



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Optimalizace metody real-time PCR pro kvantifikaci
lidské mtDNA v klinických vzorcích

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

Autor: Martin Loskot

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

České Budějovice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Optimalizace metody real-time PCR pro kvantifikaci lidské mtDNA v klinických vzorcích jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne

.....

podpis

Poděkování

Tímto bych chtěl vyjádřit upřímné poděkování své vedoucí bakalářské práce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za její odborné vedení, za cenné rady, zkušenosti a trpělivost, kterou mi věnovala při psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat své rodině, zejména Elišce Švecové, bez jejíž podpory by tato práce nevznikla.

Optimalizace metody real-time PCR pro kvantifikaci lidské mtDNA v klinických vzorcích

Abstrakt

Tato práce se zabývá stanovením mitochondriální DNA (mtDNA) a jejím významem v patologických stavech člověka. Mitochondrie patří mezi buněčné orgány eukaryotických buněk, jsou důležité zejména pro jejich energetický metabolismus a mají významnou roli v procesu stárnutí a apoptózy. Podle recentních studií se mitochondriální dysfunkce kromě mitochondriálních onemocnění podílí také na běžných onemocněních, jako jsou nemoci srdce, mozku nebo rakovina. Ukazuje se, že počet mitochondrií v buňkách koreluje se zdravotním stavem a stárnutím organismu. Buněčný obsah mtDNA se často měří jako poměr mtDNA k jaderné DNA. Měření mtDNA z periferní krve se ukazuje jako vhodný ukazatel mitochondriálních funkcí, neboť snížené množství mtDNA může korelovat se sníženou funkcí mitochondrií. Dosud nebylo objasněno, jak hladina mtDNA ovlivňuje vznik onemocnění, ale ukazuje se, že by mohla být biomarkerem pro kontrolu zdravotního stavu v čase.

Praktická část popisuje přípravu vzorků z buňkách stěrů a periferní krve a metodu stanovení mtDNA pomocí real-time PCR. Výpočet počtu kopií mtDNA z naměřených hodnot a jejich vyhodnocení. V rámci optimalizace měření je uvedeno srovnání dvou různých přístupů pro diagnostiku relativního počtu kopií mtDNA.

Klíčová slova

Mitochondrie; mtDNA; počet kopií mtDNA; zdravotní stav; biomarker; real-time PCR

Optimization of real-time PCR method for quantification of human mtDNA in clinical samples

Abstract

This bachelor thesis dealing with measuring mitochondrial DNA (mtDNA) and how is it important to pathological conditions. Mitochondria are one of the cell organelles in eukaryotic cells. They are important to energy metabolism, aging process, and apoptosis. In current studies mitochondrial dysfunctions cause mitochondrial diseases and common illnesses, for example cardiovascular diseases, brain pathology or cancer. Studies show, that copy number of mtDNA correlates with state of health and aging process. Copy number of mtDNA is often measured by ratio of mtDNA to nuclear DNA. Measuring mtDNA of peripheral blood is appropriate indicators for mitochondrial functions because decreased copy number of mtDNA correlates with decreased function of mitochondria. We don't know, how copy number of mtDNA influence on illnesses, because it doesn't still clarify. However, studies show, that copy number of mtDNA can be biomarker of control of state of health, when we take real time measurement.

In the practical part of this bachelor thesis describe preparation of samples from buccal swabs and from peripheral blood. It also describes method of measuring mtDNA by real-time PCR. There is calculation of copy number of mtDNA and evaluation of our results too. As part of the measurement optimization are described differences between two methods for diagnostic of relative copy number of mtDNA.

Key words

Mitochondria; mtDNA; mtDNA copy number; state of health; biomarker; real-time PCR

Obsah

Úvod.....	8
1. Mitochondriální DNA	10
1.1 Replikace mitochondriální DNA.....	10
1.2 Mutace mitochondriální DNA.....	11
1.2.1 Vznik mutací mtDNA.....	12
1.2.2 Heteroplasmie a homoplasmie.....	12
1.2.3 Homoplasmatické a heteroplasmatické mutace	14
2. Počet kopií mitochondriální DNA jako indikátor zdravotního stavu.....	15
2.1 Kvantifikace počtu kopií mitochondriální DNA.....	16
3. Vliv počtu kopií mtDNA u lidských onemocnění.....	17
3.1 Vliv počtu kopií mtDNA na mitochondriální onemocnění.....	17
3.2 Vliv počtu kopií mtDNA na stárnutí a neurodegenerativní onemocnění.....	18
3.3 Vliv počtu kopií mtDNA na nádorová onemocnění	19
3.4 Role mtDNA u zánětlivých onemocnění	20
3.4.1 Uvolňování mtDNA.....	21
3.5 Souvislost počtu kopií mtDNA s infekčními onemocněními	23
4. Mitochondriální biogeneze.....	25
4.1 Vliv pohybové aktivity na počet kopií mtDNA	26
5. Problematika stanovení mtDNA.....	28
5.1 Omezení metody Real-time PCR.....	28
5.2 Vliv extrakce na stanovení mtDNA	29
5.2.1 Odběry z bukových stěrů nebo ze slin	29
5.3 Heterogenita vzorků.....	29
5.3.1 Rozdíly v počtu kopií mtDNA z jaderných buněk a cf – mtDNA.....	30
6. Cíle práce.....	31
7. Metodika.....	32
7.1 Vyšetřovaný soubor	32
7.2 Izolace DNA.....	32
7.2.1 Izolace z bukových stěrů.....	33
7.2.2 Izolace z periferní krve	34
7.2.3 Přímá izolace.....	35
7.3 Měření koncentrace DNA	35
7.4 Příprava reakční směsi pro PCR	36
7.4.1 Metoda využívající reagenty od firmy Top-Bio s.r.o.....	36

7.4.2	Metoda využívající reagentie od firmy TAKARA BIO INC.....	38
7.5	Real-time PCR	40
7.5.1	Nastavení reakčních profilů PCR	40
7.5.2	Výpočet relativního počtu kopií mtDNA.....	41
8.	Výsledky.....	43
8.1	Popis souboru	43
8.2	Statistické vyhodnocení dat.....	44
8.3	Optimalizace metody	48
9.	Diskuse	58
10.	Závěr	62
11.	Seznam použité literatury	63
12.	Seznam tabulek	74
13.	Seznam obrázků.....	76
14.	Seznam zkratk	77

Úvod

Mitochondrie, důležité orgány eukaryotických buněk, jsou tvořeny dvěma membránami. Na vnitřní membráně probíhá energetický metabolismus, jehož výsledným produktem jsou molekuly ATP. Mitochondrie mají vlastní mitochondriální DNA (mtDNA) a proteosyntetický aparát, jsou tedy schopné samostatné replikace a řadí se mezi tzv. semiautonómni orgány. Lidská mtDNA je děděna výhradně po matce, protože otcovské mitochondrie jsou v oplodněných vajíčkách odstraněny procesem zvaným „mitofagie“.

Nejčastějšími typy mutací mtDNA jsou bodové mutace nebo delece. Mutace v mtDNA jsou prokazatelně spojeny s celou řadou neuromuskulárních onemocnění, kdy negativně ovlivňují metabolismus mitochondrií, zejména oxidativní fosforylaci (OXPHOS) a citrátový cyklus. Tímto jsou poškozeny zejména tkáně závislé na vysokém příjmu energie. Nejvíce je to patrné u nervové tkáně. Mutace se mohou týkat jaderné DNA (nDNA) kódující bílkoviny nezbytné pro mitochondrie nebo samotné mtDNA kódující bílkoviny a enzymy pro OXPHOS. Dle současných studií se ukazuje, že na onemocnění nemá vliv pouze mutace mtDNA, ale i její samotná exprese. To souvisí s poměrným zastoupením různých mitochondrií v buňce. Ty se v buňce vyskytují ve dvou stavech, a to ve stavu homoplasmie a heteroplasmie. Při heteroplasmii se v buňce nachází mitochondrie s mutovanou i normální „nemutovanou“ mtDNA. Pokud tento poměr přesáhne určitou hladinu, začne se projevovat onemocnění. U heteroplasmie se zdá být měření mtDNA důležité, protože může ovlivňovat závažnost onemocnění, nebo dokonce podmiňovat onemocnění jako je syndrom deplece mitochondriální DNA.

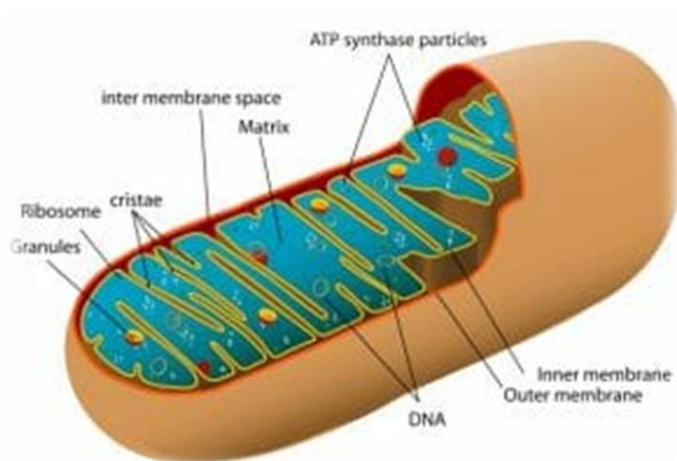
Měření obsahu mtDNA v buňkách periferní krve se ukazuje jako možný biomarker správné mitochondriální funkce, neboť snížené množství mtDNA koreluje se sníženou funkcí mitochondrií. To souvisí i s celkovým zdravotním stavem. V budoucnu by se tedy mohla diagnostika mtDNA rozšířit a používat jako doplňující vyšetření zdravotního stavu pacienta. Výhodou je rychlé provedení testu a odběr nezatěžující pacienta. Recentní studie dokonce poukazují na možnost využití této metody pro diagnostiku některých onemocnění. Snížené hladiny mtDNA jsou popisovány v souvislostech s poškozením mozku a onemocněními jako Alzheimerova choroba, demence až autismus. Zvýšené hodnoty mtDNA se považují za ukazatele dobrého zdravotního stavu například u sportovců, kde jsou zaznamenávány vyšší hodnoty mtDNA ve srovnání s kontrolními

vzorky z běžné populace. Extrémně vysoké hodnoty mohou být naopak ukazatelem patologických dějů v organismu, například u některých typů nádorů. Podle mnoha studií se nacházejí zvýšené hodnoty mtDNA také u kuřáků (Hosgood et al., 2010).

Buněčný obsah mtDNA se často udává jako relativní počet kopií mtDNA, přičemž se měří jako poměr genů mtDNA k vybraným jaderným genům. Tento typ stanovení mtDNA používá nejčastěji metodu real – time PCR. Zásadní problém pro standardizaci metody a její zavedení do praxe představuje postup měření, protože mnoho studií používá nesrovnatelné metodické přístupy k testování mtDNA. Celá řada studií proto přináší rozporuplné výsledky. Počet kopií mtDNA také závisí na typu tkáně, ze které byl vzorek odebrán, protože obsah mtDNA se liší v různých tkáních. Největší zastoupení mtDNA je v buňkách mozku, kosterní svaloviny, srdeční svaloviny a jater. Vysoký obsah mtDNA v těchto tkáních odráží jejich energetickou náročnost.

