



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Možná asociace polymorfismů genu *COMT* s psychiatrickými onemocněními

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Aneta Tomanová

Vedoucí práce: Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D.

České Budějovice 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem “Možná asociace polymorfismů genu COMT s psychiatrickými onemocněními“ jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

12.8.2021

.....

podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, PhD. za odborné vedení práce a dohled, podporu, vstřícnost, trpělivost a také za příležitost zpracovávat toto zajímavé téma. Poděkování patří také laborantce Bc. Stanislavě Škopkové za rady a pomoc při praktické části v laboratoři. Za podporu během celého studia děkuji také členům mé rodiny a přátelům.

Možná asociace polymorfismů genu *COMT* s psychiatrickými onemocněními

Abstrakt

Základním tématem mé bakalářské práce je možná asociace genu katechol-O-methyltransferázy (*COMT*) s psychiatrickými onemocněními. Cílem teoretické části bylo shrnutí poznatků o možném vlivu konkrétního jedno-nukleotidového polymorfismu Val158Met (rs4680) na mentální onemocnění, který je na základě poznatků odborné literatury nejvíce prozkoumán a stále studován.

Teoretická část uvádí definici genu i enzymu katechol-O-methyltransferázy, popisuje jejich funkci, formy a umístění v genomu. Z důvodu úzké souvislosti *COMT* s katecholaminy je právě jim věnována jedna z kapitol. Dále je popsán samotný polymorfismus rs4680, jeho vliv na lidské chování a také jeho klinický význam. Následují kapitoly obsahující definice a popis nejčastějších psychiatrických onemocnění a dostupných informací o jejich vztahu s polymorfismem Val158Met. V praktické části je popsán postup některých molekulárně-genetických metod, zahrnující izolaci DNA z buňkových stěrů, měření koncentrace DNA v izolátech, provedení amplifikace a restrikce metodou PCR-RFLP a analýzu výsledků. Získaná data reflektující frekvenci jednotlivých genotypů byla statisticky zpracována.

Na základě těchto dat bylo možné porovnat frekvenci genotypů ve zdravé populaci a ve vybraném souboru psychiatrických pacientů. Přestože procentuální zastoupení genotypů bylo u skupiny diagnostikovaných pacientů jiné než u kontrolní populace, nelze souvislost uvedených onemocnění jednoznačně potvrdit. Podobně zaměřené studie se také zřídka shodovaly v otázkách možného vlivu polymorfismu rs4680 na výskyt psychických poruch. Jejich vznik a rozvoj je často výsledkem komplexního působení nejčastějších vnitřních i vnějších faktorů, nicméně zde zjevně existuje určitý vliv tohoto genového polymorfismu.

Klíčová slova

COMT, dopamin, mentální porucha, psychiatrie, genetická predispozice, chování

Possible association of polymorphisms in *COMT* gene with mental diseases

Abstract

The subject matter of my bachelor thesis is possible association of polymorphisms in catechol-O-methyltransferase (*COMT*) gene with psychiatric diseases. The aim of this thesis is to summarize the findings regarding possible the connection of particular single-nucleotide polymorphisms Val158Met (rs4860) with mental disorders as it was the most researched and studied.

The theoretical part provides definitions of the *COMT* gene and enzyme, their function, forms, and location. One full chapter is devoted to catecholamines, due to the close connection with the *COMT*. Further I describe the polymorphism itself and its influence on human behavior and its clinical importance. The following part of the work contains a summary of findings regarding disorders and results and multiple studies dealing with the polymorphism and its connection to selected diseases. The practical part describes the procedure of some molecular-biological methods including the isolation of buccal swabs, measurement of DNA concentration in samples, performed amplifications and restrictions by PCR-RFLP and determination of polymorphism variants. The obtained data reflecting frequency of particular genotypes in this part of the work were statistically processed.

On the basis of those data was possible to see the genotype frequency in healthy population compared to data of the group of psychiatric patients. Although the percentage of genotypes was different to controls, the connection can not be confirmed. Studies which were similarly orientated were also inconsistent about the potential impact of polymorphism rs4680 on incidence of psychiatric diseases. Its origin and development is often the result of comprehensive operation of various inner and outer factors but there is certain influence of this polymorphism.

Keywords

COMT, dopamine, mental disease, psychiatry, genetic predisposition, behaviour

Obsah

	Úvod	8
1.	Teoretická část	9
1.1	Katechol-O-methyltransferáza	9
1.1.1	Struktura a funkce genu.....	9
1.1.2	Polymorfismy genu COMT.....	10
1.1.3	Polymorfismus Val158Met	11
1.2	Katecholaminy	11
1.2.1	Dopamin	12
1.2.2	Adrenalin.....	13
1.2.3	Noradrenalin.....	13
1.3	Člověk, COMT a Val158Met.....	13
1.3.1	Chování	13
1.3.2	Novelty seeking.....	14
1.3.3	Závislosti	15
1.3.4	Velokardiofaciální syndrom.....	15
1.4	Psychiatrická onemocnění a jejich vztah s polymorfismem Val158Met 16	
1.4.1	Bipolární porucha.....	16
1.4.2	Depresivní a úzkostné poruchy	17
1.4.3	Schizofrenie.....	17
1.4.4	Obsedantně kompulzivní porucha (OCD).....	18
1.4.5	Hyperkinetická porucha (ADHD)	18
1.4.6	Parkinsonova choroba	19
1.4.7	Mentální anorexie a bulimie.....	19
1.4.8	Karcinom prsu	20
2.	Praktická část	21
2.1	Cíl práce a hypotézy	21
2.2	Informace o pracovišti.....	21
2.3	Materiál pro výzkum	21
2.3.1	Informovaný souhlas pacienta s molekulárně-genetickým vyšetřením	21
2.4	Vybavení pro výzkum	22
2.5	Izolace bukálních stěrů.....	22
2.5.1	Postup izolace.....	22
2.6	Měření koncentrace DNA	23
2.7	Vyšetření metodou PCR-RFLP.....	23

2.7.1	Reagencie	24
2.7.2	Postup – PCR amplifikace.....	25
2.7.3	Elektroforéza na agarózovém gelu	26
2.7.3.1	Reagencie	26
2.7.3.2	Příprava gelu.....	26
2.7.3.3	Elektroforéza	27
2.7.4	Postup – restrikční štěpení.....	27
2.8	Sekvence.....	28
3.	Výsledky	29
3.1	Výsledné genotypy polymorfismu rs4680	29
3.2	Diagnózy účastníků.....	30
4.	Diskuse.....	34
5.	Závěr	37
6.	Použitá literatura	38
7.	Seznam zkratk	46
8.	Seznam obrázků a tabulek	47

Úvod

Psychiatrická onemocnění nemůžeme vnímat pouze jako odchylky od určité normy, které si společnost během svého dlouhého vývoje nastavila, ačkoliv díky nim jsme schopni odhalit abnormality v psychologii jednotlivců. Povaha vnějších projevů lidského chování je totiž ovlivněna dvěma stěžejními faktory – genetikou a prostředím, ve kterém se člověk vyvíjí. Význam těchto vlivů pro rozvoj lidského mentálního zdraví byl v historii psychiatrie různě definovaný. Snaha dokázat dominantní vliv jednoho či druhého se objevuje dodnes. Hypoteticky by se oba faktory měly nacházet přibližně v rovnováze, nicméně platí, že čím je genetický vliv silnější a ideál normálnosti tak vzdálenější, tím méně se následně uplatňují vlivy prostředí.

Neurotransmitter dopamin přenáší signály v částech mozku fungujících pro motivaci a schopnost učení se. Jednoduše řečeno vyvolává dobré pocity při vykonávání lidských životních potřeb. V případě, že je hladina dopaminu snížena díky procesům zvýšené degradace, vytrácí se i pozitivní přístup k různým činnostem, které člověka mentálně posouvají vpřed a vytváří se tak prostor pro rozvoj psychických problémů.

COMT je důležitým genem pro dopaminový systém. Produkuje enzym, který zpracovává katecholaminy a přímo degraduje zmíněný dopamin. Existuje několik polymorfismů, které mají různý účinek na regulaci tohoto enzymu. Nejvýznamnější a ve vztahu k dopaminovému systému a současně nejsledovanějším polymorfismem je Val158Met, který aktivitu enzymu zvyšuje nebo snižuje. Tyto změny jsou spojovány s některými psychiatrickými diagnózami jako je například schizofrenie nebo obsedantně-kompulzivní porucha. Postupně vzniklo velké množství studií zkoumajících tuto problematiku na základě nejrůznějších kritérií. Potvrzení genetické predispozice pro tato onemocnění by mohlo pomoci jak v pochopení lidských mentálních pochodů, tak i v jejich diagnostice.

1. Teoretická část

1.1 Katechol-O-methyltransferáza

Katechol-O-methyltransferáza (COMT) je katabolický enzym, který se účastní několika degradačních procesů bioaktivních molekul (Williams et al. 2007). Je klíčovým enzymem pro eliminaci dopaminu v prefrontálním kortexu mozku, kde je odpovědný až za 60 % jeho degradace (Nogueira et al. 2019). COMT zpracovává katecholaminy přemístěním methylové skupiny z S-adenosylmethioninu (SAM) na katecholaminové substráty, což má za následek inhibici biologické aktivity dopaminu po jeho uvolnění v synaptické štěrbině. Methylovaný dopamin je následně dále degradován monoaminoxidázou (MAO). Je dynamicky regulován v závislosti na stimulantech prostředí a normálním vývoji mozku. Obecně hraje roli v metabolismu katecholaminů, ačkoliv u některých, jako například u noradrenalinu, se přímo nepodílí na jejich regulaci. Aktivita COMT také ovlivňuje aktivitu dopaminergních neuronů ve středním mozku, ale pravděpodobně jde pouze o nepřímý efekt řízený prefrontální zpětnou vazbou (Tunbridge et al. 2006; Muellner et al. 2015). Nicméně souvislost mezi dopaminem a COMT jak z hlediska dostupnosti tak i signalizace není stejná pro celou populaci, ale liší se s ohledem na věk, etnikum a psychiatricky orientované procesy (Witte a Flöel 2012). Případné variace genu mohou mít za následek jistý efekt na funkce závislé na dopaminu v prefrontálním kortexu.

1.1.1 Struktura a funkce genu

Gen *COMT* je lokalizován na 22. chromozomu v pozici q11.2 a souvisí s dostupností dopaminu v prefrontálním kortexu. V případě genového polymorfismu je pak jeho role významnější (Nogueira et al. 2019). Bylo zjištěno, že jeden gen kóduje dvě formy proteinů – rozpustnou (S-COMT) a membránově vázanou formu (MB-COMT). Obě formy se liší tím, že u transmembránového proteinu MB-COMT je o 50 hydrofobních aminokyselin více. Představují transmembránovou sféru přičemž C-konec se nachází na vnější části membrány (Wang et al. 2021). MB-COMT má také desetkrát větší afinitu k dopaminu a noradrenalinu než S-COMT, což poukazuje na jeho metabolický význam (Williams et al. 2007).

Aktivita MB-COMT převažuje v mozkové tkáni zahrnující hippokampus, oblasti mozkové kůry a hypotalamu, jeho aktivita a funkce je pak v každé oblasti mírně odlišná.

Předpokládá se, že MB-COMT také moduluje inaktivaci dopaminergních a noradrenergických neurotransmiterů jako je dopamin (DA), epinefrin (E, adrenalin) a norepinefrin (NE, noradrenalin) (Williams et al. 2007).

Protein S-COMT je pak aktivnější v periferních tkáních a orgánech, především játrech a ledvinách, dále pak také v srdci, plicích, trávicím traktu, pohlavních orgánech, kůži nebo u červených krvinek. Účastní se inaktivace a detoxifikace biologicky aktivních nebo toxických látek obsahující katechol a jejich hydroxylovaných metabolitů (Wang et al. 2021). Gen *COMT* se skládá se z šesti exonů, z nichž jsou první dva nekódující (Tunbridge et al. 2006). Na třetím exonu jsou translaci-iniciující kodony pro S-COMT a MB-COMT, vzdálené od sebe 150 bp. Oblasti prodlouženého aminokyselinového řetězce membránové formy leží mezi přítomnými ATG kodony. Na šestém exonu se nachází translačně-terminační kodon TGA (Tenhunen et al. 1994).

1.1.2 Polymorfismy genu *COMT*

V tabulce č. 1 si můžeme všimnout, že existuje několik polymorfismů genu katechol-O-methyltransferázy s různými vlastnostmi a často ještě zcela neobjasněnými funkcemi. Pro účely této práce byl tedy analyzován nejvíce studovaný polymorfismus Val158Met, o jehož vlivu na lidskou psychologii a možné souvislosti s psychiatrickými onemocněními vznikají stále nové studie.

