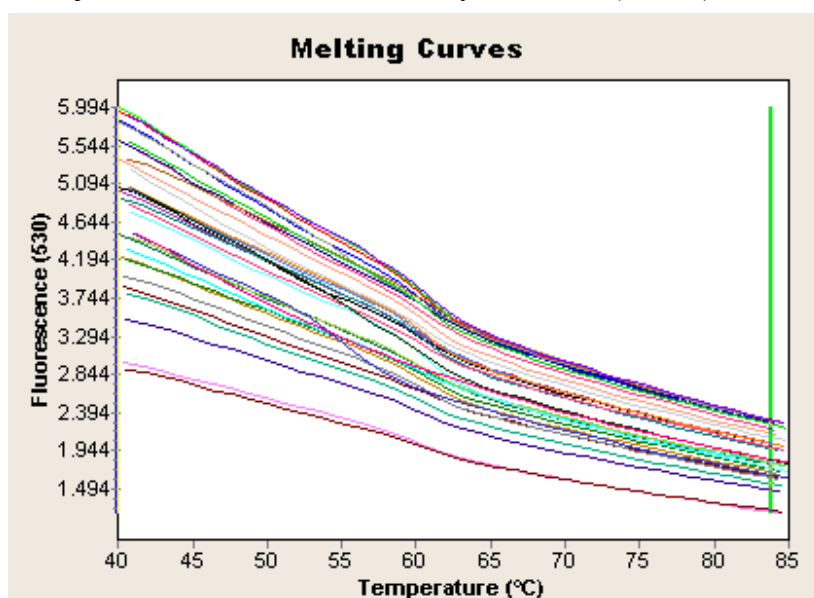
**TCGTGGACG****CCGTGATTCAGG**AGCACCAGCCCTCCGTGCTGCTGGAGCTGGGGGCCTAC  
 TGTGGCTACTCAGCTGTGCGCATGGCCCGCCTGCTGTACCAGGGGCGAGGCTCATCAC  
 CATCGAGATCAACCCCGACTGTGCCGCCATCACCAGCGGATGGTGGATTTCGCT**GGCG**  
**TGAAG**GACAAGGTGTGCAT**GCCTGACCCGTTGTCAGACCT**

## 11 VÝSLEDKY

Pro experimentální část byl použit soubor pacientů trpících psychickými poruchami. Tento soubor byl vyšetřen na přítomnost polymorfismů *CYP2D6*\*3, *CYP2D6*\*4, *CYP2D6*\*5/\*5, *CYP2C19*\*2, *CYP2C19*\*3, *CYP2C9*\*2, *CYP2C9*\*3, *CYP1A2* (*rs4646425*) a *COMT* (*rs4680*).

### 11.1 CYP2D6

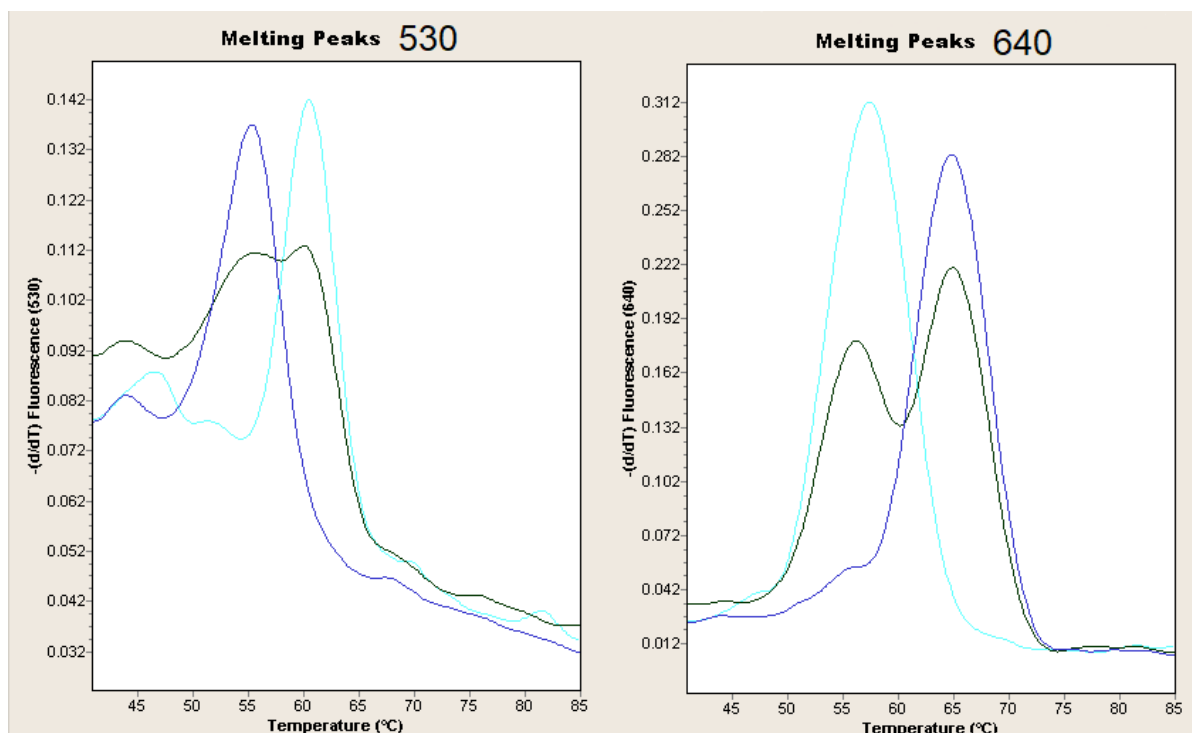
Metodou Real-time PCR pro gen *CYP2D6* (LightMix® Kit *CYP2D6*\*3, \*4 and \*5/\*5) bylo vyšetřeno 49 psychiatrických pacientů, avšak jen u 44 byly výsledky průkazné. Výsledky byly analyzovány v programu LighCycler Software (verze 4.1.1.21.), kde byly pro analýzu využita metoda křivky tání. Principem metody křivky tání je kontinuální měření fluorescence, která vzniká při denuraci dsDNA (double-stranded) na ssDNA důsledkem zvyšující se teploty. Níže je ukázka křivek tání testovaných vzorků (Obr. 9).



Obr. 8: Křivky tání vyšetřovaných vzorků v kanálu 530.

Výsledky byly analyzovány a následně odečítány z tzv. melting peaks v kanálech 530 a 640, kde bylo důležité, při které teplotě byl na grafu viditelný „peak“. Kanál 530 sloužil pro analýzu polymorfismu *CYP2D6*\*3. V případě kanálu 530 šlo při teplotě 61,3 °C o wild type (alela \*1) a při 55,8 °C o mutantní alelu (alela \*3). Pakliže byly pozorovány peaky při obou teplotách, jednalo se o heterozygota. V kanálu 640 byl analyzován polymorfismus *CYP2D6*\*4. Peak při teplotě 58 °C reprezentoval přítomnost wild type alely (\*1) a při 65,5 °C mutantní alely \*4, přítomnost obou alel a tedy heterozygota byla prokázána při výskytu obou peaků. Třetí kanál 705 sloužil především pro správnou kontrolu amplifikace. Pokud by v předchozích kanálech nebyl žádný peak, ale v kanálu 705 ano (48,8 °C), jednalo by se o genotyp *CYP2D6*\*5/\*5,

který však nebyl v tomto souboru detekován. Ukázka melting peaks je zobrazena na obrázku 9, pro přehlednost jsou zahrnuty pouze pozitivní kontroly (vlevo je kanál 530 FAM a vpravo kanál 640 HEX).



Obr. 9: Melting peaks pozitivních kontrol *CYP2D6*\*3 a *CYP2D6*\*4.

Na základě přítomnosti peaků byly odečteny výsledky. V tabulce XIX je zobrazen výsledný počet jednotlivých genotypů.

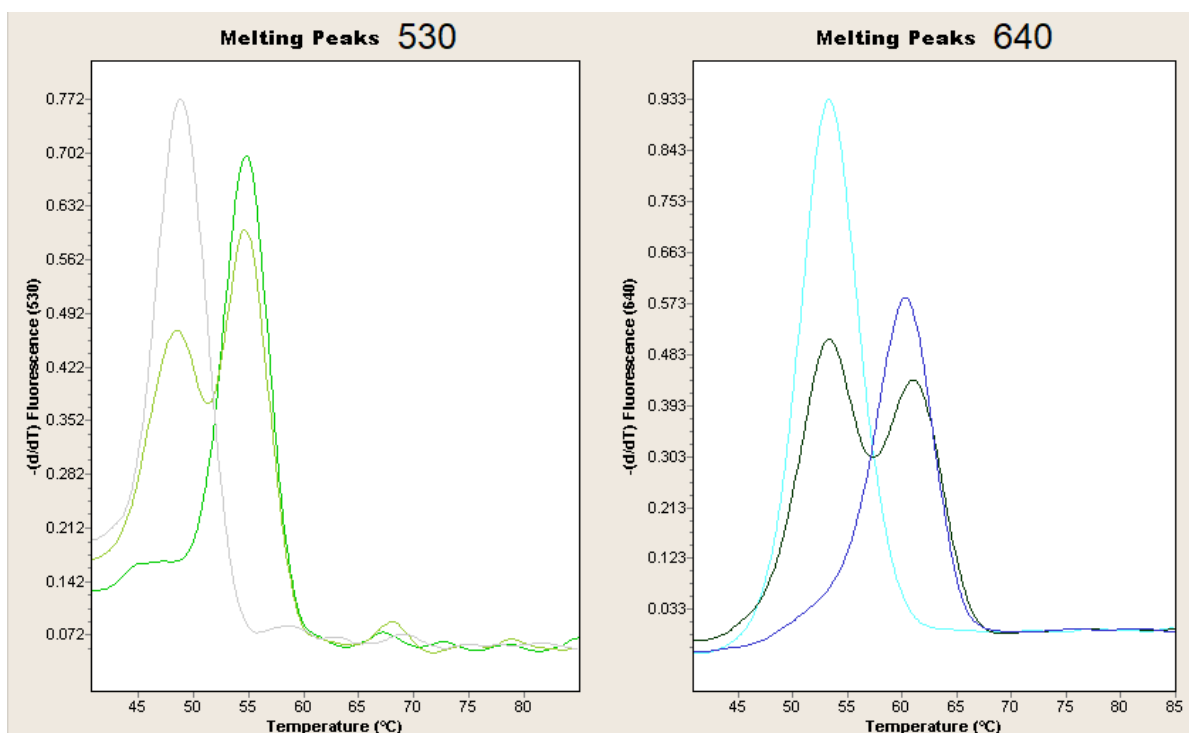
Tab. XIX: Tabulka četnosti genotypů *CYP2D6* v testovaném souboru pacientů.

| Genotyp          | Metabolismus | Počet | Procentuální zastoupení |
|------------------|--------------|-------|-------------------------|
| *1/*1            | EM           | 30    | 68,18                   |
| *1/*3            | IM           | 1     | 2,27                    |
| *1/*4            | IM           | 10    | 22,73                   |
| *3/*4            | PM           | 1     | 2,27                    |
| *4/*4 nebo *4/*5 | PM           | 2     | 4,55                    |

## 11.2 CYP2C19

Metodou Real-time PCR pro gen *CYP2C19* (LightMix<sup>®</sup> Kit *CYP2C19*\*2 and *CYP2C19*\*3) bylo vyšetřeno 49 psychiatrických pacientů, avšak jen u 45 byly odečteny výsledky analýzy. Analýza výsledků pro gen *CYP2C19* probíhala podobně jako u *CYP2D6*. Pro polymorfismus *CYP2C19*\*2 byly odečítány výsledky v kanále 530 a pro *CYP2C19*\*3 v kanále 640. V kanále 530 signál při teplotě 54,4 °C odpovídal wild type alele (*CYP2C19*\*1), a signál při teplotě

48,6 °C odpovídal mutantní alele (*CYP2C19\*2*) a signály odečtené při obou teplotách 48,6/54,4 °C heterozygotnímu genotypu *CYP2C19\*1/\*2*. V případě kanálu 640 odpovídal signál detekovaný při teplotě 53,4 °C wild type alele (*CYP2C19\*1*), při teplotě 60,8 °C mutantní alele *CYP2C19\*3* a signál detekovaný při obou teplotách 53,4/60,8 °C heterozygotnímu genotyp *CYP2C19\*1/\*3*. V následujícím obrázku (Obr. 10) jsou zobrazeny ukázky melting peaků pro pozitivní kontroly.