1. Mitochondriální DNA

Lidské mitochondrie obsahují cirkulární dvouvláknové DNA molekuly. MtDNA se nachází v mitochondriální matrix, kde je uložena do struktury zvané mitochondriální nukleoid. MtDNA má velikost přibližně 16,5 Kb, obsahuje 37 genů kódující 13 proteinových podjednotek nezbytných pro OXPHOS. Zbývající geny potřebné pro mitochondriální funkce se nacházejí v jaderném genomu (Anderson et al., 1981). Ve srovnání s jadernými chromozomy je replikace mtDNA nezávislá na buněčném cyklu a probíhá i v postmitotických buňkách (Filograna et al., 2021). Na rozdíl od jaderného genomu se v mtDNA nachází jen zanedbatelné množství nekódujících sekvencí. Jedná se konkrétně o 3 % mitochondriálního genomu. Jaderný genom je tvořen 93% nekódující DNA (Chial a Craig, 2008). Každá mitochondrie obsahuje několik desítek kopií svého mitochondriálního genomu, přičemž každá buňka obsahuje stovky až tisíce mitochondrií. To znamená, že mtDNA je přítomná v řádu stovek až tisíců kopií v každé buňce (Filograna et al., 2021). Počet kopií mtDNA v buňkách se navíc výrazně řádově liší podle typu tkáně. Nejvíce je mtDNA zastoupena v oocytech a to až $1 \cdot 10^5$ kopií na buňku (Chen et al., 1995). V srdci se tento počet pohybuje okolo $4-6 \cdot 10^3$. V játrech, plicích a ledvinách je to $0,5-2 \cdot 10^3$ kopií na buňku (D'Erchia et al., 2015).



Obrázek 1. Schéma zobrazující stavbu mitochondrie. Autor: Villarreal, M. R. (2006)

1.1 Replikace mitochondriální DNA

Významnou roli při přepisu mtDNA hraje mitochondriální DNA helikáza TWINKLE. Ta je součástí enzymatického aparátu, který zajišťuje replikaci mtDNA a podílí se také na regulaci počtu kopií mtDNA u savců (Sanchez-Martinez et al., 2012). Experimenty na myších, kde byl záměrně vyřazen gen *TWINK* pro tvorbu proteinu TWINKLE, ukázaly,

že knockout tohoto genu způsobuje závažnou depleci mtDNA v srdci a kosterním svalstvu. U myši také došlo k významnému poklesu respiračních funkcí tkání a byla detekována srdeční hypertrofie v souladu s mitochondriální kardiomyopatií. Dále se ukázalo, že regulace počtu kopií mtDNA *in vivo* je přímo závislá na hladinách proteinu TWINKLE (Milenkovic et al., 2013).

Dalším důležitým faktorem, nezbytným pro replikaci mtDNA, je transkripční faktor A tzv. TFAM, jež je zásadní pro regulaci počtu mtDNA (Filograna et al., 2021). TFAM se váže na mitochondriální promotor DNA, a tím napomáhá transkripci mitochondriálního genomu (Fukunaga, 2021). Oblast kódující TFAM byla lokalizována na chromozomu 10q21.1 (Curran et al., 2007). Heterozygotní knockout genu *TFAM* způsobuje pokles hladiny mtDNA až o 50 % (Larsson et al., 1998), zatímco jeho mírná nadměrná exprese zvýší množství mtDNA až o 50–100 % (Larsson et al., 1998; Ekstrand, 2004). Homozygotní knockout genu pro TFAM vykazuje závažnou depleci mtDNA způsobující nefunkčnost OXPHOS. Takto geneticky upravená embrya procházejí gastrulací, ale nedokáží přežít do konce embryonálního vývoje. TFAM je prvním savčím proteinem, u kterého bylo prokázáno, že reguluje počet kopií mtDNA *in vivo* a je nezbytný pro mitochondriální biogenezi a embryonální vývoj (Larsson et al., 1998).

V posledních letech se sice znalosti o replikaci a počtu kopií mtDNA značně rozšířily, ale přesný způsob, jakým se počet kopií udržuje na stále hodnotě, není dosud zcela objasněn. Bylo navrženo několik modelů založených na požadavcích ATP, dostupnosti nukleotidů a regulaci replikačních signálů, které řídí obsah mtDNA. Ztráta mtDNA je běžným sekundárním důsledkem mitochondriální dysfunkce (Filograna et al., 2021).

1.2 Mutace mitochondriální DNA

Mutace v mitochondriální DNA způsobují řadu mitochondriálních onemocnění s různými projevy. Nejčastěji způsobují různorodé myopatie a neuropatie. Nicméně bylo zjištěno, že mutace v mtDNA jsou důležité i u řady běžnějších neurodegenerativních onemocnění (Lax et al., 2011; Kukat et al., 2011).

Vznik patogenních bodových mutací nebo jednotlivých delecí mtDNA genů kódujících proteiny pro správný průběh OXPHOS (Filograna et al., 2021) do značné míry poškozuje mitochondriální metabolismus a podmiňuje tak vznik mitochondriálních onemocnění (Lax et al., 2011). Mitochondriální onemocnění mohou vzniknout také poškozením

jaderných genů. Mutace v jaderných genech jsou schopny napodobovat symptomy podobné těm, které jsou způsobeny defekty mtDNA a vedou k sekundárním poruchám mitochondriálního genomu (Taylor a Turnbull, 2005).

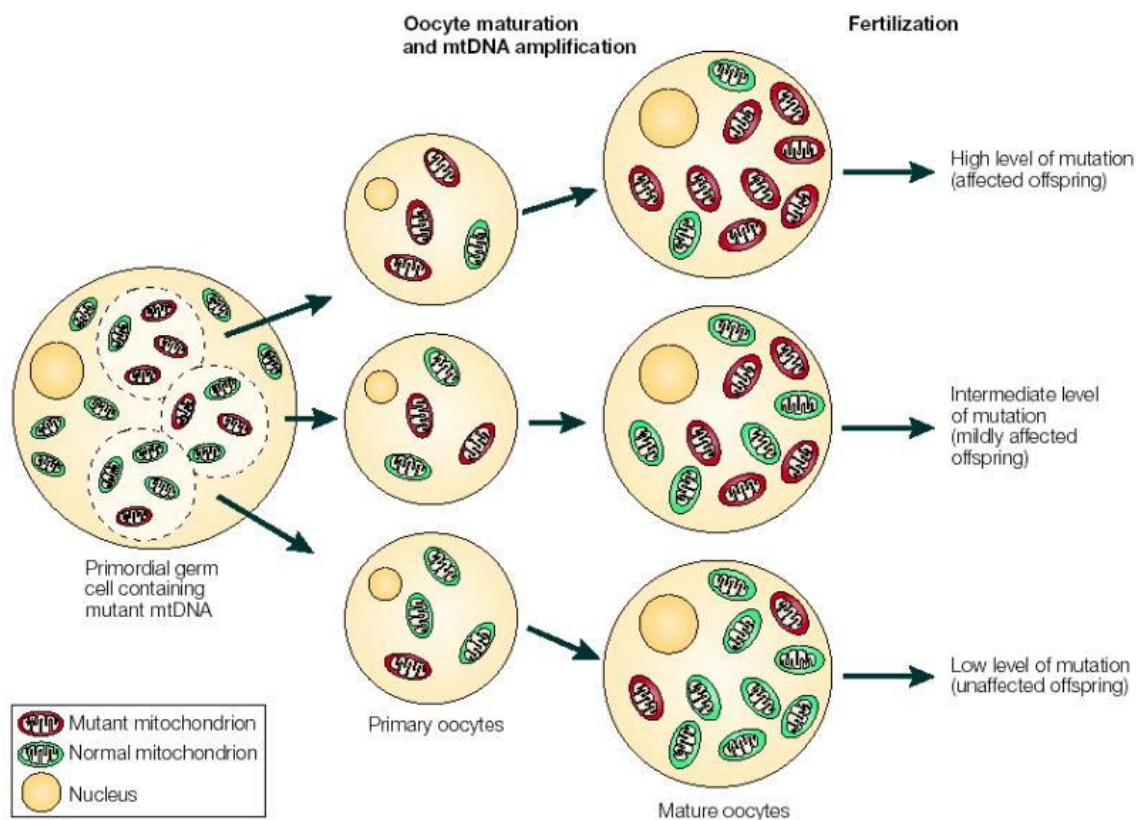
1.2.1 Vznik mutací mtDNA

V mtDNA dochází velice často k mutacím, konkrétně 100 až 1000krát častěji než v jaderném genomu (Brown et al., 1982). Mutace často vznikají spontánními chybami při replikaci DNA, nebo při chybné reparaci poškozených bází. Podle rozšířené teorie založené na oxidačním stresu je hlavní příčinou vzniku mutací mtDNA působení volných radikálů (Alexeyev, 2009). K tomu také přispívá fakt, že mtDNA je přímo v mitochondriích, kde se běžně vyskytuje velké množství volných radikálů účastnících se dýchacího řetězce. Tato teorie byla ovšem zpochybněna, protože experimentální studie na myších prokázaly, že většina mutací mtDNA je výsledkem spontánních replikačních chyb zapříčiněných heterotrimerickými DNA polymerázami gama (POLγ) během syntézy mtDNA (Kauppila et al., 2018; Kennedy et al., 2013). Vysvětlení malé četnosti mutací indukovaných volnými radikály může spočívat v kompaktní povaze mitochondriálního nukleoidu, která poskytuje chráněné prostředí před chemickými vlivy (Filograna et al., 2021).

1.2.2 Heteroplasmie a homoplasmie

Jak již bylo uvedeno v první kapitole mitochondriální genom se vyskytuje v každé jednotlivé buňce v několika kopiích. Tento stav se anglicky nazývá „multicopy genome“. Díky tomu mohou vzniknout dva stavy označované jako heteroplasmie a homoplasmie. Heteroplasmie je stav, kdy se v mitochondriálním genomu společně vyskytuje mutantní mtDNA a normální mtDNA v různém poměru. Oproti tomu homoplasmie nastává, když jsou všechny kopie mitochondriálního genomu identické (Taylor a Turnbull, 2005).

Poměr mutované mtDNA a nemutované mtDNA je do velké míry ovlivněn segregací mtDNA během dozrávání oocyty. Tento proces popisuje všeobecně rozšířená teorie úzkého hrdla tzv. bottleneck effect (Duan et al., 2018). Ta říká, že během vyžívání primárních oocytů je do každého oocyty přenesen určitý počet různých molekul mtDNA. Zrání oocytů je spojeno s rychlou replikací a záleží na přítomnosti mitochondrií s mutovanou a nemutovanou mtDNA. To pak vede k jejich náhodnému rozdělení (Taylor a Turnbull, 2005; Duan et al., 2018).



Obrázek 2. Obrázek znázorňuje proces segregace mitochondrií. Zdroj: (Taylor a Turnbull, 2005)

Nicméně k dělení buněk a náhodné segregaci dochází i během života a poměr mutované DNA a nemutované mtDNA se tak může měnit (Bogenhagen a Clayton, 1977).