Tabulka 1 – Výčet některých polymorfismů v genu *COMT* a jejich význam.

Polymorfismus	Alely A1/A2	Význam
rs4680	V/M	Vliv na enzymatickou aktivitu. Třináásobná až čtyřnásobná redukce aktivity COMT (Thota et al. 2011).
rs6269	A/G	Souvislost s redukcí enzymatické aktivity COMT; Riziko schizofrenie (Ioannidis et al. 2020).
rs4633	C/T	Podíl na regulaci enzymu (Liu et al. 2018).
rs4818	C/G	Vliv na expresi COMT. Osmnáctinásobné ovlivnění aktivity enzymatické exprese COMT změnou mRNA stability; rozdílné účinky na funkce prefrontálního kortexu včetně neemociálně založeného řešení úloh a rozhodování (Ioannidis et al. 2020).
rs6267	G/A, T	Suspektní gen pro schizofrenii (Shifman et al. 2002).

1.1.3 Polymorfismus Val158Met

Gen *COMT* obsahuje funkční polymorfismus, který kóduje substituci methioninu (Met) za valin (Val) v kodonu 158 (Val158Met), konkrétně dojde k záměně guaninu za adenin. Locus je známý pod názvem Val/Met, ale označení identifikačním kódem referenční sekvence je rs4680. Alela methioninu je termolabilní a má oproti valinu čtvrtinovou enzymatickou aktivitu (Malhotra et al. 2002; Nogueira et al. 2019). Jedinci s genotypem Val/Val mají nejvyšší aktivitu enzymu, jedinci s Met/Met nejnižší aktivitu a heterozygoti Val/Met vykazují střední aktivitu (Cohen et al. 2009; Williams et al. 2007). Polymorfismus Val158Met tedy kóduje alely s vyšší (*COMT^H*) a nižší aktivitou (*COMT^L*). Například v játrech a červených krvinkách je v případě homozygotů Val/Val *COMT* 2–4krát aktivnější než u homozygotů s Met variantou (Gothelf et al. 2007).

Významným faktorem ve spojitosti s Val158Met je podle Witteho a Flöela (2012) věk. Toto tvrzení bylo podloženo studií, ve které byly porovnány skupiny mladších a starších zdravých osob s pacienty trpícími Parkinsonovou chorobou. Ukázalo se, že šedá hmota frontální oblasti u homozygotních Val¹⁵⁸ jedinců je globálně a regionálně rozšířenější v mládí, ovšem oproti homozygotům Met¹⁵⁸ má se stoupajícím věkem také strmější pokles hodnot. Stárnutí je totiž spojeno s celkovou redukcí složek dopaminergního systému, což může znamenat, že by jedinci s nižší hladinou prefrontálního dopaminu (například Val/Val homozygoti) mohli být náchylnější k změnám závislým na věku, než jedinci s jednou nebo dvěma alelami Met (Witte a Flöel 2012).

Z hlediska pohlaví, u žen dochází k odbourávání jak dopaminu, tak i katechol-estrogenů a nízká aktivita *COMT* by znamenala jejich nadbytek v organismu (Hosák et al. 2008).

1.2 Katecholaminy

Mozek je řídicím a komunikačním centrem lidského systému. Skládá se z neuronů, základních jednotek mozkové tkáně, které předávají informace mezi mozkem a tělem a také mezi sebou pomocí složité sítě přenašečů, známých jako neurotransmitery. Komunikace probíhá vazbou neurotransmiteru na specifický receptor (Profile 2015). Katecholaminy jsou skupinou neurotransmiterů a hormonů produkovaných dření nadledvin a vyznačujících se z hlediska chemické struktury tím, že mají alespoň jedno benzenové jádro se dvěma hydroxylovými skupinami a postranní řetězec s aminovou skupinou.

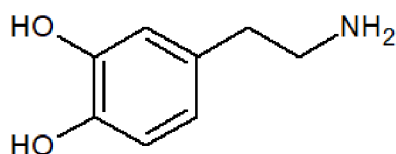
Dopamin, noradrenalin a adrenalin jsou zástupci neurotransmiterů a hormonů, které hrají klíčovou roli v regulaci psychologických procesů a vývoji neurologických,

psychiatrických, endokrinních a kardiovaskulárních onemocnění (Eisenhofer et al. 2004). Ke zvýšení produkce těchto neurotransmiterů dochází při stresových situacích, jejichž dlouhodobé působení pak může vést k extrémní únavě, snížení motivace a schopnosti soustředění. Enzym COMT hraje roli v degradaci dopaminu, adrenalinu a noradrenalinu a jeho role byla od počátku zkoumání katabolických procesů katecholaminů, v porovnání s dalším enzymem monoaminoxidázou (MAO) považována za klíčovou (Tunbridge et al. 2006).

1.2.1 Dopamin

Dopamin (obr. 1) je nízkomolekulárním neurotransmiterem, který v některých oblastech mozku umožňuje přenos nervových impulzů tak, že je vázán na příslušné dopaminové a adrenergní receptory na synapsích nervových buněk. V CNS se může vázat na pět typů dopaminových receptorů. Obecně můžeme říct, že má zásadní podíl na vzniku emocí, potěšení, motivace a příjemných pocitů způsobených různými činnostmi či omamnými látkami. Je považován za biologický základ pro rozeznávání odlišností v lidském chování (Profile 2015).

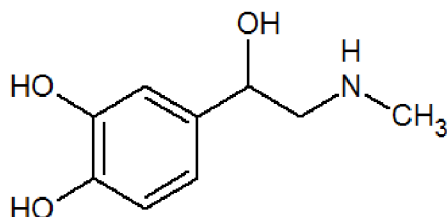
Dopamin je nejvýznamnějším a ve vztahu s výše uvedeným polymorfismem Val/Met nejvíce sledovaným katecholaminem, jelikož se COMT přímo podílí na jeho degradaci. Hraje důležitou roli v obměňování aktivity prefrontálních obvodů (Lage et al. 2014). Reabsorpce následovaná metabolickou degradací je hlavním mechanismem udávajícím synaptickou aktivitu dopaminu. Katechol-o-methyltransferáza je hlavním enzymem savců, který se účastní metabolické degradace uvolněného dopaminu a podílí se na více než 60 % degradací ve frontálním kortexu. Je pravděpodobné, že genetické faktory ovlivňující funkci enzymu COMT mohou podstatně ovlivňovat psychologické procesy zahrnující poznávání, chápání či zpracování získaných informací. Tyto funkce souhrnně nazýváme kognitivní (Malhotra et al. 2002).



Obr. 1 – Strukturální vzorec dopaminu. (Zdroj: autor)

1.2.2 Adrenalin

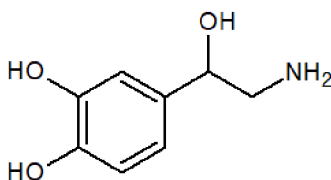
Adrenalin (obr. 2) je neurotransmiterem pro adrenergní receptory typu α a β , spolu s noradrenalinem se potom podílí na stimulaci sympatického nervového systému, tzv. sympatiku. Adrenalin zrychluje srdeční činnost, zvyšuje krevní tlak pomocí vazokonstrikce cév, rozšiřuje zornice i průdušky, a naopak zpomaluje činnost trávicího systému. Aktivace sympatiku je mimo jiné součástí stresové reakce, vedoucí k primárním instinktům – útok, útek.



Obr. 2 – Strukturní vzorec adrenalinu. (zdroj: autor)

1.2.3 Noradrenalin

Prekurzorem noradrenalinu je dopamin (obr. 3), který je syntetizován z aminokyselin fenylalaninu a tyrozinu. K jeho funkcím patří krátkodobé zvýšení aktivity organismu, stimulace katabolických procesů a získávání energie (Profile 2015). Účinek je zejména vasokonstrikční, snižuje tepovou frekvenci.



Obr. 3 – Strukturní vzorec noradrenalinu. (Zdroj: autor)

1.3 Člověk, COMT a Val158Met

1.3.1 Chování

Procesy závislé na hladině dopaminu hrají klíčovou roli v lidském chování a kognitivních dovednostech. Studie dokazují souvislost dopaminergní neurotransmise s komplexem kognitivních procesů, mezi které patří například pracovní paměť, pozornost nebo rozhodování. Na základě důkazů několika studií, které byly zaměřeny na souvislost COMT a motorických funkcí, lze usuzovat, že určitá místa v oblasti čelního laloku hrají v motorickém chování svou roli. Zároveň bylo zjištěno, že se tato souvislost neprojevila v případech, kdy byly testované subjekty s diagnózou schizofrenie podrobeny jednodušším motorickým testům, ale až při zkouškách vyžadujících pozornost, prostorovou

představivost a orientaci zrakem a psychickou a pohybovou způsobilost pro grafické znázornění (Lage et al. 2014).

Interakce mezi stavy prefrontálního kortexu (zvýšené tonikum nebo fázické uvolňování dopaminu) produkují různé stupně kognitivního zpracování v závislosti na povaze prováděného úkonu. Se zvýšeným tonickým uvolňováním dopaminu, které přispívá k udržování a stabilitě získaných relevantních informací v paměti a vykovávaných činností vyžadující tento typ kognitivního zpracování, se zjevně pojí alela Met. Naproti tomu je alela Val spojena se zvýšeným fázickým uvolňováním dopaminu umožňujícím kognitivní flexibilitu uplatňující se v úlohách, které vyžadují manipulaci s informacemi a emocionálně podložené rozhodování. Úkoly týkající se adaptace vyžadují flexibilnější přizpůsobivost (Nogueira et al. 2019). Dle Lage et al. (2014), který se ve své studii zabýval rozdíly v motorice u genotypů tohoto polymorfismu, jsou zdraví homozygotní jedinci Met/Met v porovnání s Val/Met a Val/Val genotypy prostorově přesnější i za přítomnosti rušivých prvků, ačkoliv při zvýšené náročnosti byl pozorován úbytek flexibility při řešení a dokonce i větší citlivost na změnu podmínek v porovnání s jedinci nesoucími alelu Val.

1.3.2 Novelty seeking

Novelty seeking (NS) lze definovat jako zvědavost a touha vyhledávat nové podněty. Jde o jednu ze čtyř dimenzí temperamentu ve spojení s vyhledáváním vzrušení definovaných C. L. Cloningerem v dotazníku TCI (Temperament and Character Inventory) založeném na sebeposouzení. Popis NS dle tohoto dotazníku je následující: *Jde o dědičný základ pro explorační aktivitu, reagování na novou situaci, impulzivní řešení problému, prudké změny nálady, výrazné reakce na příjemné podněty a vyhýbání se frustraci, jednotvárnosti a potrestání* (Šucha 2013). Jedinci s vysokými hladinami NS příliš netolerují stereotypní a monotónní způsob života, dychtí po nových věcech a zážitcích, například ve formě nebezpečných sportů. Také vykazují vyšší stupeň asociálního chování, sklony k užívání narkotik a alkoholu a sklony ke kouření. Naproti tomu konzervativní osoby, které nemají problém držet se pravidel a nevyhledávají cíleně nic nového mají hladinu NS nízkou (Golimbet et al. 2007). Jak lze přepokládat, jedinci s vyšším NS disponují vyšší dopaminovou aktivitou, což znamená, že Met/Met homozygotní jedinci mají v porovnání s Val/Val typem vyšší NS (van Breda et al. 2015).

1.3.3 Závislosti

Závislost můžeme definovat jako chronickou potřebu uspokojit touhu pro určitý podnět, který byl dříve opakovan a vyvolával, nebo stále vyvolává příjemné pocity. Tyto podněty rozlišujeme na behaviorální a látkové. Mezi behaviorální nebo také nelátkové řadíme například závislost na jídle, hazardních hrách nebo závislost na sexu, nicméně podnětem může být téměř jakékoliv uspokojující chování vedoucí k nutkání jej zopakovat. Látkové podněty zahrnují alkohol, omamné a psychotropní látky, které spouštějí určité patologické procesy vedoucí k fyziologicky založené závislosti. Některé studie se shodují v názoru, že oba tyto druhy závislosti mají společný genetický základ, který hraje přibližně stejnou roli jako faktory prostředí (Vacek a Vondráčková 2014).