Obr. 10: Melting peaks pozitivních kontrol *CYP2C19\*2* a *CYP2C19\*3*.

Analýzou výstupů z programu LightCycler Software (verze 4.1.1.21.) byly odečteny jednotlivé genotypy, jejichž četnost je znázorněna v tabulce níže (Tab. XX).

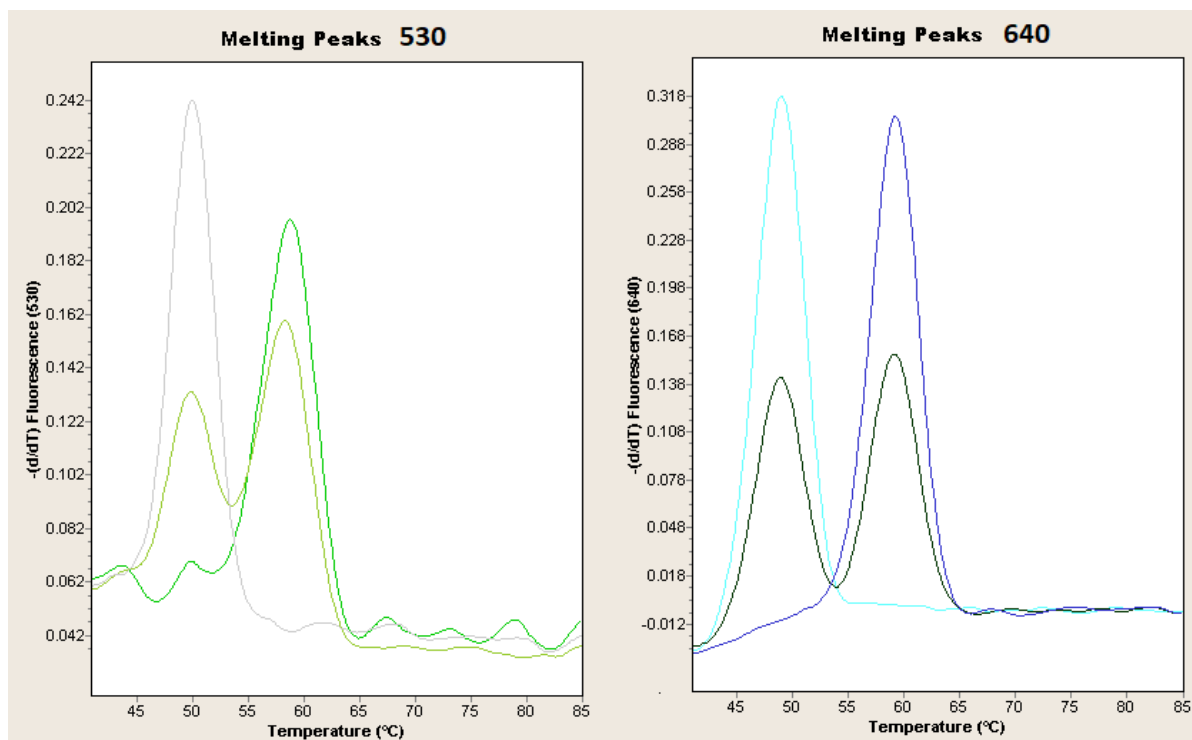
Tab. XX: Tabulka četností genotypů *CYP2C19*.

| Genotyp | Metabolismus | Počet | Procentuální zastoupení |
|---------|--------------|-------|-------------------------|
| *1/*1   | EM           | 38    | 84,45                   |
| *1/*2   | IM           | 6     | 13,33                   |
| *2/*3   | PM           | 1     | 2,22                    |

### 11.3 CYP2C9

Metodou Real-time PCR pro gen *CYP2C9* (LightMix<sup>®</sup> Kit *CYP2C9\*2* and *CYP2C9\*3*) bylo vyšetřeno 49 psychiatrických pacientů, avšak výsledky byly průkazné u 46. Melting peaky byly opět detekovány v kanálech 530 a 640. Pro polymorfismus *CYP2C9\*2* byl vypovídající

kanál 530 a pro *CYP2C9*\*3 kanál 640. Pozitivní signály odečtené v kanálu 530 při teplotě 58,8 °C odpovídaly wild type genotypu *CYP2C9* \*1/\*1, signál při teplotě 50 °C odpovídal mutantní alele (*CYP2C9*\*2) a signály při obou teplotách 50/58,9 °C heterozygotnímu genotypu *CYP2C9*\*1/\*2. V případě kanálu 640 odpovídal signál detekovaný při teplotě 48,9 °C wild type alele (*CYP2C9*\*1), při teplotě 59 °C mutantní alele *CYP2C9*\*3 a signál detekovaný při obou teplotách 48.8/59 °C heterozygotnímu genotypu *CYP2C9* \*1/\*3. Na obrázku 11 jsou ukázky peaků pozitivních kontrol.



Obr. 11: Melting peaks pozitivních kontrol *CYP2C9*\*2 a *CYP2C9*\*3.

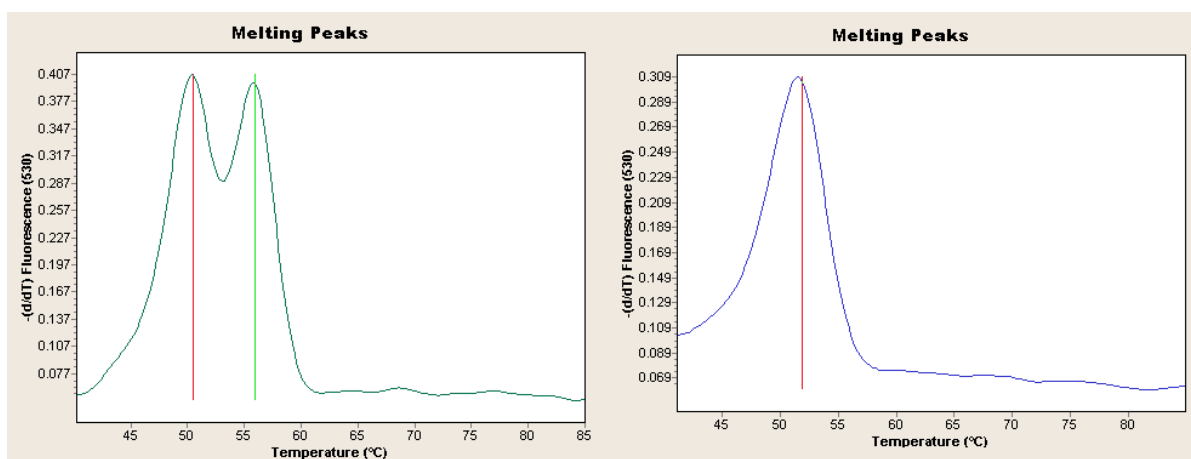
Na základě výstupů z programu LightCycler Software (verze 4.1.1.21.) byly odečteny výsledné genotypy pacientů, jejichž četnost je zobrazena v následující tabulce (Tab. XXI).

Tab. XXI: Tabulka četností genotypů *CYP2C9*.

| Genotyp | Metabolismus | Počet | Procentuální zastoupení |
|---------|--------------|-------|-------------------------|
| *1/*1   | EM           | 39    | 84,78                   |
| *1/*2   | IM           | 1     | 2,17                    |
| *1/*3   | IM           | 4     | 8,71                    |
| *2/*2   | PM           | 1     | 2,17                    |
| *3/*3   | PM           | 1     | 2,17                    |

## 11.4 CYP1A2

Pomocí real-time PCR kitem TIB MOLBIOL LightSNiP rs4646425 *CYP1A2* bylo vyšetřeno 49 vzorků, přičemž výsledky byly průkazné u 48. Jelikož byl vyšetřován jeden konkrétní polymorfismus, analýza probíhala pouze v kanálu 530. Byla vyšetřována přítomnost alely C a alely T. Pozitivní signály odečtené v kanálu 530 při teplotě 51,99 °C odpovídaly wild type genotypu *CYP1A2* C/C, při teplotě 57,6 °C mutantnímu genotypu *CYP1A2*T/T a signál



Obr. 12: Melting peaks genotypů C/T (vlevo) a C/C (vpravo).

detekovaný při obou teplotách 51,99/57,6 °C heterozygotnímu genotypu *CYP1A2* C/T. V rámci použitého kitu nebyly poskytnuty pozitivní kontroly, níže jsou tedy ukázky melting peaků pro genotypy *CYP1A2* C/T (vlevo) a *CYP1A2* C/C (vpravo) (Obr. 12). Genotyp *CYP1A2* T/T se v analyzované skupině pacientů nevyskytoval.

Analýzou výstupů z programu LightCycler Software (verze 4.1.1.21.) byly odečteny jednotlivé genotypy, jejichž počet je zobrazen v následující tabulce (Tab. XXII).

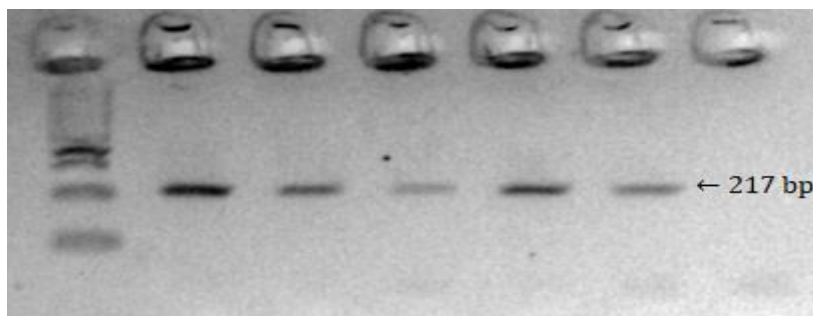
Tab. XXII: Tabulka četností genotypů *CYP1A2*.

| Genotyp | Počet | Procentuální zastoupení |
|---------|-------|-------------------------|
| C/C     | 47    | 97,92                   |
| C/T     | 1     | 2,08                    |



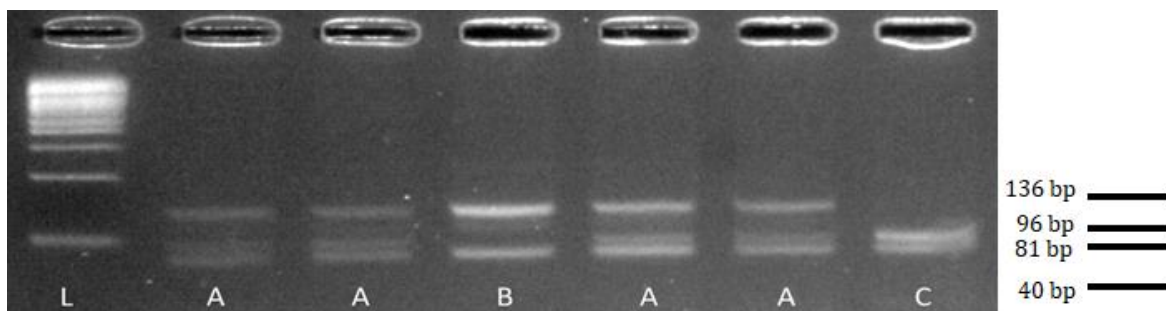
## 11.5 COMT (Val158Met)

Metodou PCR-RFLP a gelovou elektroforézou byly v prvním kroku získány jednotlivé PCR produkty (271 bp) jejichž ukázka je na obrázku níže (Obr. 13).