Obecně se předpokládá, že ve zdravých lidských buňkách převládá stav homoplasmie. U mnoha různých druhů, včetně lidí, byla však nalezena nízká úroveň heteroplasmie (He et al., 2010). Z tohoto důvodu se zdá, že stav homoplasmie je spíše nepravděpodobný, i vzhledem k častému výskytu mutací a k procesu segregace (Taylor a Turnbull, 2005). Vysvětlením převažující homoplasmie může být náhodný výskyt mutací, a pokud jsou přítomny na nízké úrovni, nemusí být ve vzorku tkáně nebo krve detekovány (Taylor a Turnbull, 2005). Jak uvádí Taylor a Turnbull „Možná bychom měli používat „homoplasmii“ pouze k popisu stavu, ve kterém není možné tyto získané mutace detekovat, protože by bylo naivní myslet si, že veškerá mitochondriální DNA v buňce, tkáni nebo dokonce v jednotlivci je totožná.“ (Taylor a Turnbull, 2005)

1.2.3 Homoplasmatické a heteroplasmatické mutace

Obdobně jako rozlišujeme stav mitochondriálního genomu na homoplasmii a heteroplasmii, můžeme rozdělit mutace mtDNA na homoplasmatické mutace, které postihují všechny kopie mtDNA v buňce, tkáních nebo organismu, a na heteroplasmatické mutace, které postihují jen část (Lightowers et al., 2015). Naprostá většina mutací je heteroplasmatická (Taylor a Turnbull, 2005; Lax et al., 2011; Lightowers et al., 2015). Homoplasmatické mutace jsou vzácnější, neboť jsou často letální a zaniknou ještě na úrovni embrya (Filograna et al., 2021). To ale neznamená, že se homoplasmatické mutace nevyskytují. Jejich exprese závisí to na tom, jaký úsek genomu postihnou. Významným onemocněním, u něhož se uplatňují homoplasmatické mutace, je např. Leberova hereditární optická neuropatie (LHON). Exprese onemocnění je ovšem variabilní, ale ne u všech jedinců, kteří zdělili mutaci pro LHON, onemocnění skutečně propukne. Typické projevy se rozvinou přibližně u 50 % mužů a pouze u 10 % žen, což ukazuje, že při projevu onemocnění jsou důležité i další genetické faktory (Taylor a Turnbull, 2005).

U heteroplasmatických mutací je důležitá nejen povaha mutace, ale i úroveň heteroplasmie, která určuje klinickou závažnost mitochondriálních onemocnění. Byl definován biochemický práh spojený s procentem mutantní mtDNA, který musí být překročen pro snížení funkce OXPHOS a který určuje nástup fenotypu (Rossignol et al., 2003). Působení tohoto biochemického prahu vysvětluje teorie mutační nálože, podle které jsou poškozeny pouze buňky, u kterých zmutovaná DNA přesáhla kritickou hladinu v poměru s nepoškozenou funkční DNA. Prahová hodnota se liší v závislosti na typu mutace a tkáni, kterou postihne. V případě velkých delecí mtDNA je prahová hodnota 50–60 % (Sciacco et al., 1994). Oproti bodovým mutacím v genech kódující tRNA, kde je prahová hodnota více než 90 % (Yoneda et al., 1995).

2. Počet kopií mitochondriální DNA jako indikátor zdravotního stavu

Počet kopií mitochondriální DNA je měřítkem počtu mitochondriálních genomů v jedné buňce. Jedná se o velmi perspektivní indikátor mitochondriálních funkcí (Longchamps et al., 2020). Počet kopií mtDNA je možné zjišťovat nejen ve tkáních odebraných biopsií, ale i v DNA získané izolací z periferní krve. V případě periferní krve je DNA obsažena nejvíce v leukocytech a trombocytech (Picard, 2021). Navíc se mtDNA může vyskytovat také volně v krvi jako cirkulující mimobuněčná mtDNA označovaná zkratkou cf – mtDNA (Trumpff et al., 2021). Je důležité upozornit na rozdíl v počtu kopií buněčné mtDNA, která více méně odpovídá počtu kopií mtDNA na buňku a volně odráží respirační kapacitu v tkáních např. v leukocytech, mozku a svalech (Filograna et al., 2020), a cf – mtDNA, která jakožto signální molekula nekoreluje s množstvím produkované energie, ale ani s počtem kopií mtDNA v cirkulujících leukocytech (Trumpff et al., 2021).

Nesporná výhoda stanovení počtu kopií mtDNA z periferní krve spočívá v její nízké invazivitě. To vedlo k myšlence, zda by se nedalo využít stanovení počtu kopií mtDNA k diagnostice jiných onemocnění. Byla provedena série studií zjišťujících souvislost mezi množstvím mtDNA a mitochondriálními onemocněními a onemocněními souvisejícími s pokročilým věkem (Castellani et al., 2020; Longchamps et al., 2020). Bylo zjištěno, že vyšší hladina počtu kopií mtDNA je spojena se sníženým výskytem kardiovaskulárních onemocnění včetně ischemické choroby srdeční a cévní mozkové příhody (Ashar et al., 2017; Chen et al., 2014). Dále se ukázalo, že snížený počet kopií mtDNA souvisí s výskytem neurodegenerativních poruch, jako je Parkinsonova a Alzheimerova choroba (Pyle et al., 2016; Wei et al., 2017) a také s výskytem několika typů rakoviny včetně rakoviny prsu, ledvin, jater a tlustého střeva (Reznik et al., 2016). Kromě toho se trvale ukazuje, že počet kopií mtDNA měřený z periferní krve je vyšší u žen, s věkem klesá a negativně koreluje s počtem bílých krvinek (Ashar et al., 2015; Knez et al.; Longchamps et al., 2020).

Přesný mechanismus, jakým je počet kopií mtDNA stanovovaný z krve asociován s onemocněními, nebyl dosud zcela objasněn. Dosavadní výsledky studií hovoří o zásadní roli mitochondrií během zánětlivých procesů a o jejich účasti na buněčné signalizaci, které vedou ke změnám v počtu kopií mtDNA (Castellani et al., 2020). Studie z roku 2021 provedená Yang et al. vnesla do problematiky nové světlo. Tato studie zkoumala vztah mezi počtem kopií mtDNA v plné krvi a genovou expresí genů u 419 jedinců. Počet

kopii mtDNA byl významně spojen s expresí 700 genů, včetně jaderných genů potřebných pro replikaci mtDNA. To naznačuje, že hladina počtu kopií mtDNA v periferní krvi by mohla být biomarkerem, který odráží metabolický stav více tkání (Yang et al., 2021).

2.1 Kvantifikace počtu kopií mitochondriální DNA

První používanou metodou pro stanovení mtDNA byla hybridizace southern blot. Přestože se jedná o spolehlivou metodu, z dnešního pohledu je zastaralá a pojí se s řadou nevýhod. Je časově náročná, vyžaduje relativně velké množství DNA a je semikvantitativní (Filograna et al., 2021). V současnosti je nejvíce používanou metodou metoda PCR tedy polymerázová řetězová reakce, zejména real-time PCR, která umožňuje relativní kvantifikaci (Longchamps et al., 2020). Nejčastěji se pomocí real-time PCR stanovuje relativní počet kopií mtDNA, kdy se kvantifikuje gen mitochondrií vzhledem k jadernému genu, za předpokladu, že každá buňka obsahuje jedno jádro a dvě kopie genu a neznámý počet mitochondrií. Následně se určí poměr mitochondriálního genomu k jadernému genomu a vypočítá se relativní počet kopií. Jaderné geny používáme jako referenční geny (Castellani et al., 2020). Ke stanovení absolutního počtu kopií se používá real time PCR využívající kalibrační křivku vytvořenou např. pomocí cílového genu vloženého do referenčního plazmidu (Bratic et al., 2009). Další možností pro stanovení absolutního počtu kopií je digitální kapková PCR (Longchamps et al., 2020). Velký potenciál skrývá metoda masivního sekvenování (NGS), včetně sekvenování celého exomu WES a celého genomu WGS (Longchamps et al., 2020).

3. Vliv počtu kopií mtDNA u lidských onemocnění

Jak již bylo zmíněno, hladiny počtu kopií mtDNA byly reprodukovatelně spojeny s celou řadou onemocnění souvisejících s věkem, včetně kardiovaskulárních onemocnění, neurodegenerativních onemocnění, chronického onemocnění ledvin a rakoviny. Dále se zánětlivými onemocněními, celkovou mortalitou a v neposlední řadě s mitochondriálními onemocněními. Změny v počtu kopií mtDNA předcházejí nástupu onemocnění a souvisí s prevalencí a incidencí mnoha onemocnění (Castellani et al., 2020).

3.1 Vliv počtu kopií mtDNA na mitochondriální onemocnění

Z literatury víme, že pouze samotné mutace nezodpovídají za mitochondriální onemocnění. Zdá se, že i hladina mtDNA významně ovlivňuje prognózu onemocnění. Mitochondriální onemocnění jsou definována jako skupina heterogenních dědičných poruch charakterizovaných deficitem OXPHOS (Filograna et al., 2021). Tyto poruchy mohou postihovat různé typy buněk a orgánů, a proto mohou způsobovat širokou škálu klinických příznaků, na základě kterých byla mitochondriální onemocnění také popsána. Mohou být způsobeny mutacemi v jaderných genech, které vedou ke snížené expresi mtDNA, nebo primárními mutacemi mtDNA, které přímo narušují funkci svých genových produktů (La Morgia et al., 2020). Syndromy deplece mtDNA (MDS) jsou autozomální recesivní poruchy charakterizované specifickým snížením hladiny mtDNA. MDS tak poukazují na přímou souvislost mezi sníženým obsahem mtDNA a patologickými stavy. Význam počtu kopií u jiných mitochondriálních onemocnění však není doposud zcela objasněn (Filograna et al., 2021). Mimo transkripční faktory uvedené v druhé kapitole se diskutuje o vlivu genu *POLGA*, který kóduje katalytickou podjednotku mitochondriální polymerázy POLc, která do jisté míry ovlivňuje počet mtDNA (Dimmock et al., 2010). Důležitým a již dobře popsaným faktorem pro rozvoj mitochondriálních onemocnění jsou hladiny heteroplazmie a homoplazmie. Heteroplazmatické a homoplazmatické patogenní mutace jsou zodpovědné za různé mitochondriální syndromy, včetně známých onemocnění jako jsou MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes), LHON (Leber hereditary optic neuropathy), MERF (myoclonic epilepsy with ragged red fibers) a KSS (Kearns – Sayre syndrome) (Filograna et al., 2021).

Byla provedena řada studií zkoumajících počet kopií mtDNA u pacientů s bodovými mutacemi v mtDNA. Studie Grady et al. (2018) ukázala u pacienta s MELAS nesoucí

heteroplazmatickou mutací m.3243A>G, že vysoký počet mtDNA a nízká hladina heteroplazmie koreluje s méně závažným průběhem onemocnění. (Grady et al., 2018). Další studie zabývající se MELAS a MERF ukázala, že pacienti se středně vysokým počtem kopií mtDNA vykazovali mírnější fenotyp (Liu et al., 2006). Obdobné výsledky se ukázaly i u pacientů s LHON, kteří byli většinou nositeli homoplazmatických mutací. Bylo zjištěno, že asymptomatictí nositelé mutací m.117789G>A nebo m.3460G>A měli vyšší počet kopií mtDNA než pacienti, u kterých došlo ke zrakovému postižení (Bianco et al., 2017). Tato zjištění naznačují, že by mohl existovat vztah mezi počtem kopií mtDNA a vznikem a progresí onemocnění. Zajímavá je myšlenka, že zvýšení počtu kopií mtDNA by mohlo být kompenzačním mechanismem zaměřeným na udržení aktivity OXPHOS. Tato endogenní regulace by mohla zvrátit metabolické defekty způsobené některými mutacemi mtDNA (Filograna et al., 2021; Grady et al., 2018).

3.2 Vliv počtu kopií mtDNA na stárnutí a neurodegenerativní onemocnění

Stárnutí je fyziologický proces, vyznačující se pomalým a postupným úbytkem fyziologických funkcí. Tento proces zahrnuje i úpadek mitochondriálních funkcí (Beregi a Regiusi, 1987). U stárnoucích jedinců byl nalezen zvýšený výskyt mutací mtDNA (Larsson, 2010). Experimenty na myších ukazují, že vlivem poškození POLc dochází k postupnému hromadění mutací v mtDNA, což způsobuje některé příznaky syndromu předčasného stárnutí, jako je anémie, ztráta vlasů, šedivění a ztráta sluchu (Kujoth et al., 2005). Obdobný vliv mají mutace mtDNA na rozvoj neurodegenerativních onemocnění. Např. bylo pozorováno hromadění mutací mtDNA u pacientů s Parkinsonovou chorobou v oblasti mozku *Substantia nigra* (Bender et al., 2006).