Hlavním neurotransmiterem při rozvoji závislosti je právě dopamin, přičemž návykové látky jako alkohol nebo drogy zvyšují jeho synaptický přenos v mozku. Dysfunkce v dopaminovém systému prefrontálního kortexu je relevantní zejména pro pacienty s alkoholovou závislostí, což dokazuje jejich redukováná výkonnost v kognitivních dovednostech. Tito pacienti se také prokázali jako méně citliví na dopaminovou léčbu apomorfinem v porovnání se zdravými jedinci. Závislé osoby s Met alelou, a tedy nízkou aktivitou COMT byly nejcitlivější k účinku apomorfinu na kognitivní výkon a podle některých studií je s alelou Met spojen během života se rozvíjející alkoholismus u jedinců s nenásilnými projevy. Nicméně fakt, že polymorfismus Val158Met není jasným ukazatelem vzniku alkoholové závislosti je podložen mnoha studii (Schellekens et al. 2009; Chaudhary et al. 2020).

1.3.4 Velokardiofaciální syndrom

Oblast na chromozomu 22q11.2 obsahující gen *COMT* je také místem poměrně časté mikrodelače, typicky zahrnující až 48 genů, v psychiatrické literatuře známé jako velokardiofaciální syndrom (VCFS) či DiGeorgův syndrom. Mikrodelače vytváří širokou škálu fenotypů projevujícími se kongenitálními srdečními chorobami, kognitivním poškozením s různě vážným dopadem a více než 180 popsány klinickými projevy. Mezi fyzicky pozorovatelné projevy patří abnormality v obličeji, rozštěpy nebo mentální retardace. Vady vnitřního prostředí zahrnují především imunodeficiencie a různé další poruchy imunity, vady srdce a srdečních cév (Shprintzen 2008b).

Jde o jeden z nejběžnějších mikrodelačních syndromů, vyskytující se přibližně u jednoho člověka z pěti tisíc a pravděpodobně je to druhý nejčastější genetický defekt po Downově syndromu. Pacienti postižení tímto syndromem mají vysoké riziko rozvinutí

psychiatrických onemocnění. Některé ze studií zjistily, že u 20–30 % z nich se vyvinula schizofrenie, z čehož vyplývá, že tito lidé jsou nejrizikovější skupinou pro toto onemocnění (Shifman et al. 2002; Shprintzen 2008). Navíc v případech, že má jedinec s VCFS zároveň alelu s nízkou aktivitou (*COMT^L*), se předpokládá naprosto minimální aktivita enzymu COMT. Tito jedinci mají jen jedinou kopii alely podmiňující nízkou aktivitu enzymu. To je však považováno za nepříliš časté. U osob s VCFS a *COMT^L* se předpokládá přebytek dopaminu v mozku, zejména v prefrontálním kortexu, který má nízkou hladinu dopaminových transportérů, klíčových pro zpětné vychytávání dopaminu do presynaptických neuronů. U pacientů postižených VCFS a hyperkinetickou poruchou (případně také obsedantně-kompulzivní poruchou) má *COMT^L* výrazně vyšší prevalenci než u kontrolní skupiny osob s VCFS, ale bez OCD, ADHD či schizofrenie. Velokardiofaciální syndrom mohou doprovázet i úzkostné a afektivní poruchy či poruchy autistického spektra (Gothelf et al. 2007).

1.4 Psychiatrická onemocnění a jejich vztah s polymorfismem Val158Met

Polymorfismus Val158Met je považován za funkční, snadno detekovatelný a prokazatelně spojený s metabolismem katecholaminů, který je základem patogeneze poměrně významného počtu duševních poruch. V následujících kapitolách je popsán polymorfismus ve spojení s vybranými onemocněními.

1.4.1 Bipolární porucha

Bipolární porucha, jinak známá také pod pojmem maniodepresivní onemocnění, je komplexní genetická porucha založená na patologickém rozdělení psychického rozpoložení, nebo také epizod, mezi kterými obvykle dochází k obnově. Epizody kolísají v rozmezí od stavů extrémní mánie do stavů těžkých depresí, které jsou často doprovázeny dalšími změnami v chování a úsudku. Toto onemocnění má obecně vysokou morbiditu, ne nutně z důvodu činností prováděných ve stavu mánie, dochází však k sebevraždám, a to až u 15 % pacientů. Celoživotní prevalence je 1 % a to bez větších rozdílů u obou pohlaví a přibližné riziko u osob příbuzných se liší dle děděné genetické výbavy. U jednovaječných dvojčat je riziko 40 až 70 %. Sourozenci, děti a rodiče pak čelí riziku mezi 5 až 10 % (Craddock a Jones 2019).

Genotyp *COMT* hraje jistou roli v symptomatologii. Jeho polymorfismus Val158Met vykazuje souvislost s příznakovými dimenzemi u bipolární poruchy i schizofrenie (Craddock a Jones 2019).

1.4.2 Depresivní a úzkostné poruchy

Depresivní porucha je jednou z pěti nejčastějších poruch na světě. Charakterizují ji stavy hlubokého smutku, nízké motivace pro konání všedních činností či absence příjemných pocitů z obvykle radostných událostí. Přítomnost a razance příznaků jsou ovlivňovány dopaminovým systémem, který se v člověku vyvinul, aby měl motivaci k základním životním potřebám – jíst, pít, být reprodukčně aktivní – a vyvolával pocit odměnění. Do oblastí působení tohoto „systému odměny“ patří část bazálních ganglií, striatum, hipokampus, amygdala, prefrontální a orbitofrontální kortex. Pro jeho rozvoj jsou klíčové faktory prostředí, zejména pak traumatizující situace či silné stresové podněty v dětství (Åberg et al. 2011). Podíl, který mají genetické faktory na rozvoj úzkostných poruch je pouze 20 až 40% – je tedy nejnižší ze všech skupin psychiatrických onemocnění (Hosák et al., 2013). Studie zabývající se vztahem deprese a stresu s polymorfismem Val/Met došly k rozporuplným výsledkům, nicméně většinou není zjištěna žádná souvislost mezi Val158Met alelami u jedinců s depresivní poruchou a zdravými kontrolami. Ovšem u úzkostné poruchy je výrazně častější varianta Met/Met (Åberg et al. 2011).

1.4.3 Schizofrenie

Schizofrenie je závažné duševní onemocnění, postihující 0,5–1 % celosvětové dospělé populace (Zhang et al. 2012; Wright et al. 2012). Studie se přiklání k závěru, že toto onemocnění zahrnuje komplex polygenních interakcí. Dále se předpokládá, že dopaminová deregulace je spojena se schizofrenní patogenezí (Singh et al. 2012; Raznahan et al. 2011; Estrada et al. 2011). Tradiční hypotéza tvrdí, že zvýšená funkčnost dopaminu je ústřední pro patofyziologii schizofrenie (Williams et al. 2007). V tomto kontextu je zřejmé její spojení s dysfunkcí dopaminového systému a prefrontálního kortexu. Studie a analýzy se shodují v názoru, že oblast na chromozomu 22q11 obsahující gen *COMT* lze považovat za suspektní pro schizofrenii. Porovnáním různých dat a výsledků vyšlo najevo, že pacienti s touto diagnózou mají na rozdíl od zdravých jedinců zvýšený výskyt delecí v již zmíněném lokusu 22q11. Podle některých metaanalýz je polymorfismus Val158 nevýznamným faktorem. Například dle Dickersona et al. 2007 polymorfismus není spojen ani s výraznější kognitivní úlohou v případě schizofrenie.

1.4.4 Obsedantně kompulzivní porucha (OCD)

Obsedantně kompulzivní porucha je vážné a vyčerpávající onemocnění postihující 1–3 % světové populace, vyskytuje se zejména u dospělých, méně často u dětí. Charakterizuje ji přítomnost obsesí a kompulzí. Obsese jsou opakované, neodbytné a nechtěné myšlenky vyvolané podnětem. Kompulze pak můžeme definovat jako opakování rituálů, často vyvolaných jako reakce na obsesivní myšlenky (Friedlander a Desrocher 2006; Kumar 2020).

Ojediné články a studie už z 90. let poukazují na přítomnost určitých genetických predispozičních znaků (Wang et al. 2009). Podle Friedlandera a Desrochera je spojitost symptomů obsedantně-kompulzivní poruchy se zvýšenou dopaminovou neurotransmisí průkazná a také rodinné studie poukázaly na *COMT* jako na důležitý gen indikující předpoklad pro OCD. Polymorfismus Val158Met je nejstudovanějším polymorfismem u tohoto onemocnění, přičemž jsou k dispozici jak studie potvrzující a tak i studie vyvracející tuto spojitost (Katerberg et al. 2009). Podle některých publikací se nositelé alely Met158 se ukázali jako náchylnější k rozvinutí OCD (Witte a Flöel 2012).

1.4.5 Hyperkinetická porucha (ADHD)

Hyperkinetická porucha se objevuje již v dětství a mezi její symptomy patří nepozornost a hyperaktivita či impulzivita, které mají tendenci se stupňovat s věkem. Jde o poruchu s poměrně vysokou prevalencí, jelikož celosvětově postihuje 8–12 % dětí školního věku. Co se týká zastoupení ADHD v celkové populaci, dle dostupné literatury je odhadováno na 5 až 10 %. Symptomy se obvykle objevují před sedmým rokem života a mohou přetrvávat do dospělosti.

Tuto poruchu lze rozdělit do tří typů – typ hyperaktivně-impulzivní, typ s převahou poruch pozornosti a kombinovaný typ. Novější studie poukazují na možnou souvislost ADHD symptomů s genetickými vlivy a rolí prostředí, což nahrává hypotézám o jejich případných změnách v průběhu času (Brinksma et al. 2017; Cheuk a Wong 2006). Kuželová et al. (2014) zmiňuje skutečnost, že na rozvoji tohoto onemocnění má genetika velký podíl. Byla zjištěna jak určitá souvislost s geny, které řídí nebo se podílejí na regulaci neurotransmiterů, tak také přítomnost potenciálních vazeb mezi ADHD a určitými chromozomálními oblastmi. Nelze však říct, že jde o jednoznačně prokazatelnou asociaci. Podle literatury a studií, které vznikly před rokem 2000, zhruba čtvrtina dospělých s anamnézou hyperkinetické poruchy má potomka s ADHD. V současnosti se takováto dědičnost odhaduje na 76 %. To je podobné procentuální zastoupení, jako dědičnost

symptomů ADHD u jednovaječných dvojčat. Hyperkinetická porucha pozornosti může také být doprovázena dalšími poruchami, jako například poruchou bipolární, antisociální poruchou osobnosti, nebo obsedantně-kompulzivní poruchou.

Symptomy u dospělých mohou ovlivnit kognitivní procesy řídící chování, ačkoliv faktory figurující v tomto vztahu byly popsány pouze několika málo studiemi, lze říci, že polymorfismus Val158Met souvisí se symptomy i souborem kognitivních funkcí při ADHD (Liu et al. 2021). Názory na vliv polymorfismu na symptomatologii tohoto onemocnění se liší. Gothelf et al. (2007) ve své studii konstatují, že asociační studie nenašly žádnou souvislost tohoto polymorfismu s ADHD v běžné populaci. Nobile et al. (2010) však se svým výzkumem došli k závěru, že u dětských homozygotních pacientů Val/Val byly v porovnání s Met homozygoty pozorovány silnější projevy poruchy, vyšší agrese a vyšší pravděpodobnost vykonávání nelegální činnosti (Nobile et al. 2010). Naopak podle Abrahama et al. (2020) se u homozygotních jedinců s Met alelou v dětství dají předpokládat vážnější symptomy této poruchy ve srovnání s Val homozygoty.

1.4.6 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je druhou nejrozšířenější neurodegenerativní chorobou. Mezi charakteristické znaky patří zpomalený pohyb, chvění, strnulost, nestabilní držení těla, ale i nepohybové symptomy, jako kognitivní dysfunkce, smyslový deficit či problémy se spánkem. Tyto projevy, jak motorické, tak i kognitivní, jsou úzce spojeny s chronickými abnormalitami dopaminu (Zhang et al. 2016). Motorické příznaky se objevují při zániku 40–60% dopaminergních neuronů, v případě, že striatální denervace dosáhne 80 %, se naruší rovnováha (Muellner et al. 2015). Ačkoliv se mnoho studií zaměřuje na význam *COMT* u jednotlivých symptomů, celková souvislost Parkinsonovy choroby s polymorfismem Val158Met se nepředpokládá (Jiménez-Jiménez et al. 2014).

