

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Významné genetické faktory asociované s výskytem
vybraných psychiatrických diagnóz v české populaci**

Diplomová práce

Bc. Tereza Kutilová

Školitelka: Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D.; Genlabs s.r.o.

České Budějovice 2021

Kutilová, T., 2021: Významné genetické faktory asociované s výskytem vybraných psychiatrických diagnóz v české populaci. [The significant genetic factors associated with the incidence of selected psychiatric diagnoses in the Czech population. Mgr, Thesis, in Czech] – 61 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANNOTATION

This thesis aimed to summarize general knowledge about dementia and its risk factors. In the experimental part was screened the incidence of genotype frequencies of genes *APOE*, *MTHFR*, *COMT* in particular individuals. These genes are associated with dementia and Alzheimer's disease. A further aim was to find a possible association between these genes and dementia's risk factors.

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

V Českých Budějovicích, 14. 4. 2021

.....

Bc. Tereza Kutilová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady a věnovaný čas. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Lucii Zajícové, ředitelce Alzheimercentra a Seniorcentra v Českých Budějovicích, za ochotu, vstřícnost a možnost realizace našeho projektu. Poděkování patří rovněž personálu obou center za spolupráci při odběru biologického materiálu a dohled nad administrativní částí projektu. Velký dík patří samozřejmě všem účastníkům projektu a jejich rodinám za souhlas s účastí. Dále děkuji doc. Mgr. Janu Riegertovi, Ph.D. za odbornou pomoc se statistickou částí práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, která mě podporovala po celou dobu mého studia.

OBSAH

ÚVOD.....	1
1 DEMENCE.....	2
1.1 RIZIKOVÉ FAKTORY.....	2
1.1.1 VĚK.....	3
1.1.2 POZITIVNÍ RODINNÁ ANAMNÉZA.....	3
1.1.3 KOUŘENÍ.....	3
1.1.4 KONZUMACE ALKOHOLU	4
1.1.5 DIABETES MELLITUS 2. TYPU	4
1.1.6 TRAUMATICKÉ POŠKOZENÍ MOZKU.....	5
1.1.7 UŽÍVÁNÍ BENZODIAZEPINŮ	5
1.1.8 HYPERTENZE	6
1.1.9 HYPERCHOLESTEROLÉMIE	6
1.1.10 VZDĚLÁNÍ.....	6
1.2 ROZDĚLENÍ DEMENCÍ.....	7
1.2.1 NEURODEGENERATIVNÍ DEMENCE	8
1.2.1.1 DEMENCE S LEWYHO TĚLÍSKY.....	8
1.2.1.2 PARKINSONOVA CHOROBA	9
1.2.1.3 ALZHEIMEROVA CHOROBA	10
1.2.1.4 FRONTOTEMPORÁLNÍ DEMENCE	12
1.2.2 SYMPTOMATICKÉ DEMENCE	13
1.2.2.1 VASKULÁRNÍ DEMENCE	13
1.2.2.2 OSTATNÍ SYMPTOMATICKÉ DEMENCE	14
2 GENETICKÉ FAKTORY DEMENCÍ.....	14
2.1 APOLIPOPROTEIN E	15
2.2 METHYLENTETRAHYDROFOLÁT REDUKTÁZA	16
2.3 KATECHOL-O-METHYLTRANSFERÁZA	17

3 CÍLE PRÁCE	19
4 METODIKA.....	20
4.1 TESTOVANÝ SOUBOR	20
4.1.1 ODBĚR VZORKŮ A SBĚR DOTAZNÍKOVÝCH DAT.....	20
4.1.1.1 DOTAZNÍK	21
4.2 IZOLACE DNA Z KRVE	21
4.3 MĚŘENÍ KONCENTRACE DNA.....	22
4.4 ANALÝZA GENŮ <i>APOE</i> , <i>COMT</i> a <i>MTHFR</i>	22
4.4.1 PCR RFLP PRO DETEKCI POLYMORFISMŮ GENU <i>MTHFR</i> A <i>COMT</i>	22
4.4.2 PCR ARMS PRO DETEKCI POLYMORFISMŮ GENU <i>APOE</i>	26
5 VÝSLEDKY.....	30
5.1 ZJIŠTĚNÉ VARIANTY V GENU <i>MTHFR</i>	31
5.2 ZJIŠTĚNÉ VARIANTY V GENU <i>APOE</i>	32
5.3 ZJIŠTĚNÉ VARIANTY V GENU <i>COMT</i>	35
5.4 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT	37
5.4.1 VYHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH DAT Z DOTAZNÍKU	37
6 DISKUZE	39
7 ZÁVĚR.....	44
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45
9 INTERNETOVÉ ZDROJE.....	53
10 SEZNAM OBRÁZKŮ	54
11 SEZNAM TABULEK	55
12 SEZNAM PŘÍLOH	55

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-MTHF	5- Methyltetrahydrofolát
(A β)	amyloid beta
AD	Alzheimer's disease
ADHD	Attention deficit hyperactivity disorder
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APOE	apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
ARMS	amplifikační refrakční mutační systém
CMP	cévní mozková příhoda
CNS	centrální nervová soustava
COMT	katechol-O-methyltransferáza
DLB	demence s Lewyho tělísky
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EOAD	early-onset Alzheimer disease (presenilní forma)
FTD	frontotemporální demence
GABA	kyselina γ -aminomáselná
HDL	high-density lipoproteins, lipoproteiny o nízké hustotě
ICHS	ischemická choroba srdeční
LOAD	late-onset Alzheimer disease (senilní forma)
LIČ	laboratorní identifikační číslo

MB-COMT	na membránu vázaná forma enzymu COMT
Met	methionin
MTHFR	methylenetetrahydrofolát reduktáza
NAc	nucleus accumbens
NK	negativní kontrola
PCR	polymerase chain reaction
PD	Parkinsonova choroba
PFC	prefrontální kortex
PK	pozitivní kontrola
PSEN1	presenilin 1
PSEN2	presenilin 2
RFLP	restriction fragment length polymorphism
S-COMT	rozpustná forma COMT
SAM	S-adenosylmethionin
SGA	Studentská grantová agentura
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
TBI	traumatické poškození mozku (z angl. traumatic brain injury)
UV	ultrafialové záření
VAD	vaskulární demence
Val	valin
VLDL	very low density lipoproteins, lipoproteiny o velmi nízké hustotě

ÚVOD

Psychiatrické diagnózy představují velkou skupinu onemocnění postihující především různé funkce mozku. Patří k nim jak onemocnění nezávažná, tak onemocnění představující nebezpečí nejen pro samotného jedince, ale i pro jeho okolí. Dle Mezinárodní klasifikace nemocí se tyto diagnózy rozdělují do několika skupin, z nichž do jedné je řazen také syndrom demence a jeho druhy. Onemocnění demencí představuje globální problém a již se netýká pouze tzv. vyspělých zemí. S prodlužující se délkou života a celkovým stárnutím populace roste výskyt demence celosvětově. V počtu výskytů demence předčila i taková onemocnění jako je *diabetes mellitus* či cévní mozkové příhody. S narůstajícím počtem nemocných ovšem vzrůstají také náklady na péči. Dle dostupných dat z roku 2018 bylo zjištěno, že v České republice žije přibližně 160 tisíc lidí s demencí, přičemž v Evropě se toto číslo blíží 10 milionům. V roce 2050 se v ČR dle odhadů počet lidí s demencí bude blížit k 280 tisícům, a to z důvodu výrazného nárůstu počtu obyvatel nad 70 let.

Přes značný pokrok medicíny zůstává problémem diagnostika demencí a určení správné diagnózy. Samotná diagnóza demence se podceňuje a až v 70 % případů bývá demence odhalena až v pokročilém stádiu, kdy léčba nemá téměř žádné účinky. Udává se, že správně diagnostikováno je v České republice přibližně 20–30 % lidí s demencí, přičemž správné počty lze jen odhadovat.

Cílem této diplomové práce bylo shrnout základní teoretické poznatky o různých typech demencí a jejich možné asociaci s vybranými vnějšími faktory, a především genetickými faktory zastoupenými třemi kandidátními geny *MTHFR*, *APOE* a *COMT*. Rizikové vnější faktory byly testovány na základě zpracování dotazníků pod lékařským dohledem. Jednotlivé genové polymorfismy byly ve studované skupině testovány experimentálně v genetické laboratoři GENLABS.

1 DEMENCE

Demence je syndrom zapříčiněný chronickým onemocněním mozku. Dochází zde k narušení vyšších korových funkcí mozku. Mezi hlavní příznaky patří pokles úrovně paměti, narušení běžných denních aktivit a poruchy kognitivních funkcí, mezi něž patří např. vnímání, schopnost učení, pozornost a řečové schopnosti. Kromě poruchy poznávacích funkcí se u jedinců s demencí vyskytují také behaviorální a psychologické příznaky demence, jako jsou poruchy chování, emocí a spánku. Tyto poruchy nakonec způsobí, že se o sebe postižený jedinec není schopen postarat a je závislý na pomoci druhých (Jiráček *et al.*, 2009; Pidrman, 2007).

Průběh demence lze rozdělit do třech stádií. V prvním stadiu počínající a mírné demence se objevují poruchy především tzv. krátkodobé paměti, kdy jedinec zapomíná, co udělal před chvílí. Oproti tomu si velmi dobře pamatuje, co bylo dříve. V tomto stadiu je jedinec stále soběstačný a pokud je již v této fázi zahájena léčba lze průběh onemocnění zpomalit. Druhé stadium je označováno jako středně pokročilá demence a průměrně trvá 2-10 let. Dochází zde k poruchám soběstačnosti a jedinec vyžaduje již nepřetržitý dohled a pomoc. Třetím stadiem je pokročilá demence, kdy jedinec již není soběstačný a vyžaduje 24hodinovou ošetrovatelskou péči. V této fázi nemoci jsou pacienti většinou upoutáni na lůžko, mají problémy s polykáním, nejsou schopni vyjádřit se a trpí ztrátou osobní identity (Holmerová *et al.*, 2007).

1.1 RIZIKOVÉ FAKTORY

I přes skutečnost, že jsou známy procesy vedoucí ke vzniku demence, není dosud známá příčina onemocnění. Existuje velké množství vnějších rizikových faktorů, které zvyšují riziko rozvinutí demence a způsobují rychlejší průběh. Některé faktory, jako je *diabetes mellitus*, kouření či užívání alkoholu, lze ovlivnit změnou životního stylu. Ovšem určité faktory, kterými je věk nebo genetické faktory ovlivnit nelze (Holmerová *et al.*, 2007; Fenclová *et al.*, 2020).

1.1.1 VĚK

Hlavním rizikovým faktorem demence je věk. Jak bylo zjištěno, ve věkové kategorii nad 65 let se demence vyskytuje s četností 5 %, u jedinců nad 85 let je to již s četností 30-50 %. S prodlužující se délkou života obyvatelstva se demence stává globálním problémem (Jirák, Laňková, 2007).

1.1.2 POZITIVNÍ RODINNÁ ANAMNÉZA

K dalším rizikovým faktorům patří pozitivní rodinná anamnéza, kdy je u přímého příbuzného riziko rozvoje třikrát až čtyřikrát vyšší než u jedinců bez tohoto zatížení. Pokud se demence vyskytne před 60. rokem života je pravděpodobné že se jedná o dědičně podmíněnou chorobu (Holmerová *et al.*, 2007).

1.1.3 KOUŘENÍ

Kouření tabákových produktů poškozuje zdraví v mnoha směrech. Kouření je spojeno se zvýšeným rizikem rozvinutí kardiovaskulárních onemocnění, cerebrovaskulárních onemocnění, vaskulárních onemocnění a má karcinogenní účinky (Pilařová, 2003). Cigaretový kouř je významným zdrojem oxidativního stresu, jelikož obsahuje methan. Oxidativní stres vyvolává zánětlivou reakci, která je podkladem aterosklerózy a neurodegenerativních změn spojených s Alzheimerovou chorobou (AD) (Swan, Lessov-Schlaggar, 2007). Rusanen *et al.* (2011) zjistili, že mozek není odolný vůči škodlivým účinkům kouření. Ve skupině jedinců, kteří byli těžkými kuřáky ve středním věku byla po dvou desetiletích nalezena souvislost s velkým rizikem rozvoje demence a AD (Rusanen *et al.*, 2011).

1.1.4 KONZUMACE ALKOHOLU

Alkohol je považován za rizikový faktor rozvoje demence z několika důvodů. Zvýšená dlouhodobá konzumace alkoholu má škodlivé účinky na mozek a urychluje rozvoj atrofie mozku (Tyas, 2001). Kromě toho ethanol a jeho metabolit acetaldehyd mají neurotoxické účinky, které vedou k poškození funkce a struktury mozku (Kruman *et al.*, 2012).

Studie Anttila *et al.* (2004) zjistila u jedinců, kteří ve středním věku pravidelně konzumovali alkohol, rozvinutí kognitivních poruch v pozdějším věku. Toto riziko bylo větší u jedinců nesoucích alelu E4 genu *APOE* (Anttila *et al.*, 2004). Alkohol také ovlivňuje cholinergní systém a pravidelná konzumace způsobuje degeneraci cholinergních neuronů. Tento systém je důležitý pro mechanismy krátkodobé paměti. Alkohol navíc snižuje hladinu acetylcholinu, která je u AD již přítomna. Acetylcholin je důležitý neurotransmitter uplatňující se v přenosu vzruchů v nervové soustavě (Tyas, 2001).

1.1.5 DIABETES MELLITUS 2. TYPU

Diabetes mellitus 2. typu je metabolické onemocnění způsobené buď relativním nedostatkem inzulínu nebo rezistencí způsobenou nedostatkem receptorů pro inzulín. Inzulín je důležitý hormon zajišťující vstup glukózy do buněk, proto se při diabetu v krvi nachází zvýšené množství glukózy. Dlouhodobě zvýšená hladina glukózy způsobuje poškození a dysfunkci orgánů jako jsou ledviny, srdce, cévy nebo oči. To vede k chronickým komplikacím, mezi něž se například řadí cévní mozková příhoda, infarkt myokardu či náchylnost k infekcím (American diabetes association, 2005). *Diabetes mellitus* 2. typu je považován za rizikový faktor rozvinutí demence z několika důvodů. Chronická hyperglykémie má neurotoxický vliv a v mozkové tkáni narušuje integritu neuronů a způsobuje neurodegeneraci. Navíc působí vznik kyslíkových radikálů a vznik oxidačního stresu, který se podílí na mikrovaskulárním poškození mozku. S rozvojem neurodegenerativních onemocnění je spojena také hyperinzulinémie, neboť zvyšuje riziko cerebrovaskulárních poruch a je spojena se zvýšenou akumulací amyloidu beta ($A\beta$) v mozku (Lee *et al.*, 2018).

1.1.6 TRAUMATICKÉ POŠKOZENÍ MOZKU

Traumatické poranění mozku (TBI) je poranění při němž dojde k poškození mozku a změně jeho funkce. TBI je působeno tupým nebo pronikavým nárazem do hlavy, přičemž míra poškození závisí na mechanismu a rozsahu poranění. Projevuje se například zmatením, změnou úrovně vědomí, kómatem a u mírného TBI mohou být jediným příznakem mírné behaviorální a neuropsychologické změny (Bruns & Hauser, 2003). Úrazy hlavy se ztrátou vědomí jsou spojovány s rizikem rozvoje různých druhů demence (Graham & Sharp, 2019). Bylo zjištěno, že u jedinců s genotypem APOE-E4 u kterých byl navíc traumaticky poškozen mozek je riziko rozvoje Alzheimerovy demence 10x vyšší v porovnání s těmi, kteří tuto rizikovou alelu nenesou (Mayeux *et al.*, 1995). Také byla nalezena souvislost prodělání TBI s větším rizikem rozvinutí Parkinsonovy choroby (Jafari *et al.*, 2013).

1.1.7 UŽÍVÁNÍ BENZODIAZEPINŮ

Benzodiazepiny jsou psychoaktivní léky působící na receptory kyseliny γ -aminomáselné (GABA) a využívají se k léčbě úzkostných poruch, nespavosti či deprese. Tyto léky by měly být užívány pouze po dobu několika týdnů, avšak mnohdy jsou užívány celé roky (Zhong *et al.*, 2015). Benzodiazepiny mohou také způsobovat určité zdravotní komplikace, jako je zhoršení kognitivních a motorických funkcí. Mohou například způsobovat ospalost, zhoršovat koordinaci pohybů či snižovat reakční čas (Johnson & Streltzer, 2013). Vzhledem ke škodlivým účinkům benzodiazepinů na paměť jsou považovány za možný rizikový faktor rozvinutí Alzheimerovy choroby. Billioti de Gage *et al.* (2014) ve své studii zkoumali vliv dlouhodobého užívání benzodiazepinů. Zjistili, že u jedinců užívajících v minulosti dlouhodobě benzodiazepiny se riziko rozvinutí Alzheimerovy choroby zvýšilo přibližně o 50 % (Billioti de Gage *et al.*, 2014).

1.1.8 HYPERTENZE

Významným rizikovým faktorem je také hypertenze, jejíž výskyt se zvyšuje s věkem. Je vážným rizikovým faktorem pro vznik cévní mozkové příhody a ischemické choroby srdeční, neboť má podíl na arteriálním poškození (Zajíc, 2012; Meyer *et al.*, 1988). Dle některých studií zvýšený krevní tlak ve středním věku přispívá k rozvoji demence v pozdním věku (Petrovitch *et al.*, 2000; Skoog *et al.* 1996; Eglit *et al.*, 2020). Vyskytují se i názory, že se vznikem demence má souvislost spíše hypotenze, a to z důvodu že může způsobovat hypoperfuzi mozku a tím snižovat jeho okysličování (Morris *et al.*, 2000). Existují však také studie, které souvislost hypertenze s rozvinutím demence neprokazují (Musicco *et al.* 2009).

1.1.9 HYPERCHOLESTEROLÉMIE

Cholesterol je důležitá molekula mající v těle rozsáhlé využití. V těle reguluje například tvorbu vitamínu D, hormonů či žlučových kyselin. V mozku je součástí neuronů a je důležitý pro jejich správnou funkci (Ghribi, 2008). Cholesterol a jeho metabolity hrají také roli v patofyziologii AD, neboť jeho zvýšená hladina zvyšuje náchylnost k rozvoji AD (Kakio *et al.*, 2001; Notkola *et al.*, 1998). Hypercholesterolemie navíc zvyšuje tvorbu amyloidu beta (A β), který hraje důležitou roli v patofyziologii AD (Refolo *et al.*, 2000). Existují ovšem také studie, které tato tvrzení vyvracejí (Musicco *et al.*, 2009).