Obr. 13: Detekce PCR produktů genu *COMT*(Val158Met) pomocí gelové elektroforézy,.

Následovalo restriční štěpení a opětovná gelová elektroforéza. Na základě výsledků restričního štěpení byly stanoveny jednotlivé genotypy. Příklad výsledků restričního štěpení je zobrazen na následujícím obrázku (Obr. 14), kde jsou jednotlivé produkty popsány písmeny: L – ladder, A – Val/Met, B – Val/Val, C – Met/Met. Velikosti produktů restričního štěpení jsou: 136 bp a 81 bp u homozygota Val/Val, 136 bp, 96 bp, 81 bp a 40 bp u heterozygota (Val/Met), 96 bp, 81 bp a 40 bp u homozygota Met/Met. Produkt o velikosti 40 bp byl velmi špatně viditelný, vzhledem k jeho velikosti.



Analýza genu *COMT* byla nejvíce problematická, proto ze 49 vzorků byly získány výsledky

Obr. 14: PCR RFLP pro gen *COMT* (Val158Met). Výsledky PCR RFLP analýzy po restričním štěpení vizualizované na 4% agarózovém gelu.

pouze pro 40 jedinců. U čtyř vzorků nebylo možné zodpovědně odečíst výsledky PCR RFLP. Důvodem byla nedostatečná koncentrace DNA nebo její špatná kvalita, která nakonec umožnila pouze amplifikaci PCR produktu. Tyto vzorky, konkrétně získané PCR produkty, byly po přečištění a potřebné přípravě pro sekvenaci (50 ng PCR produktu, 25 pmol primeru, celkový objem 10 $\mu$ l) použity odeslány na sekvenaci, která byla provedena formou komerční služby firmou SeqMe s.r.o. U pěti vzorků, kde nevyšel PCR produkt byla sekvenace bezvýznamná. Na základě shromážděných výsledků byla sestavena tabulka četnosti (Tab. XXIII).

Tab. XXIII: Četnost zastoupení genotypů genu *COMT*.

| <b>Genotyp</b> | <b>Počet</b> | <b>Procentuální zastoupení</b> |
|----------------|--------------|--------------------------------|
| Met/Met        | 17           | 42,5                           |
| Val/Met        | 14           | 35                             |
| Val/Val        | 9            | 22,5                           |

## 11.6 POPULAČNÍ STUDIE, POROVNÁNÍ ALELICKÝCH FREKVENCÍ

V této kapitole bude rozebráno frekvenční zastoupení jednotlivých alel zkoumaných genů v populaci. Pro geny *CYP2D6* a *CYP2C19* byly jako kontrolní skupina využity údaje z projektu Quinta Analytica (QA), který byl proveden v genetické laboratoři GENLABS v předchozích letech a zahrnoval lékařsky potvrzené zdravé dobrovolníky. Dle tabulky XXIV je zřejmé, že frekvence alel napříč populačními studii shodují i s výsledky této práce.

Tab. XXIV: Porovnání alelické frekvence *CYP2D6* toho výzkumu, americké populace a evropské populace.

| <b>Alela<br/><i>CYP2D6</i></b> | <b>% GENLABS<br/>tento výzkum<br/>(n=45)</b> | <b>% QA<br/>(n=67)</b> | <b>% americká<br/>populace (n=208)<br/>(Gaedigk et al. 1999)</b> | <b>% evropská<br/>populace (n=589)<br/>(Sachse et al., 1997)</b> |
|--------------------------------|--|------------------------|--|--|
| *1                             | 80,68  | 73,88                  | 70,7   | 68,8   |
| *3                             | 2,27   | 3,73                   | 1  | 2,04   |
| *4                             | 17,05  | 22,39                  | 17,5   | 20,7   |
| *5                             | 0  | 0                      | 3,8  | 1,95   |

Pro porovnání genu *CYP2C19* byl taktéž využit projekt QA společně s daty z populačních studií. Jednotlivé alelické frekvence jsou zobrazeny v tabulce XXV.

Tab. XXV: Porovnání alelické frekvence *CYP2C19* toho výzkumu, řecké populace a evropské populace.

| <b>Alela<br/><i>CYP2C19</i></b> | <b>% GENLABS<br/>Tento výzkum<br/>(n=45)</b> | <b>% QA<br/>(n=67)</b> | <b>% řecká populace<br/>(n=283)<br/>(Arvanitidis et al., 2007)</b> | <b>% evropská<br/>populace<br/>(n=1 689 308)<br/>(Ionova et al., 2020)</b> |
|---------------------------------|--|------------------------|--|--|
| *1                              | 91,11  | 84,96                  | 86,92  | 81,29  |
| *2                              | 7,78   | 15,04                  | 13,07  | 18,68  |
| *3                              | 1,11   | 0                      | 0  | 0,03   |

Dle hodnot z tabulky XXV je zjevné, že frekvence alel získaná v rámci výzkumu v laboratoři GENLABS odpovídá evropskému standardu.

V tabulce XXVI jsou porovnávány hodnoty získané z výsledků tohoto výzkumu a dvou populačních studií.

Tab. XXVI: Porovnání alelické frekvence *CYP2C9* toho výzkumu, španělské populace a evropské populace.

| <b>Alela<br/>CYP2C9</b> | <b>% GENLABS<br/>Tento výzkum<br/>(n=46)</b> | <b>% španělská populace<br/>(n=1076)<br/>(Sánchez-Diz et al., 2009)</b> | <b>% evropská populace<br/>(n=56 945)<br/>(Zhou et al., 2017)</b> |
|-------------------------|--|---|---|
| *1                      | 90,22  | 76,58   | 81,8  |
| *2                      | 3,26   | 15,61   | 11,7  |
| *3                      | 6,52   | 7,81  | 5,6   |

V tabulce XXVI je viditelná podobnost mezi frekvencemi alel, liší se jen získané hodnoty alely \*2, což může být zapříčiněno velikostí testovaného souboru pacientů.

Dále byla porovnávána přítomnost alel A a T v genu *CYP1A2* polymorfismu rs464625 mezi francouzskou populací, tchajwanskou populací a výsledky této práce. Podrobněji jsou vypsány v tabulce XXVII.

Tab. XXVII: Porovnání alelické frekvence *CYP1A2* rs464625 toho výzkumu, francouzské populace a tchajwanské populace.

| <b>Alela<br/>CYP1A2<br/>rs4646425</b> | <b>% GENLABS<br/>Tento výzkum<br/>(n=48)</b> | <b>% francouzská populace<br/>(n=96)<br/>(Tchernitchko et al., 2011)</b> | <b>% tchajwanská populace<br/>(n=158)<br/>(Kuo et al., 2013)</b> |
|---------------------------------------|--|--|--|
| C                                     | 98,96  | 97,4   | 92,79  |
| T                                     | 1,04   | 2,6  | 7,21   |

V tabulce XXVII je viditelná shoda mezi výsledky výzkumu a francouzskou populací, jelikož se jedná o stejné etnické skupiny, kde je výskyt alely T poměrně vzácný. V případě tchajwanské populace je frekvence alely T vyšší, což je dáno skutečností, že v asijské populaci je tato alela častější.

V poslední řadě budou uvedeny a porovnány jednotlivé genotypy pro rs4680 genu *COMT* (*Val158Met*). V tomto případě nejsou fenotypové projevy jednoznačně kategorizovány stejně jako u výše uvedených genu z rodiny *CYP P450*. Jako kontrolní skupina české populace byl použit soubor pacientů vyšetřených v laboratoři GENLABS s.r.o v roce 2017.

Tab. XXVIII: Porovnání frekvence genotypů polymorfismu rs4680 genu *COMT* mezi řeckou populací, evropskou populací a testovaným souborem.

| <i>COMT</i><br>(Val158Met)<br>genotyp | % GENLABS<br>Tento<br>výzkum<br>(n=40) | % GENLABS<br>česká populace<br>(n=135) | % řecká populace<br>(n=108)<br>(Kotrotsou et al.,<br>2012) | % evropská<br>populace<br>(n=258)<br>(Jacobsen et al.,<br>2012) |
|---------------------------------------|--|--|--|---|
| Val/Met                               | 42,5                                   | 50,4                                   | 51,9   | 43,02   |
| Met/Met                               | 35                                     | 25,9                                   | 22,2   | 34,11   |
| Val/Val                               | 22,5                                   | 23,7                                   | 25,9   | 22,87   |

Z údajů v tabulce je jasně viditelná frekvenční podobnost v jednotlivých genotypch, s nejčastěji zastoupeným Val/Met genotypem.

## 11.7 PACIENTI

Pro účely výzkumu byly ošetřujícím lékařem poskytnuty informace týkající se diagnózy, medikace a reakce na léčbu. Tyto informace byly poskytnuty na základě informovaného souhlasu a dobrovolnosti. V této kapitole budou dále rozebrány jednotlivé parametry.

Testovaným pacientům bylo diagnostikováno poměrně velké spektrum různých diagnóz, některým i více diagnóz najednou. Diagnózy byly uvedeny klasicky v kódech diagnóz, které stanovuje Číselník diagnóz vycházející z Mezinárodní klasifikace nemocí. Diagnózy se dělí do 11 základních skupin, jejich kódy a specifikace jsou uvedeny v tabulce XXIX.

Tab. XXIX: Kategorie duševních poruch a poruch chování.

| Kód     | Popis   |
|---------|---|
| F00-F09 | Organické duševní poruchy včetně symptomatických                                  |
| F10-F19 | Poruchy duševní a poruchy chování způsobené užíváním psychoaktivních látek        |
| F20-F29 | Schizofrenie, poruchy schizotypální a poruchy s bludy                             |
| F30-F39 | Afektivní poruchy (poruchy nálady)  |
| F40-F48 | Neurotické, stresové a somatoformní poruchy                                       |
| F50-F59 | Syndromy poruch chování, spojené s fyziologickými poruchami a somatickými faktory |
| F60-F69 | Poruchy osobnosti a chování u dospělých   |
| F70-F79 | Mentální retardace  |
| F80-F89 | Poruchy psychického vývoje  |
| F90-F98 | Poruchy chování a emocí s obvyklým nástupem v dětství a v dospívání               |
| F99     | Neurčená duševní porucha  |

Níže jsou konkrétní diagnózy týkající se vyšetřovaného souboru pacientů (Tab. XXX) a jejich konkrétní počty.