1.4.7 Mentální anorexie a bulimie

Mentální anorexie je spolu s bulimií známá porucha příjmu potravy. Jedná se o psychickou poruchu odmítání příjmu živin stupňující se v závažnější fyzické potíže, které nakonec mohou být fatální. Zatímco principem bulimie je vypuzení potravy po předchozím přejedení větším množstvím kaloricky bohatých jídel, anorexie je soustavné odmítání potravy. Obě poruchy se ale mohou kombinovat a patří do skupiny psychiatrických onemocnění, které jsou vyvolány na základě porovnávání vlastního vzhledu a estetiky. U mentální anorexie nejprve dochází k postupnému, úmyslně řízenému hubnutí, které je

vyvolané strachem nebo nechutí k představě obezity často i přes fakt, že dotyčná osoba netrpí nadváhou ani jinými problémy se vzhledem. Dochází k hladovění a postupné poruše metabolismu. Dokonce je využíváno i některých látek, které hladovění podporují, zejména laxativ či diuretik.

Mentální bulimie má podobný princip jako anorexie. Po přejedení přijde fáze deprese a provinilých pocitů, po nichž má postižená osoba nutkání dostat potravu ven, jak zvracením, tak i použitím vyprazdňovacích přípravků. (Navrátilová a Hamrová 2009).

Podle některých studií polymorfismus Val/Met souvisí s poruchami příjmu potravy. Frisch et al. (2001) ve své studii potvrdili spojitost alely Val zvyšující aktivitu COMT s anorexií a homozygotních jedinců Val/Val bylo nejvíce. Tento genotyp udávající až dvakrát větší šanci pro rozvoj anorexie se tedy dá, dle této studie, považovat za riskantní pro toto onemocnění (Gervasini et al. 2018).

1.4.8 Karcinom prsu

Rakovina prsu je celosvětově jednou z nejčastějších příčin úmrtí na rakovinu a komplikace s rakovinou spojené. Způsob, jakým se rozvíjí je stále nejasný, ale předpokládá se, že je ovlivněný expozicí cirkulujícího estrogenu. Biosyntéza a metabolismus tohoto hormonu prochází mnoha translačními a transkripčními stupni, a proto lze předpokládat, že se na vzniku rakoviny podílejí některé geny. Geny *BRCA1* a *BRCA2*, které jsou s tímto onemocněním spojované, jsou přímou příčinou asi jen z 5% (Qin et al. 2012).

Jak již bylo zmíněno, COMT má v metabolismu estrogenů svůj podíl, na jehož základě vznikla hypotéza, že snížená aktivita tohoto enzymu může být jedním z faktorů napomáhajících vzniku rakoviny prsu. Přímá spojitost polymorfismu Val158Met s rakovinou prsu byla sice vyvrácena, ale existuje několik důkazů vlivu COMT na kognitivní funkce u pacientek, které rakovinu přežily (Fernández-de-las-Peñas et al. 2012). Dále bylo také zaznamenáno zvýšené riziko rakoviny u homozygotních Met/Met obézních pacientek a podle studií zaměřených na metabolickou dráhu estrogenu se vyšší riziko skutečně pojí pouze s alelou s nižší aktivitou u žen s vysokým BMI (Qin et al. 2012).

2. Praktická část

2.1 Cíl práce a hypotézy

Cílem této práce bylo seznámit se s vlivem genu *COMT* na dopaminový systém a prokázat jeho možnou asociaci s psychiatrickými onemocněními, konkrétně určit zastoupení jednotlivých genotypů Val158Met u pacientů diagnostikovaných například se schizofrenií, depresivní poruchou nebo alkoholovou závislostí.

2.2 Informace o pracovišti

Praktická část této práce byla provedena v laboratořích GENLABS s.r.o., Lipová 1789/9 370 05 České Budějovice 2, pod odborným vedením Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D.

2.3 Materiál pro výzkum

K práci jsem měla k dispozici vzorky bukalních stěrů získaných od 49 pacientů s diagnostikovanou psychiatrickou poruchou, které mi byly poskytnuty laboratoří GENLABS s.r.o.

Biologický materiál ve formě stěru z bukalní sliznice byl proveden přímo klientem. Laboratoř poskytuje k těmto účelům odběrový kit Isohelix™ DNA/RNA Buccal Swab SK-2 S a klientům je dodán spolu s informovaným souhlasem, žádankou a návodem, jak při odběru postupovat. Odběr se provádí pomocí sterilní vatové tyčinky a zkumavky, do které je tyčinka po provedení stěru následně vložena. V příložených dokumentech jsou instrukce pro správný odběr, například že je nutné si nejprve vypláchnout ústa obyčejnou vodou, nebo informace, že hodinu před odběrem není vhodné konzumovat jídlo a nápoje jiné než vodu. Samotný stěr se provede silným tlakem na sliznici zadní strany dutiny ústní, alespoň po dobu jedné minuty. Vzorek nesmí být kontaminován, klient by na vatovou tyčinku neměl sahat, ani provádět odběr vzorku z jiné části úst, než je popsáno v návodu. Dle instrukcí laboratoře by vzorek neměl být starší než 48 hodin.

2.3.1 Informovaný souhlas pacienta s molekulárně-genetickým vyšetřením

Každý pacient účastnící se studie vyplnil informovaný souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením. Jedná se o prohlášení vyšetřovaných osob, že byli lékařem poučeni o povaze a předpokládaném přínosu laboratorního zpracování, o možném důsledku výsledků pro něj a jeho potomky, o riziku neočekávaných nálezů, a že těmito informacím porozuměli. Každý klient může rozhodnout, jak bude se vzorkem zacházeno dále, uděluje

souhlas či nesouhlas se skladováním DNA a může předem vyjádřit, s jakými výsledky si přeje být seznámen. Nakonec tyto informace potvrdí svým podpisem.

2.4 Vybavení pro výzkum

Laboratoř disponovala veškerým potřebným vybavením, které je zmíněno v praktické části, stejně jako reagensii použitými k výzkumu.

2.5 Izolace bukálních stěrů

Genomová DNA byla izolována z bukálních stěrů 49 pacientů. K izolaci byl použit komerční kit GeneAllExGene™ Clinic SV Mini (GeneAll).

Reagencie

- Proteinasa K (20mg/ml)
- Pufr BL (lyzační pufr)
- Pufr TW (promývací pufr)
- Pufr AE (eluční pufr)
- 100% ethanol (dle návodu)

2.5.1 Postup izolace

- 1) Do každé zkumavky se vzorkem jsem odpipetovala na vatový výtěrový tampon 25 µl proteinázy K a 300µl BL pufru automatickou pipetou.
- 2) Důkladně jsem promíchala zkumavky pomocí vortexu.
- 3) Vzorky jsem inkubovala 10–15 minut při 56 °C.
- 4) Krátce jsem vzorky stočila pro odstranění tekutiny ze stěn a vnitřní strany víčka mikrozkušavky.
- 5) Do každé zkumavky jsem přidala 300 µl ethanolu.
- 6) Vortexovala jsem zkumavky v pulzech.
- 7) Krátce jsem zkumavky stočila.
- 8) Tekutinu jsem z každé zkumavky postupně přenesla na popsanou kolonku.
- 9) Centrifugovala jsem kolonky 1 min při 6000 x g (> 8000 rpm).
- 10) Nahradila jsem sběrné zkumavky čistými.
- 11) Přidala jsem 600 µl BW pufru.
- 12) Centrifugovala jsem kolonky 1 min při 6000 x g (> 8000 rpm) a pak jsem znovu nahradila sběrné zkumavky čistými.
- 13) Přidala jsem 700 µl TW pufru.
- 14) Centrifugovala jsem kolonky 1 min při 6000 x g (> 8000 rpm).

- 15) Z každé sběrné zkumavky jsem odstranila supernatant a kolonku do ní vrátila.
- 16) Centrifugovala jsem znovu prázdné kolonky při nejvyšších otáčkách 1 min, pro odstranění zbytkového promývacího pufru.
- 17) Kolonky jsem umístila do nové označené zkumavky o objemu 1,5 ml.
- 18) Napipetovala jsem 50 µl AE pufru přímo na střed filtru kolonky.
- 19) Inkubovala jsem kolonky s AE puftrem 1–5 min při laboratorní teplotě.
- 20) Centrifugovala jsem kolonky při nejvyšších otáčkách, 1 min.
- 21) Získaný objem ve sběrných zkumavkách jsem znovu napipetovala na kolonky, aby došlo k získání maximálního možného množství DNA.
- 22) Kolonky jsem dala centrifugovat po dobu 1 min při nejvyšších otáčkách.
- 23) DNA izoláty byly uloženy před dalším zpracováním do lednice nebo mrazícího boxu.

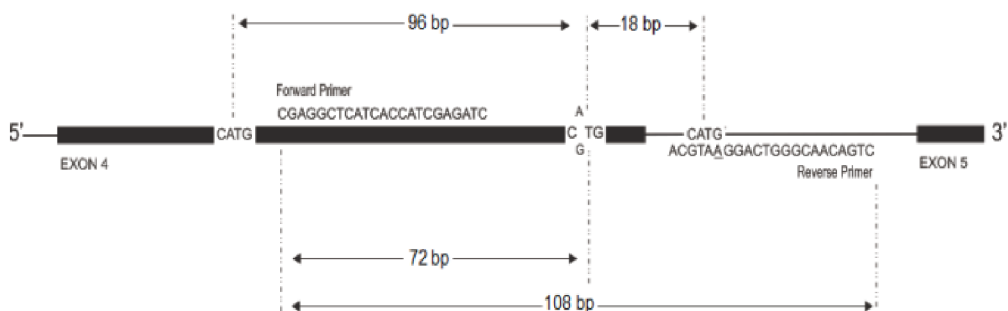
2.6 Měření koncentrace DNA

Následně bylo nutné změřit koncentraci izolované DNA jednotlivých vzorků. Po naředění jsem koncentraci měřila pomocí fluorometru Qubit[®]2.0.

- 1) Připravila jsem čisté zkumavky pro měření a popsala je.
- 2) Napipetovala jsem 198 µl roztoku AccuGreen Broad Range dsDNA Quantitation Kit (Biotium) a 2 µl izolátu do této mikrozkušavky.
- 3) Mikrozkušavku jsem umístila do fluorometru a provedla měření.
- 4) Zapsala jsem hodnoty koncentrace DNA do tabulky k příslušným pacientům.

2.7 Vyšetření metodou PCR-RFLP

Metoda PCR-RFLP je složena ze dvou částí. Během PCR reakce dochází k amplifikaci konkrétního úseku genu, který vyšetřujeme, pomocí dvou specifických primerů. Následuje restriční štěpení PCR produktů pomocí restričního enzymu, který byl izolován z bakterie *Haemophilus influenzae*, označeného jako NlaIII (Thermo Scientific). Příslušný enzym štěpí DNA v konkrétním restričním místě viz. obr. 4, na fragmenty o definované délce.



Obr. 4 – Schématické znázornění štěpení sekvencí rozeznávaných *NlaIII* (CATG), (Zdroj: Lajin a Alachkar 2011).

Klíčovým krokem pro provedení PCR reakce je příprava tzv. mastermixu – reagensii potřebných pro amplifikaci DNA. Mastermix obsahuje vodu, reakční pufr, nukleotidy, polymerázu a primery. Izolovaná DNA se pak přidá do tohoto reakčního mixu a průběh reakce probíhá v thermocycleru. Příprava vzorků i mastermixu probíhala ve dekontaminovaném laminárním boxu vysvíceným UV světlem.

2.7.1 Reagencie

Reakční mix – PCR amplifikace

- H₂O
- 5x MyTaq Red Reaction Buffer
- MyTaq polymerase
- DMSO
- Primery F+R (forward+reverse)
- DNA templát

Reakční mix – restrikce

- PCR produkt
- 10X Buffer G
- *NlaIII* (restrikční enzym)

Použité primery (Lajin a Alachkar 2011)

- Forward: 5'-TCGTGGACGCCGTGATTCAGG- 3'
- Reverse: 5'-AGGTCTGACAACGGGTCAGGC- 3'

2.7.2 Postup – PCR amplifikace

- Reagencie potřebné k PCR uložené v mrazicím boxu bylo nutné nechat alespoň mírně přizpůsobit laboratorní teplotě a všechny jsem s výjimkou enzymů zvertexovala.
- Připravila a označila jsem zkumavky pro jednotlivé vzorky tak, aby byly přehledně seřazeny a nedošlo k záměně či chybnému postupu.
- Příprava mastermixu pro konkrétní počet reakcí probíhala v PCR boxu. Celkový objem pro jednu reakci byl celkem 48 μ l a jeho složení je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2 – PCR mastermix, množství jednotlivých reagensů odpovídající jedné reakci.