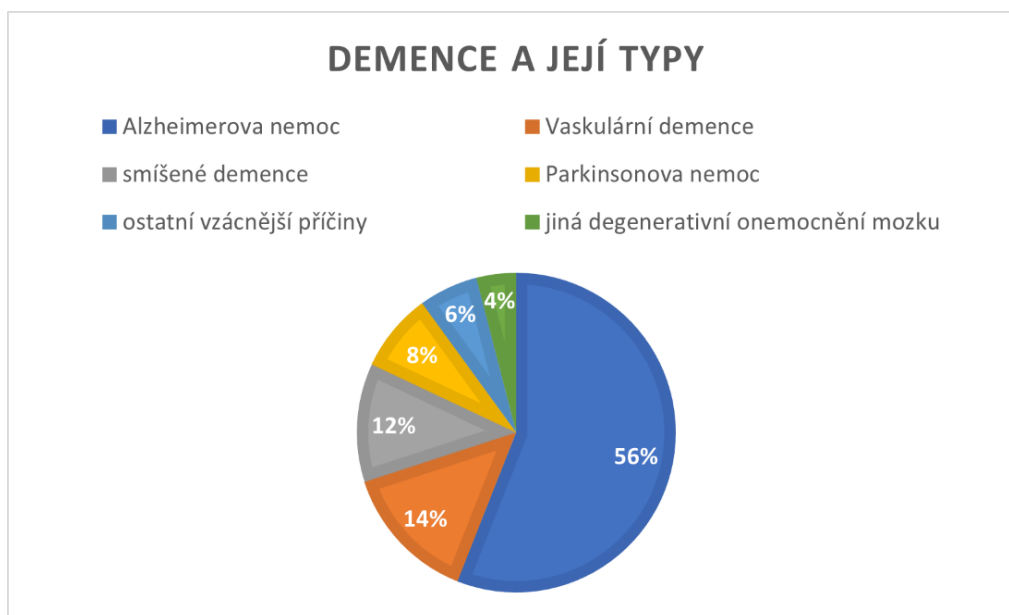
1.1.10 VZDĚLÁNÍ

Dalším rizikovým faktorem je stupeň dosaženého vzdělání. Aspekty jako vzdělání a pracovní zkušenosti zajišťují tzv. kognitivní rezervu vůči klinické manifestaci neuropatologických změn. To znamená, že u jedinců s větší kognitivní rezervou dojde ke klinickým projevům až po zničení většího množství nervových synapsí (Stern *et al.*, 1999). Nižší stupeň vzdělání je spojován s vyšším rizikem rozvoje AD, a to z důvodu, že u těchto osob je nižší kognitivní rezerva, a tudíž jsou vůči patologickým procesům více vnímaví (Musicco *et al.*, 2009).

1.2 ROZDĚLENÍ DEMENCÍ

Demence se nejčastěji dle etiologie dělí na demence neurodegenerativního původu (atroficko-degenerativní) a na demence symptomatické (sekundární), jejichž podkladem jsou celková onemocnění, cévní poruchy, infekce atd. Tyto dvě skupiny jsou poměrně heterogenní a vzájemně se prolínají, proto se u mnoha nemocných s demencí objevují projevy více onemocnění mozku, které označujeme pojmem smíšené demence (Jirák, Laňková, 2007). Dále lze demence dělit podle lokalizace na kortikální, subkortikální a kortikosubkortikální. U kortikální demence bývá postižena především mozková kůra. U demence subkortikální je postižena bílá hmota, thalamus a bazální ganglia. U kortikosubkortikální demence jsou různým stupněm postiženy jak kortikální, tak subkortikální složky (Zvěřová, 2017).

Na obrázku 1 je uvedeno zastoupení nejčastějších typů demence.



Obr. 1: Četnost nejčastějších příčin demence (převzato a upraveno dle: Zpráva o stavu demence 2014 [online]).

1.2.1 NEURODEGENERATIVNÍ DEMENCE

Neurodegenerativní demence tvoří 60 % všech demencí. Hlavní příčinou zde bývá atrofie mozku doprovázená patogenetickými změnami jako je degenerace neuronů či ukládání patologických proteinů. U demence s Lewyho tělísky je to beta-amyloid, stejně tak tomu je u Alzheimerovy choroby, kde dochází navíc k degeneraci tau-proteinu (Jirák *et al.*, 2009).

1.2.1.1 DEMENCE S LEWYHO TĚLÍSKY

Demence s Lewyho tělísky (DLB) patří mezi neurodegenerativní demence, nacházející se na rozhraní Alzheimerovy (AD) a Parkinsonovy choroby (PD). Jelikož jsou některé příznaky stejné či velmi podobné PD a AD je obtížné tyto nemoci odlišit. Z toho důvodu je během života diagnostikována pouze u 4 % pacientů trpících DLB, přičemž je její prevalence odhadována kolem 10-20 % ze všech demencí. Čistá demence s Lewyho tělísky se vyskytuje sporadicky, až v 90 % případů se objevují i neuritické plaky a neuronální klubka, jako je tomu u AD (Rektorová, 2009; Konrád, 2004; Holmerová *et al.*, 2007).

Od ostatních demencí se liší DLB především počáteční rychlostí progresu demence, která se může později na nějaký čas stabilizovat, a dále pokračovat rozvojem demence ve vyšším věku. Existuje pravidlo, že pokud se demence rozvine do jednoho roku od objevení parkinsonského syndromu jedná se o DLB. Pokud se ale demence rozvine až po pár letech od objevení syndromu jde o Parkinsonovu nemoc (Rektorová, 2009; Konrád, 2004; Holmerová *et al.*, 2007).

Mezi hlavní symptomy patří zrakové halucinace, rozvíjející se demence, fluktuující poruchy kognitivních funkcí, a parkinsonský syndrom. Parkinsonský syndrom se vyskytuje u 65–70 % a zahrnuje příznaky jako třes, pomalá chůze, ztuhlost. Neuropatologicky je zde zaznamenáno postižení struktur mozkového kmene v oblasti *substantia nigra*, kde dochází k úbytku neuronů produkujících dopamin, jako je tomu u Parkinsonovy nemoci. K tomu je zde zaznamenán výskyt Lewyho tělísek v korových mozkových oblastech, a to konkrétně v limbickém kortexu a neokortikálně. Lewyho tělíška jsou útvary v neuronech tvořené proteinem alfa-synukleinem. Navíc se v mozku nachází senilní plaky jako je tomu u AD a dochází k úbytku cholinergních neuronů v mozkovém kmene (Outeiro *et al.*, 2019; Konrád, 2004; Rektorová, 2005).

1.2.1.2 PARKINSONOVA CHOROBA

Parkinsonova choroba je progresivní neurodegenerativní onemocnění postihující přibližně 2-3 % populace nad 65 let, přičemž riziko vzniku roste s věkem. Neuropatologicky nemoc probíhá tak, že v oblasti mozku zvané *substantia nigra* dochází ke ztrátě neuronů, které za normálních okolností produkují neurotransmitter dopamin. Tyto ztráty způsobují snížení hladiny dopaminu a nedostatek tohoto nervového přenašeče se projeví ztrátou regulace bazálních ganglií (Williams-Gray *et al.*, 2008; Bonifácio *et al.*, 2007; Poewe *et al.*, 2017). Zpočátku se díky kompenzačním mechanismům, jako je zvýšené uvolňování dopaminu z ostatních neuronů, příznaky neprojevují a nemoc probíhá plíživě. Teprve při poklesu hladiny dopaminu pod 60 % se začnou příznaky objevovat zřetelněji. Nejprve se začnou projevovat somatické příznaky jako bolest svalů a kloubů. Po čase se objeví motorické příznaky, jako bradykineze, rigidita, klidový třes a v neposlední řadě posturální poruchy (poruchy držení těla a rovnováhy) (Poewe *et al.*, 2017; Růžička, 2006; Rektorová, 2005; Aarsland *et al.*, 2003).

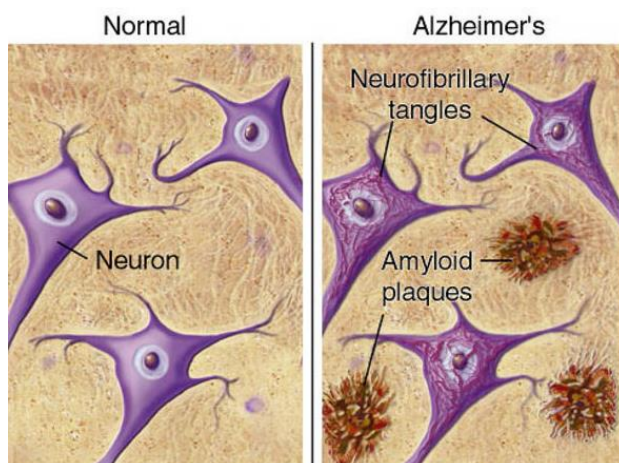
Bradykineze a rigidita způsobují typickou pomalou chůzi s malými krůčky. Mezi další projevy PD patří vegetativní poruchy a psychické poruchy mezi něž se řadí deprese. Deprese často bývá často jedním z prvních příznaků a prodělá ji přibližně 50 % pacientů s PD. Poruchy kognitivních funkcí mohou přejít až v demenci, a to výrazně snižuje kvalitu a délku života pacienta. Prevalence rozvinutí demence je 20-40 %, avšak po 10 letech od rozvinutí PD je to již 75 % (Aarsland *et al.*, 2003; Poewe *et al.*, 2017; Růžička, 2006; Rektorová, 2005). Jako možný rizikový faktor rozvinutí PD je považován gen COMT (catechol-O-methyltransferáza), neboť kóduje enzym podílející se na degradaci dopaminu. Jeho polymorfismus Val158Met ovlivňuje aktivitu enzymu COMT a tím určuje hladinu dopaminu v těle (Williams-Gray *et al.*, 2008).

1.2.1.3 ALZHEIMEROVA CHOROBA

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění postihující přibližně 5 % populace nad 65 let. V populaci nad 85 let představuje 50-70 % všech případů demence. Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou demence a také čtvrtou až pátou nejčastější příčinou smrti. Nemoc trvá přibližně v rozmezí 2-12 let a má tři stádia od mírného přes střední až po těžké stádium (Zvěřová, 2017; Rektorová, 2009; Pidrman, 2007).

AD má specifický neuropatologický obraz. Je charakterizována degenerací a úbytkem neuronů, hromaděním proteinu amyloidu beta ($A\beta$) v mozkové tkáni ve formě senilních plaků a tvorbou neurofibrilárních klubek skládajících se z hyperfosforylovaného tau-proteinu (Zvěřová, 2017, Bertram *et al.*, 2010). Senilní plaky se vyskytují v mozkové kůře, podkorových jádrech a v mozečku a jejich jádro je tvořeno proteinem zvaným amyloid beta. $A\beta$ je důležitý degenerativní protein vznikající z amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který se v těle fyziologicky vyskytuje v buněčných membránách a je nezbytný pro správnou funkci organismu. APP je za normálních podmínek štěpen alfa-sekretázou na krátké fragmenty, které jsou rozpustné a chrání nervové buňky před poškozením. Při patologických podmínkách je APP štěpen pomocí beta-sekretázy či gama-sekretázy za vzniku nerozpustných dlouhých fragmentů. Tyto fragmenty se spojují v neurotoxické oligomery či fibrily a jejich srážením vzniká beta-amyloid (Farlow & Foroud, 2013; Zvěřová, 2017; Rektorová, 2009).

Okolo jader tvořených polymerovaným $A\beta$ dochází k degeneraci neuronů a vzniku zánětlivé reakce spojené s uvolněním reaktantů akutní fáze, které nakonec způsobí apoptózu neuronu. Samotný amyloid beta způsobuje svou toxicitou poškození tau-proteinu. Tau-protein se vyskytuje nejen v neuronech, ale nachází se ve všech jaderných buňkách. Jeho funkcí je vázat se na mikrotubuly a zajišťovat jejich polymeraci. Pokud dojde k určitým změnám ve struktuře tau-proteinu mohou být narušeny mikrotubulární funkce, což zpomaluje axonální přenos vede k demenci. Za určitých nepříznivých podmínek se z tau-proteinu odštěpují postranní aminokyseliny, což vede k jeho hyperfosforylaci. Takto změněný tau-protein tvoří vlákna, jež jsou podkladem tzv. neurofibrilárních klubek, která narušují strukturu neuronů a způsobují jejich zánik (Zvěřová, 2017; Jiráček *et al.*, 2009).



Obr.2: Znázornění amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek u Alzheimerovy choroby a srovnání se zdravými neurony (převzato a upraveno dle Amyloid Plaques and Neurofibrillary Tangles [online]).

Při Alzheimerově nemoci je také postižen centrální acetylcholinergní systém, který je důležitý pro kognitivní funkce. Produkce acetylcholinu je narušena z důvodu nízké hladiny enzymu cholinacetyltransferázy, která acetylcholin syntetizuje. Acetylcholin zajišťuje nervosvalový přenos, a tudíž je důležitý pro funkci kosterních svalů. Později jsou zasaženy i neurotransmitterové systémy jako například GABA, glutamatergní, katecholaminový (noradrenalin) a další (Jiráček, 2004; Zvěřová, 2017; Jiráček *et al.*, 2009).

AD je způsobená pravděpodobně genetickými i environmentálními faktory. Mezi nejznámější rizikové faktory rozvinutí AD patří především věk. Alzheimerovu chorobu lze dělit dle počátku onemocnění na tzv. presenilní formu (EOAD) vyskytující se u lidí před 65. rokem života a na senilní formu (LOAD) vyskytující se u lidí po 65. roce života. Toto rozdělení ovšem nemá pro klinickou praxi nijak zásadní význam, neboť neuropatologicky jsou tyto dvě formy totožné. Presenilní forma se vyskytuje sporadicky a je často podmíněna dědičně. Mezi hlavní tři rizikové geny související s EOAD patří APP, presenilin 1 (PSEN1) a presenilin 2 (PSEN2) (Jiráček *et al.*, 2009; Farlow & Foroud).

Za jeden z nejvýznamnějších vrozených rizikových faktorů senilní formy AD je považován gen apolipoprotein E (*APOE*), který se vyskytuje ve třech alelách E2, E3, E4, přičemž alela E4 je spojována se zvýšeným rizikem rozvinutí Alzheimerovy choroby (Rawle *et al.*, 2018; Farlow & Foroud, 2013; Jiráček *et al.*, 2009).

AD má specifický obraz a je pro ni typický plíživý a nenápadný začátek, a proto nebývá snadné odlišit ji od klinicky normálního stárnutí. Prvními příznaky bývá ztráta krátkodobé a epizodické paměti, kdy si jedinec nevzpomíná na události proběhlé před krátkou dobou. Onemocnění je rozdělováno do 3 stádií. Mírné stádium zahrnuje poruchy kognitivních funkcí, kdy zapomínání je již patrné a objevují se emoční změny a deprese. Dále se vyskytuje narušená orientace v prostoru, nesoustředěnost, porucha logického uvažování. Ve středním stádiu dochází k výraznému zhoršení paměti ve všech složkách a rychlému zhoršení poruch aktivit běžného života, kam se řadí domácí práce či hospodaření s penězi. Jsou narušeny korové funkce, časová i prostorová orientace a objevují se afázie (problémy s vyjadřováním), apraxie (ztráta schopnosti vykonávat koordinované pohyby) a agnózie (selhání rozpoznávacích funkcí). Dochází k postupnému zhoršení intelektových funkcí a jedinci často již přestávají zvládat péči o sebe sama. V těžkém stádiu se vyskytuje úplná ztráta paměti a nemocní nerozpoznávají blízké osoby a jsou zcela závislí na okolní péči. V tomto stádiu se u nemocných vyskytují poruchy chůze a pohybu. Poměrně častá je v tomto stádiu nemoci tzv. amnestická dezorientace, kdy si nemocný nic nepamatuje a neví kde se nachází. AD je v současné době nevyлéčitelné onemocnění, nemocní umírají většinou na plicní choroby, jako je bronchopneumonie či úrazy způsobené pády (Koukolík, Jirák, 1998; Zvěřová, 2017; Jirák *et al.*,2009; Pidrman, 2007).

1.2.1.4 FRONTOTEMPORÁLNÍ DEMENCE

Frontotemporální demence (FTD) nebo také frontotemporaln lobární degenerace představuje 10 % všech demencí a je třetí nejčastější demencí neurodegenerativního původu. Dochází při ní k progresivní degeneraci frontálních a temporálních laloků mozku. Ve srovnání s AD je zde rychlejší progrese zhoršení kognitivních funkcí a nemocní přežívají kratší dobu. Začátek nemoci bývá kolem 45. a 65. roku a trvá průměrně 8 let. Přesná příčina není zcela známá, ale díky k častému familiárnímu výskytu, který je kolem 20-40 % se předpokládá genetický vliv. Mezi kandidátní geny patří tau gen či PSEN1. Existují tři hlavní formy FTD: behaviorálně-dysexekutivní (frontální) varianta, primární progresivní afázie a sémantická demence. Tyto formy se ovšem často v průběhu onemocnění vzájemně prolínají (Rektorová, 2009; Pidrman, 2007; Jirák *et al.*,2009).

Demence frontálního typu představuje 70 % všech FTD a jsou u ní charakteristické brzké změny osobnostních rysů a chování a neschopnost chování regulovat. Při této formě jsou postiženy čelní oblasti mozku. Při sémantické demenci jsou změny lokalizovány v předních částech spánkových laloků. Hlavními příznaky zahrnují těžkou poruchu porozumění mluvenému slovu, neschopnost identifikovat význam a obsah zrakových podnětů. Řečový projev je plynulý a gramaticky korektní, avšak obsahově prázdný. Primární progresivní afázie je charakteristická postižením řeči, kdy nemocný má problém nalézt správné slovo, jeho řeč není plynulá, dělá mu obtíže, a nakonec dochází k její úplné ztrátě. Při tomto typu FTD je postižen dominantní čelní a spánkový lalok. FTD bývá kvůli široké škále příznaků často chybně diagnostikována a zaměňována za vaskulární demenci či demenci při Alzheimerově chorobě (Rektorová, 2009; Pidrman, 2007; Jiráček *et al.*, 2009).

1.2.2 SYMPTOMATICKÉ DEMENCE

Tato nesourodá skupina demencí má mnoho příčin vzniku. Patří sem celá řada demencí, které vznikají na podkladě jiné nemoci, kterou může být například zánět CNS, HIV, syfilis či Creutzfeldt-Jakobova nemoc. Demence v této skupině lze rozdělit na demence vaskulární a ostatní symptomatické demence (Jiráček *et al.*, 2009).

1.2.2.1 VASKULÁRNÍ DEMENCE

Vaskulární demence (VAD) představuje 20 % všech demencí a je druhou nejčastější příčinou demence. Je způsobena poruchami cévního zásobení mozku. Některé cévní změny mohou být vrozené (cévní výdutě) jiné získané. Rizikem pro vznik VAD jsou cévní onemocnění, mezi něž se řadí ateroskleróza, hypertenze, ischemická choroba srdeční (ICHS) a především proděláním cévní mozkové příhody (CMP). Přibližně u 14–31 % pacientů s CMP se do třech měsíců od jejího proděláním objevují příznaky VAD. Toto riziko narůstá se současnou přítomností rizikových faktorů jako je hypertenze, *diabetes mellitus* či onemocnění srdce. (Pidrman, 2007; Jiráček *et al.*, 2009).

Klinický obraz je různorodý, jelikož se jedná o celou skupinu onemocnění. Poruchy kognitivních funkcí bývají nerovnoměrné a objevují se náhle. Nemocní bývají zmatení, zpomalení a mohou se u nich vyskytovat depresivní nálady. Postupně se příznaky mění a jsou typické delirantní stavy. Celkem dlouho bývá zachován úsudek, nadhled a osobnost (Jirák *et al.*, 2009; Holmerová *et al.*, 2007; Pidrman, 2007).