Tab. XXX: Jednotlivé diagnózy vyšetřovaných pacientů a jejich počty v rámci vyšetřovaného souboru.

| kód DG | Počet | Popis   |
|--------|-------|---|
| F06.4  | 1     | Organická úzkostná porucha  |
| F10.2  | 1     | Závislost na alkoholu   |
| F12.2  | 6     | Poruchy duševní a poruchy chování způsobené užíváním kanabinoidů      |
| F19.2  | 1     | Syndrom závislosti  |
| F20.0  | 3     | Paranoidní schizofrenie   |
| F20.2  | 7     | porucha s trvalými bludy  |
| F20.3  | 1     | Nediferencovaná schizofrenie  |
| F23.1  | 2     | Akutní polymorfní psychotická porucha se symptomy schizofrenie        |
| F23.3  | 1     | Jiné akutní psychotické poruchy převážně s bludy                      |
| F23.9  | 1     | Akutní a přechodné nespecifikované psychotické poruchy                |
| F25.1  | 3     | Schizoafektivní porucha, depresivní typ                               |
| F25.2  | 1     | Schizoafektivní porucha, smíšený typ                                  |
| F31.3  | 1     | Bipolární afektivní porucha, současná fáze lehká nebo střední deprese |
| F32.1  | 2     | Středně těžká deprese   |
| F32.3  | 1     | Těžká depresivní fáze s psychotickými příznaky                        |
| F41.1  | 1     | Generalizovaná úzkostná porucha                                       |
| F41.2  | 5     | Úzkostně depresivní porucha   |
| F42.1  | 1     | Obsedantně kompulzivní porucha  |
| F43.1  | 4     | Postrumatická stresová porucha  |
| F43.2  | 3     | Poruchy přizpůsobení  |
| F50.0  | 1     | Mentální anorexie   |
| F60.3  | 5     | Emočně nestabilní porucha osobnosti                                   |
| F61    | 2     | Smíšená porucha osobnosti   |

Pacientům byla lékařem na základě diagnózy navržena vhodná léčba, na kterou reagovali s různou efektivitou. Většině pacientů byla léčba pozměňována nebo užívali několik léčiv současně. Častá byla kombinace escitalopramu společně s hydroxyzinem. Nejčastěji užívaným léčivem byl escitalopram, který užívalo 67,34 % pacientů. Druhým nejčastějším léčivem byl již dříve zmíněný hydroxyzin, který užívalo 28,57 % pacientů. Ostatní léčiva byla užívána spíše sporadicky. V tabulce XXXI jsou vypsána použitá léčiva a počet pacientů, kteří léčivo užívali.

Tab. XXXI: Psychofarmaka použitá k léčbě pacientů a jejich počet napříč pacienty.

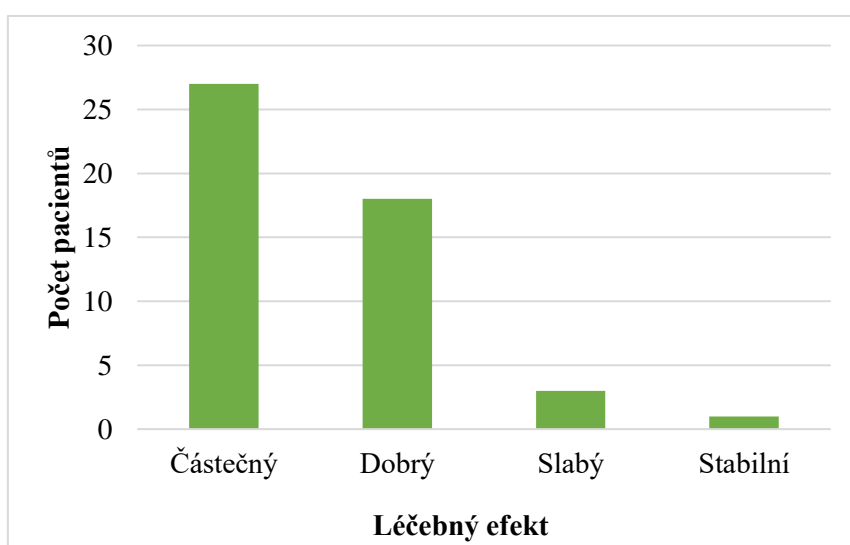
| Psychofarmakum | Počet | Psychofarmakum | Počet |
|----------------|-------|----------------|-------|
| Escitalopram   | 33    | Venlafaxin     | 3     |
| Paroxetin      | 3     | Pregabalin     | 2     |
| Sertralin      | 4     | Tiapridal      | 3     |
| Risperidon     | 3     | Haloperidol    | 2     |
| Trazodon       | 7     | Quetiapin      | 5     |
| Mirtazapin     | 5     | Lamotrigin     | 4     |
| Aripiprazol    | 6     | Gabapentin     | 2     |
| Ziprasidon     | 1     | Olanzapin      | 4     |
| Hydroxyzin     | 14    | Clozapin       | 4     |

Ošetřujícím lékařem byly taktéž poskytnuty informace týkající se účinnosti léčby. Na základě těchto dat byla sestavena tabulka (Tab. XXXII) kategoricky rozlišující léčebné efekty a počty pacientů, ke kterým se konkrétní efekt vztahuje.

Tab. XXXII: Rozdělení léčebných efektů dle počtu pacientů.

| Léčebný efekt | Počet | Procentuální zastoupení |
|---------------|-------|-------------------------|
| Částečný      | 27    | 55,1                    |
| Dobry         | 18    | 36,74                   |
| Slabý         | 3     | 6,12                    |
| Stabilní      | 1     | 2,04                    |

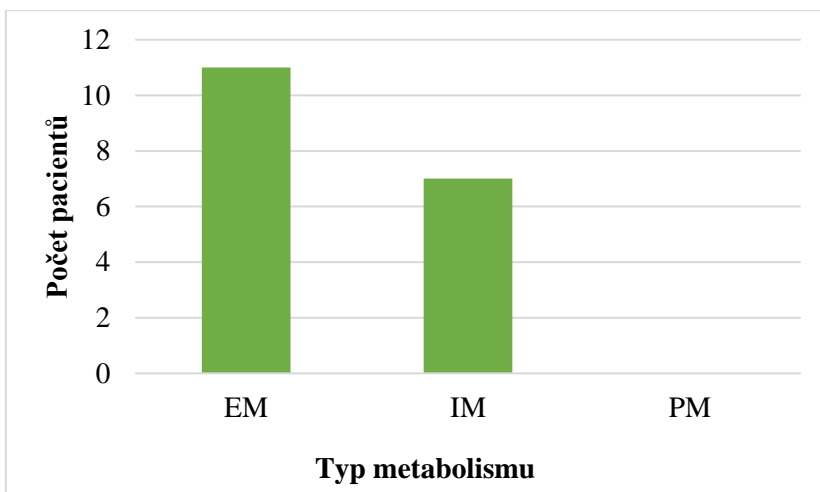
Stejně údaje jsou graficky znázorněny v následujícím grafu (Obr. 15).



Obr. 15: Rozdělení pacientů do skupin dle reakce na léčbu.

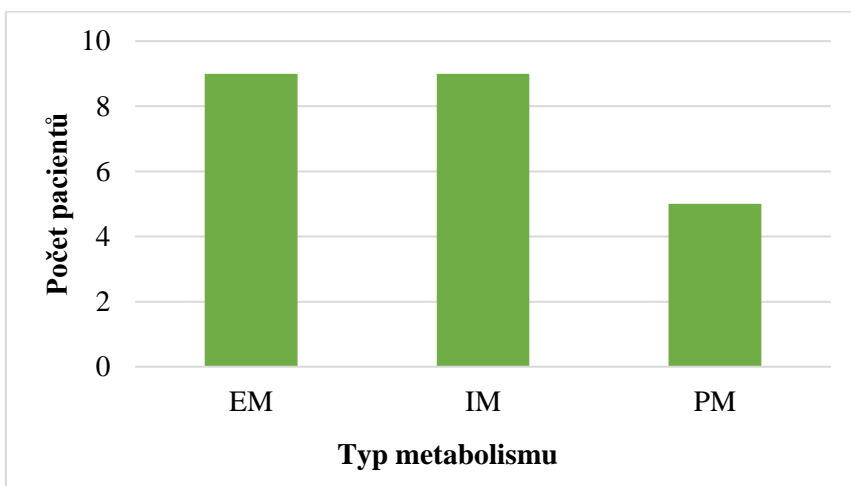
Z tabulky a grafu je zřejmé, že více než polovina pacientů (55,1 %) vykazovala pouze částečnou efektivitu léčby. Třetina pacientů (36,74 %) byla léčena efektivně a tři pacienti (6,12 %) reagovali na léčbu nepříznivě. Jeden pacient nebyl léčen psychofarmaky, ale pouze psychoterapií, jeho stav je označen jako stabilní.

Pro přehlednost byly pacienti rozděleni na tři skupiny na základě jejich reakce na léčbu (dobrá, částečná a špatná reakce). Tyto skupiny byly dále porovnávány jako celky. První skupinou byly pacienti s dobrým léčebným efektem. U těchto pacientů bylo zjištěno většinové zastoupení (61,11 %) WT genotypů odpovídajících normálnímu metabolismu. U sedmi pacientů (38,89 %) byl zjištěn genotyp IM odpovídající středním metabolizátorům. Pomalí metabolizátoři se v této skupině nevyskytovali. Tyto hodnoty jsou přehledněji shrnuty v grafu níže (Obr. 16).



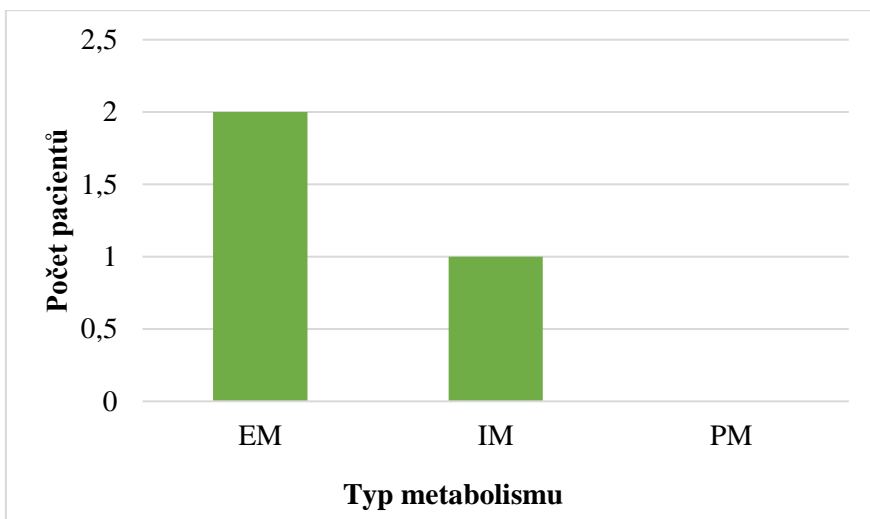
Obr. 16: Rozdělení pacientů s dobrým léčebným efektem dle typu metabolismu.

Skupina pacientů s částečnou reakcí na léčbu zahrnuje více než polovinu pacientů (60,87 %) s IM nebo PM fenotypem a devět pacientů s EM (39,13 %). Jejich rozdělení dle typu metabolismu je zobrazeno v následujícím grafu (Obr. 17)



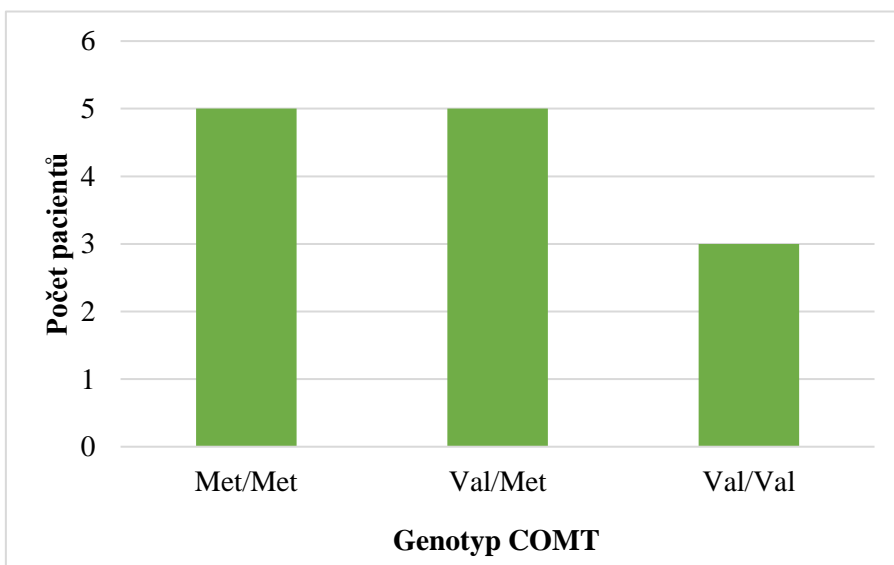
Obr. 17: Rozdělení pacientů se slabým léčebným efektem dle typu metabolismu

Nejmenší skupinu pacientů tvoří ti, jež vykazovali slabou reakci na léčbu. Jejich rozdělení dle typu metabolismu je znázorněno na následujícím grafu (Obr. 18). EM tvořili 66,67 % a IM 33,33 %.