Reagencie	Množství (μ l)
destilovaná voda	34,3
5x MyTaq Red Reaction Buffer	10
MyTaq polymeráza (5 U/ μ l)	0,4
DMSO (100 %)	2,5
primer (forward) 20 pmol	0,5
primer (reverse) 20 pmol	0,5

- Nejprve jsem smíchala MyTaq Red Reaction Buffer a vodu.
- Poté jsem přidala polymerázu, DMSO a jako poslední primery.
- Mastermix jsem rozpipetovala po 48 μ l do připravených, označených zkumavek.
- Ke 48 μ l mastermixu jsem přidala 2 μ l izolované DNA.
- Reakční směs jsem zvertexovala a krátce stočila na stolní centrifuze.
- Následovala amplifikace v thermocycleru Labnet MultiGene™ Gradient Thermal Cycler TC9600 s nastaveným reakčním profilem, který je uveden v Tabulce 3.
- Ke každému běhu bylo nutné přidat dva kontrolní vzorky se známým genotypem (Val/Val a Val/Met) a negativní kontrolu, mastermix bez DNA.
- Po ukončení PCR reakce bylo na agarózový gel nanášeno 5 μ l PCR produktu (217 bp) pro kontrolu správné amplifikace.

Tabulka 3 – Použitý PCR profil.

Proces		časový podíl	Teplota
Denaturace	1 cyklus	5 minut	95 °C
Denaturace	32 cyklů	30 vteřin	95 °C
Anealing		30 vteřin	55 °C
Extenze		60 vteřin	72 °C
Extenze	1 cyklus	10 minut	72 °C

2.7.3 Elektroforéza na agarózovém gelu

2.7.3.1 Reagencie

- agarózové tablety (FastGene)
- fluorescenční barva Midory Green Advanced DNA stain (Elisabeth Pharmacon)
- produkt restrikčního štěpení DNA
- marker 100 bp DNA Ladder H3 RTU (Nippon Genetics)

2.7.3.2 Příprava gelu

Pro gelovou elektroforézu je nutné připravit nový gel, který zaručí nejlepší možnou kvalitu rozlišení a viditelnost jednotlivých restrikčních fragmentů.

- 1) Pro 4% gel jsem do kádinky umístila 100ml 1x TBE pufru a osm tablet agarózy (1 tableta obsahuje 0,5 g agarózy)
- 2) Kádinku jsem zahřála v mikrovlnné troubě po dobu jedné minuty. Tento proces bylo nutné sledovat pro případ, že by se obsah dostal nad okraj nádoby a hrozilo vylití.
- 3) Směs musela být čirá a případná vzniklá pěna by měla vymizet. Následně jsem přidala 5µl barvičky a opatrně promíchala.
- 4) Tekutý gel jsem rovnoměrně nalila do formy a odstranila vzniklé bubliny vzduchu od hřebínků.
- 5) Vyčkala jsem, dokud gel neztuhne, případně jej bylo možné umístit do chladničky.

2.7.3.3 Elektroforéza

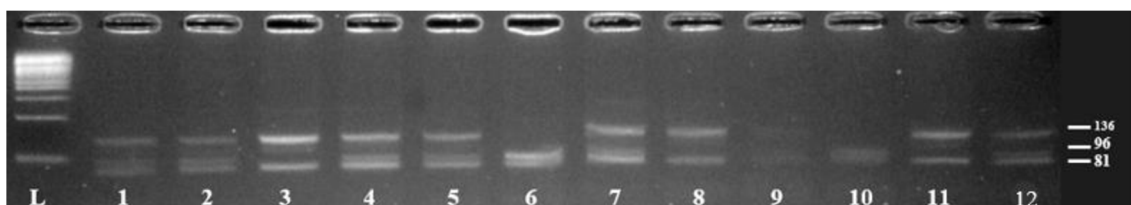
- 1) Gel jsem umístila do elektroforetické vany (Mupid® One Electrophoresis System). Nejprve bylo zapotřebí do jamek napipetovat 5 µl markeru 100 bp DNA Ladder H3 RTU, kvůli odečtení velikosti PCR produktů nebo restrikčních fragmentů.
- 2) Do jamek připraveného gelu jsem nanesla vzorky v množství 5 (PCR produkty) nebo 20 µl (restrikční fragmenty) a spustila elektroforézu na více než 30 minut při 135 V.
- 3) Pro kontrolu průběhu elektroforézy jsem gel přemístila na detekční systém FastGene® GelPic LED box (Elisabeth Pharmacon s.r.o.), zkontrolovala jsem dostatečné rozdělení restrikčních fragmentů, gel byl vyfocen a foto bylo uloženo do PC.

2.7.4 Postup – restrikční štěpení

- V dekontaminovaném laminárním boxu jsem umístila do čisté mikrozkušavky 45 µl PCR produktu, 4,5 µl pufru 10X buffer G a 1 µl restrikčního enzymu NlaIII (10U). Postup jsem opakovala u všech vzorků.
- Vzorky jsem inkubovala v termostatu při 37 °C po dobu 60 minut.
- Provedla jsem gelovou elektroforézu vzorků s markerem 100 bp DNA Ladder H3 RTU. V laboratoři byla k nahlédnutí tabulka velikosti restrikčních fragmentů pro *COMT*, viz. tabulka 4.

Tabulka 4 – Velikosti restrikčních fragmentů odpovídající jednotlivým genotypům.

Genotyp	Velikost restrikčních fragmentů
Val/Val	136 bp a 81 bp
Val/Met	136 bp a 96 bp a 81 bp a 40 bp
Met/Met	96 bp a 81 bp a 40 bp



Obr. 5 – Výsledek PCR RFLP u vzorků psychiatricky diagnostikovaných pacientů. (L = ladder, C = kontrola; 1 – Val/Met; 2 – Val/Met; 3 – Val/Val; 4 – Val/Met; 5 – Val/Met; 6 – Met/Met; 7 – Val/Met; 8 – Val/Val; 9 – Val/Val; 10 – Met/Met; 11 = kontrola Val/Val; 12 = kontrola Val/Met). Restrikční fragment na 40 bp nebyl dobře viditelný, proto zde není označen.

2.8 Sekvenace

Sekvenace je proces, sloužící pro zjištění pořadí nukleotidů v genomu. Provedena byla u čtyř vzorků s nečitelnými či nejasnými výsledky restričního štěpení.

Nejprve bylo nutné PCR produkty přečistit, a to enzymaticky pomocí SAP-Exo kitu (Jena Bioscience). Pro degradaci zbylých primerů úplnou defosforylací dNTP je zapotřebí kombinace – hydrolytických enzymů v reakčním mixu, rekombinantní alkalické fosfatázy (rSAP) a exonukleázy I (Exo I).

- 1) Do 200 μ l mikrozkušavky bylo napipetováno 5 μ l PCR produktu spolu s 2 μ l SAP-Exo reakčního mixu.
- 2) Podle instrukcí výrobce byla směs promíchána a inkubována při 37 °C po dobu 10 minut a následně proběhla stejně dlouhá inaktivace při 80°C. V čisté 200 μ l zkumavce byly smíchány 2 μ l přečištěného PCR produktu s 0,5 μ l forward primeru a 7,5 μ l vody.
- 3) Jednotlivé mikrozkušavky byly popsány a odeslány spolu s objednávkovým formulářem na sekvenaci firmě SeqMe s.r.o. Firma SeqMe s.r.o. poskytuje kompletní služby v oblasti DNA sekvenování a real-time PCR. V tomto případě byla použita Sangerova metoda, balíček StandartSeq se standartním sekvenačním protokolem. Pomocí programu Chromas byly vyhodnoceny výsledky čtyř sekvenačních reakcí a odečteny příslušné genotypy.

3. Výsledky

Po provedení PCR RFLP byly získány genotypy jednotlivých pacientů. V rámci praktické části této bakalářské práce mělo být vyšetřeno 49 pacientů s lékařsky stanovenou diagnózou psychiatrického onemocnění. Jejich počet se však snížil na 40 validních vzorků, které byly vhodné pro provedení PCR RFLP nebo sekvenování a analýzu výsledků, a to zejména z důvodu příliš nízké koncentrace či špatné kvality DNA.

3.1 Výsledné genotypy polymorfismu rs4680

Tabulky 5 a 6 ukazují poměr genotypů ve dvou sledovaných skupinách. První skupina zahrnuje 40 diagnostikovaných pacientů s psychiatrickou diagnózou a stanovenou léčbou.

Tabulka 5 – Zastoupení genotypů polymorfismu Val158Met ve skupině psychiatrických pacientů.

	počet	ženy	muži	zastoupení v %
Val/Val	9	8	1	22,5 %
Val/Met	14	11	3	35,0 %
Met/Met	17	10	7	42,5 %
Celkem pacientů	40	29	11	

Tabulka 6 – Zastoupení genotypů v kontrolní skupině jedinců bez psychiatrické diagnózy. Jedná se o klienty laboratoře GENLABS vyšetřených na COMT Val158Met od roku 2017 do 2020.

	počet	ženy	muži	zastoupení v %
Val/Val	46	28	18	24,0 %
Val/Met	93	66	27	48,0 %
Met/Met	54	35	19	28,0 %
Celkem klientů	193	129	64	

3.2 Diagnózy účastníků

Ošetřujícím lékařem byly na základě informovaného souhlasu pacientů, pro účely výzkumu poskytnuty informace o diagnózách jednotlivých pacientů shrnutých v tab. 7, předepsané medikaci a jejich účincích na léčené osoby. Celkem čtyři osoby trpěli dvěma onemocněními současně, souvisejícími většinou se závislostí či depresivními stavy.

Tabulka 7 – Seznam diagnóz a počet pacientů s uvedenou diagnózou.

kód DG.	popis	počet
F31.3	Bipolární afektivní porucha I. Typu	1
F32.3	Periodická depresivní porucha	1
F200	Paranoidní schizofrenie	6
F10.2	Závislost na alkoholu	3
F60.3	Emočně nestabilní porucha osobnosti	4
F19.2	Polymorfní syndrom + závislost na návykových látkách	1
F25.1	Schizoafektivní porucha, depresivní typ	2
F20.3	Nediferencovaná schizofrenie	1
239	Akutní a přechodné psychotické poruchy nespecifikované	2
F20.2	Porucha s trvalými bludy	1
F23.1	Akutní a přechodné psychotické poruchy	1
F32.1	Středně těžká deprese	2
F43.2	Poruchy přizpůsobení, úzkostně depresivní reakce na dlouhodobý stres + škodlivé užívání alkoholu	2
F43.1	Posttraumatická stresová porucha, akcentovaná osobnost	2
F61	Smíšená porucha osobnosti + úzkostně depresivní syndrom	2
F06.4	Organická úzkostná porucha	2
F50.0	Mentální anorexie	1
F41.2	Úzkostně depresivní porucha	5
F42.1	Obsedantně kompulzivní porucha	1
F23.3	jiné akutní psychotické poruchy	1
F41.1	Generalizovaná úzkostná porucha	3

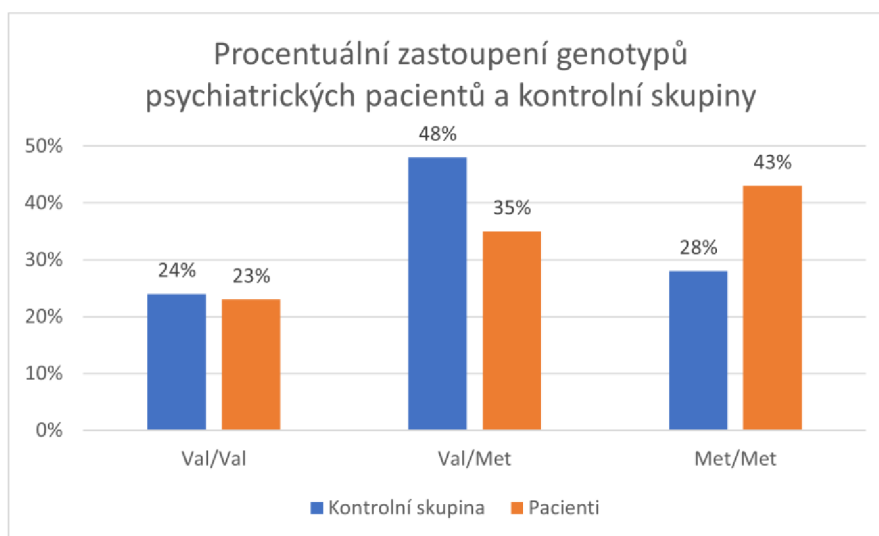
Diagnózy pacientů jsou poměrně specifické, byly mnou rozděleny do několika barevně odlišených obecných skupin pro snazší spojení s teoretickou částí práce. Níže zpracované výsledky v tab. 8 zohledňují pohlaví pacientů, přičemž je zmíněna i dědičnost v rodině.