Vaskulární demence lze dle příčiny rozdělit do 3 skupin: vaskulární demence s náhlým začátkem, multiinfarktová demence, subkortikální ischemická leukoencefalopatie. Vaskulární demence s náhlým začátkem vzniká po proděláním rozsáhlých mozkových infarktů, které postihnou oblasti mozku důležité pro paměť. Multiinfarktová demence vzniká na podkladě infarktů v kůře a podkorových oblastech. Třetí skupinou je subkortikální ischemická leukoencefalopatie neboli Binswangerova choroba, kde dochází k poškození bílé hmoty mozku a vyskytuje se převážně u lidí s hypertenzí (Jirák *et al.*, 2009; Holmerová *et al.*, 2007; Pidrman, 2007).

1.2.2.2 OSTATNÍ SYMPTOMATICKÉ DEMENCE

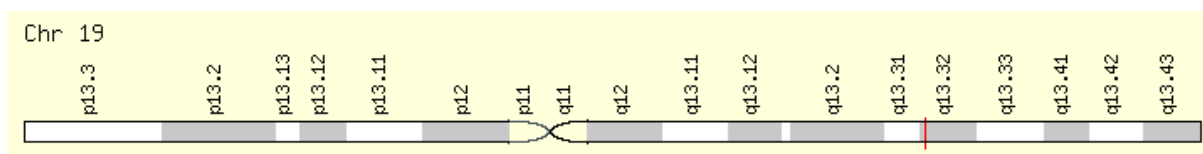
Tato skupina demencí je poměrně nesourodá, neboť se sem řadí demence vznikající z různých příčin. Jedná se o demence vzniklé v souvislosti s infekcemi (např. syfilis, AIDS), s prionovými onemocněními (např. Creutzfeldtova-Jakobova nemoc, kuru) či v souvislosti s intoxikacemi (např. způsobené alkoholem, drogami či otravou oxidem uhelnatým). Dále se do této skupiny řadí posttraumatické demence, metabolické demence, demence při hydrocefalu, demence farmakogenního původu a spousta dalších (Jirák *et al.*, 2009; Pidrman, 2007).

2 GENETICKÉ FAKTORY DEMENCÍ

Rozvoj demence je kromě faktorů vnějšího prostředí ovlivněn také faktory genetickými. Pro Alzheimerovu chorobu existuje kolem 700 kandidátních genů, mezi kterými se kromě jediného prokázaného rizikového genu *APOE* nachází i geny *COMT* a *MTHFR*, jejichž souvislost s rozvojem demence není zatím zcela prokázaná. Existují však důvody, díky nimž jsou považovány za možné kandidáty v etiopatogenezi Alzheimerovy choroby.

2.1 APOLIPOPROTEIN E

Apolipoprotein E (APOE) je 299 aminokyselin dlouhý protein řadící se mezi lipoproteiny. Enzym APOE je exprimován buňkami v různých částech těla, ale primárně v játrech hepatocyty a v CNS kde je exprimován převážně astrocyty a mikroglie. V mozku ovlivňuje růst dendritů, reparaci neuronů, synaptickou plasticitu a zachovává strukturální integritu mikrotubulu uvnitř neuronu (Nathoo *et al.*, 2003; Zende *et al.*, 2013; Kálmán *et al.*, 1997). Je důležitou součástí VLDL (very low density lipoproteins), HDL (high-density lipoproteins) a chylomikronů. Účastní se transportu cholesterolu a lipidů, neboť pomáhá vychytávat cholesterol z krve a transportuje ho do jater, kde je následně metabolizován (Abondio *et al.*, 2019).



Obr. 3: Umístění genu APOE na chromozomu 19 (převzato z APOE Gene, [online]).

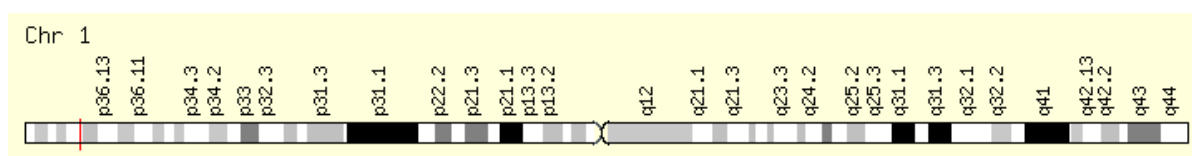
Gen pro *APOE* se nachází na 19. chromozomu na pozici q13.2 a obsahuje 4 exony a tři introny. Vyskytuje se ve třech kodominantních alelách E2, E3, E4 kódujících odpovídající izoformy proteinu E2, E3 a E4, které se liší záměnou aminokyselin argininu a cysteinu na pozicích 112 a 158. Alela E3 má na pozici 112 cystein a na pozici 158 arginin. Alela E4 obsahuje v obou pozicích arginin a alela E2 má v obou pozicích cystein (Sun *et al.*, 2015). I přes záměnu pouze jedné či dvou aminokyselin se izoformy liší jak svou funkcí, tak strukturou (Sun *et al.*, 2015). Existuje šest různých genotypů *APOE*: tři homozygotní (E2/E2, E3/E3, E4/E4) a tři heterozygotní (E2/E3, E2/E4, E3/E4). Isoforma E3 se v populaci vyskytuje nejčastěji, a to s frekvencí 78 %. Druhou nejčastěji zastoupenou je izoforma E4 s frekvencí 15 % a u 7 % populace se vyskytuje izoforma E2 (Nathoo *et al.*, 2003).

Izoforma E2 má cholesterol snižující účinky a je považována za protektivní alelu ve vztahu k Alzheimerově chorobě, neboť snižuje riziko jejího vzniku až o čtvrtinu. Oproti tomu alela E4 je považována za hlavní rizikový faktor rozvinutí AD. Riziko rozvinutí pozdní formy AD je u heterozygotů pro ApoEε4 4x vyšší než u lidí, kteří tuto alelu nemají. U homozygotů ApoEε4 je toto riziko dokonce až 15x vyšší. U nosičů obou alel E4 dojde k dřívějšímu nástupu nemoci, než je tomu u nositelů jedné alely E4 či žádné (Farlow & Foroud, 2013; Koukolík a Jiráček, 1998).

2.2 METHYLENTETRAHYDROFOLÁT REDUKTÁZA

Enzym methylenetetrahydrofolát reduktáza (MTHFR) je 656 aminokyselin dlouhý protein s enzymatickými vlastnostmi. Skládá se z N-terminální katalytické domény, která se váže na NAD, NADPH a 5,10-methylen-THF a C-terminální regulační domény vázající se na inhibitor S-adenosylmethionin (SAM). Enzym MTHFR katalyzuje redukci 5,10-Methylenetetrahydrofolátu na 5-Methyltetrahydrofolát (5-MTHF), který je v lidském těle hlavní formou folátů. Folát je přirozenou aktivní formou kyseliny listové vyskytující se v lidském těle a je nezbytný pro remethylaci homocysteinu na methionin. Methionin je důležitou aminokyselinou, jejíž využití v těle je především v syntéze bílkovinných struktur a DNA (Wan *et al.*, 2018; Froese *et al.*, 2016; Stránský, 2011; Hyánek *et al.*, 2017).

Lidský gen pro *MTHFR* se nachází na chromozomu 1 na krátkém raménku v pozici 36.3. Gen se skládá z 12 exonů z nichž první je nekódující. Bylo zjištěno, že gen *MTHFR* obsahuje 14 běžných či vzácných jednonukleotidových polymorfismů (SNP), které souvisí s enzymatickým nedostatkem (Wan *et al.*, 2018; Rai, 2017).



Obr. 4: Umístění genu *MTHFR* na chromozomu 1 (převzato z *MTHFR Gene*, [online]).

Mezi nejznámější se řadí polymorfismy C677T a A1298C. Polymorfismus C677T způsobuje na pozici 677 nukleotidového řetězce záměnu cytosinu na thymin, což má za následek substituci alaninu za valin v peptidickém řetězci. Pro tento polymorfismus existují tři možné genotypy a to CC, CT a TT, přičemž alela T způsobuje termolabilitu enzymu a jeho sníženou funkci. Navíc inhibuje tvorbu 5-methyltetrahydrofolátu, jenž funguje během remethylace homocysteinu na methionin jako donor methylu. Z toho důvodu se u homozygotů TT vyskytuje vyšší hladina homocysteinu v krvi než u ostatních dvou genotypů (McIlroy *et al.*, 2002; Wan *et al.*, 2018). Zvýšené množství homocysteinu v krvi zvyšuje oxidační stres, vytváří volné kyslíkové radikály, zvyšuje tvorbu A β a podporuje neuronální expresi tau-proteinu a APP (Rai, 2017). Díky tomu je považováno za rizikový faktor pro rozvinutí demence a tato souvislost byla nalezena v několika průřezových studiích provedených v minulých letech (Clarke *et al.*, 1998; McCaddon *et al.*, 1998; Seshadri&Shea, 2006; Smith, 2008).

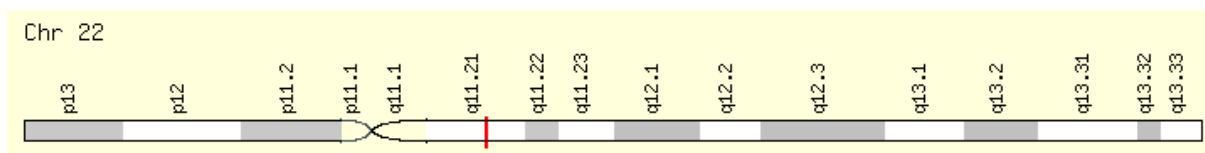
U polymorfismu A1298C dochází k záměně adenosinu za cytosin na pozici 1298 a to způsobuje nahrazení glutamátu za alanin. Tyto dva polymorfismy jsou snižují aktivitu enzymu MTHFR v různých stupních (Wan *et al.*, 2018).

Díky tomu, že kóduje enzym ovlivňující metabolismus homocysteinu je *MTHFR* považován za kandidátní gen v etiopatogenezi AD. V Evropské populaci se vyskytuje 12 % homozygotů TT, 43 % heterozygotů CT a 45 % homozygotů CC pro tento polymorfismus (Prinz-Langenohl *et al.*, 2009).

2.3 KATECHOL-O-METHYLTRANSFERÁZA

Enzym katechol-O-methyltransferáza (COMT) je enzym, katalyzující přenos methylové skupiny z S-Adenosyl-methioninu (SAM) na hydroxylovou skupinu katecholaminů. Tím dochází k inaktivaci katecholových neurotransmiterů dopaminu, norepinefrinu a epinefrinu a katecholových xenobiotik a hormonů. (Pereira *et al.*, 2012). V těle se v periferních tkáních nachází rozpustná forma enzymu (S-COMT) a v mozku na membránu vázaná forma enzymu (MB-COMT). COMT je exprimován v celém těle, ale jeho největší aktivita je v prefrontálním kortexu (PFC), což je místo v mozku spojené s emocemi, osobností a abstraktním myšlením, které pro svou správnou funkci vyžaduje signalizaci pomocí neurotransmiterů, jako je dopamin. Právě hladina dopaminu je řízena pomocí COMT (Pereira *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2004).

Gen *COMT* se nachází v pozici 11.2 na dlouhém raménku chromozomu 22 a obsahuje šest exonů. Nejznámějším polymorfismem je jednonukleotidový polymorfismus Val158Met. Na exonu 4 dochází k substituci guaninu za adenin, a to vede k záměně aminokyselin valinu (Val) za methionin (Met) na pozici 158. V rámci tohoto polymorfismu existují tři možné genotypy a to Val/Val, Val/Met a Met/Met. Tyto polymorfismy se liší aktivitou genu *COMT*. U homozygotů Met/Met je aktivita genu přibližně čtyřikrát nižší než u homozygotů Val/Val, a to má za následek nižší termostabilitu i aktivitu enzymu *COMT* a tím i pomalejší rozpad dopaminu a jeho zvýšenou hladinu v PFC (Malhotra *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004; Rostami *et al.*, 2017).



Obr. 5: Umístění genu *COMT* na chromozomu 22 (převzato *COMT Gene* [online]).

COMT je díky svému působení v PFC spojován s mnoha psychickými problémy, kterými jsou především schizofrenie, ADHD, Parkinsonova choroba či Alzheimerova choroba. Dále je často spojován se závislostmi z důvodu jeho klíčové role v degradaci dopaminu, neboť návykové látky zvyšují dopaminergní přenos v mozku. Závislost se rozvíjí na podkladě dopaminové dráhy odměny. Tato dráha vede z dopaminových neuronů středního mozku přes oblast zvanou *nucleus accumbens* (NAc) do PFC, a právě návykové látky stimulují uvolňování dopaminu. Dopamin způsobuje navození příjemných pocitů a běžně je nazýván hormonem štěstí, proto tato dráha hraje zásadní roli v systému potěšení a odměn (Pilařová, 2003). Závislost na alkoholu je dle vědeckých studií spojena s přítomností alely Met genu *COMT*. Tato teorie je založena na podkladě dopaminergního odměňování, neboť ethanol stimuluje aktivitu neuronů uvolňujících dopamin a zvyšuje tak přenos dopaminergního signálu v NAc oblasti. Bylo zjištěno, že dokonce i nízké dávky alkoholu tyto děje v NAc podněcují. Homozygotní jedinci pro alelu Met se sníženou enzymatickou aktivitou *COMT* vnímají alkohol příjemněji oproti ostatním jedincům a snadněji u nich vznikne závislost (Bilder *et al.*, 2004; Bowirrat & Oscar-Berman, 2005; Di Chiara, 1997; Kauhanen *et al.*, 2000).

3 CÍLE PRÁCE

- 1) Vypracování rešerše zabývající se syndromem demence, vnějšími rizikovými faktory a s demencí asociovanými polymorfismy genů *COMT*, *MTHFR* a *APOE*.
- 2) Vytvoření dotazníku pro zjištění bližších informací o testovaném souboru.
- 3) Sběr biologického materiálu pro genetické zpracování experimentální části.
- 4) Vyšetření výskytu genotypových frekvencí pro geny *APOE*, *MTHFR* a *COMT* u testovaných jedinců pomocí metod molekulární biologie.
- 5) Statistické zhodnocení všech získaných dat.

4 METODIKA

4.1 TESTOVANÝ SOUBOR

Výzkum probíhal v genetické laboratoři GENLABS pod vedením Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. a byl finančně podpořen Studentskou grantovou agenturou (SGA) PřF JU. Vybrané vzorky byly získány ve spolupráci s Alzheimercentrem a Seniorcentrem v Českých Budějovicích. Pro výzkum bylo plánováno vybrat 50-100 jedinců s Alzheimerovou demencí a 50-100 jedinců bez diagnózy demence, kteří měli sloužit jako kontrolní skupina. Získávání vzorků probíhalo po částech v průběhu 6 měsíců a celkem se nám podařilo z obou center získat 55 vzorků pacientů s Alzheimerovou chorobou a s různými formami demence. Všichni účastníci byli seznámeni s účelem tohoto výzkumu, tudíž podepsali informovaný souhlas a vyplnili námi připravený dotazník (viz příloha č. 1, příloha č. 2). Z dotazníku jsme následně zjistili, že většina jedinců z kontrolní skupiny uvedla, že trpí nějakou (většinou odlišnou) formou demence, anebo ve čtyřech případech dokonce Alzheimerovou chorobou, která se u nich ale rozvinula až během pobytu v příslušném zařízení. Proto jsme se rozhodli rozdělit tyto pacienty na dvě skupiny, kde jednu skupinu tvořili pouze pacienti s Alzheimerovou chorobou a druhou skupinu pacienti s různými formami demence. Jako kontrolní skupinu jsme zvolili pacienty bez diagnózy demence ze Senior centra a pacienty starší 64 let, kteří byli v minulých letech vyšetřováni v genetické laboratoři GENLABS, nemají diagnózu demence a souhlasili s využitím výsledků k dalším výzkumným účelům. U těchto jedinců nebyl vyplněn dotazník z důvodu pozdějšího doplnění kontrolní skupiny. Všichni účastníci výzkumu poskytli vzorek periferní krve.

4.1.1 ODBĚR VZORKŮ A SBĚR DOTAZNÍKOVÝCH DAT

Vzorky periferní krve byly odebírány postupně u všech 55 dobrovolníků přímo zdravotnickým personálem Alzheimercentra a Seniorcentra v Českých Budějovicích, současně byly s klienty obou center vyplněny pod dohledem personálu informované souhlasy s genetickým vyšetřením a také dotazníky reflektující vnější rizikové faktory pro rozvinutí demence. Následně byly vzorky periferní krve spolu s dotazníky převezeny do laboratoře GENLABS a zpracovány tak, aby nedošlo k znehodnocení nebo zneužití.

4.1.1.1 DOTAZNÍK

Pro získání informací ohledně zdravotního stavu testovaných osob byl vytvořen dotazník. Tento dotazník obsahoval 17 otázek, pomocí nichž jsme se snažili získat přehled o předchozím životním stylu dotazovaných. Dotazník byl vytvořen na základě znalostí možných rizikových a protektivních faktorů rozvinutí demence. V dotazníku byly uvedeny otázky ohledně diagnózy jednotlivých pacientů díky čemuž bylo možné je rozřadit do třech skupin. Dále bylo možné z dotazníku získat informace ohledně vzdělání, užívání návykových látek či léků a zda jedinec trpí i nějakými dalšími nemocemi. Získaná data byla následně statisticky vyhodnocena. Dotazník je uveden v příloze č. 2.

4.2 IZOLACE DNA Z KRVE

Genomická DNA byla izolována z periferní krve pomocí komerčního izolačního kitu GenneAll® Exgene™Clinic SV mini. Použité reagensie a jejich objem jsou uvedené v tabulce I. Pro každý vzorek byly připraveny 1,5 ml mikrozkušavky, které se řádně popsaly konkrétním laboratorním identifikačním číslem (LIČ), které je specifické pro každého pacienta a dále se postupovalo dle protokolu od výrobce. Pouze v posledním kroku došlo k pozměnění postupu, kdy se přidalo pouze 50 µl AE pufru a inkubovalo se namísto 1 minuty po dobu 5 minut při pokojové teplotě, poté následovala centrifugace. Následně se získaný objem ze zkumavky napipetoval znovu na kolonku, inkubovalo se opět 5 minut a poté proběhla centrifugace. Kolonky se poté odstranily, změřila se koncentrace DNA. Izolovaná označená DNA se uložila do mrazicího boxu, kde byla skladována při -20 °C.

Tab. I: Reagensie izolačního kitu GenneAll® Exgene™Clinic SV mini použité pro izolaci DNA z 200µl plné krve.

Reagensie	Objem 1 reakce (µl)
Proteináza K	40
BL pufr	200
100 % ethanol	400
BW pufr	600
TW pufr	700
AE pufr	50

4.3 MĚŘENÍ KONCENTRACE DNA

U všech vzorků vyizolované DNA byla změřena koncentrace izolované DNA pomocí fluorometru Quibit® 2.0 (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific). K měření koncentrace byl použit kit AccuGreen Broad Range dsDNA Quantitation Kit. Všechny vzorky poskytly dostatek materiálu pro níže uvedené genetické testy.

4.4 ANALÝZA GENŮ *APOE*, *COMT* a *MTHFR*

4.4.1 PCR RFLP PRO DETEKCI POLYMORFISMŮ GENU *MTHFR* A *COMT*

RFLP PCR (restriction fragment length polymorphism) je metoda skládající se z několika kroků. Nejprve dojde k amplifikaci úseku DNA, který je ohraničen dvěma specifickými primery, pomocí PCR. Přítomnost PCR produktu je zkontrolována pomocí elektroforézy. Poté je amplifikovaný úsek štěpen restrikcí endonukleázami a naštípané fragmenty jsou opět vizualizovány elektroforeticky. Rozdíly ve variabilitě genu jsou detekovatelné díky tvorbě různě dlouhých fragmentů. Pro PCR amplifikaci byly použity specifické primery, jejichž sekvence byly převzaty z prací Tahara *et al.* (2009) a Frosst *et al.* (1995) a jsou uvedeny v tabulce II. Optimalizace reakce nebyla nutná.