U těchto neurodegenerativních onemocnění se ukazuje, že svou roli hrají kromě mutací mtDNA i počty kopií mtDNA. Začíná být všeobecně uznávaným faktem, že počet kopií mtDNA s věkem klesá (Liu et al., 2006). Byla provedena rozsáhlá studie u více než 2000 subjektů, která prokázala mírné, ale významné snížení mtDNA s rostoucím věkem (Ding et al., 2015). U vzorků krve byl pokles mtDNA patrnější, přičemž k výraznějšímu poklesu došlo u jedinců po 50. roce života a u starších osob byl pokles ještě dramatičtější. Jiná studie prokázala, že u jedinců nad 58 let byla snížená hladina mtDNA spojena s vysokou úmrtností a celkovým zhoršeným zdravotním stavem (Mengel-From et al., 2014). Počet kopií ve vzorcích krve byl zřetelně snížen u jedinců mezi 50. a 70. rokem života (Van Leeuwen et al., 2014). U jiných typů vzorků odebraných z kosterní svaloviny a srdce

nebylo prokázáno snížení počtu kopií mtDNA souvisejících s věkem (Frahm et al., 2005). Naopak studie Wachsmuth et al. zaznamenala snížení počtu kopií mtDNA v kosterním svalstvu, a naopak jeho zvýšení v jaterních buňkách u stárnoucích osob (Wachsmuth et al., 2016). U pacientů trpících neurodegenerativními onemocněními byly zjištěny snížené hodnoty počtu kopií mtDNA (Wei et al., 2017). Studie Grünewald et al. a Pyle et al. zjistily snížení počtu kopií mtDNA v *Substantia nigra* u pacientů s Parkinsonovou chorobou (Grünewald et al., 2016; Pyle et al., 2016). U pacientů postižených Alzheimerovou chorobou byla mtDNA ve frontální kůře pacientů snížena o 30–50 % ve srovnání s kontrolami (Rodríguez-Santiago et al., 2001). Také ve vzorcích krve pacientů s Parkinsonovou chorobou byly hladiny mtDNA sníženy ve srovnání se zdravými jedinci (Pyle et al., 2016). Analýzy mozkomíšního moku u obou onemocnění prokázaly snížené množství cf – mtDNA (Podlesniy et al., 2013). To naznačuje, že by se cf – mtDNA dala využít pro screening těchto onemocnění. Z výše uvedených skutečností se zdá, že pokles mitochondriální funkce pozorovaný u poruch souvisejících s věkem a stárnutím koreluje s poklesem hladin mtDNA.

3.3 Vliv počtu kopií mtDNA na nádorová onemocnění

Vztah mezi rakovinným bujením a mitochondriemi prokázal již ve 20. letech 20. století Otto H. Warburg. Všiml si, že nádorové buňky uspokojují své energetické potřeby výhradně prostřednictvím aerobní glykolýzy (Warburg, 1956). S objevem onkogenů se tento přístup vytratil. Nové studie se opět zaměřují na úlohu mitochondriálních funkcí v procesu iniciace a progresu rakoviny. Z hlediska výskytu mutací mtDNA je prokázáno, že u mnoha druhů nádorů dochází k jejich akumulaci (Larman et al., 2012), avšak úloha těchto mutací v procesu nádorového bujení není jasná. Mutace mohou vznikat v důsledku rychlé replikace mtDNA v rychle se prolifерujících buňkách nádoru. U nádorových buněk dochází k poruše OXPHOS vlivem velkého výskytu mutované mtDNA (Filograna et al., 2021). U nádorů ledvin, kolorekta a štítné žlázy byl nalezen zvýšený obsah mtDNA obsahující geny důležité pro OXPHOS, což naznačuje, že by se mohlo jednat o kompenzační mechanismus. (Yuan et al., 2020) Zároveň je ale možné, že akumulace mutací u některých typů rakoviny poskytuje maligním buňkám selektivní výhodu a mutace mtDNA tak přispívají k rozvoji rakoviny. Kromě mutační zátěže je množství mitochondrií důležitým ukazatelem závislosti buňky na OXPHOS (Filograna et al., 2021). Existuje snaha o pochopení souvislosti mezi počtem kopií mtDNA a výskytem nádorů ať už pro diagnostické, nebo prognostické účely. Pro diagnostické účely byla

provedena řada studií hledající korelaci mezi počtem kopií mtDNA a vznikem onemocnění. Bylo zjištěno, že vysoké hladiny mtDNA souvisí se zvýšeným rizikem vzniku lymfomů (Mi et al., 2015), nádorů prsu (Lemnrau et al., 2015), kůže (Shen et al., 2015), plic (Hosgood et al., 2010) a slinivky (Lynch et al., 2011). Jiné studie uvádějí protektivní vliv vysokého počtu kopií mtDNA proti nádorům kostí, ledvin a dalším typům rakoviny (Xing et al., 2008). Riziko vzniku kolorektálního karcinomu bylo spojeno jak s vyšším, (Thyagarajan et al., 2012) tak i s nižším (Huang et al., 2014) množstvím počtu kopií mtDNA v periferní krvi. Hladiny počtu kopií byly také hodnoceny jako prognostický faktor, kdy se porovnály shodné vzorky tkáně postižené nádorem a zdravé tkáně u několika typů rakoviny. Výsledky naznačují, že zvýšené i snížené hladiny mtDNA korelují se závažností onemocnění. Progrese kolorektálního karcinomu byla spojena jak se zvýšením (Yang, 2011), tak snížením (Cui et al., 2013) počtem kopií mtDNA. Podobné výsledky byly zaznamenány i u karcinomů plic, žaludku a ledvin. Některé zdroje tedy uvádějí korelaci mezi vysokými hladinami a závažností onemocnění (Davis et al., 2014), jiné popisují vztah opačný (Lin et al., 2008). Na základě studií sledujících různé typy nádorů se zdá, že některé nádory regulují mtDNA, jedná se o lymfomy, nádory slinivky nebo štítné žlázy (Yuan et al., 2020). Takto velké rozdíly ve výsledcích by mohly být způsobeny tím, že se jedná o výsledky různých studií používající odlišné metodologické přístupy, různé druhy vzorků a různé typy nádorů v různých stádiích (Filograna et al., 2021). Z dostupných studií vyplývá, že závislost nádorů je mnohem složitější a rozmanitější, neboť mtDNA může korelovat jak se zvýšenou, tak i se sníženou závažností onemocnění.

3.4 Role mtDNA u zánětlivých onemocnění

Kromě své role v dýchacím řetězci se mitochondrie také aktivně zapojují během zánětlivých procesů a produkují řadu signalizačních molekul včetně metabolitů, proteinů, RNA a samotné mtDNA (Wu et al., 2021; Trumpff et al., 2021).

Mitochondrie se velmi pravděpodobně vyvinuly z bakterií, a proto s nimi mají mnoho společných znaků včetně mtDNA, která se velmi podobá bakteriální DNA. Vrozený imunitní systém disponuje receptory PRR, pomocí kterých je schopný rozlišit vlastní struktury od konzervovaných bakteriálních molekul. Díky své podobnosti s bakteriemi působí mtDNA podobně imunogenně. MtDNA je rozpoznávána jako molekulární vzory spojené s poškozením DAMP (Boyapati et al., 2017). Pokud se mtDNA uvolní mimo

mitochondrie do cytoplazmy a do extracelulárního prostoru, dojde k aktivaci velkého množství různých receptorů pro rozpoznávání molekul DAMP jako je TLR (Toll-like receptor) a cGAS (Cyclic GMP-AMP synthase), které spouštějí vrozenou imunitní reakci a podporují zánět (Boyapati et al., 2017; Nakahira et al., 2011).

Mezi Toll-like receptory patří TLR 9, který je klíčový pro detekci DNA, zejména nemetylované CpG DNA. CpG DNA jsou krátké úseky DNA bohaté na cytosin a guanosen, které jsou charakteristické pro bakterie a některé DNA viry (TLR9 toll like receptor 9 [Homo sapiens (human)]). Interakce mezi mtDNA a TLR9 je zřejmě zapojena do vývoje různých onemocnění jako je akutní infarkt myokardu (Bliksøen et al., 2016), hepatocelulární karcinom (Liu et al., 2015), nealkoholická steatohepatitida (Garcia – Martinez et al., 2016) a poškození plic (Zhang et al., 2014).

Dalším aktivátorem vrozené imunitní reakce je dráha cGAS-STING. Pokud se na cGAS naváže DNA, spustí se reakce mezi GTP a ATP, na jejímž konci vzniká cyklický GMP-AMP (cGAMP). Ten aktivuje stimulator interferonových genů (STING), který následně indukuje produkci interferonů typu I. Tato dráha hraje klíčovou roli při zprostředkování imunitní obrany proti virům s dvouvláknovou DNA (Boyapati et al., 2017).

MtDNA se také uvolňuje do krevního oběhu jako volná cf – mtDNA, nebo mtDNA ve vezikulách, popřípadě formou celých mitochondrií (De Gaetano et al., 2021). Zvýšené hodnoty cf – mtDNA v plazmě nebo séru se často nacházejí u stavů s významným poškozením tkáně, jako je trauma, sepse nebo infarkt. Stále častěji jsou detekovány u chronických orgánově specifických a systémových onemocnění, jako je steatohepatitida a systémový lupus erythematosus (Boyapati et al., 2017). Dále se zvýšené hladiny ukazují jako prediktivní ukazatel vyššího rizika mortality u kriticky nemocných jedinců (Nakahira et al., 2013; Scozzi et al., 2021; Boyapati et al., 2017).

3.4.1 Uvolňování mtDNA

K uvolňování mtDNA dochází na dvou úrovních. Nejprve se uvolňuje do cytoplazmy a poté se vylučuje extracelulárně. Tento proces probíhá několika mechanismy a může se odehrávat „pasivně“ společně s různými formami apoptózy, nebo „aktivně“ prostřednictvím regulovaných procesů (Boyapati et al., 2017).

V prvním případě uvolňování mtDNA do cytoplazmy dochází k procesu zvaném permeabilizace vnější mitochondriální membrány, kterou zprostředkovávají dva proteiny BAK a BAX, což vede k uvolnění cytochromu C a aktivaci apoptotických kaspáz. Tento proces je fyziologický mechanismus, který vede k apoptóze způsobené vnitřní cestou. Bylo zjištěno, že proteiny BAK a BAX tvořící makropóry ve vnější membráně umožňují herniaci vnitřní mitochondriální membrány, což má za následek ztrátu integrity membrány a následné uvolnění obsahu mitochondrií, včetně mtDNA, do cytoplazmy (Chipuk et al., 2006; De Gaetano et al., 2021). Dalším nedávno objeveným mechanismem uvolňování mtDNA nezávislým na BAX/BAK je cesta zprostředkovaná proteinem VDAC. VDAC je transportní protein ve vnější mitochondriální membráně označovaný také jako mitochondriální porin. Zprostředkovává transport aniontů, kationtů, ATP, Ca²⁺ a metabolitů přes membránu (Kim a Cho, 2019; De Gaetano et al., 2021). To, zda k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány dochází prostřednictvím BAX/BAK nebo VDAC, je pravděpodobně do značné míry ovlivněno úrovní buněčného stresu. Zatímco první mechanismus je přítomen při extrémním stresu nebo apoptóze, druhý mechanismus převládá v podmínkách středního stresu (Boyapati et al., 2017). Z experimentu provedeného Garcia et al. na potkanech vyplývá, že při oxidativním stresu byla mtDNA uvolňována prostřednictvím mitochondriálního póru přechodné propustnosti v jaterních buňkách. Jedná se o transmembránový protein na vnitřní membráně mitochondrií, který se tvoří za určitých patologických stavů (García et al., 2005).