Tabulka 8 – Psychiatrická onemocnění rozdělená do obecnějších skupin pro porovnání přítomnosti jednotlivých genotypů polymorfismu Val158Met u 40 vzorků pacientů s psychiatrickou diagnózou.

	počet, %	COMT			pohlaví		heredita	
		V/V	V/M	M/M	Ž	M	Ano	Ne
Bipolární porucha	1 (2,5 %)	-	1	-	-	1	1	-
Depresivní porucha	14 (35 %)	6	5	3	12	2	9	4
Úzkostná porucha	5 (12,5 %)	1	2	2	3	2	3	2
Schizofrenie	8 (20 %)	-	1	7	3	5	4	4
Závislost (návykové látky, alkohol)	6 (15 %)	1	3	2	3	3	6	-
Obsedantně kompulzivní porucha osobnosti	1 (2,5 %)	-	-	1	1	-	1	-
Mentální anorexie	1 (2,5 %)	1	-	-	1	-	-	1
Emočně nestabilní porucha osobnosti	4 (10 %)	-	2	2	4	-	-	4
Akutní a přechodné psychotické poruchy osobnosti	3 (7,5 %)	-	1	2	3	-	3	-
Jiné psychotické poruchy	1 (2,5 %)	-	1	-	1	-	-	1

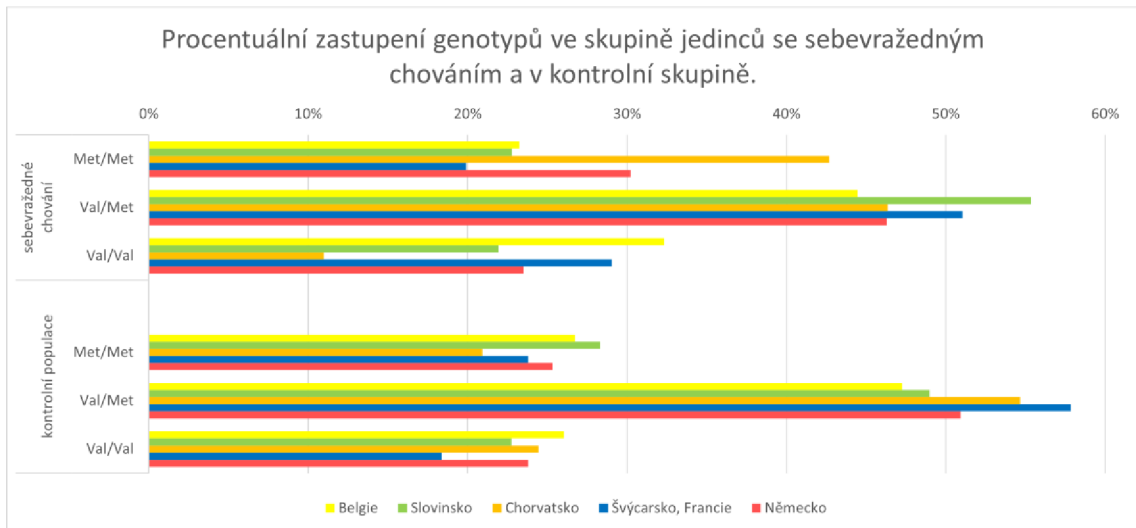
Nejčetněji jsou zastoupeni pacienti s depresivními poruchami, zahrnující diagnózy jako je periodická depresivní porucha, středně těžká deprese a úzkostně depresivní reakce na dlouhodobý stres. Ve této skupině pacientů převládaly ženy, přičemž u jedné z pacientek nebyla známá heredita, dále byla zastoupena více homozygotní forma Val/Val, ale ne dost výrazně ve srovnání s ostatními genotypy. Do úzkostných poruch byl zahrnuta organická a generalizovaná úzkostná porucha a úzkostně depresivní syndrom. V tomto případě bylo rozložení genotypů také vyrovnané. Jasnější výsledek můžeme pozorovat u pacientů diagnostikovaných s paranoidní či nediferencovanou schizofrenií, kde s vyrovnanou hereditou a více mužskými pacienty je sedm z osmi pacientů Met/Met homozygotní.

Na obr. 6 je znázorněno rozložení genotypů Val158Met ve zdravé populaci a ve vybrané skupině pacientů. V kontrolní skupině zdravých osob bylo nejvíce heterozygotů Val/Met, obě homozygotní varianty jsou přibližně vyrovnané. Ve skupině pacientů bylo nejvíce homozygotních Met/Met jedinců. Dále si můžeme všimnout téměř stejného procentuálního zastoupení homozygotů Val/Val obou skupin. Nicméně další genotypy vykazují téměř opačný vztah – heterozygoti Val/Met kontrolní skupiny jsou početněji zastoupeni, než ve skupině pacientů a v případě Met/Met je pacientů s tímto genotypem více než v kontrolní skupině.

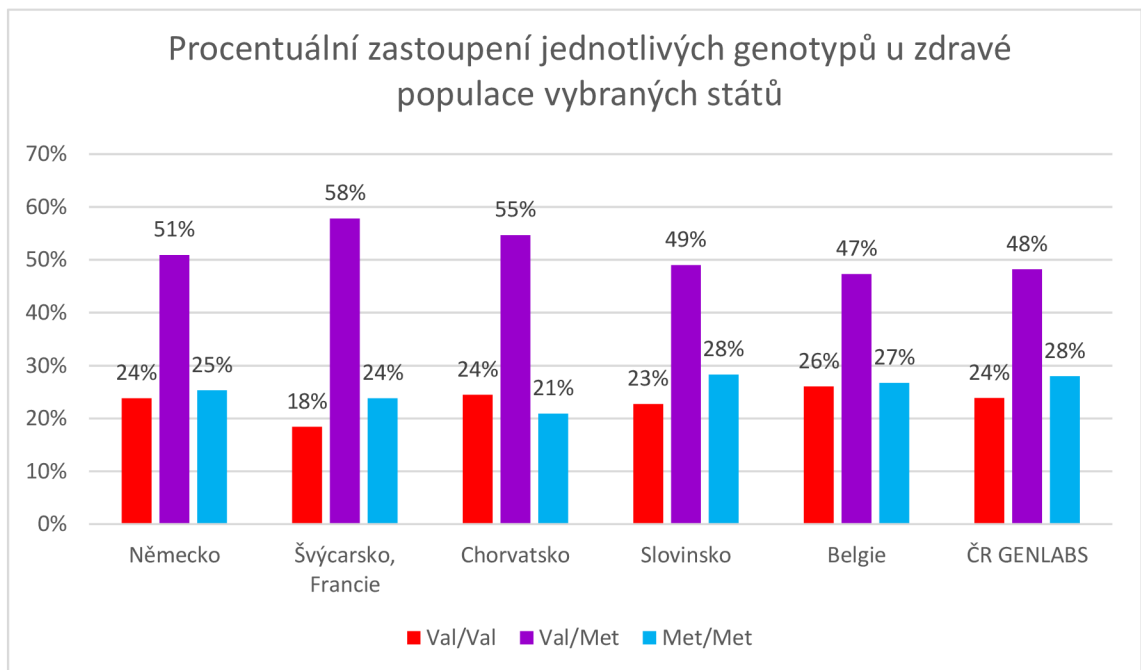


Obr. 6 – Porovnání frekvence jednotlivých genotypů v souboru psychiatrických pacientů a kontrolním souboru jedinců bez psychiatrické diagnózy.

Studie od González- et al. 2018 zkoumající vztah polymorfismu Val158Met se sebevražděným chováním přinesla komplexní výsledky zahrnující výstupy studií vzniklých v různých státech světa. Obrázek č. 7 zobrazuje tyto výsledky získané z několika evropských států (Německo, Švýcarsko a Francie, Chorvatsko, Slovinsko a Belgie). Výsledky získané testováním zdravých kontrol a tedy jedinců bez psychiatrické diagnózy jsou patrné z obrázku č. 7, kde je na grafu je jasně viditelná dominance heterozygotů Val/Met napříč všemi vybranými státy. Z celkového počtu případů bylo homozygotních Val/Val 38 %, heterozygotních Val/Met 52 % a Met/Met bylo 10 %. V kontrolní skupině bylo 32 % Val/Val, 46 % Val/Met a 22 % Met/Met.



Obr. 7 – Graf znázorňující vybrané evropské státy, ve kterých proběhly studie vztahu Val158Met a sebevražedného chování. Počet případů sebevražedného chování v použitých výzkumech: Německo $n=149$; Švýcarsko, Francie $n=427$; Chorvatsko $n=82$; Slovinsko $n=356$; Belgie $n=213$ (González- et al. 2018).



Obr. 8 – Kontrolní data z výzkumů polymorfismu Val158Met v evropských zemích získaná v letech 2003–2016 spolu s daty laboratoře GENLABS s.r.o. získanými v letech 2017–2020. Počet kontrolních vzorků zdravé populace u jednotlivých států: Německo $n=328$; Švýcarsko, Francie $n=185$; Chorvatsko $n=311$; Slovinsko $n=198$; Belgie $n=240$ (González- et al. 2018), laboratoř GENLABS $n=193$.

4. Diskuse

Studium polymorfismů a odhalování mutantních variant se vztahem k psychickým onemocněním je v dnešní době stále nové a neprobádané téma, které by mohlo v budoucnu přinést výsledky klíčové pro diagnostiku a léčbu pacientů. *COMT* se řadí mezi nejprozkoumanější geny díky jeho jasnému umístění a snadné detekci, přesto vznikají stále nové studie sledující klinický potenciál nalezených polymorfismů.

V praktické části byl popsán metodický postup výzkumu vzorků získaných od 40 pacientů se známou diagnózou. Odběr primárního vzorku ve formě bukalního stěru od psychiatricky diagnostikovaných osob může být sám o sobě obtížný, proto bylo několik vzorků vyřazeno, z důvodu nedostatečné koncentrace DNA nebo nesprávně provedeného odběru, nepochopení či nedodržení přesných instrukcí, ať už z hlediska nedoporučené konzumace jídla před odběrem nebo manipulace s odebraným stěrem. Není vyloučena možnost vlivu podávaných léků. Některé vzorky měly velmi nízkou koncentraci, přesto se je podařilo zpracovat a vyhodnotit.

Jak již bylo uvedeno v úvodu aktivita enzymu *COMT* závisí na jeho genotypu. Homozygoti *Met/Met* mají nejnižší aktivitu enzymu, *Val/Met* homozygoti mají střední a *Val/Val* nejvyšší aktivitu enzymu. Dle informací z databáze jedno-nulkeotidových polymorfismů *SNPedia* mají nositelé jednotlivých alel určité vlastnosti, ovlivněné množstvím dopaminu. *Met* alela s nižší enzymatickou aktivitou enzymu *COMT*, a tedy vyšší hladinou dopaminu je označována jako „*Worrier*“ a disponuje vyšší citlivostí na bolest, náchylností ke stresu a větší efektivností ve zpracovávání informací. Alela *Val* neboli „*Warrior*“ s vyšší enzymatickou aktivitou a nižšími hladinami dopaminu je téměř přesným opakem a determinuje nižší práh bolesti, lepší snášení stresu ale zato zredukované kognitivní dovednosti. Tyto informace poukazují na možnou souvislost alely *Met* s psychologickými nebo psychiatrickými potížemi a můžeme tedy odhadnout, že ve skupině pacientů bude mít větší podíl, zatímco alela *Val* bude vzácnější.