Tab. II: Sekvence primerů pro PCR reakci pro geny *COMT* a *MTHFR*.

Název primeru	PCR produkt	Sekvence od 5' k 3'
COMT F primer (Tahara et al., 2009)	217 bp	TCGTGGACGCCGTGATTCAGG
COMT R primer (Tahara et al., 2009)		AGGTCTGACAACGGGTCAGGC
MTHFR 677F (Frosst et al., 1995)	198 bp	TGA AGG AGA AGG TGT CTG GGG GA
MTHFR 677R (Frosst et al., 1995)		AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG

pozn.: „F“ značí forward primer, „R“ reverse primer

PŘÍPRAVA PCR REAKCE PRO *MTHFR C677T*

Nejprve byl v laminárním boxu na ledu do 1,5 ml zkumavky připraven MasterMix, jehož složení je uvedeno v tabulce III. Následně byl tento mix rozpipetován po 23 μ l do předem připravených 0,2 ml mikrozkuvek a mimo laminární box byly do každé mikrozkuvky přidány 2 μ l DNA izolátu. Výsledný objem reakční směsi byl 25 μ l pro každý vzorek. Jako ukazatel správného provedení metody a možnosti kontaminace sloužily dvě pozitivní kontroly (PK) se známými genotypy a jedna negativní kontrola (NK).

Tab. III: Složení reakčního mixu pro polymorfismus *C677T*.

Reagencie	Objem 1 reakce
voda	8,25 μ l
PCRBIO Taq Mix Red (Bio-Consult)	12,5 μ l
DMSO	1,25 μ l
Primer F+R	0,5 + 0,5 μ l
celkem	23 μ l

Po přidání lyzátu DNA byly mikrozkuvky s reakční směsí důkladně zvortexovány, stočeny a umístěny do termocycleru (MultiGene, Labnet), jehož teplotní profil je uveden v tabulce IV.

Tab. IV: Teplotní profil pro detekci polymorfismu *MTHFR C677T*.

	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas
Denaturace	1	95	5 min
Denaturace	35	95	1 min
Annealing		60	1 min
Extenze		72	1 min
Finální extenze	1	72	5 min

PŘÍPRAVA PCR REAKCE PRO *COMT Val158Met*

V laminárním boxu byl do 1,5 ml zkumavky připraven MasterMix jehož složení je uvedeno v tabulce V. Do již předem popsaných 0,2 μ l mikrozkuvek bylo nepipetováno 48 μ l MasterMixu a mimo laminární box byly do každé mikrozkuvky přidány 2 μ l DNA izolátu. Jako ukazatel správného provedení metody a možnosti kontaminace nám sloužily dvě pozitivní kontroly (PK) se dvěma známými genotypy a jedna negativní kontrola (NK) obsahující destilovanou vodu.

Tab. V: Složení MasterMixu pro polymorfismus Val158Met.

Reagencie	Objem 1 reakce
voda	34,3 μ l
5x MyTaq Red Reaction Buffer (Labmark)	10 μ l
My Taq Red DNA Polymerase (Labmark)	0,2 μ l
DMSO	2,5 μ l
Primer F+R	0,5 μ l + 0,5 μ l
celkem	48 μ l

Vzorky byly zvortexovány, stočeny a umístěny do termocycleru jehož reakční profil je uveden v tabulce VI.

Tab. VI: Teplotní profil pro detekci polymorfismu Val158Met.

	Počet cyklů	Teplota (°C)	čas
Denaturace	1	95	5 min
Denaturace	32	95	30 s
Annealing		55	30 s
Extenze		72	1 min
Finální extenze	1	72	10 min

VIZUALIZACE PCR PRODUKTŮ

Pomocí gelové elektroforézy na 4 % agarózovém gelu byla ověřena přítomnost a velikost PCR produktů. Gel byl připraven z 50 ml 1× TBE Bufferu (Thermo Scientific) a čtyř 0,5 g agarózových tablet (FastGene). Pro vizualizaci bylo přidáno 15 µl fluorescenční barvy Midori Green Advanced DNA Stain. Na gel bylo nanášeno 5 µl pro každý vzorek a 5 µl markeru (100 bp FastGene DNA Ladder, Elisabeth Pharmacon). Kromě dvou PK byla nanášena také NK, která sloužila ke zjištění, zda nedošlo ke kontaminaci při přípravě MasterMixu. Po nanášení vzorků byla spuštěna elektroforetická separace při napětí 135 V po dobu přibližně 10 minut. Po proběhnutí byl gel přenesen na UV dokumentační systém (FastGene GelPic LED Box, Nippon Genetics) a výsledky gelové elektroforézy byly vyfoceny a následně vyhodnoceny. V případě genu *MTHFR* byla délka PCR produktu 198 bp a v případě genu *COMT* 217 bp.

RESTRIKČNÍ ANALÝZA

Restrikční štěpení PCR produktu genu *MTHFR* C677T proběhlo za použití enzymu Hinf I, který rozeznává štěpné místo GANTC. Nejprve byl připraven mix pro restrikční štěpení smícháním 10 U restrikčního enzymu Hinf I (1 µl) a 2 µl příslušného restrikčního pufru 10x CutSmart (New England BioLabs) dle počtu reakcí. K jednotlivým PCR produktům byly přidány 3 µl směsi a zkumavky byly stočeny pomocí stolní centrifugy (*Microspin FV-2400*; *BioSan*) a inkubovány v miniinkubátoru (*Mini Incubator*, *Labnet*) při teplotě 37 °C po dobu minimálně 60 minut. Po ukončení inkubace byla provedena kontrola restrikčního štěpení pomocí elektroforetické separace na agarózovém gelu.

V případě genu *COMT* Val158Met bylo restrikční štěpení provedeno za použití restrikčního enzymu NlaIII a příslušného restrikčního pufru CutSmart. Další postup byl obdobný jako při použití enzymu Hinf I.

DETEKCE RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ

Detekce výsledných fragmentů restrikčního štěpení u obou genů proběhla na 4 % nebarveném agarózovém gelu. Příprava probíhala stejně jako u barveného gelu s rozdílem, že se fluorescenční barva nepřidávala do gelu. Na parafilm byla nepipetována 0,5 µl kapka barviva Midori Green Direct DNA Stain a následně se ke kapce napipetovalo 10 µl vzorku, který byl promíchán s barvivem. Takto obarvený vzorek se nanese na gel. Elektroforetická separace probíhala při 135 V po dobu 15-45 minut. Doba byla případně upravena pro co nejlepší viditelnost fragmentů o různých délkách. Velikosti produktů byly odečteny pomocí 100 bp Ladder DNA marker a následně byl gel přenesen na detekční systém a výsledky elektroforézy byly vyhodnoceny a zdokumentovány. V tabulce VII jsou uvedeny velikosti produktů restrikčního štěpení.

Tab. VII: Přehled produktů restrikčního štěpení metody PCR-RFLP odpovídajících jednotlivým genotypům.

	MTHFR C677T	COMT Val158Met
mutace	175+23 bp	96+81+40 bp
wild type	198 bp	136+81 bp
heterozygot	198+175+23 bp	136+96+81+40 bp

4.4.2 PCR ARMS PRO DETEKCI POLYMORFISMŮ GENU *APOE*

Amplifikační refrakční mutační systém (ARMS) je metoda, kterou lze detekovat bodové mutace či drobné delece v DNA. ARMS test se skládá ze dvou samostatných reakcí kdy jedna je specifická pro normální DNA sekvenci a druhá pro sekvenci s mutací.

Pro amplifikaci byly použity primery jejichž sekvence včetně vstupních koncentrací do reakce byly převzaty z publikace Zende *et al.* (2013) (viz Tab. VIII). V průběhu našeho pokusu jsme ovšem zjistili v této publikaci chybu. Ta spočívala v prohození sekvencí primerů Cys112 a Arg112, kvůli čemuž nám nejprve vycházely výsledky chybně. Optimalizace reakce nebyla nutná.

Tab. VIII: Sekvence primerů pro PCR reakci pro gen *APOE*.

Primery	Sekvence od 5' k 3'	Velikost PCR produktu (bp)
Cys158	ATGCCGATGACCTGCAGAATT	588
Arg158	ATGCCGATGACCTGCAGAATC	588
Cys112	CGCGGACATGGAGGACGTTT	451
Arg112	CGCGGACATGGAGGACGTTC	451
COMMON	G TTCAGTGATTGTCGCTGGGCA	-

PŘÍPRAVA PCR REAKCE

V laminárním boxu byly připraveny do 1,5 ml zkumavek 2 MasterMixy (A a B) jejichž složení je uvedeno v tabulce IX. Tyto MasterMixy byly následně rozpipetovány do 0,2 ml mikrozkušavek po 23 μ l a mimo laminární box byly do každé mikrozkušavky přidány 2 μ l DNA izolátu, takže pro každý vzorek byly provedeny dvě PCR reakce ve dvou zkumavkách.

Tab. IX: Složení reakčních mixů pro reakci PCR ARMS genu *APOE*.

MIX A		MIX B	
Reagencie	Objem pro 1 reakci	Reagencie	Objem pro 1 reakci
H ₂ O	7,25 μ l	H ₂ O	7,25 μ l
PCRBIO Taq Mix Red (Bio-Consult)	12,5 μ l	PCRBIO Taq Mix Red	12,5 μ l
DMSO	1,25 μ l	DMSO	1,25 μ l
COMMON primer	0,8 μ l	COMMON primer	0,8 μ l
Arg158	0,8 μ l	Cys158	0,8 μ l
Arg112	0,4 μ l	Cys112	0,4 μ l
celkem	23 μ l	celkem	23 μ l

Vzorky se poté zvortexovaly (Mini centrifuga/vortex MicroSpin V-2400, bioSan), stočily a umístily se do gradientového termocycleru (MultiGene, Labnet), jehož teplotní profil je uveden v tabulce X. Jako ukazatel správného provedení metody a možnosti kontaminace sloužily dvě pozitivní kontroly (PK) a jedna negativní kontrola (NK).

Tab. X: Teplotní profil reakce PCR ARMS.

	Počet cyklů	Teplota (°C)	čas
Denaturace	1	95	4 min
Denaturace	35	94	45 s
Annealing		66	45 s
Extenze		72	45 s
Finální extenze	1	72	5 min

GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Výsledné produkty PCR byly naneseny na 4 % agarózový gel, který byl připraven z 50 ml 1× TBE Bufferu (Thermo Scientific) a čtyř 0,5 g agarózových tablet (FastGene). Pro vizualizaci bylo přidáno 15 µl fluorescenční barvy Midori Green Advanced DNA Stain. Na gel bylo naneseno 5 µl markeru (100 bp FastGene DNA Ladder, Elisabeth Pharmacon) a poté bylo vedle sebe naneseno 20 µl mixu A a mixu B pro každý vzorek.

Pro kontrolu možné kontaminace při přípravě master mixu byla na gel nanesena PK v mixu A i B, a to samé bylo provedeno i s NK. Po nanesení vzorků byla spuštěna elektroforetická separace při napětí 135 V po dobu přibližně 20 minut. Po proběhnutí byl gel přenesen na UV dokumentační systém (FastGene GelPic LED Box, Nippon Genetics) a výsledky gelové elektroforézy byly vyfoceny a následně vyhodnoceny. V tabulce XI jsou uvedeny velikosti PCR produktů pro gen *APOE*.

Tab. XI: Velikosti PCR produktů pro gen *APOE*.

Genotyp	Velikost produktů (bp)			
	MIX A	MIX A	MIX B	MIX B
E3E2	451	-	451	588
E4E2	451	588	451	588
E4E3	451	588	-	588
E4E4	541	588	-	-
E3E3	451	-	-	588
E2E2	-	-	451	588

5 VÝSLEDKY

Testování jedinci byli rozděleni do tří skupin. Jedna skupina byla tvořena 19 pacienty s Alzheimerovou chorobou, druhá skupina byla tvořena 31 pacienty s různými formami demence. Třetí skupina sloužila jako kontrolní skupina a byla tvořena 5 zdravými pacienty ze Senior centra a 25 dobrovolníky, kteří byli v minulých letech vyšetřováni v genetické laboratoři GENLABS a kteří souhlasili s využitím svých výsledků k výzkumným účelům. Věkové zastoupení testovaných jedinců v jednotlivých skupinách je uvedeno v tabulce XII.

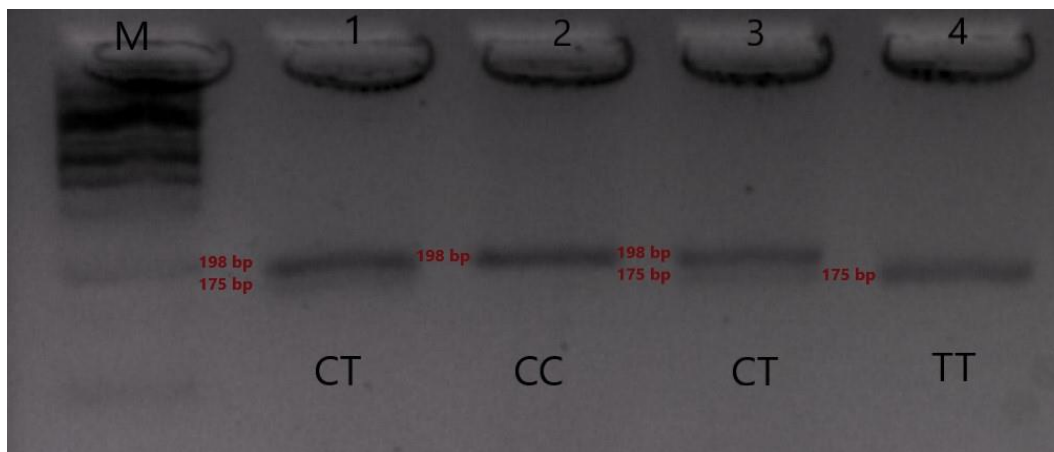
Metodami PCR-RFLP a PCR ARMS jsme otestovali celkem 55 vzorků pro vybrané polymorfismy genů *MTHFR*, *APOE* a *COMT*. V naší studii jsme předpokládali zvýšenou frekvenci výskytu izoformy ApoE4, genotypu *MTHFR677* T/T a v případě genu *COMT* genotyp Met/Met. Výsledky jednotlivých genotypů u testovaných skupin pro polymorfismy uvedených genů jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. XIII, Tab. XIV, Tab. XV).

Tab. XII: Věkové zastoupení testovaných jedinců v jednotlivých skupinách.

věková hranice	pacienti s AD		pacienti s demencí		kontrolní skupina	
	počet jedinců	procentuální zastoupení (%)	počet jedinců	procentuální zastoupení (%)	počet jedinců	procentuální zastoupení (%)
60-69 let	0	0	2	6	12	40
70-79 let	4	21	13	42	13	44
80-89 let	10	53	8	26	4	13
90-99 let	5	26	8	26	1	3

5.1 ZJIŠTĚNÉ VARIANTY V GENU *MTHFR*

Pro detekci polymorfismu C677T genu *MTHFR* byla využita metoda PCR-RFLP. Příklad produktů restričního štěpení je uveden na obr. 6.



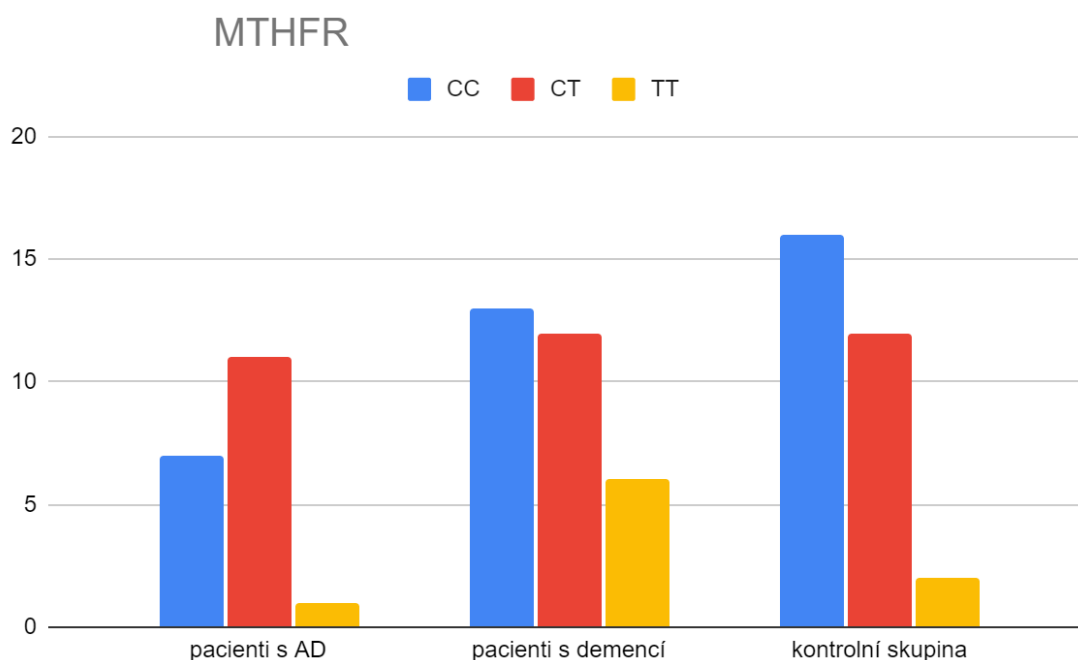
Obr. 6: Příklad produktů restričního štěpení genu *MTHFR* (zdroj vlastní).

M – hmotnostní marker; jamka 1 a 3 zobrazují heterozygoty *CT* s délkou fragmentů 198 bp, 175 bp a 23bp. 2. jamka zobrazuje neštěpený fragment o délce 198 bp, který dokládá přítomnost wild-type alely (*CC*). 4. jamka pak štěpené fragmenty o délce 198 a 175 bp – mutantní alela *T* (*TT*). pozn. krátký fragment o velikosti 23 bp není vzhledem ke své délce viditelný.