Pokud hovoříme o extracelulárním uvolňování mtDNA, tak zde má největší roli apoptóza a nekróza (Boyapati et al., 2017). Kromě těchto pasivní mechanismů se na uvolňování mtDNA také podílí další procesy, jako je nekroptóza neboli regulovaná nekróza (Kaczmarek et al., 2013). Ukázalo se, že zdrojem cf – mtDNA v krevním oběhu mohou být krevní destičky, které při aktivaci uvolňují celé mitochondrie. Ty následně aktivují imunitní systém a mohou být hydrolyzovány fosfolipázou A2, tím dojde k porušení mitochondriální membrány a uvolnění mtDNA (Boudreau et al., 2014). Aktivního uvolňování mtDNA z buněk se účastní vysoce regulované procesy. Jedním z nejlépe popsaných mechanismů, jak k tomu dochází, je prostřednictvím neutrofilů. K uvolňování mtDNA dochází během NETózy, kdy v reakci na bakteriální struktury tvoří neutrofilové extracelulární sítě, z jaderného chromatinu nazývané NET (Neutrophil Extracellular Traps). Během tohoto procesu dochází k rozpadu mitochondrií a uvolnění mtDNA

(Brinkmann et al., 2004). Druhým aktivním zdrojem extracelulární mtDNA jsou extracelulární vezikuly, které se aktivně účastní mezibuněčné komunikace (Tkach a Théry, 2016).

3.5 Souvislost počtu kopií mtDNA s infekčními onemocněními

Zatímco se většina studií zaměřuje na stanovení počtu kopií mtDNA u zánětlivých onemocnění a na úlohu mtDNA v modulaci zánětů, objasnění vztahu mezi počtem kopií mtDNA a infekčními onemocněními zůstává pozadu.

Rozsáhlá studie Fazzini et al. zkoumala spojení počtu kopií mtDNA z plné krve s infekčními onemocněními a celkovou mortalitou ze všech možných příčin u kohorty 4512 pacientů s chronickým onemocněním ledvin. Studie zjistila, že nízké počty kopií mtDNA byly signifikantně spojeny s vyšší úmrtností ze všech příčin a úmrtím v důsledku infekcí, stejně jako s hospitalizacemi v důsledku infekcí (Fazzini et al., 2019). Toto zjištění koreluje se studií provedenou Sun et al., která spojila závažnost onemocnění HIV se sníženým počtem kopií mtDNA. V této studii byl počet kopií stanovován ze zmražených vzorků krve (Sun et al., 2019). Na druhou stranu podle výsledků kompilační studie z roku 2019 mnoho jiných studií našlo naopak spojení vysokého počtu kopií mtDNA se zvýšenou mortalitou (Harrington et al., 2019). Ovšem je důležité podotknout, že tyto studie se nezabývaly souvislostí s infekčními onemocněními.

Poslední dobou byla věnována velká pozornost hodnocení počtu kopií mtDNA v souvislosti s onemocněním Covid 19. Nedávné studie ukazují, že vysoké hladiny cf – mtDNA v době hospitalizace zvýšily pravděpodobnost přijetí na jednotku intenzivní péče a zvýšily riziko úmrtí (Scozzi et al., 2021; Moreno Fernández-Ayala et al., 2020). Podle studie Valdés – Aguayo et al., která kvantifikovala počet kopií mtDNA u pacientů s Covid 19 z periferní krve došlo k zvýšení počtu kopií u pacientů s lehkým nebo středně těžkým průběhem onemocnění oproti negativním kontrolám, zatímco u těžkých případů došlo ke snížení počtu kopií. Zároveň u pacientů s těžkým průběhem, kteří zemřeli, byla nalezena nižší hladina počtu kopií mtDNA oproti pacientům s těžkým průběhem onemocnění, kteří se uzdravili (Valdés-Aguayo et al., 2021). Jiná studie zaměřující se na vztah s Covid 19, měřila hladiny cf – mtDNA ve vzorcích plazmy od 97 pacientů s onemocněním Covid 19. Výsledkem studie bylo, že zvýšené hladiny cf – mtDNA byly naměřeny u pacientů, kteří zemřeli, nebo vyžadovali přijetí na JIP (Scozzi et al., 2021).

Pokud se podíváme na dobu před pandemií koronaviru, studie z roku 2018 si vzala za cíl objasnit souvislost mezi cf – mtDNA a virovou zátěží u infekcí HIV, HBV a HCV. Bylo pozorováno zvýšení průměrné hodnoty cf – mtDNA u všech sledovaných infekcí, oproti zdravým kontrolám, přičemž nejvyšší hodnoty byly u infekce HCV. Ovšem nebyla pozorována žádná významná korelace mezi cf – mtDNA a virovou zátěží u žádné ze tří infekcí (Ali et al., 2020).

4. Mitochondriální biogeneze

Mitochondriální biogeneze je velice komplikovaný a vysoce regulovaný fyziologický proces. V principu se jedná o růst stávajících mitochondrií a jejich následné dělení. Jedná se o jeden ze základních mechanismů, kterým organismus řídí počet mitochondrií v buňkách. Druhým mechanismem je mitofagie, kdy naopak dochází k jejich odstraňování. Mitochondriální biogeneze probíhá zejména při dělení buněk, kdy je důležité kromě dělení jádra a duplikace genetického materiálu také namnožit buněčné organely. Může ale nastat i v reakci na stimul volnými radikály, na zvýšení energetických požadavků buněk, během vývoje a také u některých mitochondriálních onemocnění atd. Mitochondriální biogeneze je proto definována jako proces, kterým buňky zvyšují svůj individuální obsah mitochondrií (Valero, 2014).

Mitochondriální biogeneze je regulována vnějšími i vnitřními podmínkami, jako je cvičení, elektrická stimulace nebo teplota. Z vnitřních faktorů se na mitochondriální biogenezi podílí značné množství transkripčních faktorů, které řídí transkripci genů kódujících mitochondriální proteiny. Mezi tyto aktivátory a regulátory patří zejména PGC-1 α (Peroxisome proliferator – activated receptor gamma coactivator 1alpha) a TFAM (Sanchis-Gomar et al., 2014). PGC-1 α je transkripční koaktivátor, to znamená, že aktivuje další transkripční faktory, které regulují transkripci genů kódujících mitochondriální proteiny (Holloszy, 2011). Fakt, že pravidelný vytrvalostní trénink zvyšuje počet mitochondrií v kosterním svalstvu, je známý poměrně dlouho. (Holloszy a Coyle, 1984) Nově se povedlo objasnit, že cvičení přímo aktivuje a indukuje zvýšenou expresi PGC-1 α (Holloszy, 2011).

Zvýšení celkového množství mitochondrií prostřednictvím mitochondriální biogeneze představuje způsob, jak čelit mitochondriálním poruchám způsobeným mutacemi v mtDNA nebo jaderném genomu (Viscomi, 2016). Toto tvrzení navíc podporují experimentální důkazy. Ty ukazují, že pouhé zvýšení mitochondriální hmoty stačilo k obnovení produkce ATP v kosterních svalech myši s mitochondriální myopatií (Wredenberg et al., 2002). Hypotézu, že zvýšená mitochondriální biogeneze může zmírnit závažnost mitochondriálních onemocnění podporuje i fakt, že studie v rodinách s LHON ukázaly, že asymptomatické nositelé mají tendenci ke zvýšené mitochondriální biogenezi a vyššímu počtu mtDNA ve srovnání se zřetelně postiženými příbuznými z matčiny strany (Giordano et al., 2014). Podpora mitochondriální biogeneze pomocí farmakologických přípravků přináší sice slibné výsledky, ale jejich vývoj je teprve ve fázi

experimentálních studií a objevují se vážně vedlejší účinky (Steele et al., 2020). Pravidelné cvičení by proto mohlo být důležitou součástí prevence i léčby mitochondriálních onemocnění.

4.1 Vliv pohybové aktivity na počet kopií mtDNA

Jak již bylo uvedeno výše, to že zastoupení mitochondrií je pozitivně ovlivňováno dlouhodobým cvičením, je obecně uznávaným faktem, ovšem jakou roli hraje hladina počtu kopií jako indikátor obsahu mitochondrií ve svalech, není doposud zcela objasněno. Objevují se ale důkazy, že cvičení může vyvolat akutní poškození mtDNA projevující se sníženým počtem kopií. MtDNA je poškozována prostřednictvím zvýšené produkce ROS, během stresové reakce, kterou zahrnuje právě cvičení nebo změna teploty. Touto problematikou se podrobněji zabývala studie McGlynn et al., která porovnávala účinky akutního cvičení na změny počtu kopií mtDNA po cvičení v různých teplotních podmínkách (McGlynn et al., 2021). Studie zkoumala účinky cvičení v chladu (7 °C), při pokojové teplotě (20 °C) a při zvýšené teplotě (33 °C) na počet kopií mtDNA měřené z biopsie svalů. Výsledkem bylo, že fyzická zátěž vede ke snížení počtu kopií mtDNA. Přičemž největší pokles hladin byl ve skupině provádějící cvičení při 33 °C ve srovnání se skupinou, která cvičila při 7 °C (McGlynn et al., 2021). Tuto teorii se snažila objasnit i studie Baykara, která stanovovala počet kopií z plné krve u profesionálních plavců, ale navzdory očekávaní se zjistilo, že trénovaní plavci mají vyšší počet kopií než kontrolní skupina nesportujících jedinců (Baykara, 2016). Další dvě studie Lim et al. a Chang et al. se také zabývaly vlivem dlouhodobého cvičení na počet kopií mtDNA, přičemž testovaly vzorky plné krve. Obě tyto studie vycházely z předpokladu, že pravidelné dlouhodobé cvičení podporuje mitochondriální biogenezi ve svalech. Obě studie přišly se stejným výsledkem, že dlouhodobé cvičení zvyšuje hladiny mtDNA (Lim et al., 2000; Chang et al., 2016). Studie Chen et al. sledovala, zda je počet kopií mitochondriální DNA spojen s účinností ventilace při cvičení. DNA byla izolována ze vzorků slin. Ve výsledku byl vyšší počet kopií mtDNA spojen s účinností ventilace, ale nebyl prokazatelně spojen se spotřebou kyslíku vzhledem k tělesné hmotnosti. Autoři výsledky interpretují tak, že jedinci s větším obsahem mitochondrií mají větší kapacitu pro OXPHOS, a tudíž sníženou závislost na anaerobním metabolismu při fyzickém výkonu (Chen et al., 2017).

Existuje také řada studií, která sledovala cf – mtDNA v souvislosti s dlouhodobým tréninkem nebo akutní fyzickou aktivitou. Nasi et al. měřili změny v plazmatické

koncentraci cf – mtDNA každé dva měsíce během dvou sezón u profesionálních volejbalových hráčů. Koncentrace cf – mtDNA se u volejbalových hráčů během první sezóny výrazně snížily, zatímco během druhé sezóny zůstaly stabilní (Nasi et al., 2016). Shockett et al. zjistili, že po 54 a 90 minut aerobního cvičení došlo k poklesu plazmatické koncentrace cf – mtDNA (Shockett et al., 2016). Beiter et al. studovali mužské sportovce a zjistili, že 30minutový test na běžícím pásu nezměnil plazmatické koncentrace cf – mtDNA, ale zvýšil volnou nukleární DNA (cf – nDNA) 14krát okamžitě a 4,2krát 30 minut po cvičení (Beiter et al., 2011). K rozdílným výsledkům došli Stawski et al., kteří studovali skupinu zdravých mužů a zjistili, že tři kola vyčerpávajícího cvičení zvýšily jak cf – mtDNA, tak hladiny cf – nDNA, přičemž nárůst hladin cf – nDNA byl v průměru 7krát větší než nárůst cf – mtDNA (Stawski et al., 2017). Podobně Hummel et al. zjistili, že 15 minut na běžícím pásu u 20 zdravých mužů zvýšilo cf – mtDNA 1,6krát po 2 minutách po cvičení, zatímco cf – nDNA se zvýšilo 4krát (Hummel et al., 2018).