Z odborných publikací vyplývá, že homozygotní jedinci *Met/Met*, kteří jsou ve zkoumané skupině psychiatrických pacientů opravdu nejvíce zastoupeni (42,5 %), z diagnóz především u schizofrenie (7 z 8 pacientů), disponují také přesnější prostorovou motorikou, a to i při zapojení rušivých podnětů, nicméně jsou pravděpodobně citlivější na změny podmínek při náročnějších činnostech. V porovnání s homozygoty *Val/Val* mají na základě výsledků výzkumu *novelty-seeking* větší tendence k impulzivnímu rozhodnutí a řešení problémů. U homozygotů *Val/Val*, kterých bylo v souboru pacientů nejméně

(22,5 %) byla sledována výraznější kognitivní flexibilita při řešení úloh vyžadujících práci s informacemi a také v případě emocionálně podloženého rozhodování. Nejpočetněji se tento genotyp vyskytoval u depresivních poruch (6 ze 14 pacientů), kde ale zastoupení dalších genotypů nebylo jednoznačně rozdílné, proto Val/Val genotyp nelze jasně přiřadit k této diagnóze. Heterozygotní genotyp Val/Met podle předpokladů nepřevládá u žádné diagnózy, což se dá předpokládat, protože nesnižuje ani nezvyšuje aktivitu enzymu COMT, tudíž by nemusel vyvolávat potíže v souvislosti s hladinou dopaminu. Heterozygotní jedinci se střední aktivitou enzymu COMT převládali také ve skupině zdravých osob (48 %) testovaných v laboratoři GENLABS s.r.o. Získaná data shromážděná od roku 2017 do roku 2020 jsou v porovnání s daty evropských států velmi podobná. Jasně převládá genotyp Val/Met. Heterozygoti Val/Met mají selektivně nejvýhodnější genotyp, hladina dopaminu je ovlivňována střední aktivitou COMT a případná rizika, kterým čelí homozygotní jedinci jsou tak alespoň částečně eliminována.

Pacienti diagnostikovaní s některou psychiatrickou poruchou či jejich kombinací, zejména lidé se závažnými nemocemi jako je schizofrenie, bipolární porucha nebo deprese a úzkosti mají často problém začlenit se do společnosti a přiblížit se životním standardům normálního člověka, jako je založení rodiny, dobré studium, pracovní výsledky a ohodnocení nebo vykonávání rutinních činností. Řada ztrápených, neléčených nebo na léčbu negativně reagujících lidí se tak vzdá šance na běžný život a rozhodnou se ho předčasně ukončit. Z tohoto pohledu se tak můžeme zaměřit i na tendence k sebevraždám zmíněné výše. Sebevražedné chování lze definovat jako soubor fenotypů ovlivněný biologickými, genetickými a na prostředí závislými rizikovými faktory. V metaanalýze González- et al. 2018, byl analyzován polymorfismus Val158Met u případů v různých zemích. Největší zastoupení měl genotyp Val/Met, naopak nejnižší pak Met/Met. Domnívám se, že pro jasný výsledek by však bylo zapotřebí vyšetřit také pacienty, kteří nemají pouze sebevražedné sklony, ale k samotnému činu již dospěli. Alela Met má totiž podle dostupných informací největší předpoklady pro to být rizikovým faktorem sebevražedného chování a šlo by tak polemizovat o důvodu, proč bylo homozygotů Met/Met v této skupině nejméně.

Pro vyvození přímých závěrů o vztahu Val158Met s psychiatrickými onemocněními bychom potřebovali detailnější informace o závažnosti symptomů, o mentálním stavu pacientů a anamnéze, o jejich chování – např. sklony k závislostem nebo typ temperamentu, popis úrovně kognitivních schopností a dovedností či výsledky novelty-seeking. Pak by bylo možné výsledky studií shrnutých v teoretické části propojit s daty získanými v části

praktické. Pro signifikantní závěry by bylo vhodné, aby všechny diagnózy zahrnuté ve výzkumu měly vyšší počty pacientů. Vznikly tak možná výraznější rozdíly v poměru jednotlivých genotypů a případná spojitost onemocnění s polymorfismem Val/Met by pak byla lépe viditelná.

5. Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na možný vztah polymorfismů genu *COMT* s psychiatrickými diagnózami. Tento vztah byl u několika onemocnění vyvrácen, u dalších spekulován, u některých byl zjištěn určitý vliv na razanci symptomů u jednotlivých genotypů, který korespondoval jeho působením na aktivitu enzymu.

Mezi cíle práce patřilo vypracování odborné rešerše shrnující poznatky o enzymu a genu *COMT* a jeho polymorfismech (zejména Val158Met), které mohou ovlivňovat psychiatrická onemocnění v důsledku snížené aktivity enzymu *COMT*. Dalším cílem bylo zvládnutí praktické části zahrnující zejména metodu PCR, dále izolaci a měření koncentrace získané DNA z bukalních stěrů, gelovou elektroforézu a analýzu výsledků. Oba tyto stanovené cíle byly splněny.

Na základě poznatků z odborné literatury bych konstatovala, že polymorfismus Val158Met není jasným ukazatelem přítomnosti psychiatrických poruch. Příliš mnoho zdrojů bylo ve svých výsledcích nejednoznačných nebo tuto souvislost přímo vyvracelo. Z výsledků praktické části mé práce nelze odvodit, jestli a do jaké míry tento polymorfismus ovlivňuje průběh psychiatrických onemocnění, jelikož u vybrané skupiny pacientů nejsou známy přesné informace o průběhu nemoci a jednotlivých symptomech, o chování, úrovni kognitivních dovedností nebo také o výsledcích novelty-seeking. Z procentuálního zastoupení genotypů vyplývá, že homozygotních nositelů Met/Met s nejnižší aktivitou enzymu *COMT* je ve skupině pacientů nejvíce, nejméně je homozygotů Val/Val. Zdravá populace je z největší části tvořena evolučně výhodnějšími heterozygoty Val/Met, a to celosvětově. Ačkoliv jsou názory na souvislost jednotlivých psychiatrických diagnóz s polymorfismem Val158Met nesourodé a výsledky nejednotné, jistě bude nadále sledován, studován a propojován s některými aspekty lidské psychologie a v budoucnu přinese výsledky které více či méně podpoří diagnostiku a léčbu psychiatrických pacientů.

6. Použitá literatura

ÅBERG, Elin, Andrés FANDIÑO-LOSADA, Louise K. SJÖHOLM, Yvonne FORSELL a Catharina LAVEBRATT, 2011. The functional Val158Met polymorphism in catechol-O-methyltransferase (COMT) is associated with depression and motivation in men from a Swedish population-based study. *Journal of Affective Disorders* [online]. **129**(1–3), 158–166. ISSN 01650327. Dostupné z: doi:10.1016/j.jad.2010.08.009

ABRAHAM, Eyal, Marc SCOTT a Clancy BLAIR, 2020. Catechol-O-Methyltransferase Val158Met Genotype Interacts With Family Adversity During Infancy to Predict ADHD Symptoms Across Childhood. *Biological Psychiatry* [online]. **87**(9), S149. ISSN 00063223. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopsych.2020.02.396

BRINKSMA, Djûke M, Pieter J HOEKSTRA, Barbara Van Den HOOFDAKKER, Annelies De BILDT, Jan K BUITELAAR, Catharina A HARTMAN a Andrea DIETRICH, 2017. Age-dependent role of pre- and perinatal factors in interaction with genes on ADHD symptoms across adolescence. *Journal of Psychiatric Research* [online]. **90**, 110–117. ISSN 0022-3956. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpsychires.2017.02.014

CHAUDHARY, Amrita, Pradeep KUMAR a Vandana RAI, 2020. Title : Catechol-O-methyltransferase (COMT) Val158Met Polymorphism and susceptibility to alcohol dependence Authors : Amrita Chaudhary , Pradeep Kumar , Vandana Rai Affiliation : Department of Biotechnology , VBS Purvanchal University , Jaunpur , (UP).

CHEUK, Daniel Ka Leung a Virginia WONG, 2006. Meta-analysis of association between a catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. *Behavior Genetics* [online]. **36**(5), 651–659. ISSN 00018244. Dostupné z: doi:10.1007/s10519-006-9076-5

COHEN, H., L. NEUMANN, Y. GLAZER, R. P. EBSTEIN a D. BUSKILA, 2009. The relationship between a common catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism val158met and fibromyalgia. *Clinical and Experimental Rheumatology*. **27**(5 SUPPL. 56). ISSN 0392856X.

CRADDOCK, Nick a Ian JONES, 2019. Genetics of bipolar disorder. *Bipolar Disorder: The Science of Mental Health* [online]. 29–38. ISSN 0022-2593. Dostupné z: doi:10.4324/9781315054308-4

DICKERSON, Faith B., John J. BORONOW, Cassie STALLINGS, Andrea E. ORIGONI, Anne SULLENS a Robert H. YOLKEN, 2007. The catechol O-methyltransferase Val158Met polymorphism is not associated with broad-based cognitive functioning in schizophrenia. *Schizophrenia Research* [online]. **96**(1–3), 87–92. ISSN 09209964. Dostupné z: doi:10.1016/j.schres.2007.05.021

EISENHOFER, Graeme, Irwin J. KOPIN a David S. GOLDSTEIN, 2004. Catecholamine metabolism: A contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological Reviews* [online]. **56**(3), 331–349. ISSN 00316997. Dostupné z: doi:10.1124/pr.56.3.1

FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS, César, Irene CANTARERO-VILLANUEVA, Carolina FERNÁNDEZ-LAO, Silvia AMBITE-QUESADA, Lourdes DÍAZ-RODRÍGUEZ, Inés RIVAS-MARTÍNEZ, Rosario del MORAL-AVILA a Manuel ARROYO-MORALES, 2012. Influence of catechol-o-methyltransferase genotype (Val158Met) on endocrine, sympathetic nervous and mucosal immune systems in breast cancer survivors. *Breast* [online]. **21**(2), 199–203. ISSN 15323080. Dostupné z: doi:10.1016/j.breast.2011.09.012

FRIEDLANDER, Laura a Mary DESROCHER, 2006. Neuroimaging studies of obsessive-compulsive disorder in adults and children. *Clinical Psychology Review* [online]. **26**(1), 32–49. ISSN 02727358. Dostupné z: doi:10.1016/j.cpr.2005.06.010

FRISCH, A., N. LAUFER, Y. DANZIGER, E. MICHAELOVSKY, S. LEOR, C. CAREL, D. STEIN, S. FENIG, M. MIMOUNI, A. APTER a A. WEIZMAN, 2001. Association of anorexia nervosa with the high activity allele of the COMT gene: A family-based study in Israeli patients. *Molecular Psychiatry* [online]. **6**(2), 243–245. ISSN 13594184. Dostupné z: doi:10.1038/sj.mp.4000830

GERVASINI, G., L.M.; GONZALEZ, S.; MOTA-ZAMORANO a A. GAMERO-VILLARROEL, C.; CARRILLO, J.A.; FLORES, I.; GARCIA-HERRAIZ, 2018. Association of COMT Val158Met Polymorphism with Psychopathological Symptoms in Patients with Eating Disorders. *Current Molecular Medicine*. **18**, 65-70(6).

GOLIMBET, V E, M V ALFIMOVA, I K GRITSENKO a R P EBSTEIN, 2007. Relationship Between Dopamine System Genes and Extraversion and Novelty Seeking. *37*(6), 1–6.

GONZÁLEZ-, Thelma Beatriz, Yazmín HERNÁNDEZ-, Isela ESTHER, María LILIA, Alfonso TOVILLA-ZÁRATE, Alma DELIA a Ana FRESAN, 2018. The role of COMT gene Val108 / 158Met polymorphism in suicidal behavior : systematic review and updated meta-analysis. 2485–2496.

GOTHELF, Doron, Elena MICHAELOVSKY, Amos FRISCH, Ada H. ZOHAR, Gadi PRESBURGER, Merav BURG, Ayala AVIRAM-GOLDRING, Moshe FRYDMAN, Josepha YESHAYA, Mordechai SHOHAT, Michael KOROSTISHEVSKY, Alan APTER a Abraham WEIZMAN, 2007. Association of the low-activity COMT 158Met allele with ADHD and OCD in subjects with velocardiofacial syndrome. *International Journal of Neuropsychopharmacology* [online]. **10**(3), 301–308. ISSN 14611457. Dostupné z: doi:10.1017/S1461145706006699

HOSÁK, Ladislav, A. HANUŠOVÁ, M. BERÁNEK a E. ČERMÁKOVÁ, 2008. Polymorfismus Val158Met genu pro katechol-O-methyltransferázu a psychotické příznaky u závislosti na metamfetaminu. *Ceska a Slovenska Psychiatrie*. **104**(3), 109–114. ISSN 12120383.

HOSÁK, Ladislav, D PH, Mudr Petr ŠILHÁN a Mgr Jiřina HOSÁKOVÁ, 2013. Genetika úzkostných poruch. **14**(1), 7–9.

