

strukturálních variant, jako jsou „copy number“ varianty (CNV) či hybridní alely je možné detekovat pomocí nových technologií, jako je sekvenování nové generace (NGS) (22, 23). Je však nutno doplnit, že zatímco například u genu *CYP2D6* představují tyto strukturální varianty zcela zásadní součást farmakogenetické interpretace, u genu *CYP2C19* je jejich celkový klinický význam a frekvence výskytu v populaci obecně menší (18, 24).

Jednotlivé metody se od sebe výrazně liší nejen pokrytím variant, ale i praktickými parametry relevantními pro klinické nasazení. Přehled klíčových charakteristik je uveden v tabulce 1.

Konvenční metody jako TaqMan a PCR-RFLP jsou v klinické praxi dobře zavedené a pro detekci nejčastějších alel *2 a *17 zcela dostačující. Jejich nevýhodou je však design, kdy je analýza omezena pouze na varianty explicitně zahrnuté v testovacím panelu. Pro standardní klinické testování doporučuje Asociace pro molekulární patologii (AMP) pouze tři varianty *CYP2C19* (20). V nomenklatuře hvězdičkových alel a sub-alel je přitom v databázi PharmVar aktuálně popsáno více než 70 variant *CYP2C19*, z nichž mnohé mají klinicky relevantní funkční dopad, ale konvenčními metodami je detekovat nelze (2). Specifickým problémem konvenčních přístupů je také nemožnost fázování haplotypů (haplotype phasing), tedy přiřazení variant ke konkrétním alelám na každém z homologních chromozomů (2). Zejména u pacientů s více heterozygotními variantami může neznalost fázování vést k chybné diplotypové klasifikaci a následné nesprávné predikci fenotypu (2). Tento problém je obzvláště aktuální u populací s vysokou frekvencí alely *17, kde kombinace *2/*17 (IM) zvyšuje riziko chybné diplotypové klasifikace při absenci fázování haplotypu nebo při nedostatečně širokém testovacím panelu (2, 27).

Technologie NGS, zejména tzv. short-read NGS platformy, tato omezení částečně překonávají díky schopnosti současné detekce velkého počtu variant a CNV v rámci jednoho analytického procesu (25). Nicméně i short-read NGS má své limity v podobě omezené délky čtení (cca 150–300 bp), která neumožňuje přímé fázování vzdálených variant u jedné molekuly DNA (18). Na toto

Tab. 1. Srovnání hlavních metod genotypizace *CYP2C19* v klinické praxi (25, 26)

Metoda	Pokrytí variant	Detekce CNV	Rychlost analýzy	Náklady	Vhodnost pro rutinní praxi
TaqMan / AS-PCR	Nízké (předem definované SNP)	Ne	Rychlá (2–4 h)	Nízké	Vysoká
PCR-RFLP	Nízké (1–2 varianty)	Ne	Střední	Nízké	Střední
SNP array (ADME panel)	Střední (stovky SNP)	Omezená	Střední	Střední	Střední
Krátké NGS	Vysoké	Částečná	Delší (1–2 dny)	Střední–vysoké	Rostoucí
Dlouhé NGS	Velmi vysoké	Ano	Delší	Vysoké	Zatím výzkumná

omezení reaguje rozvíjející se technologie long-read sekvenování (sekvenování dlouhých čtení), reprezentovaná například platformami PacBio HiFi (Single Molecule, Real-Time; SMRT) a Oxford Nanopore Technologies (ONT) (25). Tyto platformy generují čtení v délce tisíců až desítek tisíců bazí, což umožňuje přímé fázování alel, spolehlivou detekci strukturálních variant a identifikaci vzácných i dosud nepopsaných funkčních alel (25). Studie využívající long-read sekvenování pro analýzu CYP genů prokázaly schopnost detekce hybridních alel a nových sub-alel, které by metodami krátkých čtení nebyly zaznamenány (28). Volba konkrétní genotypizační metody by tedy měla reflektovat jak klinický kontext (urgentnost výsledku, dostupnost laboratoře, spektrum testovaných léčiv), tak populační specifika cílové skupiny pacientů. Pro rychlé analýzy postačují point-of-care platformy s TaqMan sondami (29). Pro komplexní preemptivní farmakogenetické testování v rámci personalizované medicíny jsou perspektivní NGS panely pokrývající desítky klinicky relevantních genů (30).

Cílené NGS panely pro farmakogenetické analýzy a sekvenování exomu

Technologie NGS umožňuje simultánní analýzu velkého počtu variant napříč celým genem nebo rozsáhlým panelem farmakogeneticky relevantních genů v rámci jednoho analytického procesu. Specializované farmakogenetické NGS panely typicky pokrývají 50–200 klinicky relevantních genů, včetně *CYP2C19*, při vysokém sekvenačním pokrytí (tj. hloubka čtení udávající, kolikrát je každá nukleotidová pozice nezávisle přečtena), což zajišťuje spolehlivou detekci i minoritních alel a CNV, jako jsou duplikace nebo delece celého genu (31, 32). Pilotní studie Mayo Clinic ukázala, že 99 % z 1013 účastníků neslo alespoň

jednu klinicky relevantní variantu v pěti klíčových farmakogenetických genech včetně *CYP2C19*, přičemž část těchto variant by byla mimo detekční rozsah konvenčních genotypizačních analýz (33).

V současnosti je k dispozici řada komerčních farmakogenetických NGS panelů, které pokrývají geny s nejvyšším klinickým významem podle guidelines CPIC, včetně *CYP2C19*, *CYP2D6* nebo *SLCO1B1* (31). Tyto panely využívají pravidelně aktualizované databáze variant a jejich bioinformatické pipelines jsou koncipovány tak, aby na základě alelových definic PharmVar a mapování CPIC/ClinPhx umožňovaly automatizované přiřazení detekovaných variant k diplotypům a fenotypovým kategoriím (22, 34). Výhodou oproti konvenčním metodám je tedy nejen širší pokrytí variant, ale i standardizovaná interpretace výsledků s přímým klinickým výstupem (22, 34).

Ani cílené NGS panely však nejsou bez limitací. Klíčovým problémem zůstává interpretace variant nejasného klinického významu (variants of uncertain significance, VUS), jejichž funkční dopad na aktivitu enzymu nebyl dosud experimentálně ověřen (35). Výskyt VUS komplikuje klinické rozhodování a vyžaduje konzultaci se specialistou na klinickou farmakogenetiku (35). Dalším omezením je rozsah pokrytí – cílené panely jsou svou definicí omezeny na předem vybrané geny a nemohou zachytit varianty mimo jejich záběr. Toto omezení je zvláště patrné u genů s vysokou strukturální komplexitou, jako je *CYP2D6*, u něž jsou časté rozsáhlé genomové přestavby vyžadující specializované bioinformatické algoritmy (24).

Alternativou překonávající omezení daná předvýběrem genů je sekvenování celého exomu (whole exome sequencing, WES). WES umožňuje simultánní analýzu veškerých kódujících oblastí genomu, čímž v principu zachycuje i varianty ve farmakogeneticky relevantních