

**Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Kláry Koutské
„Možnosti individualizované farmakoterapie u psychiatrických pacientů na základě polymorfismů
vybraných genů zodpovědných za metabolismus léčiv“**

Předložená práce se zabývá možnou rolí polymorfismů vybraných cytochromů P450 (CYP) a katechol-O-metyltransferázy (COMT) v metabolismu psychofarmak. Úvod pokrývá poměrně velké množství relevantních témat, která jsou však zpracována spíše encyklopedickou formou a vzájemně na sebe logicky moc nenavazují. Pochopení lékových interakcí popisovaných v kap. 4 by jistě usnadnila elementární znalost psychofarmak, o kterých se píše až v kap. 7. V úvodu postrádám jakékoli informace o předchozích studiích polymorfismů studovaných detoxifikačních genů, které se objevují v tabulkách s výsledky (např. Sachse et al. 1997 nebo Gaedigk et al. 1999).

V textu se informace často opakují, viz např. definice polymorfismu v kap. 3 nebo typy metabolizátorů včetně zkratk v kap. 2 a 4.3.2. Podivná je i místy používaná terminologie, což je patrně dáno překladem z angličtiny, např. „zisky počtu genomických kopií“ nebo „nerovnoměrné křížové reakce“. U posledně jmenovaných si významem nejsem jist, předpokládám, že má jít o nerovnoměrný „crossing-over“? K úvodu mám několik otázek:

1. V kap. 4.3.1 se uvádí, že první genetické varianty *CYP2D6* byly identifikovány v r. 1990 a díky technologickému pokroku, jmenovitě polymerázové řetězové reakci (PCR) a Sangerovu sekvenování, byly odhaleny další varianty tohoto genu. Jak byly identifikovány první varianty a kdy byla vyvinuta PCR a Sangerovo sekvenování?
2. V tab. II mě zaujaly vysoké frekvence alel v jednotlivých etnikách. Jak si je autorka vysvětluje?
3. Co je to alela a co má znamenat věta na str. 9 „Alely genu *CYP2D6* se v rámci lidského genomu vyskytují ve dvou kopiích, přičemž tyto alely nemusí být shodné.“
4. Jaký je rozdíl mezi dědičností a dědivostí (cf. kap. 6.1)?

Práce si klade za cíl vypracovat rešerši k tématu, což je patrně výše rozebraný úvod, osvojit si metodiku, zpracovat výsledky a porovnat je s jinými studiemi, vyhodnotit vliv individuálního typu metabolismu na průběh léčby a „vyvodit odpovídající závěry.“

Metody začínají detailním popisem fenol chloroformové izolace, kterou však autorka ve své práci nepoužila. Další metody už jsou relevantní a jejich popis je velmi detailní. Autorka např. uvádí, že extrakce DNA byla provedena komerční soupravou dle doporučení výrobce, což by bylo zcela dostačující. Nicméně následuje velmi detailní popis extrakce doplněný ještě tabulkou s reagensy. Mezi tabulkami X, XII, XIV a XVI popisující teplotní profily použité pro PCR amplifikaci jednotlivých CYP jsem nenašel žádný rozdíl a stačila by tedy uvést jen jednu. V tabulce XVII chybí koncentrace použitých oligonukleotidů a na str. 34 je chybně odkazováno na kapitulu Gelová elektroforéza jako na 9.2.1. V ní asi není třeba u popisu gelové elektroforézy opakovaně uvádět, že byl obrázek uložen na SD kartu a následně do PC. Chybí kritéria pro výběr studovaných vzorků a kontrolní skupiny.

Celkem bylo vyšetřeno 49 vzorků na polymorfismy v genech *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP1A2* a *COMT*. Polymorfismy byly s výjimkou *COMT* detekovány pomocí real-time PCR

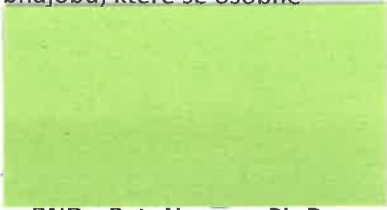
s komerčními soupravami s fluorescenčními sondami. Jestli jsem to však dobře pochopil, detekce nebyla založena na detekci přibývajících PCR produktu, ale na základě tzv. melting peaks, které jsou ukázány na příkladu použitých kontrol (Obr. 9-12). Obrázkům chybí detailní legendy a tak si nejsem jistý, zda dobře chápu princip této metody. Mohla by mi ho autorka vysvětlit? Co je na Obr. 8? V textu na něj chybí odkaz. Polymorfismus v genu *COMT* byl detekován pomocí PCR-RFLP.

V kap. 11.6 jsou v tabulkách a textu uvedeny zjištěné frekvence alel studovaných pacientů, blíže nespecifikované a údajně zdravé kontrolní skupiny dobrovolníků a data z publikovaných populačních studií. Jedním z cílů práce bylo porovnání těchto dat. Nic takového se však nestalo. Dle autorky je sice „zjevné“ nebo „zřejmé“, že jsou si frekvence v jednotlivých datasetech podobné, neprovedla ale žádné statistické srovnání. Datasets jsou porovnávány od oka, ačkoli jeden reprezentuje nemocné, druhý zdravé, a další patrně reprezentativní populační vzorky. Prosím alespoň o návrh nějakého smysluplného statistického srovnání. Kapitola 11.7 porovnává fenotypy pacientů jako léčebný efekt nebo typ metabolismu, ale nedává je do souvislosti se zjištěnými genotypy. Obrázky v této části nemají velkou informační hodnotu. V závěru výsledků je bez dalších podrobností zmíněná jediná statistická analýza, mnohorozměrná CCA analýza, která neidentifikovala žádný statisticky významný faktor vysvětlující průběh léčby u analyzovaných pacientů.

V Diskuzi však autorka opět rozebírá srovnání, rozdíly a podobnosti. Překvapením je zjištění, že třetina pacientů (tj. N=9), kteří na léčbu reagovali pouze částečně, nese alespoň jednu mutaci ve studovaných genech zodpovědnou za středně rychlý metabolismus léků a u pěti pacientů (z oněch devíti nebo dalších pěti?) jsou přítomné dvě nefunkční alely. To je potenciálně zajímavé zjištění, pro které však ve výsledcích postrádám oporu. Fenotyp a komplexní genotyp pro jednotlivé pacienty nikde není ukázán, ačkoli jsou v textu jednotliví pacienti diskutováni. Autorka také zmiňuje databázi „The Pharmacogenomics Knowledgebase“. Zde mi není jasné, zda autorka v této databázi na základě získaných genotypů ověřila klinickou průkaznost alelických kombinací a vhodnost medikace pacientů.

Autorka dle mého zvládla experimentální stránku práce, má však velké rezervy ve zpracování dat a prezentaci výsledků. S hodnocením práce tak počkám na obhajobu, které se osobně zúčastním.

V Českých Budějovicích dne 20. 5. 2021



RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.