Tab. XIII: Zastoupení genotypů u testovaných skupin pro polymorfismus C677T genu *MTHFR*.

zastoupení genotypu	pacienti s AD		pacienti s demencí		kontrolní skupina	
	počet jedinců	procentuální zastoupení (%)	počet jedinců	procentuální zastoupení (%)	počet jedinců	procentuální zastoupení (%)
CC	7	37,00	13	41,90	16	53,33
CT	11	58,00	12	38,71	12	40,00
TT	1	5,00	6	19,40	2	6,67
počet celkem	19		31		30	

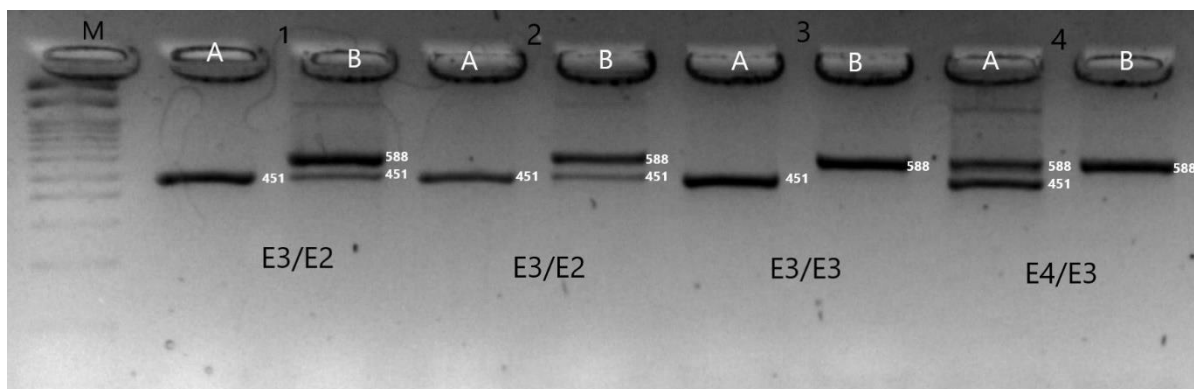
Ve skupině pacientů s demencí byl genotyp TT zastoupen z 19 %, ve skupině s AD z 5 % a v kontrolní skupině z 6,67 %. Genotyp CC byl nejvíce zastoupen v kontrolní skupině a genotyp CT ve skupině pacientů s AD. Frekvence jednotlivých genotypů u testovaných skupin je zobrazena na obrázku 7.



Obr. 7: Grafické znázornění zastoupení jednotlivých genotypů u testovaných skupin pro gen *MTHFR*.

5.2 ZJIŠTĚNÉ VARIANTY V GENU *APOE*

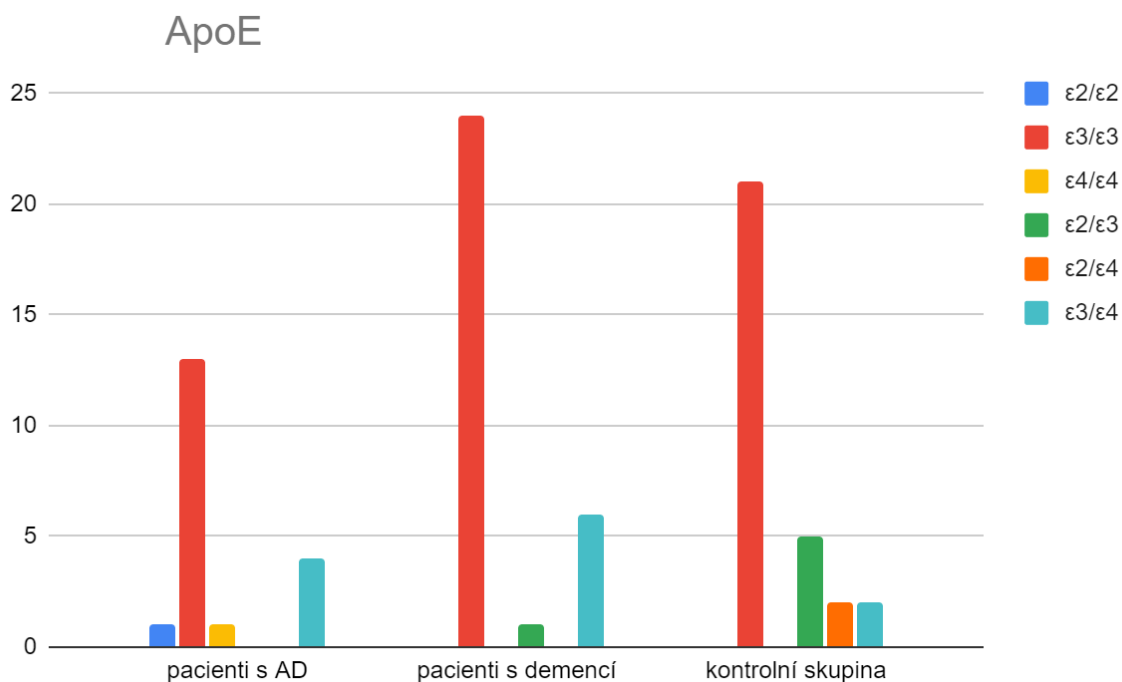
Pro zjištění polymorfismů genu *APOE* byla zvolena metoda PCR ARMS. Každý vzorek byl analyzován pomocí dvou odlišných reakčních mixů se specifickými primery. Mix A obsahoval primery Arg112 (451 bp), Arg158 (588 bp) a mix B obsahoval Cys112 (451 bp) a Cys158 (588 bp). Oba mixy zároveň obsahovaly stejný common primer. Na obrázku 8 jsou zobrazeny amplifikační produkty alel *APOE* na elektroforetickém agarózovém gelu.



Obr. 8: Příklad amplifikačních produktů několika alel *APOE* (zdroj vlastní).

M - hmotnostní marker; vzorek 1 a 2 - E3E2 (mix A: Arg112 pozitivní, Arg158 negativní, mix B: Cys112 pozitivní, Cys158 pozitivní); vzorek 3 - E3E3 (mix A: Arg112 pozitivní, Arg158 negativní, mix B: Cys112 negativní, Cys158 pozitivní); vzorek 4 - E4E3 (mix A: Arg112 pozitivní, Arg158 pozitivní, mix B: Cys112 negativní, Cys158 pozitivní).

Frekvence jednotlivých genotypů u jednotlivých skupin je zobrazena na obrázku 9.



Obr. 9: Grafické znázornění zastoupení jednotlivých genotypů u testovaných skupin pro gen *APOE*.

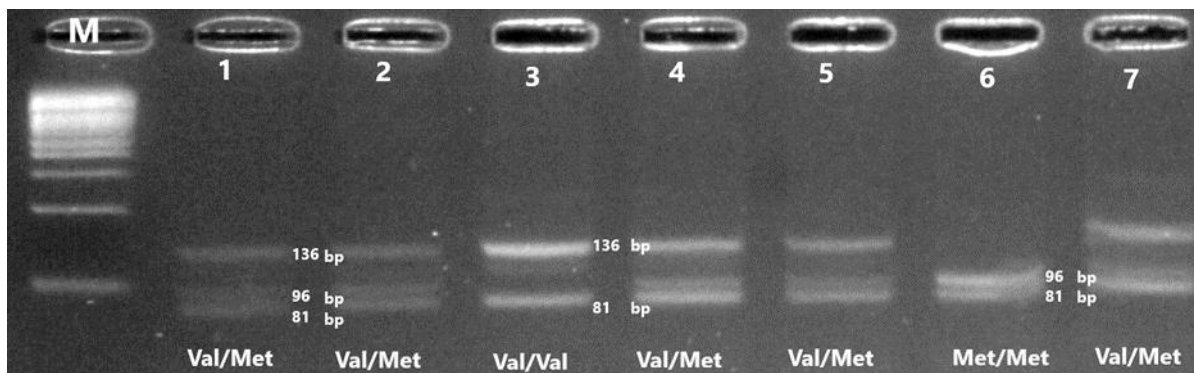
Tab. XIV: Zastoupení jednotlivých genotypů u testovaných skupin pro gen *APOE*.

genotyp	pacienti s AD		pacienti s demencí		kontrolní skupina	
	počet jedinců	procentuální zastoupení (%)	počet jedinců	procentuální zastoupení (%)	počet jedinců	procentuální zastoupení (%)
E2/E2	1	5,3	0	0	0	0
E3/E3	13	68,4	24	77,4	21	70,0
E4/E4	1	5,3	0	0	0	0
E2/E3	0	0	1	3,2	5	16,67
E2/E4	0	0	0	0	2	6,67
E3/E4	4	21,0	6	19,4	2	6,67
počet celkem	19		31		30	

V naší studii bylo zaznamenáno všech 6 možných genotypů, přičemž u skupiny tvořené pacienty s AD bylo procentuální zastoupení alel následující: E3 78,9 %, E4 15,8 % a E2 5,3 %. Ve skupině pacientů s demencí bylo 88,7 % zastoupeno alelou E3, 9,7 % alelou E4 a 1,6 % alelou E2. V kontrolní skupině bylo 81,67 % zastoupeno alelou E3, 6,67 % alelou E4 a 11,67 % alelou E2. Tyto hodnoty jsou více méně shodné s četností zastoupení jednotlivých alel v Evropské populaci. Ve skupinách pacientů s Alzheimerovou chorobou a demencí je zastoupení alely E4 významně větší, než je tomu u kontrolní skupiny.

5.3 ZJIŠTĚNÉ VARIANTY V GENU *COMT*

Pro detekci polymorfismu Val158Met genu *COMT* byla zvolena metoda PCR-RFLP a typický výsledek gelové elektroforézy je uveden na obr. 10.



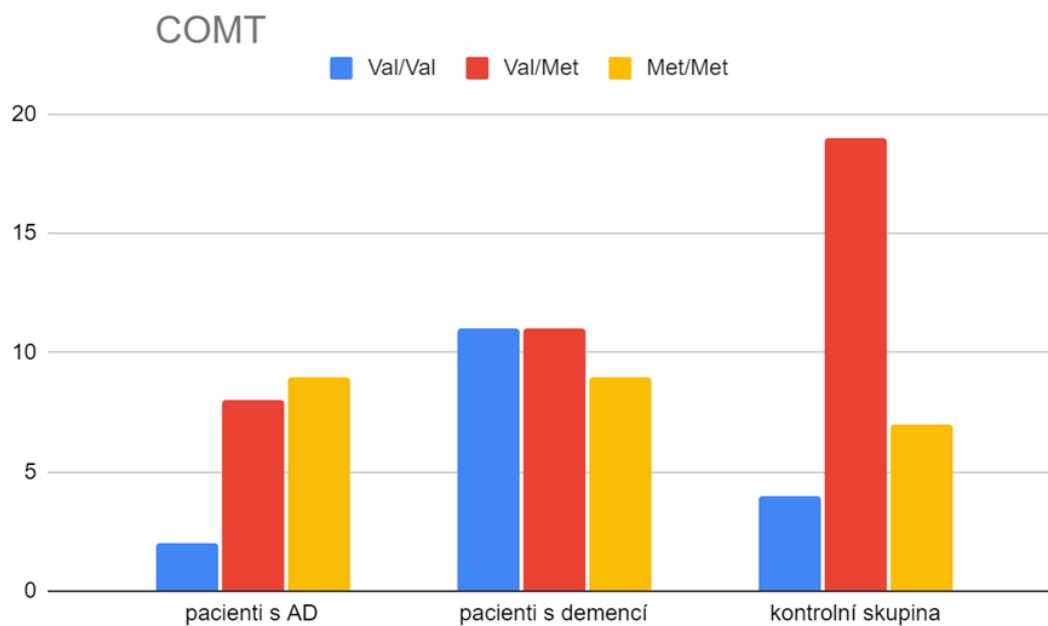
Obr. 10: Příklad produktů restrikčního štěpení genu *COMT* (zdroj vlastní).

M – hmotnostní marker; jamky 1, 2, 4, 5 a 7 zobrazují heterozygoty Val/Met s délkou fragmentů 136 bp, 96 bp, 81bp a 40 bp. 3 jamka zobrazuje fragmenty o délce 136bp a 81 bp, které dokládají přítomnost wild-type alely (Val/Val). 6. jamka zobrazuje homozygota Met/Met s fragmenty o délce 96 bp, 81 bp a 40 bp. pozn. krátký fragment o velikosti 40 bp není vzhledem ke své délce viditelný.

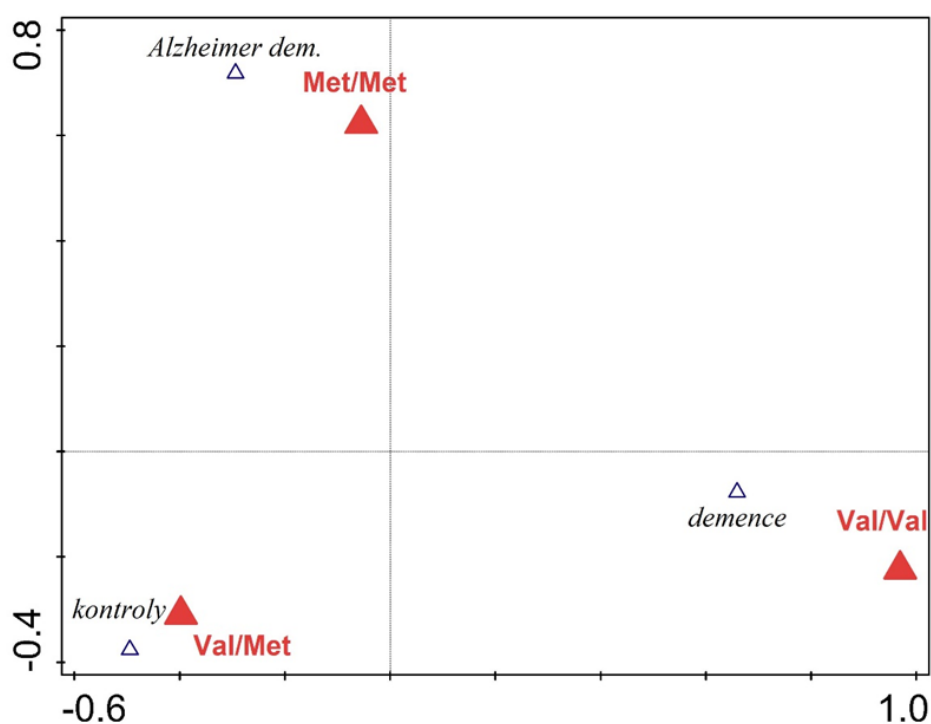
Tab. XV: Zastoupení jednotlivých genotypů u testovaných skupin pro gen *COMT*.

Genotyp	pacienti s AD		pacienti s demencí		kontrolní skupina	
	počet jedinců	procentuální zastoupení (%)	počet jedinců	procentuální zastoupení (%)	počet jedinců	procentuální zastoupení (%)
Val/Val	2	10,5	11	35,50	4	13,33
Val/Met	8	42,1	11	35,50	9	63,33
Met/Met	9	47,4	9	29,00	7	23,33
počet celkem	19		31		30	

Zastoupení genotypu Met/Met bylo u skupiny pacientů s Alzheimerovou chorobou s četností 47 % a u pacientů s demencí s četností 29 %. Tyto hodnoty jsou ve srovnání s kontrolní skupinou vyšší. Frekvence zastoupení jednotlivých genotypů je uvedena na obrázku 11 a distribuce alel v jednotlivých skupinách je zobrazena na obrázku 12.



Obr. 11: Grafické znázornění zastoupení jednotlivých genotypů u testovaných skupin pro gen *COMT*.



Obr. 12: Distribuce alel genu *COMT* mezi jednotlivými skupinami. (CCA analýza, Pseudo-F=3.6, P=3.6, P=0.034). Z grafu je patrné rozmístění testovaných skupin a jednotlivých genotypů genu *COMT*, tzn. pro genotyp Val/Val je signifikantní výskyt ve skupině s demencí, genotyp Met/Met se nejvíce objevuje ve skupině s Alzheimerovou demencí a genotyp Val/Met je nejvíce zastoupen v kontrolní skupině.

Ve skupině pacientů s Alzheimerovou chorobou je nejvíce zastoupen genotyp Met/Met, který je díky svým vlastnostem spojován s vyšším rizikem rozvinutí Alzheimerovy choroby. Ve skupině pacientů s různými formami demence se vyskytuje genotyp Val/Val, který způsobuje sníženou hladinu dopaminu a relativně nižší kognitivní funkce. V kontrolní skupině je nejvíce zastoupen heterozygot Val/Met, jehož nositelé jsou díky jeho optimální aktivitě považováni za zdravé.

5.4 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT

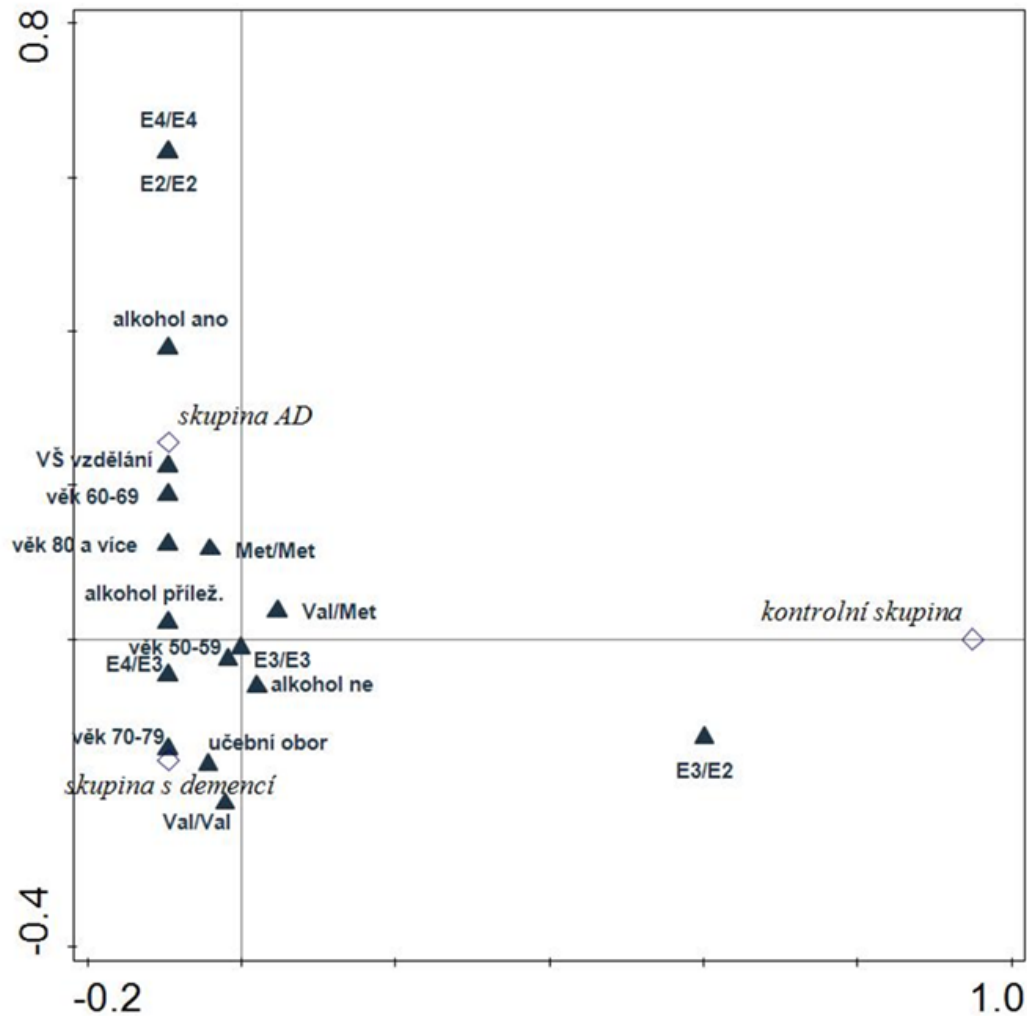
Získaná data byla vyhodnocena v programech Canoco 5 a Excel. V programu Canoco 5 byla data analyzována pomocí metody Canonical Correspondence Analysis (přímá metoda CCA). Jako závislá proměnná byl u CCA analýzy určen faktor diagnózy Alzheimerovy choroby, faktor diagnózy demence a faktor zahrnující kontrolní, zdravou skupinu pacientů a jako vysvětlující proměnná zjištěný genotyp pro geny *APOE*, *COMT* a *MTHFR*.