Obr. 18: Rozdělení pacientů se slabým léčebným efektem dle typu metabolismu

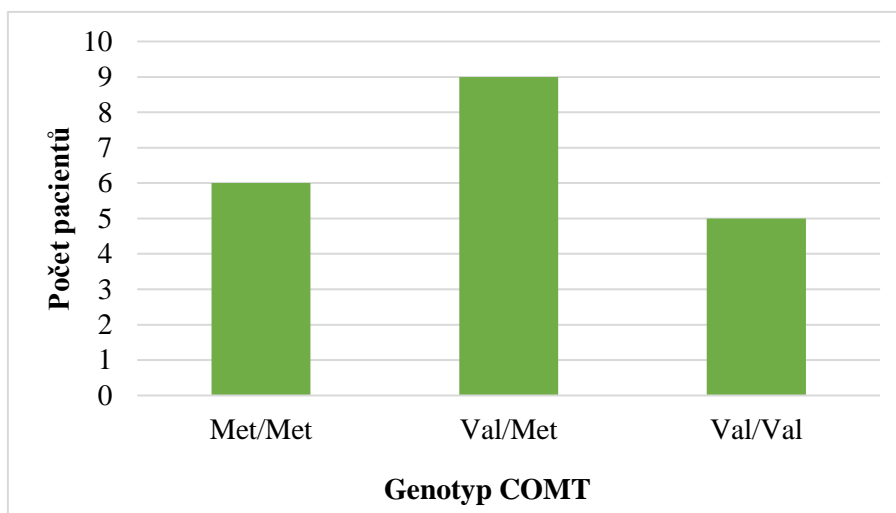
Dále byly sestaveny grafy četnosti zastoupení COMT genotypů ve skupinách pacientů s dobro, částečnou a špatnou reakcí na léčbu. V případě skupiny s dobrou reakcí byly genotypy zastoupeny téměř stejně (Met/Met 38,46 %, Val/Met 38,46 % a Val/Val 23,07 %). Data jsou přehledněji zobrazena v následujícím grafu (Obr. 19).



Obr. 19: Graf četnosti genotypů COMT ve skupině pacientů s dobrou reakcí na léčbu.

V případě pacientů s částečnou reakcí na léčbu byly jednotlivé genotypy COMT zastoupeny v různém počtu s nejčastěji se vyskytujícím Val/Met (45 %) poté Met/Met (30 %) a Val/Val (25 %). Data jsou zobrazena v grafu níže (Obr. 20).





Obr. 20: Graf četnosti genotypů COMT ve skupině pacientů s částečnou reakcí na léčbu.

V poslední skupině pacientů se slabou reakcí na léčbu se genotypy COMT vyskytovali v počtu jeden Val/Val a jeden Met/Met genotyp. U jednoho vzorku vzhledem k nízké koncentraci nebylo možné uvedený genotyp stanovit ani pomocí sekvenace.

Výsledky získané postupným zpracováním jednotlivých dat budou podrobněji rozebrány v diskuzi. Zároveň byla provedena mnohorozměrná CCA analýza pro všechny sledované faktory (jednotlivé analyzované genotypy *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP1A2*, *COMT*, diagnózy, reakce na léčbu, použité léky), která ale neprokázala žádný statisticky významný faktor, který by vysvětloval vliv genotypu na průběh léčby.

## 12 DISKUZE

Součástí individuálně přizpůsobeného přístupu k psychiatrickému pacientovi je důkladná personalizovaná psychoterapie, ale i správná medikace. Významný rozvoj farmakogenomiky a farmakogenetiky umožňuje ještě lepší implementaci principů personalizované medicíny v psychiatrii. V oblasti farmakogenomiky bylo největšího pokroku dosaženo studiem genetické variability ovlivňující metabolismus léčiv. Potenciálními možnostmi pro aplikaci personalizované medicíny v psychiatrii jsou: výběr personalizované léčby, přizpůsobené dávkování, individuální předvídání možných vedlejších účinků a personalizovaná následná léčba s rehabilitací. Pacienti podstupující léčbu psychofarmaky se často setkávají s nedostatečnými účinky terapie či zažívají vedlejší účinky, které jim znepríjemňují či dokonce znemožňují léčbu. Na účinnost léčby mohou mít vliv faktory prostředí, ale taktéž genetické faktory. Personalizovaná terapie psychofarmaky by v tomto ohledu usnadnila již takto komplikovanou léčbu psychiatrických pacientů.

V experimentální části této práce byly v souboru 49 pacientů vyšetřovány polymorfismy genů enzymů zodpovědných za metabolismus psychofarmak. Konkrétně se jednalo o geny *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP1A2* a *COMT*. Ve všech případech CYP genů byly vyšetřeny pouze polymorfismy odpovídající fenotypovým projevům EM, IM a PM, ne však genotypy zodpovědné za fenotypový projev UM, který taktéž značně ovlivňuje metabolismus léčiv. Pro zjištění tohoto fenotypu by bylo nutné použít jiné typy analýz, např. long range PCR (Steijns and Weide, 1998). Ve všech případech byl nejčastěji zastoupen WT genotyp. Pro účely této práce byl vyšetřen soubor 49 psychiatrických pacientů léčících se v 67,35 % escitalopramem s různými reakcemi na probíhající léčbu. U těchto pacientů byl porovnáván výsledný metabolický fenotyp (EM, IM, PM) s mírou efektivity léčby.

Při genetické analýze *CYP2D6* byl ve studovaném souboru nejvíce zastoupen genotyp *CYP2D6*\*1/\*1 (WT), vykazující fenotyp EM. Genotyp *CYP2D6*\*1/\*4 byl druhý nejčastěji zastoupený a fenotypově odpovídá IM, stejně jako *CYP2D6*\*1/\*3, který byl ve zkoumaném souboru pozorován pouze jednou. U dvou jedinců byl zjištěn genotyp *CYP2D6*\*4/\*4 (\*4/\*5) a u jednoho *CYP2D6*\*3/\*4, což jsou genotypy vyznačující se pomalým metabolismem (PM), protože alely *CYP2D6*\*3 a *CYP2D6*\*4 jsou nefunkční (Ingelman-Sundberg, 2004). Získané výsledky byly porovnávány s dalšími populačními studii. Při srovnání procentuálního zastoupení alel genu *CYP2D6* s americkou populací (Gaedigk et al. 1999) a evropskou populací (Sachse et al., 1997) se zkoumaný soubor pacientů ve smyslu zastoupení jednotlivých genotypů a jim odpovídajících fenotypů nijak zásadně nelišil.

V případě *CYP2C19* byl opět nejčastějším genotypem *CYP2C19*\*1/\*1, jež je charakterizován normální úrovní metabolismu. Druhý nejčastější byl genotyp *CYP2C19*\*1/\*2 (IM) a pouze u jednoho pacienta byl identifikován genotyp *CYP2C19*\*2/\*3 vyznačující se pomalým metabolismem. Při porovnání alelického zastoupení získaných výsledků s řeckou populací (Arvanitidis et al., 2007) a evropskou populací (Ionova et al., 2020) nebyly zjištěny významné rozdíly.

Stejně jako u dvou předchozích i v případě *CYP2C9* byl nejčastěji zastoupeným genotypem *CYP2C9*\*1/\*1 WT. Druhý nejčastější byl *CYP2C9*\*1/\*3 (IM) a poté po jednom genotypy *CYP2C9*\*1/\*2 (IM), *CYP2C9*\*2/\*2 (PM) a *CYP2C9*\*3/\*3 (PM). Zjištěné fenotypová frekvence ve sledovaném souboru psychiatrických pacientů byla porovnána se španělskou populací (Sánchez-Diz et al., 2009) a evropskou populací (Zhou et al., 2017), kde se výsledky lišily pouze v případě alely *CYP2C9*\*2, což bylo pravděpodobně způsobeno velikostí porovnávaných souborů.

V případě polymorfismu rs4646425 *CYP1A2* vykazovali všichni pacienti až na jednoho genotyp *CYP1A2* C/C WT. Jeden pacient měl heterozygotní genotyp *CYP1A2* C/T. Při porovnání frekvence alel s francouzskou (Tchernitcho et al., 2011) a tchajwanskou populací (Kuo et al., 2013) se projevila taktéž určitá podobnost. V tchajwanské populaci byla však zaznamenána vyšší frekvence výskytu alely T, což je dáno faktem, že se tato alela vyskytuje nejčastěji v asijské populaci (Lim et al., 2010).

V neposlední řadě byl vyšetřen gen *COMT* (*Val158Met*), který je částečně zodpovědný za metabolismus některých psychofarmak (paroxetin, clozapin) methylací a konjugací katecholů vzniklých po jejich oxidaci CYP enzymy (Tulloch a Johnson, 1992), či za vedlejší účinky léků (haloperidol) a také je spojován s možným vznikem schizofrenie (Shifman et al., 2002). Při porovnání genotypové frekvence s českou kontrolní skupinou složenou ze zdravých dobrovolníků, řeckou populací (Kotrotsou et al., 2012) a evropskou populací (Jacobsen et al., 2012) byla zjištěna podobnost v zastoupení jednotlivých genotypů.

Soubor vyšetřovaných pacientů obsahoval bez výjimky pacienty léčící se s psychickou poruchou. V takovém případě není obtížná spolupráce s pacientem výjimkou, a proto byl v některých případech problematický i odběr primárního vzorku (bukální stěr). Mohlo dojít k nepochopení instrukcí pro provedení bukálního stěru, stěr nebyl prováděn dostatečně dlouho, ústní sliznice nebyla stírána pod správným tlakem, nebyly dodrženy podmínky o konzumaci potravin, tekutin, žvýkaček, mohl se projevit vliv konzumace léků apod.

a to v některých případech i při opakovaném odběru. Výsledná koncentrace DNA pak nebyla dostatečná či kvalitní (byly přítomny inhibitory PCR reakce) pro provedení všech potřebných genetických analýz. Z těchto důvodů nebyly získány výsledky genetických analýz *COMT* u 9 pacientů, *CYP2D6* u 5 pacientů, *CYP2C19* u 4 pacientů, *CYP2C9* u 3 pacientů a *CYP1A2* u 1 pacienta.

Z celkového počtu 49 pacientů reagovalo 36,73 % na léčbu dostatečně. U jedenácti pacientů (61,11 %) byl ve všech vyšetřovaných polymorfismech CYP P450 zjištěn WT genotyp, tedy dvě funkční alely \*1/\*1 nebo C/C v případě *CYP1A2*, což odpovídá normální míře metabolismu, tedy fenotypu EM. Sedmi pacientům byl zjištěn střední metabolismus, který by se měl projevovat sníženou funkcí enzymu, avšak v tomto případě průběh léčby neovlivnil. Dále byl u všech pacientů byl vyšetřován i Val158Met polymorfismus genu *COMT*, jehož výsledky byly u dobře reagujících pacientů nejednotné. Pěti pacientům byl zjištěn Val/Met genotyp, šesti Met/Met a třem Val/Val. U pěti pacientů nebyly z výše uvedených technických důvodů výsledné genotypy získány. Většinové zastoupení WT genotypů, a tedy EM potvrzuje předpoklad, že tito jedinci snášíjí probíhající léčbu dobře a nastavená dávka je pro ně adekvátní.