5. Problematika stanovení mtDNA

Existuje rozsáhlý souhrn zdrojů popisující roli mtDNA v lidském organismu a snažící se o pochopení úlohy počtu kopií mtDNA u lidských onemocnění (Filograna et al., 2021). Jednotlivé studie často přináší rozdílné výsledky. Současně jsou tyto rozdíly diskutovány a mnoho autorů se snaží o standardizaci postupů měření (Fazzini et al., 2018) (Longchamps et al., 2020).

První možné vysvětlení rozdílných výsledků může spočívat ve výběru metodiky. Zároveň může být přesnost měření počtu kopií mtDNA ovlivněna různými preanalytickými faktory (Andreu et al., 2009). Ukázalo se, že zejména metoda použitá pro extrakci DNA významně ovlivňuje výsledky měření (Filograna et al., 2021). V neposlední řadě je důležitý také design samotné studie. Při výběru studované kohorty je potřeba vzít v úvahu faktory jako je věk a pohlaví, probíhající onemocnění atd. (Ding et al., 2015). Je jasné, že je potřeba další zdokonalování a vývoj přesných metod pro stanovení počtu kopií mtDNA. Jak navrhla studie Hammond et al. (2003). Při porovnání výsledků z několika různých laboratoří se ukázalo, že ve výsledcích panuje velká nepřesnost a naměřené hodnoty se lišily až o 91 %. Pokud ale laboratoře používaly společné standardy dosáhly poměrně konzistentních výsledků (Hammond et al., 2003).

5.1 Omezení metody Real-time PCR

Relativní počet kopií mtDNA se vypočítá poměrem mitochondriálního genomu k jadernému genomu. K tomuto účelu se nejčastěji používá real time PCR. Pro validní měření je tedy nezbytné, aby byl jaderný gen přítomen pouze v jedné kopii na genom. Identifikace těchto jedinečných genů je cestou pro vývoj robustní metody. Některé starší studie používaly pro kvantifikaci nDNA jaderné geny s více kopiemi. Počet kopií těchto genu se však pohybuje v řádech tisíců a je individuální, což výrazně zkresluje výsledné hodnoty počtu kopií mtDNA (Picard, 2021). Dalším omezením je, že velká část mitochondriálního genomu je duplikována v jádře a mnoho běžně používaných primerů pro mtDNA koamplifikuje homologní pseudogeny. Posledním problémem je rozdíl velikosti mitochondriálního a jaderného genomu, který způsobuje potíže při přípravě DNA pro analýzu (Malik et al., 2011).

5.2 Vliv extrakce na stanovení mtDNA

Pravděpodobně jedním z nejvýznamnějších faktorů, které ovlivňují výsledek, je typ extrakce mtDNA. Bylo zjištěno, že použití odlišných metod izolace nukleových kyselin ovlivňuje výsledky měření (Fazzini et al., 2018). Při porovnání metod extrakce organickými rozpouštědly jako je fenol-chloroformová metoda s kolonkovou metodou na bázi oxidu křemičitého poskytuje tradiční metoda založená na organických rozpouštědlech konzistentnější a přesnější stanovení počtu kopií mtDNA. (Guo et al., 2009) Tato odlišnost je založena na rozdílné velikosti obou genomů. Kolony jsou typicky optimalizovány pro izolaci fragmentů DNA větších než 50 Kb, což vede k vyšší eluci menších molekul mtDNA (Nacheva et al., 2017). V závislosti na použité metodě se hodnoty počtu kopií mtDNA extrahované ze stejného vzorku mohou lišit až o 100 % (Guo et al., 2009). Jedním z řešení, jak snížit zkreslení způsobené extrakcí DNA, může být použití metody přímé extrakce, založené na lyzi buněk (Longchamps et al., 2020).

5.2.1 Odběry z bukálních stěrů nebo ze slin

Vhodnou alternativou pro získání DNA z periferní krve by mohl být bukální stěr nebo samotné sliny. Tento odběr ještě méně zatěžuje pacienta a je tak vhodný zejména pro malé děti. Dá se předpokládat, že DNA získaná z bukálních stěrů bude pocházet především z epitelálních buněk, což podporuje zjištění, že bukální stěry obsahují až 90,3 %, epitelálních buněk (Theda et al., 2018). Zatímco sliny obsahují až 74% DNA pocházejících z leukocytů (Thiede et al., 2000). Další nevýhodou z pohledu možného ovlivnění výsledku je, že sliny obsahují kromě lidské DNA také bakteriální DNA. V porovnání s bukálními stěry mají sliny nižší zastoupení bakteriální DNA (James et al., 2008).

5.3 Heterogenita vzorků

Velký problém pro reprodukovatelnost představuje heterogenita vzorků. Ta je způsobena tím, že počet kopií mtDNA se výrazně liší v různých typech tkání. Pro lepší interpretaci výsledků by se měl standardizovat druh odebírané tkáně. Doporučuje se například odběr žilní krve, neboť nezatěžuje pacienta jako biopsie svalů či jiné tkáně (Filograna et al., 2021). Nevýhodou ale je, že zastoupení mtDNA v krvi nemusí vypovídat o zastoupení mtDNA v jiných tkáních. Zastoupení mtDNA se liší i v jednotlivých buněčných složkách krve. Trombocyty obsahují vysoký podíl mtDNA na

rozdíl od leukocytů, a navíc postrádají jaderný genom. V důsledku toho může být při trombocytóze zvýšená hladina mtDNA (Urata et al., 2008).

Počet kopií mtDNA se mění během života v závislosti na různých faktorech. Hladiny mohou kolísat v důsledku patologických stavů nebo stárnutí. Je prokázáno, že v pokročilém věku dochází k úbytku mtDNA a také řada onemocnění ovlivňuje množství mtDNA. Důležitá jsou také zánětlivá onemocnění, kdy dochází k výrazným změnám ve hladinách mtDNA (Filograna et al., 2021). Nesmíme zapomenout i na další faktory jako zdravotní stav pacienta a léčba. Například chemoterapie má velký vliv na mtDNA. Důležitý je také životní styl, protože je známo, že pravidelný vytrvalostní trénink vyvolává metabolickou a adaptivní reakci kosterního svalstva, která vede ke zvýšení celkové mitochondriální hmoty a mtDNA (Dudley et al., 1982).

5.3.1 Rozdíly v počtu kopií mtDNA z jaderných buněk a cf – mtDNA

Existuje velký rozdíl, pokud měříme počet kopií mtDNA z plné krve (nebo jiných buněk či tkání) nebo z plazmy jako cf-mtDNA. Výsledky se mohou výrazně lišit, což může vést k opačným asociacím v klinických studiích (Fazzini et al., 2019). Měření počtu kopií mtDNA z jaderných buněk vypovídá o relativním množství mitochondrií v buňkách a odpovídá respirační funkci tkání. Proto se očekává, že vyšší počet kopií mtDNA bude spojen s lepším zdravotním stavem, což bylo prokázáno v řadě studií (Rao et al., 2009; Mengel-From et al., 2014). Naproti tomu počty kopií cf – mtDNA mohou indikovat mtDNA, která byla uvolněna do krevního oběhu z poškozených buněk. Tento mechanismus je spojený s patologickými, zejména zánětlivými procesy (Boyapati et al., 2017; De Gaetano et al., 2021).

6. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo:

1. Vypracování odborné rešerše na zadané téma z odborných zdrojů.
2. Zvládnutí základních metod a protokolů v genetické laboratoři (izolace DNA, měření koncentrace DNA, real-time PCR). Zavedení metody kvantifikace mitochondriální DNA pomocí real-time PCR.
3. Zpracování výsledků a analýza dat.

Hypotézy:

„Ženy mají vyšší hladiny mtDNA než muži“

„U lidí s vyšším věkem klesá počet kopií mtDNA“

7. Metodika

Praktická část bakalářské práce probíhala v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích pod odborným dohledem Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. Před zahájením práce jsem byl seznámen s vnitřním řádem laboratoře a zásadami BOZP. Byl jsem též informován o povinnosti zachovat mlčenlivost o všech citlivých informacích souvisejících s klienty laboratoře. Během práce jsem používal ochranné pomůcky a postupoval podle pracovních protokolů schválených laboratoří GENLABS, nebo podle pokynů vedoucí práce.

Nejprve popíši izolaci DNA z bukálních stěrů a periferní krve, poté měření koncentrace DNA a samotné měření real-time PCR. V poslední části se budu zabývat metodou výpočtu relativního počtu kopií mtDNA. V kapitole Výsledky statisticky vyhodnotím naměřená data a porovnáám použité metody.

7.1 Vyšetřovaný soubor

Hlavním testovaným souborem byli klienti společnosti Finclub Plus, a.s., kterým bylo nabídnuto vyšetření mtDNA. Do projektu se zapojilo 133 osob. Zastoupena byla obě pohlaví a všechny věkové kategorie. Pro doplňující analýzu byly použity vzorky jiných klientů, kteří souhlasili s vyšetřením pro výzkumné účely. Celkově se měření zúčastnilo 181 žen a 86 mužů.

7.2 Izolace DNA

Vyizolovaná DNA je základním materiálem pro následné molekulárně genetické vyšetření. Nejčastěji používaným typem vzorku pro izolaci jsou bukální stěry nebo periferní krev. Každý klient před odběrem vyplňuje žádanku o laboratorní vyšetření a podepisuje informovaný souhlas s genetickým vyšetřením. Bukální stěry si provádí klienti sami pomocí odběrového tamponu. Odběrovou sadu dostávají společně s informačním dopisem a obrázkovým návodem. Vzorky krve jsou odebírány na klinických pracovištích kvalifikovanými pracovníky. Krev se odebírá do vakuových zkumavek obsahující antikoagulační činidlo K3 EDTA. Zkumavky jsou označeny rodným číslem, jménem klienta a podpisem osoby, která provedla odběr. Po transportu do laboratoře jsou vzorky zapsány do informačního systému laboratoře a označí se laboratorním identifikačním číslem, pod kterým jsou evidovány. Vzorky se před izolací uchovávají v chladničkové teplotě při 4 °C.

7.2.1 *Izolace z bukálních stěrů*

Pro izolaci DNA z bukálních stěrů byla použita komerční izolační souprava GeneAll ExGene™ Clinic SV mini podle doporučení výrobce.