5.4.1 VYHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH DAT Z DOTAZNÍKU

Dotazník byl vyplněn za lékařského dohledu a pomoci 55 klienty Alzheimercentra a Seniorcentra v Českých Budějovicích. U zbylých 25 účastníků výzkumu nebylo možné dotazník vyplnit z důvodu doplnění kontrolní skupiny pacienty vyšetřovanými v minulých letech v genetické laboratoři GENLABS. Tito vybraní pacienti souhlasili s využitím výsledků k dalším výzkumným účelům.

Studie se zúčastnilo 80 jedinců z toho 57 žen a 23 mužů, jejichž průměrný věk byl 79 let (u žen 80 let, u mužů 77 let).

Na obrázku 13 je zobrazena distribuce alel v jednotlivých skupinách v souvislosti s vnějšími rizikovými faktory.



Obr. 13: Distribuce alel v souvislosti s vnějšími rizikovými faktory v jednotlivých skupinách (CCA analýza; Pseudo-F=53; P=0.002, I. A II. Ordinační osa I. A II. dohromady vysvětlují 70.21 %).

V grafu jsou porovnávány tři testované skupiny. Ve skupině pacientů s Alzheimerovou demencí byli nejvíce zastoupeni jedinci s vysokoškolským vzděláním a ve skupině pacientů s různými formami demence byli nejvíce zastoupeni jedinci, kteří měli vzdělání typu učebního oboru. Respondenti, kteří odpověděli že užívají alkohol a ti co uvedli že jej užívají někdy byli zastoupeni významně ve skupině pacientů s AD. Ve skupině pacientů s demencí byli zastoupeni jedinci, kteří uvedli že alkohol neužívají. Dále je z grafu patrné, že ve skupině pacientů s Alzheimerovou demencí se nemoc rozvinula mezi 60-69 roky a mezi 80-89 roky. Ve skupině pacientů s různými formami demence došlo k rozvoji demence mezi roky 50-59 a 70-79.

6 DISKUZE

I přes skutečnost, že demence postihují především starší populaci nejsou přirozenou součástí stárnutí nýbrž důsledkem chorobného procesu. Demencí trpí celosvětově kolem 50 miliónů lidí z nichž téměř 60 % žije v zemích s nízkými a středními příjmy. Tento syndrom má nejen sociální ale i ekonomické dopady na společnost. Dle odhadů byly v roce 2015 celkové globální náklady na péči kolem 818 miliard amerických dolarů a vzhledem k tomu, že celosvětově každým rokem přibývá přibližně 10 miliónů nových případů demence lze předpokládat další růst těchto nákladů (Dementia, 2020. [online]; Holmerová, 2007). Proto je do výzkumu problematiky demencí investováno velké množství finančních prostředků. Přesná příčina vzniku demence zatím není známa, avšak jsou známy určité rizikové faktory. Jako vnější rizikové faktory jsou uváděny například věk, nadměrná konzumace alkoholu, traumatické poranění hlavy či diabetes. V souvislosti s neurodegenerativními demencemi, a především s Alzheimerovou chorobou je zkoumán také možný genetický vliv. Existuje velké množství kandidátních genů, které jsou spolu s provedenými studii uvedeny v online databázi AlzGene (alzgene.org). Mezi těmito geny se nachází kromě jediného potvrzeného rizikového genu, kterým je gen *APOE* také geny *COMT* a *MTHFR*. Tyto dva geny jsou předmětem mnoha studií a jsou jim připisovány určité vlastnosti, avšak jejich vliv v etiopatogenezi demence či Alzheimerovy choroby je poněkud rozporuplný.

Cílem diplomové práce bylo vyšetřit pomocí metod molekulární biologie genotypové frekvence pro geny *COMT*, *MTHFR*, *APOE* u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou, či jinými formami demence a pomocí dotazníkového šetření zjistit jejich anamnézu. Pro náš výzkum bylo osloveno Alzheimer centrum v Českých Budějovicích, které nám umožnilo spolupráci s klienty a pomohlo nám s celkovou realizací projektu. V rámci diplomové práce byly u testovaných jedinců dotazníkovým šetřením zjištěny informace týkající se rizikových faktorů rozvinutí demence. Tyto rizikové faktory byly porovnány multivariantní analýzou Canoco. Celkem bylo geneticky vyšetřeno 55 jedinců, kteří byli rozděleni do dvou skupin a jako kontrolní skupina sloužili pacienti vyšetřovaní v minulých letech v genetické laboratoři GENLABS jako samoplátci. V kontrolní skupině byl dotazník vyplněn pouze 5 námi testovanými zdravými dobrovolníky ze Senior centra. U zbylé části kontrolní skupiny se bohužel nepodařilo retrospektivně dotazník vyplnit. Pomocí metod PCR-RFLP a PCR ARMS jsme otestovali celkem 55 vzorků pro vybrané polymorfismy genů *MTHFR*, *APOE* a *COMT*.

Gen *APOE* se vyskytuje ve třech alelách E2, E3, E4. Protein APOE se účastní transportu cholesterolu a lipidů. Alela E4 je spojena se zvýšeným rizikem vzniku AD kdy nositelé jedné alely mají 4x vyšší riziko rozvoje AD v porovnání s těmi, co tuto alelu nemají. V případě homozygotů pro alelu E4 je toto riziko dokonce 12x vyšší (Abondio *et al.*, 2019; Hyman *et al.*, 1996). Kromě toho alela E4 přispívá k tvorbě senilních plaků a homozygotní jedinci E4/E4 mají oproti heterozygotním jedincům (E3/E4 nebo E2/E4) zvýšené riziko dřívějšího rozvinutí AD. Alela E2 je v tomto ohledu považována za protektivní a alela E3 za neutrální (Abondio *et al.*, 2019; Hyman *et al.*, 1996). Zastoupení jednotlivých alel se mezi populacemi a etniky významně liší, ovšem ve všech sledovaných populacích se nejčastěji vyskytuje alela E3, která je v evropské populaci zastoupena z 78 %. Po ní je druhou nejčastější alela E4 se zastoupením 14 % a nejmenší zastoupení má alela E2 a to 8 % (Hallman *et al.*, 1991; Beránek *et al.*, 1999).

V naší studii jsme zaznamenali u 80 vyšetřovaných jedinců výskyt všech 6 možných genotypů. Ve všech třech skupinách byl nejvíce zastoupen genotyp E3/E3, který je obecně považován za příznivý, a tudíž jsme předpokládali jeho zvýšenou frekvenci v kontrolní skupině, což se nám nepotvrdilo. Genotyp E3/E4 byl nalezen ve všech testovaných skupinách, nejvíce byl zastoupen ve skupině pacientů s AD, a to s procentuálním zastoupením 15,8 %. Homozygotní genotyp E4/E4 byl v našem souboru nalezen pouze v jednom případě, a to ve skupině s AD. Alela E2 byla v našem souboru zastoupena nejvíce v kontrolní skupině, konkrétně se jednalo o genotypy E4/E2 (2x) a E3/E2 (5x). Navíc byl v jednom případě nalezen genotyp E2/E2 ve skupině pacientů s AD. Vzhledem k tomu, že je alela E2 považována za protektivní faktor rozvinutí AD je toto zjištění poměrně zajímavé. V tomto konkrétním příkladě zde mohou určitou roli hrát také vnější rizikové faktory, neboť jsme zjistili, že tato žena užívala v minulosti dlouhodobě benzodiazepiny, které jsou vzhledem ke svým účinkům na mozek považovány za rizikový faktor rozvinutí AD.

Dalším testovaným genem byl *COMT*. Jeho polymorfismus Val158Met je díky své funkci spojován se širokým spektrem problémů přes psychické poruchy až po závislosti. Ovlivňuje metabolismus dopaminu v prefrontálním kortexu. Dopamin má vliv na pracovní paměť a výkonné funkce, které jsou u pacientů s AD narušeny (Serretti & Olgiati, 2012; Pereira *et al.*, 2012).

Polymorfismus vykazuje tři genotypy lišící se svou aktivitou Val/Val, Val/Met, Met/Met. V bělošské populaci se pro polymorfismus Val158Met genu *COMT* vyskytuje 50 % homozygotů (25 % Val/Val a 25 % Met/Met) a zbylých 50 % jsou heterozygoti Val/Met (Palmatier *et al.*, 1999; Hursel *et al.*, 2011). V naší studii byla heterozygotní varianta Val/Met, která je spojena se střední aktivitou genu, zastoupena nejvíce u kontrolní skupiny v procentuálním zastoupení 63 %. Mutovaná varianta Met/Met se nejvíce vyskytovala u skupiny pacientů s Alzheimerovou chorobou, a to v počtu 47 %. U skupiny pacientů s demencí byla nejvíce zastoupena varianta Val/Val, která je považována za normální nemutovanou variantu.

V rámci dotazníkového šetření byla v testovaném souboru zjištěna korelace genotypu Met/Met s užíváním alkoholu. Ethanol způsobuje rychlé zvýšení hladiny dopaminu v mozku a Met/Met jedinci, jelikož mají sníženou aktivitu enzymu, mohou zaznamenat déletrvající uvolňování dopaminu v mozku, a tedy i snáze propadnout závislosti (Kauhanen *et al.*, 2000). Tvrzení, že homozygoti pro alelu Met vnímají alkohol příjemněji než jedinci s genotypem Val/Val a Val/Met potvrdili ve své studii Kauhanen *et al.* (2000). Navíc bylo zjištěno, že tento genotyp přispívá k rozvoji závislosti na alkoholu (Tiihonen *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001). Existují však také studie, které toto vyvracejí. Například Chaudhary *et al.* (2021) ve své metaanalýze spojitost genu *COMT* Val158Met se závislostí na alkoholu vyvrátili. V našem souboru pacientů s AD bylo zjištěno, že ze všech jedinců nesoucích genotyp Met/Met 71 % jedinců užívá alkohol. Tito jedinci odpověděli v dotazníku na otázku, zdali užívají alkohol „ano“ či „příležitostně“. Jelikož je známým faktem, že lidé na otázky týkající se alkoholu odpovídají nepřesně a uvádějí menší dávky, než skutečně vypijí, mohli bychom brát tyto údaje s rezervou. Proto jsme odpověď „příležitostně“ považovali za „ano“. Tato námi zjištěná spojitost polymorfismu Val158Met s konzumací alkoholu je i přes malý počet naší kohorty zajímavá a měla by být přezkoumána na větším vzorku participantů.

Třetím genem, který jsme v rámci mé diplomové práce vyšetřovali byl gen *MTHFR*. Je považován za kandidátní gen v etiopatogenezi AD kvůli tomu, že kóduje enzym ovlivňující metabolismus homocysteinu. Polymorfismus C677T genu *MTHFR* způsobuje sníženou aktivitu enzymu MTHFR projevující se zvýšeným množstvím homocysteinu v krvi. Toto zvýšené množství je považováno za rizikový faktor pro rozvinutí demence, a tedy i AD (Smith *et al.* 2010).

V Evropské populaci se vyskytuje 12 % homozygotů *MTHFR* 677 TT, 43 % heterozygotů *MTHFR* 677 CT a 45 % homozygotů *MTHFR* 677 CC (Prinz-Langenohl *et al.*, 2009). V naší studii byl genotyp *MTHFR* 677 TT významně zastoupen ve skupině pacientů s demencí s četností 19,4 %. Ve zbylých dvou skupinách se tento genotyp vyskytoval s četností kolem 5-6 %. Heterozygotní varianta *MTHFR* 677 CT se s četností 58 % vyskytovala ve skupině pacientů s AD. Zdravá varianta *MTHFR* 677 CC byla zastoupena nejsignifikantněji v kontrolní skupině s četností 53 %. Jelikož dle studií genotyp *MTHFR* 677 TT přímo souvisí s hladinou homocysteinu naše výsledky by mohly být průkaznější, pokud by se u jednotlivých pacientů změřila také hladina homocysteinu v plazmě a tyto hodnoty by se spolu s dalšími zjištěnými rizikovými faktory porovnály mezi skupinami.

Při analýze dalších rizikových faktorů, na které jsme se v rámci dotazníku zaměřili byla nalezena souvislost nejvyššího dosaženého vzdělání s typem onemocnění. Vysokoškolské vzdělání bylo s největší četností nalezeno ve skupině pacientů s AD. Učební obor byl nejvíce zastoupen ve skupině pacientů s různými formami demence. Základní a středoškolské vzdělání nebyly v porovnání s ostatními dvěma typy nijak signifikantní. Nižší stupeň vzdělání je považován za rizikový pro rozvoj AD, jelikož u těchto jedinců je nižší kognitivní rezerva a jsou vůči patologickým procesům více vnímaví (Musicco *et al.*, 2009). Oproti tomu vyšší dosažené vzdělání je spojeno se sníženým rizikem rozvoje AD (Larsson *et al.*, 2017). Bonaiuto *et al.* (1995) ve své studii zjistili spojitost manuální práce s rizikem vzniku demence. Z jejich studie vyplývá, že jedinci, kteří pracují manuálně mají vyšší riziko, že se u nich rozvine demence. Pracovní zkušenosti jsou dle této studie silnějším ukazatelem rizika, než je vzdělání. Skutečnost, že v našem souboru testovaných bylo vysokoškolské vzdělání více zastoupeno ve skupině pacientů s AD, představuje zajímavé zjištění vzhledem k protektivní funkci, za kterou je vyšší vzdělání považováno.

Mezi další významné rizikové faktory, které jsme analyzovali patřila rodinná anamnéza, přičemž kromě dvou respondentů všichni ostatní uvedli, že se v jejich rodině demence ani Alzheimerova choroba nevyskytovaly. Ohledně dalšího rizikového faktoru, kterým je traumatické poškození mozku, nebyly zaznamenány žádné potvrzené případy. Oproti tomu užívání benzodiazepinů potvrdilo 33 % ze všech 55 zúčastněných, přičemž většina z nich byla ze skupiny s demencí.

Studie, zabývající se benzodiazepiny jako rizikovými faktory potvrzují souvislost užívání těchto léků s vyšším rizikem rozvoje AD (Billioti de Gage *et al.*, 2014). Ostatní rizikové faktory uvedené v dotazníku nebyly signifikantní.

V diplomové práci jsme byli limitováni skutečností, že jsme mohli porovnat data týkající se rizikových faktorů pouze ve skupině pacientů s AD a ve skupině pacientů s demencí. Tím, že nám chyběla dotazníková data od kontrolní skupiny nelze s jistotou říci, že rizikové faktory potvrzené v rámci výzkumu jsou dostatečně průkazné. Pro potvrzení těchto tvrzení by bylo vhodné vyšetřit větší soubory pacientů i kontrol a doplnit dotazníková data získaná nejen od pacientů, ale i od kontrolní skupiny. I přes zmíněné limity poskytuje dotazníková část práce zajímavé výsledky odlišující různé formy demence.

Genetické pozadí demencí je stále předmětem rozsáhlých vědeckých výzkumů. Geny *APOE*, *MTHFR* a *COMT* a jejich polymorfismy by měly i přes poněkud rozdílná tvrzení jednotlivých studií být stále zkoumány, neboť ovlivňují mnoho biologických pochodů v organismu. V naší studii se jevil jako daleko významnější pro výskyt AD gen *COMT*, který je asociován také s výskytem závislostí, ve srovnání s genem *APOE*, který v multivariantní analýze nevyšel ani jako indikativní. Pokud by se podařilo najít další významné rizikové faktory zapříčínující demenci, mohla by být vyvinuta odpovídající léčba, nebo zavedena účinná preventivní opatření, která by při včasném nastolení výskytu demence alespoň významně oddálila.

7 ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byly shrnuty poznatky o syndromu demence a jeho možné asociaci jak s vnějšími, tak s genetickými rizikovými faktory. Demence se vzhledem k celosvětově rostoucímu množství jejího výskytu a nevléčitelnosti stává jednou z nejčastěji zkoumaných chorob. Toto téma jsem si zvolila vzhledem k jeho aktuálnosti a závažnosti

Cílem experimentální části práce bylo vyšetřit u vybraných jedinců výskyt genotypových frekvencí pro geny *APOE*, *MTHFR* a *COMT* pomocí metod molekulární biologie. Všechny genetické analýzy byly provedeny úspěšně. Dalším cílem bylo vytvoření dotazníku reflektujícího vnější rizikové faktory demence a statistické hodnocení získaných dat. Z našeho výzkumu vyplývá, že nosičství rizikových alel, kterou je například alela E4 genu *APOE*, neznamená, že se u jedince demence s jistotou rozvine. V rámci diplomové práce však byla zjištěna souvislost homozygotní varianty Met/Met polymorfismu genu *COMT* se zvýšeným užíváním alkoholu a rozvojem AD.

I přes omezený počet participantů je toto zjištění statisticky významné a ukazuje, že polymorfismus v genu *COMT* Val158Met ovlivňující hladinu exprese enzymu COMT je nepochybně důležitý. Jeho predispoziční vliv by mohl být využíván pro predikci náchylnosti k závislostem a mohl by přispět také k preventivním opatřením oddalujícím výskyt demence.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AARSLAND, D.; ANDERSEN, K.; LARSEN, J., P.; LOLK, A. (2003): Prevalence and Characteristics of Dementia in Parkinson Disease. *Archives of Neurology*. **60**(3). ISSN 0003-9942.
2. ABONDIO, P.; SAZZINI, M.; GARAGNANI, P.; BOATTINI, A.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C.; LUISELLI, D.; GIULIANI, C. (2019): The Genetic Variability of APOE in Different Human Populations and Its Implications for Longevity. *Genes*. **10**(3). ISSN 2073-4425.
3. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. (2005): Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care*. (28), 537-542.
4. ANTTILA, T.; HELKALA, E.L.; VIITANEN, M.; KÅREHOLT, I.; FRATIGLIONI, L.; WINBLAD, B.; SOININEN, H.; TUOMILEHTO, J.; NISSINEN, A.; KIVIPELTO, M. (2004): Alcohol drinking in middle age and subsequent risk of mild cognitive impairment and dementia in old age: a prospective population based study. *BMJ*. 329(7465):53.
5. BERÁNEK, M., FRIEDECKÝ, B., PALIČKA, V. (1999): Heterogeneity of the frequency of the lipoprotein E- 4 allele in the European population. *Čas Lék Čes.***138** (16): p. 500-503.
6. BERTRAM, L.; LILL, CH. M.; TANZI, R. E. (2010): The Genetics of Alzheimer Disease: Back to the Future. *Neuron*; **68**(2), 270-281. ISSN 08966273.
7. BILDER, R. M.; VOLAVKA, J.; LACHMAN, H. M.; GRACE, A. A. (2004): The Catechol-O-Methyltransferase Polymorphism: Relations to the Tonic-Phasic Dopamine Hypothesis and Neuropsychiatric Phenotypes. *Neuropsychopharmacology*. **29**(11): 1943-1961. ISSN 0893-133X.
8. BILLIOTI DE GAGE, S., MORIDE, Y.; DUCRUET, T.; KURTH, T.; VERDOUX, H.; TOURNIER, M.; PARIENTE, A.; BEGAUD, B. (2014): Benzodiazepine use and risk of Alzheimer's disease: case-control study. *BMJ*. **349**(sep09 2), g5205-g5205. ISSN 1756-1833.
9. BONAIUTO, S.; ROCCA, W.A; LIPPI, A.; GIANNANDREA, E.; MELE, M.; CAVARZERAN, F.; AMADUCCI, L. (1995): Education and Occupation as Risk Factors for Dementia: A Population-Based Case-Control Study. *Neuroepidemiology*. **14**(3), 101-109. ISSN 0251-5350.