Další skupinu pacientů tvoří 27 jedinců (55,1 %), kteří na léčbu reagovali pouze částečně. V rámci této skupiny bylo dosaženo zajímavých výsledků. Z již zmíněných 27 pacientů bylo devět WT pro všechny CYP P450 polymorfismy, avšak dalším devíti pacientům byl zjištěn jeden nebo více polymorfismů a výsledný střední metabolismus. V neposlední řadě byla u pěti pacientů zjištěna přítomnost dvou nefunkčních alel, které odpovídají za pomalý metabolismus, některé v kombinaci IM/PM pro různé geny. V tomto souboru se i vyskytoval pacient, který byl jako jediný heterozygotní (C/T) pro *CYP1A2*. Výsledky PCR RFLP genu *COMT* byly i v tomto případě značně nesourodé (5x Val/Val, 9x Met/Met a 9x Val/Met).

Přítomnosti pacientů s WT genotypy ve skupině s částečnou reakcí na léčbu si v tomto případě lze vysvětlit možným nedodržováním doporučené dávky, či vlivem jiných genetických polymorfismů a faktorů prostředí. U 60,87 % pacientů s částečnou reakcí na léčbu byl však dle předpokladu zjištěn alespoň jeden genový polymorfismus, který ve výsledku vedl ke zpomalení metabolismu léků. Tito pacienti mohli kromě nízké efektivity léčby zažívat i negativní vedlejší účinky, což mohlo vést k negativnímu přístupu k léčbě vedoucí k vysazení určitého léčiva. Pro zefektivnění léčby této skupiny pacientů by bylo vhodné upravit adekvátně dávku užívaného léčiva a také vybrat správný lék na základě zjištěných metabolických

možností pacienta. Fenotypový metabolismus konkrétního genu ovlivňuje definovanou skupinu léčiv a účinných látek, proto je možné sáhnout po jiném léku, který má obdobný terapeutický efekt, ale jeho metabolismus není negativně ovlivněn zjištěným genotypem.

Pouze tři pacienti byly lékařem označeni jako špatně na léčbu reagující (P20, P37 a PET52). Dva pacienti byly WT pro všechny vyšetřované CYP P450 polymorfismy a jednomu pacientovi byl zjištěn polymorfismus \*1/\*2 v genu *CYP2C9*. Možné vysvětlení slabého léčebného efektu těchto pacientů může být právě jejich diagnóza, kdy např. pacient PET52 trpí paranoidní schizofrenií v kombinaci se závislostí na návykových látkách. Dle ošetřujícího lékaře špatně spolupracuje a léky si sám vysazuje, což může být důvodem špatného efektu medikace.

Pacient P37 trpí obsedantně kompulzivní poruchou v kombinaci s úzkostně depresivní poruchou, což bylo bez efektu léčeno escitalopramem a později též paroxetinem. U pacienta P20 probíhala taktéž léčba escitalopramem neefektivně, byl tedy nahrazen sertralinem, a stav pacienta se až pak zlepšil.

Přestože pacientům P20 a P37 byl v genu *CYP2C19*, který je nejdůležitější v metabolismu escitalopramu, zjištěn WT genotyp \*1/\*1, léčba escitalopramem byla neefektivní. Alely *CYP2C19* \*2 a \*3 jsou spojeny se zvýšenou hladinou citalopramu a escitalopramu ve srovnání s *CYP2C19*\*1 (Chang et al., 2013), zapříčiňují zvýšené riziko selhání léčby escitalopramem (Jukić et al., 2018) a obecně způsobují snížené odbourávání escitalopramu (oproti \*1) (Jin et al., 2010). Tato skutečnost může být způsobena například polymorfismy v jiných genech či přítomností polymorfismů resultujících k fenotypovému projevu UM, které nebyly v rámci toho výzkumu vyšetřovány. U pacienta P37 byla neefektivní i následující léčba paroxetinem, což může být vysvětleno Val/Val genotypem *COMT* genu, což může způsobit vyšší aktivitu enzymu, který rychleji metabolizuje paroxetin (Benedetti et al., 2008). V případě pacienta P37 bych doporučila nahradit paroxetin jiným léčivem, který nepodléhá metabolismu *COMT*.

Během analýzy byla porovnávána četnost genotypů *COMT* v rámci jednotlivých skupin pacientů s dobrou, částečnou a špatnou reakcí na léčbu. V tomto ohledu bylo předpokládáno, že u pacientů s dobrou reakcí na léčbu bude převládat genotyp Val/Val, jelikož se jedná o WT nemutovaný genotyp, a tedy by neměl léčbu ovlivnit, avšak genotypy se vyskytovaly v téměř stejných poměrech (Met/Met 38,46 %, Val/Met 38,46 % a Val/Val 23,07 %). V případě pacientů s částečnou reakcí na léčbu byl předpokládán převládající výskyt heterozygotního genotypu Val/Met a Met/Met, což bylo potvrzeno. Genotyp Val/Met se vyskytoval u 45 %

pacientů, Met/Met u 30 % a Val/Val u 25 %. Rozdíly mezi počtem genotypů Met/Met a Val/Val však nelze považovat za signifikantní, jelikož se liší pouze v počtu jednoho jedince. Skupina pacientů špatně reagujících na léčbu nebyla pro tuto analýzu průkazná, jelikož se skládala pouze ze tří pacientů, přičemž koncentrace DNA jednoho pacienta nebyla pro tuto analýzu dostatečná.

V současné době existuje mnoho online databází, kde je možnost dohledat informace týkající se jednotlivých SNP. Z farmakogenetického hlediska je významná především databáze PharmGKB neboli The Pharmacogenomics Knowledgebase. PharmGKB je pravidelně validovaná veřejně dostupná online databáze odpovědná za agregaci, integraci a šíření znalostí týkajících se dopadu lidských genových variant na efektivitu léčby. Informace shromážděné v této databázi mohou využít vědci i lékaři. Lékaři si mohou před předepsáním konkrétního léku vyhledat jeho klinické anotace, kde jsou vypsány vlivy genových polymorfismů na míru metabolismu, toxicitu či efektivitu vybraného léku a na základě těchto znalostí doplněných o genetické vyšetření lépe stanovit vhodnou medikaci. Klinické anotace jsou v databázi řazeny dle úrovně průkaznosti (Level1A, Level1B, Level2A, Level2B, Level3 a Level4). Level1A značí nejdůvěryhodnější zdroje dle aktuálních klinických pokynů schválené FDA (Food and Drug Administration) a naopak Level4 popisuje kombinaci variant a léků, kde důkazy nepodporují souvislost mezi variantou a fenotypem léku a anotace je založená na kazuistice či nevýznamné studii. V databázi PharmGKB mohou lékaři nalézt i doporučené dávkování konkrétního léku na základě zjištěného typu metabolismu. Například pro lék escitalopram je uvedeno v databázi celkem 26 klinických anotací.

Výsledky této práce odpovídají z velké části prvotním předpokladům, kdy pacienti dobře reagující na léčbu vykazují převážně fenotyp EM. U pacientů s částečnou reakcí na léčbu převažují fenotypy IM (39,13 %) a PM (21,74 %). Hodnocení tří pacientů se slabou reakcí na léčbu je komplikované, vzhledem k dalším výše uvedeným faktorům. Jejich typ metabolismu spadá do kategorie EM a IM (fenotyp UM nebyl geneticky analyzován). Na závěr je nutno podotknout, že i přes prvotní neznalost fenotypů a genotypů byla léčba stanovena adekvátně a u většiny pacientů probíhala léčba psychofarmaky spíše dobře nebo částečně. Částečná odpověď na léčbu může být mimo jiné významně ovlivněna genovými polymorfismy a z toho důvodu je dobré polymorfismy znát a testovat.

## 13 ZÁVĚR

V diplomové práci byl řešen vliv genetických polymorfismů na léčbu vyšetřovaného souboru pacientů. Byla zjištěna spojitost s částečnou odpovědí na léčbu a výskytem pomalých a středních metabolizátorů. Pacientům s tímto typem metabolismu je potřeba individuálně přizpůsobit dávkování za účelem zefektivnění psychiatrické léčby. V ideálním případě by bylo vhodné doplnit genetické vyšetření detekcí genotypů zodpovědných za ultrarychlý metabolismus a tím tak docílit maximální efektivity.

Stanovené cíle byly úspěšně splněny. Byla vypracována rešerše týkající se psychických onemocnění, léčiv na tyto onemocnění působící a popsány genové polymorfismy, jež mají na medikaci vliv. V experimentální části byl soubor pacientů otestován metodami real-time PCR a PCR RFLP. Dále byl z hlediska analyzovaných genů vyhodnocen metabolický fenotyp u jednotlivých pacientů a diskutován jeho možný vliv na průběh léčby. Na základě znalosti typu metabolismu byla nastíněna v některých případech případná úprava léčby.

Na závěr je třeba podotknout, že detekce genetických polymorfismů má své místo ve farmakologii, avšak v rutinní praxi se zatím neuplatňuje. Budoucí zavedení individualizované farmakoterapie vzhledem k jeho racionálním pozitivním dopadům na vlastní léčbu pacienta, ale i ekonomickou stránku terapie je však jen otázkou času.

## 14 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AHMED, M., LIANG, P. (2012): Transposable Elements Are a Significant Contributor to Tandem Repeats in the Human Genome. *Comparative and Functional Genomics* 1–7.

AITKEN, N., SMITH, S., SCHWARZ, C., MORIN, P. A. (2004): Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in mammals: a targeted-gene approach. *Molecular Ecology*, 13(6), 1423–1431.

ALMAZROO, O. A., MIAH, M. K., VENKATARAMANAN, R. (2017): Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in Liver Disease*, 21(1), 1–20.

ANDERSON W.H. (2020): Antidepressants. In: LEVINE B.S., KERRIGAN S. (eds) *Principles of Forensic Toxicology*. Springer, Cham.

ANDREASEN, N. C. (2000): Schizophrenia: the fundamental questions, *Brain Research Reviews*, 31, 106-112.

ARIETI, S. (1971): Schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 128(3), 348–350.

ARRANZ, M. J., KAPUR, S. (2008): Pharmacogenetics in Psychiatry: Are We Ready for Widespread Clinical Use? *Schizophrenia Bulletin*, 34(6), 1130–1144.

ARVANITIDIS, K., RAGIA, G., IORDANIDOU, M., KYRIAKI, S., XANTHI, A., TAVRIDOU, A., MANOLOPOULOS, V. G. (2007): Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A5 in the Greek population. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 21(4), 419–426.

BAJ-ROSSI, C., DE, G., CARRAR, S. (2011). P450-Based Nano-Bio-Sensors for Personalized Medicine. *Biosensors – Emerging Materials and Applications*.

BARNES, T. R. (2011): Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of schizophrenia: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *Journal of Psychopharmacology*, 25(5), 567–620.

BECK, A.T., WARD, C.H., MENDELSON, M., MOCK, J., ERBAUGH, J. (1961): An inventory for measuring depression. *Archives of general psychiatry*, 4, 561-571.

BENEDETTI, F., COLOMBO, C., PIROVANO, A., MARINO, E., SMERALDI, E. (2008): The catechol-O-methyltransferase Val(108/158)Met polymorphism affects antidepressant response to paroxetine in a naturalistic setting. *Psychopharmacology*, 203(1), 155–160.