Použité reagensy:

- proteináza K
- BL pufr
- BW pufr
- TW pufr
- AE pufr
- 96% ethanol

Pomůcky:

- 1,5ml zkumavky typu Eppendorf
- Rukavice
- Pipetovací špičky
- Automatické pipety (20-200 μ l a 100-1000 μ l)
- Sběrné zkumavky
- Kolonky s pevnou fází

Přístroje:

- Minicentrifuga – Microspin 12
- Centrifuga – Centrifuge 5415 R
- Vortex – Microspin FV-2400
- Inkubátor – TDB 120

Postup:

Nejprve vyndáme z chladničky proteinázu K, kterou necháme temperovat na laboratorní teplotu. Během toho si připravíme vzorky na izolaci, zapneme inkubátor, který nastavíme na teplotu 56°C. Do zkumavek se vzorky napipetujeme 25 μ l proteinázy K a 300 μ l lyzačního BL pufru. Tuto směs vortexujeme 20 sekund a poté ji dáme do inkubátoru na 20 minut. Po skončení inkubace zkumavky krátce centrifugujeme na malé centrifuze a napipetujeme 300 μ l 96% ethanolu. Znovu vortexujeme, nyní ale v pulzech, a poté krátce stočíme. Připravíme si kolonky se sběrnou zkumavkou a popíšeme je číslem vzorku. Po stočení napipetujeme obsah vzorku ve dvou krocích tak, abychom všechnu směs přenesli na kolonku. Dáme centrifugovat 1 minutu při 8 600 otáčkách za minutu na centrifuze

5415 R. Následně vyměníme sběrnou zkumavku za novou sběrnou zkumavku a přidáme 600 µl BW pufru. Opět dáme centrifugovat na 1 minut při totožných otáčkách a nahradíme sběrnou zkumavku čistou sběrnou zkumavkou. Poté napipetujeme 700 µl TW pufru a znovu centrifugujeme 1 minutu. Vzniklý supernatant odstraníme a kolonku vrátíme zpět do sběrné zkumavky. Dále centrifugujeme 1 minutu při maximálních otáčkách. Připravíme si 1,5 ml zkumavky typu Eppendorf a popíšeme je číslem vzorku. Kolonky vložíme do připravených zkumavek. Na střed kolonky napipetujeme 50 µl elučního pufru a umístíme je do inkubátoru, ve kterém je 56°C. Po 5 minutách je vložíme do centrifugy na 1 minutu při maximálních otáčkách. Eluát obsahující DNA přeneseme ze zkumavky a opět jej napipetujeme na střed kolonky. Inkubujeme při stejné teplotě 56 °C 5 minut a centrifugujeme při maximálních otáčkách 1 minutu. Kolonky odstraníme a vyzolovanou DNA polepíme identifikačním štítkem, který obsahuje jméno a rodné číslo klienta, datum izolace, typ primárního vzorku, laboratorní číslo a iniciály laboranta.

7.2.2 Izolace z periferní krve

Pro izolaci DNA z periferní krve byl použit stejný kit GeneAll ExGene™ Clinic SV mini jako u bukálního stěru. Pracovní postup se liší jen v několika krocích, a to zejména v objemech použitých reagensů. Byly použity stejné reagensy, pomůcky a přístroje jako u izolace bukálních stěrů.

Postup:

Proteinázu K připravíme na izolaci tím, že ji vyndáme z chladničky a necháme ji vytemperovat při pokojové teplotě. Ze zkumavky s periferní krví odebereme 200 µl krve do předem připravené a popsané 1,5 ml zkumavky. Dále do ní přidáme 20 µl proteinázy K a 200 µl lyzačního BL pufru. Řádně promícháme za pomoci vortexu a dáme inkubovat na 20 minut při teplotě 56°C. Krátce stočíme pro odstranění kapek z vnitřní strany víčka zkumavky. Napipetujeme 200 µl 96% ethanolu a vortexujeme v pulzech. Následně krátce stočíme na malé centrifuze. Směs přeneseme na kolonku a centrifugujeme 1 minutu při 8 600 rpm. Nahradíme sběrnou zkumavku novou sběrnou zkumavkou a do ní přidáme 600 µl BW pufru. V dalším kroku znovu centrifugujeme při stejných otáčkách a následně nahradíme sběrnou zkumavku za novou. Pokud není supernatant průhledný, budeme opakovat tento krok ještě jednou. Poté použijeme 700 µl TW pufru a centrifugujeme při 8 600 rpm. Supernatant odstraníme ze sběrné zkumavky a kolonku vrátíme do sběrné zkumavky. Následuje centrifugace 1 minutu při maximálních otáčkách, čímž dojde

k odstranění zbytkového promývacího pufru. Kolonku umístíme do 1,5 ml zkumavky s víčkem a přímo na střed kolonky přidáme 50 µl AE pufru. Inkubujeme při teplotě 56 °C 5 minut. Následně opět centrifugujeme 1 minutu při maximálních otáčkách. Eluční pufr vrátíme na střed kolonky a opakujeme pětiminutovou inkubaci a minutovou centrifugaci při maximálních otáčkách. Po provedení všech těchto kroků získáme izolovanou DNA z periferní krve.

7.2.3 Přímá izolace

K přímé izolaci jsme použili kit Dep-25 DNA extraction kit od firmy Top-Bio s.r.o. Jedná se o metodu určenou k izolaci DNA pro PCR, výhodou je časová nenáročnost. Výrobce udává maximální dobu 25 minut. Sada obsahuje START-Blue a STOP reagensie. START-Blue obsahuje barevný indikátor pro vizuální indikaci správnosti roztoku. Po přidání stejného objemu STOP reagens se roztok změní na bezbarvý. U tohoto typu extrakce nelze měřit koncentraci DNA. Výrobce udává použití 1-2,5 µl extraktu jako zdroje templátové DNA pro následnou PCR nebo qPCR o objemu 25 µl.

Postup:

Do odběrové zkumavky s tamponem napipetujeme 150 µl START-Blue reagens zvortexujeme a krátce stočíme na stolní minicentrifuze. Zkumavku dáme inkubovat na 20 minut při 95 °C. Poté zkumavku vyndáme a počkáme až vychladne na pokojovou teplotu. Přidáme 150 µl STOP reagens a opět zvortexujeme a stočíme.

7.3 Měření koncentrace DNA

Koncentraci DNA jsme měřili za pomoci přístroje Qubit® 2.0 Fluorometer. Jelikož se reagensie Qubit™ 1x dsDNA HS working solution uchovává v chladu a temnu, vyndáme je z chladničky a temperujeme na laboratorní teplotu. Připravíme si mikrozukavky, které si popíšeme číslem vzorku. Napipetujeme 198 µl daného pracovního roztoku a 2 µl stanovované DNA. Mikrozukavku zvortexujeme a krátce stočíme na centrifuze Microspin 12. Necháme zhruba 5 minut inkubovat v temnu. Mezitím si připravíme přístroj na měření. Na přístroji navolíme možnost měření DNA Broad Range. Zkumavku vložíme do přístroje a provedeme měření. Je důležité na přístroji zvolit objem použité DNA, což bylo v našem případě 2 µl. Výsledná koncentrace DNA, kterou přístroj vypočítá, je v jednotkách ng/µl. Výslednou hodnotu zapíšeme do laboratorního deníku, který je určen pro zapisování výsledků.

7.4 Příprava reakční směsi pro PCR

Při přípravě reakční směsi pro PCR jsme využívali dvou postupů. První postup je zcela nekomerční, používá primery pro analýzu převzaté z odborného článku Refinetti et al. (2017) a dále využívá reagensii qPCR 2x SYBR Master Mix od výrobce Top-Bio s.r.o. Druhá metoda využívá komerční primery od firmy TAKARA BIO INC. a reagensii TB Green® Premix Ex Taq™ II také od firmy TAKARA BIO INC.

7.4.1 Metoda využívající reagensie od firmy Top-Bio s.r.o

Metoda používá qPCR 2x Master mix od výrobce Top-Bio s.r.o., který je učený pro real – time PCR. Tento produkt obsahuje interkalační činidlo Sybergreen I, které se váže na dvouvláknovou DNA a získává schopnost fluorescence s maximální excitací při 497 nm a emisí při 520 nm. Protože je fluorescence nenavázaného činidla velmi nízká, je nárůst fluorescence na konci elongační fáze PCR přímo úměrný množství amplifikovaných fragmentů. Mimo jiné obsahuje Taq polymerázu a monoklonální protilátku anti-Taq. Protilátka blokuje aktivitu enzymu při nízkých teplotách, aby nedocházelo k amplifikaci nespecifických produktů ještě před samotným průběhem PCR reakce. K aktivaci enzymu tedy dojde až po první denaturaci, kdy se protilátka inaktivuje vysokou teplotou. Tato modifikace se nazývá HOT START. Primery byly sestaveny podle práce Refinetti et al. (2017). Jeden primer mix je určen pro amplifikaci nukleární DNA a druhý pro amplifikaci mitochondriální DNA, sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Přehled sekvencí použitých primerů.

Primer	Sekvence (5' to 3')	Primer mix
mtDNA forward	5' ACA CCC TCC TAG CCT TAC TAC 3'	mtDNA mix 1
mtDNA reverse	5' GAT ATA GGG TCG AAG CCG C 3'	
nDNA forward	5' AGG GTA TCT GGG CTC TGG 3'	mtDNA mix 2
nDNA reverse	5' GGC TGA AAA GCT CCC GAT TAT 3'	

Zdroj: (Refinetti et al., 2017)

Postup:

Vyndáme izolovanou DNA z mrazicího boxu a necháme ji roztát při pokojové teplotě. Primery a reagensii SYBR Master Mix od výrobce Top-Bio s.r.o. vyjmeme z mrazáku. Izolovanou DNA, primery a Master Mix zvortexujeme. Připravíme si sterilní

mikrozkumavky pro stanovovaný počet vzorků a označíme je číslem vzorku. V laminárním boxu si připravíme reakční směs. Objemy reagensů jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2. Přehled reagensů a objemů použitých pro 1 a 32 reakcí (Top-Bio s.r.o.).

1 reakce		32 reakcí	
Reagencie	objem [μl]	Reagencie	objem [μl]
qPCR 2x Master mix	12,5	qPCR 2x Master mix	400
PCR H ₂ O	9,5	PCR H ₂ O	304

Zdroj: Manuál od výrobce Top-Bio s.r.o.

Maximum je 16 vzorků, protože karusel přístroje LightCycler 2.0 má pouze 32 pozic pro skleněné kapiláry. Jedna skleněná kapilára je určena na jednu reakci, protože jeden vzorek je složen ze dvou reakcí, potřebujeme dvě kapiláry. Reagencie napipetujeme do 1,5 ml mikrozkumavky označené Mix a zvortexujeme. V laminárním boxu si připravíme skleněné kapiláry do vychlazeného adaptéru. Jedna kapilára je pro mtDNA mix1 a druhá pro mtDNA mix 2. Do předem připravených mikrozkumavek označených číslem vzorku napipetujeme 20 μl reakční směsi. Přidáme objem DNA podle její koncentrace tak, aby její koncentrace v reakční směsi bylo vstupní množství DNA 100 ng (tzn. 50 ng pro jednu reakci). Zkumavky s reakční směsí a DNA vortexujeme a krátce stočíme. Takto připravené vzorky (DNA + reakční směs) pipetujeme po 20 μl do kapilár ve dvou řadách (jedna řada bude obsahovat mtDNA mix 1 a druhá mtDNA mix2). Primer mixy si předem připravíme tak, že smícháme stejné množství primeru mtDNA forward a mtDNA reverse (vznikne mtDNA mix 1) nebo nDNA forward a nDNA reverse (vznikne mtDNA mix 2). Poté do první řady napipetujeme připravený 1 μl mtDNA mix1 pro mtDNA a do druhé řady 1 μl primer mix mtDNA mix 2 pro nDNA. Kapiláry zavíčkujeme a stočíme je v centrifuze na pár sekund. Při vkládání do karuselu dbáme na to, aby bylo zachované pořadí. Toho docílíme tak, že vložíme za vzorek 1 z první řady vzorek 1 z řady druhé a takto postupujeme u všech vzorků.

Tabulka 3. Pipetovací protokol primerů a vzorků. Čísla v tabulce označují čísla vzorků.