IOANNIDIS, Konstantinos, Sarah A. REDDEN, Stephanie VALLE, Samuel R. CHAMBERLAIN a Jon E. GRANT, 2020. Problematic internet use: An exploration of associations between cognition and COMT rs4818, rs4680 haplotypes. *CNS Spectrums* [online]. **25**(3), 409–418. ISSN 10928529. Dostupné z: doi:10.1017/S1092852919001019

JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, Félix J., Hortensia ALONSO-NAVARRO, Elena GARCÍA-MARTÍN a José A.G. AGÚNDEZ, 2014. COMT gene and risk for Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenetics and Genomics* [online]. **24**(7), 331–339. Dostupné z: doi:10.1097/FPC.0000000000000056

KATERBERG, Hilga, Danielle C CATH, Damiaan A J P DENYS, Peter HEUTINK, Annemiek POLMAN, Filip C W Van NIEUWERBURGH, Dieter L D DEFORCE, Anton J L M Van BALKOM a Johan A Den BOER, 2009. The Role of the COMT Val 158 Met Polymorphism in the Phenotypic Expression of Obsessive-Compulsive Disorder [online]. Dostupné z: doi:10.1002/ajmg.b.30971

KUMAR, Pradeep, 2020. Catechol-O-methyltransferase gene Val158Met polymorphism and obsessive compulsive disorder susceptibility : a meta-analysis. 241–251.

KUŽELOVÁ, Hana, M. MACEK, J. RABOCH a R. PTÁČEK, 2014. Genetická variabilita u poruchy pozornosti s hyperaktivitou (ADHD). *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie*. **77**(4), 423–427. ISSN 18024041.

LAGE, Guilherme M., Débora M. MIRANDA, Marco A. ROMANO-SILVA, Simone B. CAMPOS, Maicon R. ALBUQUERQUE, Humberto CORRÊA a Leandro F. MALLOY-DINIZ, 2014. Association between the catechol- O-methyltransferase (COMT) val 158met polymorphism and manual aiming control in healthy subjects. *PLoS ONE* [online]. **9**(6), 1–6. ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0099698

LAJIN, Bassam a Amal ALACHKAR, 2011. Detection of catechol-O-methyltransferase (COMT) Val158Met Polymorphism by a New Optimized PCR-RFLP Method. *American Journal of Biomedical Sciences* [online]. (June), 170–175. Dostupné z: doi:10.5099/aj110300170

LIU, Hongliang, Hongmou ZHAO, Zhong LI, Hanzhong XUE, Jun LU a Wei MA, 2018. A common polymorphism of COMT was associated with symptomatic lumbar disc herniation based on a large sample with Chinese Han ancestry. *Scientific Reports* [online]. **8**(1), 1–6. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-31240-9

LIU, Jianbo, Tingting ZHANG, Yanzi MO a Jingbo GONG, 2021. The COMT gene rs4680 polymorphism moderates the relationship between adult ADHD symptoms and executive dysfunction. *Asian Journal of Psychiatry* [online]. **56**, 102546. ISSN 1876-2018. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajp.2021.102546

MALHOTRA, Anil K., Lisa J. KESTLER, Chiara MAZZANTI, John A. BATES, Terry GOLDBERG a David GOLDMAN, 2002. A functional polymorphism in the COMT gene and performance on a test of prefrontal cognition. *American Journal of Psychiatry* [online]. **159**(4), 652–654. ISSN 0002953X. Dostupné z: doi:10.1176/appi.ajp.159.4.652

MUELLNER, Julia, Iman GHARRAD, Marie Odile HABERT, Aurélie KAS, Jean Baptiste MARTINI, Florence CORMIER-DEQUAIRE, Khadija TAHIRI, Marie VIDAILHET, Niklaus MEIER, Alexis BRICE, Michael SCHUEPBACH, Alain MALLET, Andreas HARTMANN a Jean Christophe CORVOL, 2015. Dopaminergic denervation severity depends on COMT Val158Met polymorphism in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* [online]. **21**(5), 471–476. ISSN 18735126. Dostupné z: doi:10.1016/j.parkreldis.2015.02.009

NAVRÁTILOVÁ, MUDR MIROSLAVA A MICHAELA HAMROVÁ, 2009. Realimentace u závažných poruch příjmu potravy – mentální anorexie a bulimie. 22–36.

NOBILE, Maria, Marianna RUSCONI, Monica BELLINA, Cecilia MARINO, Roberto GIORDA, Ombretta CARLET, Laura VANZIN, Massimo MOLTENI a Marco BATTAGLIA, 2010. COMT Val158Met polymorphism and socioeconomic status interact to predict attention deficit/hyperactivity problems in children aged 10-14. *European Child and Adolescent Psychiatry* [online]. **19**(7), 549–557. ISSN 10188827. Dostupné z: doi:10.1007/s00787-009-0080-1

NOGUEIRA, Nathálya Gardênia de Holanda Marinho, Mariane Faria Braga BACELAR, Bárbara de Paula FERREIRA, Juliana Otoni PARMA a Guilherme Menezes LAGE, 2019. Association between the catechol-O-methyltransferase (COMT) Val158Met polymorphism and motor behavior in healthy adults: A study review. *Brain Research Bulletin* [online]. **144**(October 2018), 223–232. ISSN 18732747. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainresbull.2018.11.002

PROFILE, S E E, 2015. Role výživy v léčbě osob s alkoholovou a drogovou závislostí [online]. (January 2014). Dostupné z: doi:10.13140/RG.2.1.3227.5369

QIN, Xue, Qiliu PENG, Aiping QIN, Zhiping CHEN, Liwen LIN, Yan DENG, Li XIE, Juanjuan XU a Haiwei LI, 2012. Association of COMT Val158Met polymorphism and breast cancer risk : an updated meta-analysis. 1–12.

SCHELLEKENS, A, S HOPPENREIJS, B ELLENBROEK, C De JONG, B FRANKE, J BUITELAAR, L COOLS a R VERKES, 2009. P.4.15 The COMT Val158Met genotype and prefrontal dopamine sensitivity in alcohol dependent patients and healthy controls. *European Neuropsychopharmacology* [online]. **19**, S91–S92. ISSN 0924-977X. Dostupné z: doi:10.1016/S0924-977X(09)70105-1

SHIFMAN, Sagiv, Michal BRONSTEIN, Meira STERNFELD, Anne PISANTÉ-SHALOM, Efrat LEV-LEHMAN, Avraham WEIZMAN, Ilya REZNIK, Baruch SPIVAK, Nimrod GRISARU, Leon KARP, Richard SCHIFFER, Moshe KOTLER, Rael D. STROUS, Marnina SWARTZ-VANETIK, Haim Y. KNOBLER, Eilat SHINAR, Jacques S. BECKMANN, Benjamin YAKIR, Neil RISCH, Naomi B. ZAK a Ariel DARVASI, 2002. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *American Journal of Human Genetics* [online]. **71**(6), 1296–1302. ISSN 00029297. Dostupné z: doi:10.1086/344514

SHPRINTZEN, Robert J., 2008a. Velo-cardio-facial syndrome: 30 Years of study. *Developmental Disabilities Research Reviews* [online]. **14**(1), 3–10. ISSN 19405510. Dostupné z: doi:10.1002/ddrr.2

SNPedia.com, databáze jednonukleotidových polymorfismů dostupná online z: <https://www.snpedia.com/index.php/Rs4680>

ŠUCHA, Matúš, 2013. SENSATION SEEKING V PSYCHOLOGICKÉ DIAGNOSTICE ŘIDIČŮ. 71–78.

TENHUNEN, Jukka, Marjo SALMINEN, Kenneth LUNDSTRÖM, Tuula KIVILUOTO, Raija SAVOLAINEN a Ismo ULMANEN, 1994. Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *European Journal of Biochemistry* [online]. **223**(3), 1049–1059. ISSN 14321033. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb19083.x

THOTA, Chandrasekhar, Ramkumar MENON a Melissa J WENTZ, 2011. A Single-Nucleotide Polymorphism in the Fetal Catechol-O- Methyltransferase Gene is Associated With Spontaneous Preterm Birth in African Americans [online]. (June 2014). Dostupné z: doi:10.1177/1933719111417885

- TUNBRIDGE, Elizabeth M., Paul J. HARRISON a Daniel R. WEINBERGER, 2006. Catechol-o-Methyltransferase, Cognition, and Psychosis: Val158Met and Beyond. *Biological Psychiatry* [online]. **60**(2), 141–151. ISSN 00063223. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopsych.2005.10.024
- VACEK, Jaroslav a Petra VONDRÁČKOVÁ, 2014. Behaviorální závislosti: klasifikace, fenomenologie, prevalence a terapie. *Ceska a Slovenska Psychiatrie*. **110**(6), 326–332. ISSN 12120383.
- VAN BREDA, Keelyn, Malcolm COLLINS, Dan J. STEIN a Laurie RAUCH, 2015. The COMT val158met polymorphism in ultra-endurance athletes. *Physiology and Behavior* [online]. **151**, 279–283. ISSN 1873507X. Dostupné z: doi:10.1016/j.physbeh.2015.07.039
- WANG, Fang Yuan, Ping WANG, Dong Fang ZHAO, Frank J. GONZALEZ, Yu Fan FAN, Yang Liu XIA, Guang Bo GE a Ling YANG, 2021. Analytical methodologies for sensing catechol-O-methyltransferase activity and their applications. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. **11**(1), 15–27. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2020.03.012
- WANG, Zhen, Zeping XIAO, Sabra S. INSLICHT, Huiqi TONG, Wenhui JIANG, Xiao WANG, Thomas METZLER, Charles R. MARMAR a Sanduo JIANG, 2009. Low expression of catecholamine-O-methyl-transferase gene in obsessive-compulsive disorder. *Journal of Anxiety Disorders* [online]. **23**(5), 660–664. ISSN 08876185. Dostupné z: doi:10.1016/j.janxdis.2009.02.004
- WILLIAMS, Hywel J., Michael J. OWEN a Michael C. O'DONOVAN, 2007. Is COMT a susceptibility gene for schizophrenia? *Schizophrenia Bulletin* [online]. **33**(3), 635–641. ISSN 05867614. Dostupné z: doi:10.1093/schbul/sbm019
- WITTE, A Veronica a Agnes FLÖEL, 2012. Effects of COMT polymorphisms on brain function and behavior in health and disease. *Brain Research Bulletin* [online]. **88**(5), 418–428. ISSN 0361-9230. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainresbull.2011.11.012

ZHANG, Youwen, Shujun FENG, Kun NIE, Xin ZHAO, Rong GAN, Limin WANG, Jiehao ZHAO, Hongmei TANG, Liang GAO, Ruiming ZHU, Lijuan WANG a Yuhu ZHANG, 2016. Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism influences prefrontal executive function in early Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* [online]. **369**, 347–353. ISSN 18785883. Dostupné z: doi:10.1016/j.jns.2016.08.063

7. Seznam zkratek

ADHD	attention deficit hyperactivity disorder (porucha pozornosti s hyperaktivitou)
BMI	body mass index
bp	base pair, pár bází
<i>BRCA</i>	breast cancer gene
C	Cytosin
COMT	catechol-O-methyltransferase
<i>COMT^H</i>	Alela s vyšší aktivitou (high)
<i>COMT^L</i>	Alela s nižší aktivitou (low)
DA	dopamin
E	epinefrin (adrenalin)
MAO	monoaminoxidáza
MB-COMT	membrane bound catechol-O-methyltransferase
Met, M	Methionin
NE	norepinefrin
OCD	obsessive-compulsive disease
SAM	S-adenosylmethionin
S-COMT	soluble catechol-O-methyltransferase
T	Tyrosin
Val, V	Valin
VCFS	velocardiofacial syndrom

8. Seznam obrázků a tabulek

Obr. 1 – Strukturní vzorec dopaminu.

Obr. 2 – Strukturní vzorec adrenalinu.

Obr. 3 – Strukturní vzorec noradrenalinu.

Obr. 4 – Schématické znázornění štěpení sekvencí rozeznávaných NlaIII.

Obr. 5 – Výsledek PCR RFLP u vzorků diagnostikovaných pacientů.

Obr. 6 – Procentuální zastoupení pacientů v porovnání s kontrolní skupinou.

Obr. 7 – Procentuální zastoupení případů sebevražedného chování a kontrol.

Obr. 8 – Data kontrolní populace evropských států.

Tab. 1 – Výčet některých polymorfismů v genu COMT a jejich význam.

Tab. 2 – PCR mastermix, množství jednotlivých reagensů.

Tab. 3 – Použitý PCR profil.

Tab. 4 – Velikosti restrikčních fragmentů odpovídající jednotlivým genotypům.

Tab. 5 – Zastoupení genotypů polymorfismu Val158Met ve skupině pacientů.

Tab. 6 – Zastoupení genotypů v kontrolní skupině zdravých jedinců.

Tab. 7 – Seznam diagnóz a počet pacientů s uvedenou diagnózou.

Tab. 8 – Psychiatrická onemocnění rozdělená do obecnějších skupin.