- BENEDETTI, F., DALLASPEZIA, S., COLOMBO, C., LORENZI, C., PIROVANO, A., SMERALDI, E. (2010): Effect of catechol-O-methyltransferase Val(108/158)Met polymorphism on antidepressant efficacy of fluvoxamine. *European Psychiatry*, 25(8), 476–478.
- BENEDETTI, M. S., WHOMSLEY, R., POGGESI, I., CAWELLO, W., MATHY, F.-X., DELPORTE, M.-L., PAPELEU, P., WATELET, J.-B. (2009): Drug metabolism and pharmacokinetics. *Drug Metabolism Reviews*, 41(3), 344–390.
- BERTILSSON, L., DAHL, M. L., DALÉN, P., AL-SHURBAJI, A. (2002): Molecular genetics of CYP2D6: Clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Clinical Pharmacology*, 53, 111-122.
- BLAISDELL, J., MOHRENWEISER, H., JACKSON, J., FERGUSON, S., COULTER, S., CHANAS, B., GOLDSTEIN, J. A. (2002): Identification and functional characterization of new potentially defective alleles of human CYP2C19. *Pharmacogenetics*, 12(9), 703–711.
- BOSIA, M., LORENZI, C., PIROVANO, A., GUGLIELMINO, C., COCCHI, F., SPANGARO, M., BRAMANTI, P., SMERALDI, E., CAVALLARO, R. (2015): COMT Val158Met and 5-HT1A-R -1019 C/G polymorphisms: effects on the negative symptom response to clozapine. *Pharmacogenomics*, 16(1), 35–44.
- BOTTON, M. R., WHIRL-CARRILLO, M., DEL TREDICI, A. L., SANGKUHL, K., CAVALLARI, L. H., AGÚNDEZ, J. A. G., GAEDIGK, A. (2020): PharmVar GeneFocus: CYP2C19. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 109(2), 352-366.
- BRÅTEN, S. L., HASLEMO, T., JUKIC, M. M., INGELMAN-SUNDBERG, M., MOLDEN, E., KRISTIANSEN KRINGEN, M. (2019): Impact of CYP2C19 genotype on sertraline exposure in 1200 Scandinavian patients. *Neuropsychopharmacology*, 1-7.
- BUZKOVÁ, H., PECHANDOVÁ, K., SLANAŘ, O., PERLÍK, F. (2007): Genetický polymorfismus cytochromu CYP2C9 v české populaci. *Klinická biochemie a metabolismus*, 15 (36), 102-105.
- CABALEIRO, T., LÓPEZ-RODRÍGUEZ, R., OCHOA, D., ROMÁN, M., NOVALBOS, J., ABAD-SANTOS, F. (2013). Polymorphisms influencing olanzapine metabolism and adverse effects in healthy subjects. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 28(3), 205–214.

- CARACI, F., ENNA, S. J., ZOHAR, J., RACAGNI, G., ZALSMAN, G., BRING, W. VAN DEN, KASPER, S., KOOB, G. F., PARIANTE, C. M., PIAZZA, P. V., YAMADA, K., SPEDDING, M., DRAGO, F. (2017): A new nomenclature for classifying psychotropic drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83, 1614-1616.
- CONLEY, R. R., KELLY, D. L. (2005): Second-Generation Antipsychotics for Schizophrenia: A Review of Clinical Pharmacology and Medication-Associated Side Effects. *Israel Journal of Psychiatry and Related Sciences*, 42(1), 51-60.
- CORNELIS, M. C., EL-SOHEMY, A., KABAGAMBE, E. K., CAMPOS, H. (2010): Coffee, CYP1A2 Genotype, and Risk of Myocardial Infarction. *American Medical Association*, 295(10), 1135-1141.
- CORPONI, F., FABBRI, C., SERRETTI, A. (2018): Pharmacogenetics in Psychiatry. *Advances in Pharmacology*, 297–331.
- COTE, A. T., PANAGIOTOPOULOS, C., DEVLIN, A. M. (2014): Interaction between the Val158Met catechol-O-methyltransferase gene variant and second-generation antipsychotic treatment on blood pressure in children. *The Pharmacogenomics Journal*, 15(1), 95–100.
- DALY, A. K., BROCKMÖLLER, J., BROLY, F., EICHELBAUM, M., EVANS, W. E., GONZALES, F. J., HUANG, J. D. (1996): Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics* 6, 193-201.
- DENISOV, I. G., MAKRIS, T. M., SLIGAR, S. G., SCHLICHTING, I. (2005): Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chemical Reviews*, 105(6), 2253–2278.
- DESAI, M., TANUS-SANTOS, J. E., LI, L., GORSKI, J. C., AREFAYENE, M., LIU, Y., FLOCKHART, D. A. (2003): Pharmacokinetics and QT interval pharmacodynamics of oral haloperidol in poor and extensive metabolizers of CYP2D6. *The Pharmacogenomics Journal*, 3(2), 105–113.
- ELLIOTT, S. P., HOLDBROOK, T., BRANDT, S. D. (2020): Prodrugs of New Psychoactive Substances (NPS): A New Challenge. *Journal of Forensic Sciences*, 1-8.
- FAVA, M., KENDLER, K. S. (2000): Major Depressive Disorder, *Neuron*, 28, 335-341.
- FUJÁKOVÁ, M., KOPEČK, M. (2012): Antidepresiva – od teorie ke klinické praxi. *Klinická farmakologie a farmacie*, 26(1), 29-37.

- GAEBEL, W., ZIELASEK, J. (2015): Schizophrenia in 2020: Trends in diagnosis and therapy. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 69(11), 661–673.
- GAEDIGK, A., GOTSCHALL, R. R., FORBES, N. S., SIMON, S. D., KEARNS, G. L., LEEDER, J. S., (1999): Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics*, 9, 669-682.
- GALDERISI, S., HEINZ, A., KASTRUP, M., BEEZHOLD, J., SARTORIUS, N. (2015): Toward a new definition of mental health. *World Psychiatry*, 14(2), 231-233.
- GARTLEHNER, G., GAYNES, B. N. (2009): Are all antidepressants equal? *Evid Based Mental Health*, 12, 98-100.
- HERINK, J. (2004): Interakce antipsychotik. *Klinická Farmakologie a Farmacie*, 18, 207-211.
- CHANG, M., TYBRING, G., DAHL, M.-L., LINDH, J. D. (2014): Impact of Cytochrome P450 2C19 Polymorphisms on Citalopram/Escitalopram Exposure: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Pharmacokinetics*, 53(9), 801–811.
- CHARLIER, C., BROLY, F., LHERMITTE, M., PINTO, E., ANSSEAU, M., PLOMTEUX, G. (2003): Polymorphisms in the CYP 2D6 Gene: Association with Plasma Concentrations of Fluoxetine and Paroxetine. *Therapeutic Drug Monitoring*, 25(6), 738–742.
- CHORLEY, B. N., WANG, X., CAMPBELL, M. R., PITTMAN, G. S., NOUREDDINE, M. A., BELL, D. A. (2008): Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current and developing technologies. *Mutation Research*, 659 (1-2), 147-57.
- INGELMAN-SUNDBERG, M., SIM, S. C. (2010): Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1), 90–94.
- INGELMAN-SUNDBERG, M., SIM, S. C., GOMEZ, A., RODRIGUEZ-ANTONA, C. (2007): Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects, *Pharmacology & Therapeutics* 116, 496–526.
- IONOVA, Y., ASHENHURST, J., ZHAN, J., NHAN, H., KOSINSKI, C., TAMRAZ, B., CHUBB, A. (2020): CYP2C19 allele frequencies in over 2.2 million direct-to-consumer

genetics research participants and the potential implication for prescriptions in a large health system. *Clinical and Translational Science*.

ISMAIL, S., ESSAWI, M. (2012): Genetic polymorphism studies in humans, *Middle East Journal of Medical Genetics*, 1, 57-63.

JACOBSEN, L. M., SCHISTAD, E. I., STORESUND, A., PEDERSEN, L. M., RYGH, L. J., RØE, C., GJERSTAD, J. (2012): The COMT rs4680 Met allele contributes to long-lasting low back pain, sciatica and disability after lumbar disc herniation. *European Journal of Pain*, 16(7), 1064–1069.

JEFFREYS, A. J., MACLEOD, A., TAMAKI, K., NEIL, D. L., MONCKTON, D. G. (1991): Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature*, 354(6350), 204–209.

JIBSON, M. D., MARDER, S., HERMANN, R. (2011): First-generation antipsychotic medications: Pharmacology, administration, and comparative side effects. *UptoDate Waltham, MA*.

JIN, Y., POLLOCK, B. G., FRANK, E., CASSANO, G. B., RUCCI, P., MÜLLER, D. J., BIES, R. R. (2010): Effect of Age, Weight, and CYP2C19 Genotype on Escitalopram Exposure. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 50(1), 62–72.

JOHNSON, M., MARKHAM-ABEDI, C., SUSCE, M. T., MURRAY-CARMICHAEL, E., MCCOLLUM, S., DE LEON, J. (2006): A Poor Metabolizer for Cytochromes P450 2D6 and 2C19: A Case Report on Antidepressant Treatment. *CNS Spectrums*, 11(10), 757–760.

JORNIL, J., NIELSEN, T. S., ROSENDAL, I., AHLNER, J., ZACKRISSON, A. L., BOEL, L. W. T., BROCK, B. (2013): A poor metabolizer of both CYP2C19 and CYP2D6 identified by mechanistic pharmacokinetic simulation in a fatal drug poisoning case involving venlafaxine. *Forensic Science International*, 226(1-3), e26–e31.

JUKIĆ, M. M., HASLEMO, T., MOLDEN, E., INGELMAN-SUNDBERG, M. (2018): Impact of CYP2C19 Genotype on Escitalopram Exposure and Therapeutic Failure: A Retrospective Study Based on 2,087 Patients. *American Journal of Psychiatry*, 175(5), 463–470.

KAMENÍKOVÁ, L., POMYKACZ, J., FARGHALI, H. (2015): Nežádoucí účinky antipsychotické léčby. *Psychiatrie pro praxi*, 16(2), 56-59.

- KONOPKA, L. M. (2014): Genetic vulnerability in patients with psychiatric presentations: a neuroscience perspective. *Croatian Medical Journal*, 55(5), 545–546.
- KOTROTSOU, M., TOULOUMIS, CH., DIDO, V., SYRIOU, S., KALAMPOKI, V., DRAKOULIS, N. (2012): Frequency Distribution of COMT Polymorphisms in Greek Patients with Schizophrenia and Controls: A Study of SNPs rs737865, rs4680, and rs165599. *ISRN Psychiatry*, 1–6.
- KUO, H.-W., LIU, S. C., TSOU, H.-H., LIU, S.-W., LIN, K.-M., LU, S.-C. LIU, Y.-L. (2013): CYP1A2 genetic polymorphisms are associated with early antidepressant escitalopram metabolism and adverse reactions. *Pharmacogenomics*, 14(10), 1191–1201.
- LEE, C., SCHERER, S. W. (2010): The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12.
- LIEBERMAN, J. A., TOLLEFSON, G., TOHEN, M., GREEN, A. I., GUR, R. E., KAHN, R., MCEVOY, J., PERKINS, D., SHARMA, T., ZIPURSKY, R., WEI, H., HAMER, R. M. (2003): Comparative Efficacy and Safety of Atypical and Conventional Antipsychotic Drugs in First-Episode Psychosis: A Randomized, Double-Blind Trial of Olanzapine Versus Haloperidol. *American Journal of Psychiatry*, 160, 1396-1404.
- LIM, J. S. L., SINGH, O., RAMASAMY, R. D., RAMASAMY, S., SUBRAMANIAN, K., LEE, E. J. D., CHOWBAY, B. (2010): Pharmacogenetics of CYP1A2, Novel Polymorphisms and Haplotypes in Three Distinct Asian Populations. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 25(6), 616–623.
- LIN, K.-M., TSOU, H.-H., TSAI, I.-J., HSIAO, M.-C., HSIAO, C.-F., LIU, C.-Y., LIU, Y.-L. (2010): CYP1A2 genetic polymorphisms are associated with treatment response to the antidepressant paroxetine. *Pharmacogenomics*, 11(11), 1535–1543.
- LISBETH, P., VINCENT, H., KRISTOF, M., BERNARD, S., MANUEL, M., HUGO, N. (2015): Genotype and co-medication dependent CYP2D6 metabolic activity: effects on serum concentrations of aripiprazole, haloperidol, risperidone, paliperidone and zuclopenthixol. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 72(2), 175–184.
- LIU, J., JAYALAKSHIMI, S., FOROOZESH, M. (2013): Cytochrome P450 Family 1 Inhibitors and Structure-Activity Relationships. *Molecules* 18, 14470-14495.