10. BONIFÁCIO, M. J.; PALMA, P. N.; ALMEIDA, L.; SOARES-DA-SILVA, P. (2007): Catechol-O-methyltransferase and Its Inhibitors in Parkinson's Disease. *CNS drug reviews*. **13**(3): 352-379. ISSN 1080-563X.
11. BOWIR RAT, A.; OSCAR-BERMAN, M. (2005): Relationship between dopaminergic neurotransmission, alcoholism, and reward deficiency syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. **132B**(1), 29-37. ISSN 15524841.
12. BRUNS, J.; HAUSER, W. A. (2003): The Epidemiology of Traumatic Brain Injury: A Review. *Epilepsia*. **44**, 2-10. ISSN 00139580.
13. CHAUDHARY, A.; KUMAR, P.; RAI, V. (2021): Catechol-O-methyltransferase (COMT) Val158Met Polymorphism and Susceptibility to Alcohol Dependence. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. ISSN 0970-1915.
14. CHEN, J.; LIPSKA, B. K.; HALIM, N., et al. (2004): Functional Analysis of Genetic Variation in Catechol-O-Methyltransferase (COMT): Effects on mRNA, Protein, and Enzyme Activity in Postmortem Human Brain. *The American Journal of Human Genetics*., **75**(5): 807-821. ISSN 0002-9297.
15. CLARKE, R.; SMITH, A. D.; JOBST, K. A.; REFSUM, H.; SUTTON, L.; UELAND, P. M. (1998): Folate, Vitamin B12, and Serum Total Homocysteine Levels in Confirmed Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*. **55**(11). ISSN 0003-9942.
16. DI CHIARA, G. (1997): Alcohol and dopamine. *Alcohol health and research world*, **21**(2), 108–114.
17. EGLIT, G. M. L.; WEIGAND, A.J.; NATION, D.A.; BONDI, M.W.; BANGEN, K.J. (2020): Hypertension and Alzheimer's disease: indirect effects through circle of Willis atherosclerosis. *Brain Communications*. **2**(2). ISSN 2632-1297.
18. FARLOW, J.; FOROUD, T. (2013): The Genetics of Dementia. *Seminars in Neurology*. **33**(04), 417-422. ISSN 0271-8235.
19. FENCLOVÁ, E.; ALBRECHT, J.; HARSÁ, P.; JIRÁK, R. (2020): Rizikové faktory Alzheimerovy nemoci. *Čes a slov Psychiatr*. **116**(2), 59-65.
20. FROESE, D. S., HUEMER, M., SUORMALA, T., BURDA, P., COELHO, D., GUÉANT, J. L.; BAUMGARTNER, M. R. (2016): Mutation Update and Review of Severe Methylene tetrahydrofolate Reductase Deficiency. *Human Mutation*, **37**(5), 427-438.
21. FROSST, P., BLOM, H.J.; MILOS, R.; et al. (1995): A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylene tetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*. **10**(1), 111-113.

22. GHRIBI, O. (2008): Potential Mechanisms Linking Cholesterol to Alzheimer's Disease-like Pathology in Rabbit Brain, Hippocampal Organotypic Slices, and Skeletal Muscle. *Journal of Alzheimer's Disease*. **15**(4), 673-684. ISSN 18758908.
23. GRAHAM, N. SN.; SHARP, D.J. (2019): *Understanding neurodegeneration after traumatic brain injury: from mechanisms to clinical trials in dementia*. **90**(11), 1221-1233. ISSN 0022-3050.
24. HALLMAN, D.M., BOERWINKLE, E., SAHA, N. et al. (1991): The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet*. **49**: p. 338-349.
25. HOLMEROVÁ, I.; JAROLÍMOVÁ, E.; SUCHÁ, J. (2007): Péče o pacienty s kognitivní poruchou. Praha: Pro Gerontologické centrum vydalo EV public relations. Vážka. ISBN 978-80-254-0177-4.
26. HURSEL, R.; VIECHTBAUER, W.; DULLOO, A. G.; TREMBLAY, A.; TAPPY, L.; RUMPLER, W.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. (2011): The effects of catechin rich teas and caffeine on energy expenditure and fat oxidation: a meta-analysis. *Obesity reviews*. **12**(7): E573-E581. ISSN 1467-7881.
27. HYÁNEK, J.; MAŤOŠKA, V.; DUBSKÁ, L.; MÍKOVÁ, B.; PEJZNOCHOVÁ, H.; DVOŘÁKOVÁ, J.; TÁBORSKÝ, L.; KOŠAN, L.; MARTINIKOVÁ, V.; PRIVAROVÁ, J.; BRTNOVÁ, J. (2017): Mírné hyperhomocysteinémie z deficitu MTHFR (C677T a C1298A) u dospělých a adolescentů v metabolické ambulanci. Je třeba je diferencovat a léčit? *Klinická biochemie a metabolismus*. **25**(46), 18-26.
28. HYMAN, B.T.; GOMEZ-ISLA, T.; WEST, H.; BRIGGS, M.; CHUNG, H.; GROWDON, J.H.; REBECK, G.W. (1996): Clinical and Neuropathological Correlates of Apolipoprotein E Genotype in Alzheimer's Disease - Window on Molecular Epidemiology. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **777**(1), 158-165. ISSN 00778923.
29. JAFARI, S.; ETMINAN, M.; AMINZADEH, F.; SAMII, A. (2013): Head injury and risk of Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*. **28**(9), 1222-1229. ISSN 08853185.
30. JIRÁK, R. (2004): Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klin Farmakol Farm*. **18**, 212-214.
31. JIRÁK, R.; LAŇKOVÁ, J. (2007): Demence: Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře. *Doporučené postupy pro praktické lékaře*. **2007**, 1-9.

32. JIRÁK, R.; HOLMEROVÁ, I.; BORZOVÁ, C.; FRANKOVÁ, V.; KALVACH, Z.; KONRÁD, J.; VAŇKOVÁ, H.; JAROLÍMOVÁ, E. (2009): Demence a jiné poruchy paměti: Komunikace a každodenní péče. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-2454-6.
33. JOHNSON, B.; STRELTZER, J. (2013): Risks associated with long-term benzodiazepine use. *Am Fam Physician*. 88(4):224-6.
34. KAKIO, A.; NISHIMOTO, S.; YANAGISAWA, K.; KOZUTSUMI, Y.; MATSUZAKI, K. (2001): Cholesterol-dependent Formation of GM1 Ganglioside-bound Amyloid β -Protein, an Endogenous Seed for Alzheimer Amyloid. *Journal of Biological Chemistry*. **276**(27), 24985-24990. ISSN 00219258.
35. KAUKANEN, J.; HALLIKAINEN, T.; TUOMAINEN, T. P.; KOULU, M.; KARVONEN, M. K.; SALONEN, J. T.; TIIHONEN, J. (2000): Association Between the Functional Polymorphism of Catechol-O-Methyltransferase Gene and Alcohol Consumption Among Social Drinkers. *Alcoholism-clinical and experimental research*. **24**(2): 135-139. ISSN 0145-6008.
36. KÁLMÁN, J.; JUHÁSZ, A.; CSÁSZÁR, A.; KANKA, A.; MAGLÓCZKY, E.; BENCSIK, K.; JANKA, Z.; RASKÓ, I. (1997): Apolipoprotein E allele frequencies in patients with late-onset sporadic Alzheimer's dementia in Hungary. *Acta neurologica scandinavica*. 95: 56-59. ISSN 0002-6314.
37. KONRÁD, J. (2004): Demence s Lewyho tělísky, diagnostika, klinický význam, možnosti léčby, kazuistika. *Psychiatrie pro praxi*. (1), 9-11.
38. KOUKOLÍK, F., JIRÁK, R. (1998): Alzheimerova nemoc a další demence. Praha: Grada. ISBN 80-7169-615-3.
39. KRUMAN, I. I.; HENDERSON, G.I.; BERGESON, S.E. (2012): DNA damage and neurotoxicity of chronic alcohol abuse. *Experimental Biology and Medicine*. **237**(7), 740-747. ISSN 1535-3702.
40. LARSSON, S. C.; TRAYLOR, M.; MALIK, R.; DICHGANS, M.; BURGESS, S.; MARKUS, H. S. (2017): Modifiable pathways in Alzheimer's disease: Mendelian randomisation analysis. *BMJ*. 1-6. ISSN 0959-8138.
41. LEE, H. J.; SEO, H.Y.; CHA, H.Y.; YANG, Y.J.; KWON, S.H.; YANG, S.J. (2018): Diabetes and Alzheimer's Disease. *Clinical Nutrition Research*. **7**(4). ISSN 2287-3732.

42. MALHOTRA, A. K.; KESTLER, L. J.; MAZZANTI, C.; BATES, J. A.; GOLDBERG, T.; GOLDMAN, D. (2002): A Functional Polymorphism in the COMT Gene and Performance on a Test of Prefrontal Cognition. *American Journal of Psychiatry*. **159**(4): 652-654. ISSN 0002-953x.
43. MAYEUX, R.; OTTMAN, R.; MAESTRE, G.; et al. (1995): Synergistic Effects of Traumatic Head Injury and Apolipoprotein-epsilon4 in Patients With Alzheimer's Disease. *Neurology*. **45**(3). ISSN 0028-3878.
44. MCCADDON, A.; DAVIES, G.; HUDSON, P.; TANDY, S.; CATELL, H. (1998): Total serum homocysteine in senile dementia of Alzheimer type. *Int J Geriatr Psychiatry*. Apr;13(4):235-9.
45. MCILROY, S. P.; DYNAN, K. B.; LAWSON, J. T.; PATTERSON, CH. C.; PASSMORE, A. P. (2002): Moderately Elevated Plasma Homocysteine, Methylene tetrahydrofolate Reductase Genotype, and Risk for Stroke, Vascular Dementia, and Alzheimer Disease in Northern Ireland. *Stroke*. **33**(10), 2351-2356. ISSN 0039-2499.
46. MEYER, J. S.; MCCLINTIC, K. L.; ROGERS, R.L.; SIMS, P.; MORTEL, K.F. (1988): Aetiological considerations and risk factors for multi-infarct dementia. **51**(12), 1489-1497. ISSN 0022-3050.
47. MORRIS, M. C.; SCHERR, P. A.; HEBERT, L. E.; BENNETT, D. A.; WILSON, R. S.; GLYNN, R. J.; EVANS, D. A. (2000): The Cross-sectional Association Between Blood Pressure and Alzheimer's Disease in a Biracial Community Population of Older Persons. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. **55**(3), M130-M136. ISSN 1079-5006.
48. MUSICCO, M.; PALMER, K.; SALAMONE, G.; et al. (2009): Predictors of progression of cognitive decline in Alzheimer's disease: the role of vascular and sociodemographic factors. *J Neurol* **256**, 1288.
49. NATHOO, N.; CHETTY, R.; VAN DELLEN, J. R.; BARNETT, G. H. (2003): Genetic vulnerability following traumatic brain injury: the role of apolipoprotein E. *Journal of Clinical Pathology*. **56**, 132-136.
50. NOTKOLA, I-L.; SULKAVA, R.; PEKKANEN, J.; ERKINJUNTTI, T.; EHNHOLM, CH.; KIVINEN, P.; TUOMILEHTO, J.; NISSINEN, A. (1998): Serum Total Cholesterol, Apolipoprotein E epsilon e4 Allele, and Alzheimer's Disease. *Neuroepidemiology*. **17**(1), 14-20. ISSN 0251-5350.

51. OUTEIRO, T.M.; KOSS, D.J.; ERSKINE, D.; et al. (2019): Dementia with Lewy bodies: an update and outlook. *Molecular Neurodegeneration*. **14**(1). ISSN 1750-1326.
52. PALMATIER, M. A.; KANG, A. M.; KIDD, K. K. (1999): Global variation in the frequencies of functionally different catechol-O-methyltransferase alleles. *Biological psychiatry*. **46**(4): 557-567. ISSN 0006-3223
53. PEREIRA, P. A.; ROMANO-SILVA, M. A.; BICALHO, M. A. C.; et al. (2012): Catechol-O-Methyltransferase Genetic Variant Associated with the Risk of Alzheimer's Disease in a Brazilian Population. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. **34**(2): 90-95. ISSN 1420-8008.
54. PETROVITCH, H.; WHITE, L.R.; IZMIRILIAN, G.; et al. (2000): Midlife blood pressure and neuritic plaques, neurofibrillary tangles, and brain weight at death: the HAAS☆. *Neurobiology of Aging*. **21**(1), 57-62. ISSN 01974580.
55. PIDRMAN, V. (2007): DEMENCE: 1. ČÁST: DIAGNOSTIKA A DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA. *Med. pro praxi*. (2), 83-88.
56. PILAŘOVÁ, L., Mudr. (2003): Problematika závislosti na nikotinu. *Psychiatrie pro praxi*. **5**, 205-208.
57. POEWE, W.; SEPPI, K.; TANNER, C.M.; HALLIDAY, G.M.; BRUNDIN, P.; VOLKMANN, J.; SCHRAG, A.E.; LANG, A.E. (2017): Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*. **3**(1). ISSN 2056-676X.
58. PRINZ-LANGENOHL, R.; BRÄMSWIG, S.; TOBOLSKI, O.; SMULDERS, Y. M.; SMITH, D. E. C.; FINGLAS, P.M.; PIETRZIK, K. (2009): [6S]-5-methyltetrahydrofolate increases plasma folate more effectively than folic acid in women with the homozygous or wild-type 677C→T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase. *British Journal of Pharmacology*. **158**(8), 2014-2021.
59. RAI, V. (2017): Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Polymorphism and Alzheimer Disease Risk: a Meta-Analysis. *Molecular Neurobiology*. **54**(2), 1173-1186. ISSN 0893-7648.
60. RAWLE, M. J.; DAVIS, D.; BENDAYAN, R.; WONG, A.; KUH, D.; RICHARDS, M. (2018): Apolipoprotein-E (ApoE) ε4 and cognitive decline over the adult life course. *Translational Psychiatry*. **8**(1).
61. REFOLO, L. M.; PAPPOLLA, M. A.; MALESTER, B.; et al. (2000): Hypercholesterolemia Accelerates the Alzheimer's Amyloid Pathology in a Transgenic Mouse Model. *Neurobiology of Disease*. **7**(4), 321-331. ISSN 09699961.

62. REKTOROVÁ, I. (2005): Parkinsonova nemoc, antiparkinsonika a kognitivní funkce. *Remedia*. **6**(15), 528-533.
63. REKTOROVÁ, I. (2009): Neurodegenerativní demence. *Cesk Slov Neurol N*. **105**(2), 97-109.
64. ROSTAMI, H. N.; SAVILLE, C. W. N.; KLEIN, C.; OUYANG, G.; SOMMER, W.; ZHOU, C.; HILDEBRANDT, A. (2017): COMT genotype is differentially associated with single trial variability of ERPs as a function of memory type. *Biological psychology*. 209-219. ISSN 0301-0511.
65. RUSANEN, M.; KIVIPELTO, M.; QUESENBERRY, CH. P.; ZHOU, J.; WHITMER, R. A. (2011): Heavy Smoking in Midlife and Long-term Risk of Alzheimer Disease and Vascular Dementia. *Archives of Internal Medicine*. **171**(4). ISSN 0003-9926.
66. RŮŽIČKA, E. (2006): Parkinsonova nemoc. *Čes. a slov. Neurol. Neurochir*. **69**(102), 249-258.
67. SERRETTI, A.; OLGATI, P. (2012): Catechol-O-Methyltransferase and Alzheimer's Disease: A Review of Biological and Genetic Findings. **11**(3): 299-305. ISSN 18715273.
68. SESHADRI, S.; SHEA, T. (2006): Elevated plasma homocysteine levels: Risk factor or risk marker for the development of dementia and Alzheimer's disease? *Journal of Alzheimer's Disease*. **9**(4), 393-398. ISSN 18758908.
69. SKOOG, I.; NILSSON, L.; PERSSON, G.; et al. (1996): 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *The Lancet*. **347**(9009), 1141-1145. ISSN 01406736.
70. SMITH, A. D. (2008): The Worldwide Challenge of the Dementias: A Role for B Vitamins and Homocysteine? *Food and Nutrition Bulletin*. **29**(2_suppl1). ISSN 0379-5721.
71. SMITH, A. D.; SMITH, S. M.; DE JAGER, C.A.; et al. (2010): Homocysteine-Lowering by B Vitamins Slows the Rate of Accelerated Brain Atrophy in Mild Cognitive Impairment: A Randomized Controlled Trial. *PLoS ONE*. **5**(9).
72. STERN, Y.; ALBERT, S.; TANG, M.-X.; TSAI, W.-Y. (1999): Rate of memory decline in AD is related to education and occupation. *Neurology*. **53**(9), 1942-1942. ISSN 0028-3878.
73. STRÁNSKÝ, M., doc. MUDr. (2011): Preventivní účinky kyseliny listové. *Interní medicína pro praxi*. **13**(4), 159–162.
74. SUN, Y.P.; ZHANG, B.; MIAO, L.; et al. (2015): Association of apolipoprotein E (ApoE) polymorphisms with risk of primary hyperuricemia in Uygur men, Xinjiang, China. *Lipids in Health and Disease*. **14**(1). ISSN 1476-511X.

75. SWAN, G. E.; LESSOV-SCHLAGGAR, CH. N. (2007): The Effects of Tobacco Smoke and Nicotine on Cognition and the Brain. *Neuropsychology Review*. **17**(3). ISSN 1040-7308.
76. TAHARA, T.; SHIBATA, T.; ARISAVA, T.; NAKAMURA, M.; YAMASHITA, H.; YOSHIOKA, D.; OKUBO, M.; MARUYAMA, N.; KAMANO, T.; KAMIYA, Y.; FUJITA, H.; et al. (2009): Impact of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphism on promoter methylation status in gastric mucosa. *Anticancer research*.
77. TIIHONEN, J.; HALLIKAINEN, T.; LACHMAN, H.; SAITO, H.; VOLAVKA, J.; KAUKHANEN, J.; SALONEN, J. T.; et al. (1999): Association between the functional variant of the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and type 1 alcoholism. *Molecular psychiatry*. **4**(3): 286-289. ISSN 1359-4184
78. TYAS, S. L., (2001): Alcohol Use and the Risk of Developing Alzheimer's Disease. *Alcohol Research & Health*. **25**(4), 299-306.
79. WAN, L.; LI, Y.; ZHANG, Z.; SUN, Z.; HE, Y.; LI, R. (2018): Methylenetetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases. *Translational Psychiatry*. **8**(1). ISSN 2158-3188.
80. WANG, T.; FRANKE, P.; NEIDT, H.; CICHON, S.; KNAPP, M.; et al. (2001): *Molecular Psychiatry*. **6**(1). ISSN 1359-4184.
81. WILLIAMS-GRAY, C. H., HAMPSHIRE, A.; BARKER, R. A.; OWEN, A. M. (2008): Attentional control in Parkinson's disease is dependent on COMT val158met genotype. *Brain*. 397-408. ISSN 0006-8950.
82. ZAJÍC, J. (2012): Hypertenze ve vysokém věku: Nikdy není pozdě na léčbu. *Interní Med*. 14(4). 161-164.
83. ZENDE, P. D.; BANKAR, KAMBLE, A.; MOMIN, A. (2013): Apolipoprotein E Gene Polymorphism And Its Effect On Plasma Lipids In Arteriosclerosis. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. **7**(10), 2149-2152. ISSN 2249782X.
84. ZHONG, G.CH., Yi, W.; ZHANG, Y.; ZHAO, Y.; ALEMAN, A. (2015): Association between Benzodiazepine Use and Dementia: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*. **10**(5). ISSN 1932-6203.
85. ZVĚŘOVÁ, M. (2017): *Alzheimerova demence*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0561-8.