- LIU, Z. (2007): Single Nucleotide Polymorphism (SNP), In: Liu, Z. *Aquaculture Genome Technologies*, Blackwell Publishing, USA, 29-72.
- LLERENA, A., BERECZ, R., DORADO, P., GONZÁLEZ, A. P., PENAS-LLEDÓ, E. M., RUBIA, A. D. (2003): *CYP2C9* gene and susceptibility to major depressive disorder. *The Pharmacogenomics Journal*, 3, 300-302.
- LUNDSTROM, K., TENHUNEN, J., TILGMANN, C., KARHUNEN, T., PANULA, P., ULMANEN, I. (1995): Cloning, expression and structure of catechol-O-methyltransferase. *Biochim Biophys Acta*, 1251, 1–10.
- MANIKANDAN, P., NAGINI, S. (2017): Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review, *Current Drug Targets* 18, 38-54.
- MÄNNISTÖ, P. T. (1997): Catechol O-methyltransferase: characterization of the protein, its gene, and the preclinical pharmacology of COMT inhibitors. *Advances in pharmacology*, (42), 324-328.
- MARTÍNKOVÁ, J. (2007): Látky ovlivňující centrální nervovou soustavu. In: Martínková, J. (eds.): *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Grada Publishing, Praha, 119-150.
- MICÓ, J. A., ARDID, D., BERROCOSO, E., ESCHALIER, A. (2006): Antidepressants and pain. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 27(7), 348-354.
- MIYAMOTO, S., MIYAKE, N., JARSKOG, L. F., FLEISCHHACKER, W. W., LIEBERMAN, J. A. (2012): Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. *Molecular Psychiatry*, 17(12), 1206–1227.
- MONTGOMERY, S., DOYLE, J. J., STERN, L., MCBURNEY, C. R. (2005): Economic Considerations in the Prescribing of Third-Generation Antidepressants. *Pharmacoeconomics*, 23(5), 477–491.
- MURDOCH, D., KEAM, S.J. (2005): Escitalopram. *Drugs*, 65, 2379–2404.
- NARASIMHAN, S., AQUINO, T. D., MULTANI, P. K., RICKELS, K., & LOHOFF, F. W. (2012): Variation in the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and treatment response to venlafaxine XR in generalized anxiety disorder. *Psychiatry Research*, 198(1), 112–115.

- NOFZIGER, C., TURNER, A. J., SANGKUHL, K., WHIRL-CARRILLO, M., AGÚNDEZ, J. A. G., BLACK, J. L., DUNNENBERGER, H. M., RUANO, G., KENNEDY, M. A., PHILLIPS, M. S., HACHAD, H., KLEIN, T. E., GAEDIGK, A. (2019): PharmVar GeneFocus: CYP2D6. *Clinical pharmacology & therapeutics* 107(1), 154-170.
- OLVER, J. S., BURROWS, G. D., NORMAN, T. (2001): Third-Generation Antidepressants, Do They Offer Advantages Over the SSRIs? *CNS Drugs*, 15(12), 941-954.
- OMURA, T. (1999): Forty Years of Cytochrome P450, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266, 690-698.
- OTYEPKA, M., BERKA, K., ANZENBACHER, P. (2012). Is There a Relationship Between the Substrate Preferences and Structural Flexibility of Cytochromes P450? *Current Drug Metabolism*, 13(2), 130–142.
- OU-YANG, D. S., HUANG, S. L., WANG, W., XIE, H. G., XU, Z. H., SHU, Y., ZHOU, H. H. (2000): Phenotypic polymorphism and gender-related differences of CYP1A2 activity in a Chinese population. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 49(2), 145-151.
- PALMATIER, M. A., KANG, A. M., KIDD, K. K. (1999): Global Variation in the Frequencies of Functionally Different Catechol-*O*-Methyltransferase Alleles. *Biological Psychiatry*, 46, 557-567.
- PIERRE, J. M. (2005): Extrapyramidal Symptoms with Atypical Antipsychotics. *Drug Safety*, 28(3), 191-208.
- RACKOVÁ, S., JANŮ, L. (2008): Psychofarmaka v léčbě schizofrenie. *Praktické lékařství*, 4(4), 172-176.
- RAU, T., WOHLLEBEN, G., WUTTKE, H., THUERAUF, N., LUNKENHEIMER, J., LANCZIK, M., ESCHENHAGEN, T. (2004): Cyp2d6 genotype: impact on adverse effects and nonresponse during treatment with antidepressants—a pilot study, *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 75(5): 386-393.
- SACHSE, C., BROCKMÖLLER, J., BAUER, S., & ROOTS, I. (1997): Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *American journal of human genetics*, 60(2), 284–295.

SÁNCHEZ-DIZ, P., ESTANY-GESTAL, A., AGUIRRE, C., BLANCO, A., CARRACEDO, A., IBÁÑEZ, L., FIGUEIRAS, A. (2009): Prevalence of CYP2C9 polymorphisms in the south of Europe. *The Pharmacogenomics Journal*, 9(5), 306–310.

SHIFMAN, S., BRONSTEIN, M., STERNFELD, M., PISANTÉ-SHALOM, A., LEV-LEHMAN, E., WEIZMAN, A., DARVASI, A. (2002): A Highly Significant Association between a COMT Haplotype and Schizophrenia. *The American Journal of Human Genetics*, 71(6), 1296–1302.

SISTONEN, J., FUSELLI, S., PALO, J. U., CHAUHAN, N., PADH, H., SAJANTILA, A. (2009): Pharmacogenetic variation at CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 at global and microgeographic scales. *Pharmacogenetics and Genomics*, 19(2), 170–179.

SISTONEN, J., FUSELLI, S., PALO, J. U., CHAUHAN, N., PADH, H., SAJANTILA, A. (2008): Pharmacogenetic variation at *CYP2C9*, *CYP2C19* and *CYP2D6* at global and microgeographic scales. *Pharmacogenetics and Genomics*, 19, 170-179.

SPINA, E., SANTORO, V., D'ARRIGO, C. (2008): Clinically Relevant Pharmacokinetic Drug interactions with Second-Generation Antidepressants: An Update. *Clinical Therapeutics*, 30(7), 1206-1227.

STEIJNS, L. S. W., VAN DER WEIDE, J. (1998): Ultrarapid drug metabolism: PCR-based detection of CYP2D6 gene duplication. *Clinical Chemistry*, 44(5), 914–917.

STUBBINS, M. J., HARRIES, L. W., SMITH, G., TARBIT, M. H., WOLF, C. R. (1996): Genetic analysis of the human cytochrome P450 *CYP2C9* locus. *Pharmacogenetics*, 6, 429-439.

TAHARA, T., SHIBATA, T., ARISAWA, T., NAKAMURA, M., YAMASHITA, H., YOSHIOKA, D., OKUBO, M., MARUYAMA, N., KAMONO, T. KAMIYA, Y., FUJITA, H., NAGASAKA, M., IWATA, M., TAKAHAMA, K., WATANABE, M., HIRATA, I. (2009): Impact of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphism on promoter methylation status in gastric mucosa. *Anticancer Research*, 29 (7), 2857–2861.

TAHARA, T., SHIBATA, T., ARISAWA, T., NAKAMURA, M., YAMASHITA, H., YOSHIOKA, D., OKUBO, M., MARUYAMA, N., KAMONO, T. KAMIYA, Y., FUJITA, H., NAGASAKA, M., IWATA, M., TAKAHAMA, K., WATANABE, M., HIRATA, I. (2009): Impact of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphism on promoter methylation status in gastric mucosa. *Anticancer Research*. 29 (7): 2857–2861.



- TAMMINGA, W. J., WEMER, J., OOSTERHUIS, B., DE BOER, A., VRANCKX, S., DRENTH, B. F. H., JONKMAN, J. H. G. (2003): Polymorphic drug metabolism (CYP2D6) and utilisation of psychotropic drugs in hospitalised psychiatric patients: a retrospective study. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 59(1), 57–64.
- TAN, S. C., YIAP, B. C. (2009): DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1–10.
- TANDON, R. (2011): Antipsychotics in the Treatment of Schizophrenia: An Overview. *Journal of Clinical Psychiatry*, 72(1), 4-8.
- TCHERNITCHKO, D., ROBRÉAU, A. M., LEFEBVRE, T., LAMORIL, J., DEYBACH, J. C., PUY, H. (2011): Comprehensive cytochrome P450 CYP1A2 gene analysis in French caucasian patients with familial and sporadic porphyria cutanea tarda. *British Journal of Dermatology*, 166(2), 425–429.
- TULLOCH, I. F., JOHNSON, A. M. (1992): The pharmacologic profile of paroxetine, a new selective serotonin reuptake inhibitor. *Journal of Clinical Pharmacology*, 53(2), 7-12.
- VANDENBERGHE, F., GUIDI, M., CHOONG, E., VON GUNTEN, A., CONUS, P., CSAJKA, C., EAP, C. B. (2015): Genetics-Based Population Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Risperidone in a Psychiatric Cohort. *Clinical Pharmacokinetics*, 54(12), 1259–1272.
- VIGNAL, A., MILAN, D., SANCRISTOBAL, M., EGGEN, A. (2002): A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics, *Genetics Selection Evolution*, 34, 275-305.
- VINAŘ, O. (2012): Psychofarmakologie už je šedesátiletá. *Klinická farmakologie a farmacie*, 26(1), 14-17.
- WEDLUND, P. (2000): The CYP2C19 Enzyme Polymorphism. *Pharmacology*, 61, 174-183.
- WHO (1973): Report of The international pilot study of schizophrenia.
- YUET, W. C., DERASARI, D., SIVORAVONG, J., MASON, D., JANN, M. (2019): Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Use and Risk of Gastrointestinal and Intracranial Bleeding. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 119(2), 102-111.

- ZANE, L., BARGELLONI, L., PATARNELLO, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review, *Molecular ecology*, 11(1), 1-16.
- ZANGER, U. M., & SCHWAB, M. (2013): Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1), 103–141.
- ZANGER, U. M., SCHWAB, M. (2013): Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & therapeutics*, 138(1), 103-141.
- ZHANG, F., GU, W., HURLES, M. E., LUPSKI, J. (2009): Copy Number Variation in Human Health, Disease, and Evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10, 51-81.
- ZHOU, Y., INGELMAN-SUNDBERG, M., LAUSCHKE, V. (2017): Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 102(4), 688–700.
- ZIVKOVIĆ, M., MIHALJEVIĆ-PELES, A., BOZINA, N., SAGUD, M., NIKOLAC-PERKOVIC, M., VUKSAN-CUSA, B., MUCK-SELER, D. (2013): The Association Study of Polymorphisms in DAT, DRD2, and COMT Genes and Acute Extrapyrimal Adverse Effects in Male Schizophrenic Patients Treated With Haloperidol. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 33(5), 593–599.
- ZUBIAUR, P., SORIA-CHACARTEGUI, P., KOLLER, D., NAVARES-GÓMEZ, M., OCHOA, D., ALMENARA, S., SAIZ-RODRÍGUEZ, M., MEJÍA-ABRIL, G., VILLAPALOS-GARCÍA, G., ROMÁN, M., MARTÍN-VÍLCHEZ, S., VILLAPALOS-GARCÍA, G., ABAD-SANTOS, F. (2021): Impact of polymorphisms in transporter and metabolizing enzyme genes on olanzapine pharmacokinetics and safety in healthy volunteers. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, 1-8.