9 INTERNETOVÉ ZDROJE

1. Amyloid Plaques and Neurofibrillary Tangles, 2015. In: *BrightFocus Foundation* [online]. [cit. 2021-03-03].
Dostupné z: <https://www.brightfocus.org/alzheimers-disease/infographic/amyloid-plaques-and-neurofibrillary-tangles>
2. APOE Gene, 2021. In: *GeneCards* [online]. Weizmann Institute of Science [cit. 2021-03-10]. Dostupné z:
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=APOE&keywords=apoe>
3. COMT Gene, 2021. In: *GeneCards* [online]. Weizmann Institute of Science [cit. 2021-03-10]. Dostupné z:
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=COMT&keywords=comt>
4. Dementia, 2020. *World Health Organization* [online]. [cit. 2021-04-04]. Dostupné z:
<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
5. MTHFR Gene, 2021. In: *GeneCards* [online]. Weizmann Institute of Science [cit. 2021-03-10]. Dostupné z:
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MTHFR&keywords=mthfr>
6. Zpráva o stavu demence 2014 [online]. In: *ČALS*. [cit. 2021-04-13]. Dostupné z:
<http://www.alzheimer.cz/res/archive/003/000389.pdf?seek=1455022795>

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Četnost nejčastějších příčin demence (převzato a upraveno dle: Zpráva o stavu demence 2014 [online]).	7
Obr. 2: Znázornění amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek u Alzheimerovy choroby a srovnání se zdravými neurony (převzato a upraveno dle Amyloid Plaques and Neurofibrillary Tangles [online]).	11
Obr. 3: Umístění genu <i>APOE</i> na chromozomu 19 (převzato z <i>APOE Gene</i> [online]).	15
Obr. 4: Umístění genu <i>MTHFR</i> na chromozomu 1 (převzato z <i>MTHFR Gene</i> [online]). ...	16
Obr. 5: Umístění genu <i>COMT</i> na chromozomu 22 (převzato z <i>COMT Gene</i> [online]).	18
Obr. 6: Příklad produktů restrikčního štěpení genu <i>MTHFR</i> (zdroj vlastní).	31
Obr. 7: Grafické znázornění zastoupení jednotlivých genotypů u testovaných skupin pro gen <i>MTHFR</i>	32
Obr. 8: Příklad amplifikačních produktů několika alel <i>APOE</i> (zdroj vlastní).	33
Obr. 9: Grafické znázornění zastoupení jednotlivých genotypů u testovaných skupin pro gen <i>APOE</i>	33
Obr. 10: Příklad produktů restrikčního štěpení genu <i>COMT</i> (zdroj vlastní).	35
Obr. 11: Grafické znázornění zastoupení jednotlivých genotypů u testovaných skupin pro gen <i>COMT</i>	36
Obr. 12: Distribuce alel genu <i>COMT</i> mezi jednotlivými skupinami. (CCA analýza, Pseudo-F=3.6, P=3.6, P=0.034). Z grafu je patrné rozmístění testovaných skupin a jednotlivých genotypů genu <i>COMT</i> , tzn. Pro genotyp Val/Val je signifikantní výskyt ve skupině s demencí, genotyp Met/Met se nejvíce objevuje ve skupině s Alzheimerovou demencí a genotyp Val/Met je nejvíce zastoupen v kontrolní skupině.	36
Obr. 13: Distribuce alel v souvislosti s vnějšími rizikovými faktory v jednotlivých skupinách (CCA analýza; Pseudo-F=53; P=0.002), I. A II. Ordinační osa I. A II. Dohromady vysvětlují 70.21 %.	38

11 SEZNAM TABULEK

Tab. I: Reagencie izolačního kitu GenneAll® Exgene™Clinic SV mini použité pro izolaci DNA z 200 µl plné krve.	21
Tab. II: Sekvence primerů pro PCR reakci pro geny <i>COMT</i> a <i>MTHFR</i>	22
Tab. III: Složení reakčního mixu pro polymorfismus C677T.	23
Tab. IV: Teplotní profil pro detekci polymorfismu <i>MTHFR</i> C677T.	23
Tab. V: Složení MasterMixu pro polymorfismus Val158Met.	24
Tab. VI: Teplotní profil pro detekci polymorfismu Val158Met.	24
Tab. VII: Přehled produktů restrikčního štěpení metody PCR-RFLP odpovídajících jednotlivým genotypům.	26
Tab. VIII: Sekvence primerů pro PCR reakci pro gen <i>APOE</i>	27
Tab. IX: Složení reakčních mixů pro reakci PCR ARMS genu <i>APOE</i>	27
Tab. X: Teplotní profil reakce PCR ARMS.	28
Tab. XI: Velikosti PCR produktů pro gen <i>APOE</i>	29
Tab. XII: Věkové zastoupení testovaných jedinců v jednotlivých skupinách.	30
Tab. XIII: Zastoupení genotypů u testovaných skupin pro polymorfismus C677T genu <i>MTHFR</i>	31
Tab. XIV: Zastoupení jednotlivých genotypů u testovaných skupin pro gen <i>APOE</i>	34
Tab. XV: Zastoupení jednotlivých genotypů u testovaných skupin pro gen <i>COMT</i>	35

12 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Informovaný souhlas.	57
Příloha č. 2: Dotazník.	59
Příloha č. 3: Výsledné genotypy a typ onemocnění u jedinců z testovaných skupin.	61

Příloha č. 1: Informovaný souhlas.

Genlabs s.r.o.
Poliklinika Medipont
Matice školské 1786/17
370 01 České Budějovice



Souhlas vyšetřované/ho (zákonného zástupce) s genetickým laboratorním vyšetřením

Údaje o vyšetřované osobě:

Jméno a příjmení:

Rodné číslo:

Pojišťovna:

Jméno a příjmení zákonného zástupce:

Vztah k vyšetřované osobě:

PROHLÁŠENÍ VYŠETŘOVANÉ OSOBY

1) Za účelem vědeckého výzkumu souhlasím s odběrem dále uvedeného vzorku z mého těla a s provedením těchto vyšetření:

Molekulárně genetická vyšetření

Ze vzorku: žilní krev

2) Souhlas vyšetřované osoby/zákonného zástupce:

Potvrzuji, že rozumím níže uvedeným bodům:

- Účel, povaha, předpokládaný přínos genetického laboratorního vyšetření
- Možný dopad výsledků genetického vyšetření na mé zdraví, na zdraví mých potomků (budoucích generací) a zdraví geneticky příbuzných osob

Měl/a jsem možnost vše si řádně, v klidu a v dostatečně poskytnutém čase zvážit vše, co jsem považoval/a za pro mě podstatné a potřebné vědět a probrat s výzkumníkem vše, čemu jsem nerozuměl/a. Na ty to mé dotazy jsem dostal/a jasnou a srozumitelnou odpověď.

3) Rozhodl/a jsem, že se vzorkem bude po ukončení testování naloženo takto:

Souhlas se skladováním

Pokud to bude možné a/nebo účelné, bude můj vzorek skladován pro další vyšetření provedená k mému prospěchu a prospěchu mých příbuzných. Před genetickým vyšetřením, které by se provádělo za jinými účely, než je uvedeno v části 1) budu řádně poučen/a a toto vyšetření bude vždy provedeno až s novým informovaným souhlasem. Vzorek bude skladován u poskytovatele zdravotních služeb uvedeného v záhlaví nebo v laboratoři spolupracujícího poskytovatele, a to nejvýše po dobu 50 let.

- Jestliže bude vzorek mého biologického materiálu dále skladován, **souhlasím/nesouhlasím*** s jeho využitím ke kontrole kvality DNA diagnostiky (vzorek je použit jako kontrola pro vyšetření jiného pacienta).
- **Souhlasím/nesouhlasím*** s anonymním využitím skladovaného biologického materiálu v lékařském výzkumu dědičných onemocnění.
- **Souhlasím/nesouhlasím*** s tím, že mohu být znovu kontaktován/a, na adrese uvedené ve zdravotnické dokumentaci, za účelem souhlasu s využitím mého skladovaného biologického materiálu v konkrétním výzkumném projektu.

Nesouhlas se skladováním

Můj vzorek bude po provedení genetického laboratorního vyšetření zlikvidován s tím rizikem, že nebude již možné v budoucnosti výsledek vyšetření v případě potřeby znovu ověřit, a že zlikvidování vzorku může vést ke zhoršení dostupnosti diagnostiky u rodinných příslušníků. Dále jsem si vědom, že pro další genetické testování bude nutný nový odběr materiálu.

4) Dále si přeji následující:

- Abych s výsledky genetického laboratorního vyšetření: **byl(a) / nebyl(a) seznámen(a)***
- Aby o **výsledcích vyšetření a/nebo neočekávaných nálezech*** byly informovány následující osoby:
- **Souhlasím/ nesouhlasím*** s využitím výsledků genetického laboratorního vyšetření a relevantních informací o mém zdravotním stavu, včetně fotodokumentace, k vědeckým a výukovým účelům za podmínky, že tyto údaje budou prezentovány a publikovány pouze v anonymní formě.

Na základě tohoto poučení prohlašuji, že souhlasím s odběrem příslušného vzorku z mého těla a s provedením výše popsaného genetického laboratorního vyšetření s podmínkami uvedenými výše.

Jsem si vědom/a, že svůj souhlas mohu kdykoliv písemně odvolat.

Podpis vyšetřované osoby (zákonného zástupce)

V

Dne

* vybranou variantu označte

Příloha č. 2: Dotazník.

Genlabs s.r.o.
Poliklinika Medipont
Matice školské 1786/17
370 01 České Budějovice



DOTAZNÍK PRO VĚDECKÝ VÝZKUM

Projekt vznikl ve spolupráci genetické laboratoře GENLABS s.r.o. a Přírodovědecké fakulty JU, katedry Medicínské biologie a je finančně podpořen Studentskou grantovou agenturou (SGA) PŘF JU.

1) Bylo vám diagnostikováno nějaké neurodegenerativní/ psychiatrické* onemocnění?

ANO/NE

2) Pokud ano, jedná se o toto onemocnění:

- Neurodegenerativní demence
- Alzheimerova choroba
- Parkinsonova choroba
- Sekundární (symptomatická) demence
- Demence s Lewyho tělísky
- Vaskulární demence
- Smíšená demence (AD a vaskulární současně)
- nespecifikovaná demence
- schizofrenie/psychóza
- jiné _____

3) V kolika letech Vám byla diagnostikována demence?

- méně než 50 let 50-59 let 60-69 let 70-79 let více

4) Vyskytuje se ve Vaší rodině ještě někdo další s Alzheimerovou chorobou? **ANO/NE**

Pokud ano jaký je Váš příbuzenský vztah?

příbuzenský vztah: _____

5) Vyskytuje se ve Vaší rodině ještě někdo další s neurodegenerativním onemocněním typu demence? **ANO/NE**

Pokud ano jaký je Váš příbuzenský vztah?

příbuzenský vztah: _____

typ onemocnění: _____

6) Jaké léky pravidelně užíváte?

7) Jaké je vaše nejvyšší dosažené vzdělání?

- základní
- učební obor
- středoškolské (s maturitou/bez maturity*)
- vysokoškolské

8) Jaké bylo Vaše povolání?

9) Jak často jste dříve sportoval(a)? **ANO/NE**

- denně
- alespoň 1x týdně
- alespoň 1x měsíčně

10) Kouřil(a) jste případně kouříte? **ANO/NE** Příležitostně

11) Pil(a) jste alkohol? **ANO/NE** Příležitostně

12) Trpíte onemocněním *Diabetes mellitus 2. typu*? **ANO/NE**

13) Vyskytovalo se u Vás toto onemocnění již před začátkem demence? **ANO/NE**

14) Léčíte se s vysokým krevním tlakem? **ANO/NE** Od kolika let? _____

15) Vyskytuje se u Vás vysoká hladina cholesterolu? **ANO/NE**

16) Užíval(a) jste dříve benzodiazepiny (léky k mírnění úzkostných poruch a nespavosti)?
ANO/NE

17) Utrpěl(a) jste někdy traumatické poškození mozku? **ANO/NE**

Před výskytem demence? **ANO/NE**

ČÍSLO INFORMOVANÉHO SOUHLASU:

VYPLNIL:

PRIMÁRNÍ VZOREK: bukální stěr/periferní krev*

DATUM:

DATUM ODBĚRU:

*nehodící se škrtněte

Příloha č. 3: Výsledné genotypy a typ onemocnění u jedinců z testovaných skupin.

	LIČ	ROK NAROZENÍ	GEN APOE	GEN COMT	GEN MTHFR677	TYP ONEMOCNĚNÍ
1	A1	1944	E3/E3	Met/Met	CT	Alzheimerova choroba
2	A2	1927	E3/E3	Val/Met	CC	Alzheimerova choroba
3	A6	1931	E3/E3	Met/Met	CT	Alzheimerova choroba
4	A7	1935	E4/E3	Met/Met	CT	Alzheimerova choroba
5	A8	1938	E4/E3	Met/Met	CC	Alzheimerova choroba
6	A10	1934	E3/E3	Val/Met	CC	Alzheimerova choroba
7	A11	1931	E3/E3	Met/Met	CT	Alzheimerova choroba
8	A17	1934	E4/E3	Val/Met	CT	Alzheimerova choroba
9	A21	1939	E3/E3	Met/Met	CT	Alzheimerova choroba
10	A22	1931	E3/E3	Met/Met	CT	Alzheimerova choroba
11	A26	1947	E3/E3	Val/Val	CT	Alzheimerova choroba
12	A27	1942	E4/E3	Met/Met	CC	Alzheimerova choroba
13	A29	1937	E3/E3	Val/Val	CT	Alzheimerova choroba
14	A30	1935	E3/E3	Val/Met	TT	Alzheimerova choroba
15	A31	1936	E4/E4	Val/Met	CC	Alzheimerova choroba
16	A33	1940	E3/E3	Val/Met	CC	Alzheimerova choroba
17	S6	1933	E3/E3	Val/Met	CT	Alzheimerova choroba
18	S7	1930	E2/E2	Val/Met	CT	Alzheimerova choroba
19	S8	1948	E3/E3	Met/Met	CC	Alzheimerova choroba
20	A3	1939	E3/E3	Met/Met	CT	smíšená kortikální a subkortikální demence
21	A4	1932	E3/E3	Val/Val	TT	vaskulární demence
22	A5	1927	E3/E3	Met/Met	CC	nespecifická demence
23	A9	1956	E3/E3	Val/Val	CT	neurodegenerativní demence
24	A12	1948	E4/E3	Val/Met	CC	smíšená demence
25	A13	1943	E3/E3	Val/Met	CT	nespecifická demence
26	A14	1936	E4/E3	Val/Val	CC	nespecifická demence
27	A15	1941	E3/E3	Val/Val	TT	nespecifická demence
28	A16	1928	E3/E3	Val/Met	CC	vaskulární demence
29	A18	1931	E3/E3	Met/Met	CT	neurodegenerativní demence, nespecifická demence
30	A19	1949	E3/E3	Val/Val	CT	úzkostná porucha NS
31	A20	1924	E3/E3	Val/Met	CT	neurčená demence
32	A23	1948	E3/E3	Val/Val	CC	neurčená demence
33	A24	1943	E3/E3	Val/Met	CC	nespecifická demence
34	A25	1936	E4/E3	Met/Met	CC	nespecifická demence
35	A28	1952	E3/E3	Val/Met	CC	neurodegenerativní demence

36	A32	1924	E4/E3	Val/Val	TT	nespecifická demence
37	S1	1946	E3/E3	Met/Met	CT	vaskulární demence
38	S2	1922	E3/E3	Val/Met	TT	demence s Lewyho tělísky
39	S3	1945	E3/E3	Met/Met	CT	vaskulární demence
40	S4	1945	E3/E3	Val/Val	TT	vaskulární demence
41	S5	1930	E3/E3	Met/Met	TT	vaskulární demence
42	S10	1948	E4/E3	Val/Met	CT	vaskulární demence
43	S11	1943	E3/E3	Val/Met	CC	vaskulární demence
44	S12	1943	E3/E2	Val/Met	CT	vaskulární demence
45	S13	1929	E4/E3	Val/Met	CC	vaskulární demence
46	S14	1935	E3/E3	Val/Val	CT	vaskulární demence
47	S16	1932	E3/E3	Val/Val	CC	vaskulární demence
48	S17	1950	E3/E3	Met/Met	CC	vaskulární demence
49	S18	1943	E3/E3	Val/Val	CT	vaskulární demence
50	S19	1933	E3/E3	Met/Met	CC	vaskulární demence
51	S20	1932	E3/E3	Val/Met	CC	bez demence
52	S21	1925	E3/E3	Val/Met	CC	bez demence
53	S22	1941	E3/E2	Val/Val	CC	bez demence
54	S23	1938	E3/E2	Met/Met	CC	bez demence
55	S24	1952	E3/E3	Val/Met	CC	bez demence
56	77/17	1948	E3/E3	Val/Met	CC	pravděpodobně bez demence
57	84/17	1940	E3/E3	Val/Met	CT	pravděpodobně bez demence
58	95/17	1948	E3/E3	Val/Met	CT	pravděpodobně bez demence
59	98/17	1949	E2/E4	Val/Val	CT	pravděpodobně bez demence
60	125/17	1944	E3/E3	Val/Met	TT	pravděpodobně bez demence
61	229/17	1947	E3/E3	Met/Met	CC	pravděpodobně bez demence
62	72/17	1954	E3/E3	Val/Met	TT	pravděpodobně bez demence
63	81/17	1953	E3/E3	Val/Met	CC	pravděpodobně bez demence
64	85/17	1954	E3/E3	Val/Met	CT	pravděpodobně bez demence
65	97/17	1953	E4/E3	Val/Met	CT	pravděpodobně bez demence
66	118/17	1950	E3/E3	Val/Met	CC	pravděpodobně bez demence
67	127/17	1945	E3/E4	Val/Met	CT	pravděpodobně bez demence
68	176/17	1946	E3/E3	Val/Val	CC	pravděpodobně bez demence
69	228/17	1950	E3/E3	Val/Met	CT	pravděpodobně bez demence
70	244/17	1949	E3/E2	Val/Met	CT	pravděpodobně bez demence
71	56/18	1949	E3/E3	Val/Met	CT	pravděpodobně bez demence
72	130/17	1955	E3/E3	Met/Met	CT	pravděpodobně bez demence
73	136/17	1952	E3/E3	Val/Met	CC	pravděpodobně bez demence
74	132/17	1949	E4/E2	Val/Val	CC	pravděpodobně bez demence
75	59/17	1954	E3/E3	Val/Met	CT	pravděpodobně bez demence
76	203/17	1948	E3/E2	Met/Met	CT	pravděpodobně bez demence
77	109/17	1956	E3/E3	Met/Met	CC	pravděpodobně bez demence
78	111/17	1956	E3/E3	Val/Met	CC	pravděpodobně bez demence
79	135/17	1956	E2/E3	Met/Met	CC	pravděpodobně bez demence
80	161/17	1956	E3/E3	Met/Met	CC	pravděpodobně bez demence