8	8	16	16
7	7	15	15
6	6	14	14
5	5	13	13
4	4	12	12
3	3	11	11
2	2	10	10
1	1	9	9
mtDNA mix1	nDNA mix2	mtDNA mix1	nDNA mix2

Zdroj: Vlastní

7.4.2 Metoda využívající reagentie od firmy TAKARA BIO INC.

Metoda využívá komerční kit od firmy TAKARA BIO INC. Kit Human Mitochondrial DNA (mtDNA) Monitoring Primer Set. Kit obsahuje 4 připravené primerové páry: ND1 Primer Mix, SLCO2B1 Primer Mix, ND5 Primer Mix, SERPINA1 Primer Mix. První a třetí primer slouží ke stanovení mtDNA a druhý a čtvrtý slouží ke stanovení nukleární DNA. Tento kit je přímo určený pro diagnostiku lidské mtDNA. Pro amplifikaci používáme TB Green® Premix Ex Taq™ II od stejné firmy, ta obsahuje interkalační činidlo Sybeegreen pod označením TB Green, který je nezbytný pro Real-time PCR. Použitá polymeráza je také HOT START.

Postup:

Vyizolovanou DNA a reagentie vyjmeme z mrazicího boxu a temperujeme při pokojové teplotě. Připravíme si sterilní 1,5 ml zkumavky typu Eppendorf a označíme je čísly vzorků. Tento postup využívá 4 reakce na 1 vzorek, každá reakce obsahuje jeden z výše uvedených primerů. Z toho vyplývá, že na 1 vzorek budeme potřebovat 4 skleněné kapiláry. Můžeme tak stanovit maximálně 8 vzorků, jelikož karusel do přístroje má pouze 32 pozic a pro 1 vzorek je nutné použít 4 primerové páry. Do připravené 1,5 ml zkumavky napipetujeme 8 µl příslušné DNA, protože na 1 primer připadají 2 µl DNA. V laminárním boxu zhotovíme reakční směs. Objemy reagentií jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 4. Přehled reagensií a objemů použitých pro 1 a 32 reakcí (TAKARA BIO INC).

1 reakce		32 reakcí	
Reagencie	objem [μl]	Reagencie	objem [μl]
TB Green® Premix Ex Taq TM II	12,5	TB Green® Premix Ex Taq TM II	400
PCR H2O	9,5	PCR H2O	304

Zdroj: Manuál od výrobce Top-Bio s.r.o

Celkový objem reagensií napipetuje do sterilní zkumavky označené jako Mix. Dále si v laminárním boxu připravíme skleněné kapiláry do adaptéru. Mimo laminární box do 1,5 ml zkumavek označených číslem vzorku napipetujeme 84 μl reakční směsi místo 88 μl a to proto, abychom minimalizovali chybu při pipetování. Zkumavky se směsí zvortexujeme a krátce stočíme na minicentrifuze Microspin 12. Z této zkumavky napipetujeme 24 μl do 4 kapilár. Následně do jednotlivých kapilár přidáme 1 μl příslušného primeru. Kapiláry zavíčkuje a krátce stočíme. Kapiláry vložíme do karuselu tak, aby bylo zachováno pořadí vzorku.

Tabulka 5. Pipetovací protokol primerů a vzorků. Čísla v tabulce označují čísla vzorků.

mix4 SERPINA1	2	4	6	8
mix3 ND5	2	4	6	8
mix2 SLCO2B1	2	4	6	8
mix1 ND1	2	4	6	8
mix4 SERPINA1	1	3	5	7
mix3 ND5	1	3	5	7
mix2 SLCO2B1	1	3	5	7
mix1 ND1	1	3	5	7

Zdroj: Vlastní

7.5 Real-time PCR

Pro analýzu jsme použili přístroj Light Cycler 2.0 od výrobce Roche. Přístroj je připojený k počítači s ovládacím programem. V příslušném programu jsme nastavili reakční profil pro danou metodu, dále se v PC zaznamenává název a datum měření, pod kterým se každý běh uloží. Vložíme karusel do přístroje, zadáme počet kapilár a spustíme měření.

7.5.1 Nastavení reakčních profilů PCR

V následujících tabulkách jsou uvedeny reakční profily použitých metod.

Tabulka 6: Reakční profil pro qPCR 2x SYBR Master Mix od výrobce Top-Bio s.r.o.

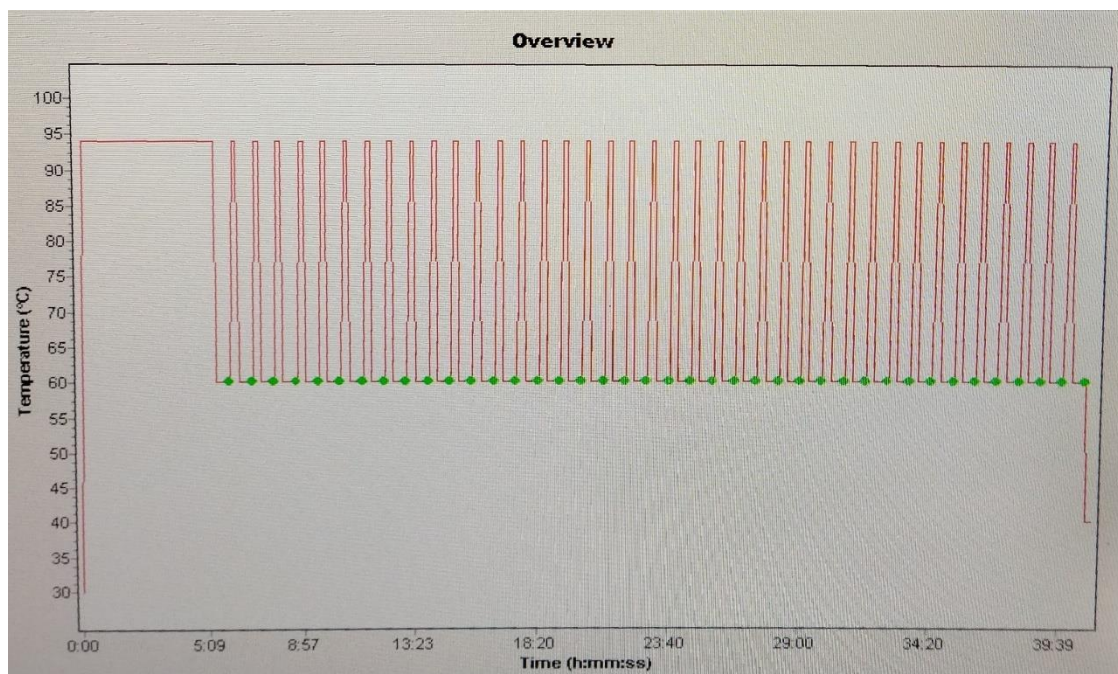
Fáze	Počet cyklů	teplota [°C]	Čas [hh:mm:ss]	Acquisition mode
I. Počáteční denaturace	1	94	00:05:00	none
II. Amplifikace + měření fluorescence	Denaturace	94	00:00:10	none
	Aneeling + elongace	60	00:00:30	single
III. Chlazení	1	40	00:00:20	none

Zdroj: Vlastní

Tabulka 7: Reakční profil pro Human Mitochondrial DNA (mtDNA) Monitoring Primer Set a TB Green® Premix Ex Taq™ II (TAKARA)

Fáze	Počet cyklů	teplota [°C]	Čas [hh:mm:ss]	Acquisition mode
I. Počáteční denaturace	1	95	00:00:30	none
II. Amplifikace + měření fluorescence	Denaturace	95	00:00:05	none
	Aneeling + elongace	60	00:00:30	single
III. Chlazení	1	40	00:00:20	none

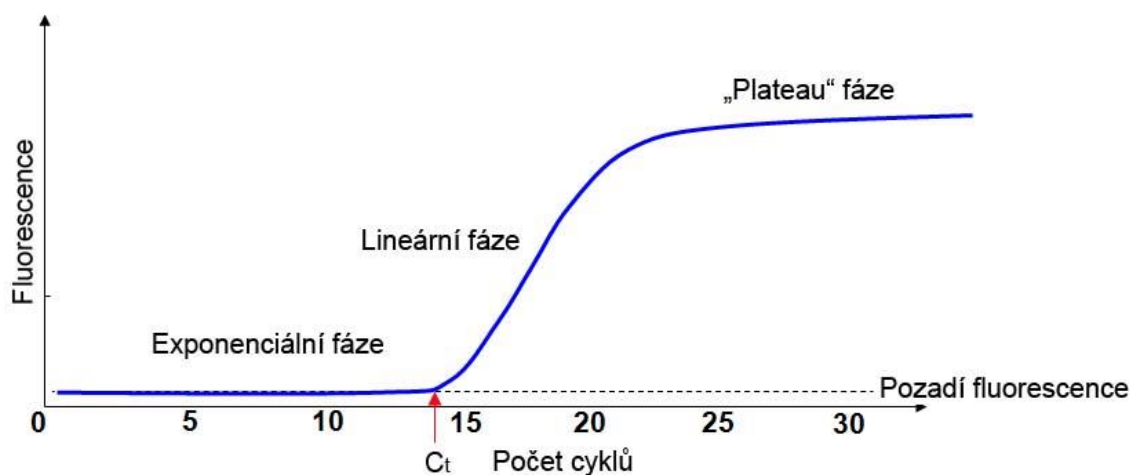
Zdroj: Vlastní



Obrázek 3. Graficky znázorněný reakční profil real-time PCR v počítačovém programu, který ukazuje teplotní změny v průběhu celého procesu. Zelená barva znázorňuje měření fluorescence.

7.5.2 Výpočet relativního počtu kopií mtDNA

Po ukončení celého cyklu v počítačovém programu ovládající Light Cycler zvolíme možnost „Absolute analysis“. Program nám u jednotlivých měření zobrazí hodnoty Ct. Zkratka Ct je odvozena z anglického cycle of threshold neboli cyklus prahu. Hodnota Ct udává číslo cyklu, kdy úroveň fluorescence snímaná detektorem, překročí šum pozadí.



Obrázek 4. Obrázek znázorňující místo záznamu hodnoty Ct na amplifikační křivce
Zdroj: (dostupný z <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>)

Tuto hodnotu jsme využili pro výpočet relativního počtu kopií mtDNA. Vyhodnocení jsme provedli metodou $2^{\Delta Ct}$. Při které se porovnají změřené Ct hodnoty dvou

stanovovaných genů. První hodnota Ct odpovídá tzv. hledanému genu, tedy mitochondriálnímu genu. Druhá hodnota se používá jako tzv. vnitřní kontrola. Jako vnitřní kontroly se používají geny, jejichž počet kopií v testovaném genomu nebo DNA by měl být ve všech testovaných vzorcích uniformní. To znamená, zjištěné rozdíly skutečně odpovídají rozdílům v množství testovaných genů a nejsou způsobeny tím, že byla do reakce vložena rozdílná koncentrace DNA z testovaného vzorku. Jedná se o tzv. referenční geny, nejčastěji "housekeeping" geny, jako jsou geny pro aktin, tubulin a ribozomální proteiny.

Vlastní výpočet se provádí následovně:

$$\text{Relativní počet kopií mtDNA} = 2^{Ct_1 - Ct_2}$$

Kde Ct_1 je cílový mitochondriální gen a Ct_2 je referenční jaderný gen.

Tabulka 8. Příklad tabulky pro vyhodnocení počtu kopií mtDNA s použitím Top-Bio s.r.o.

LIČ	Primer	Ct Value	ΔCt	Copy Number of mtDNA
1	mix1 mtDNA	10,56	8,81	449
	mix2 cDNA	19,37		

Zdroj: Vlastní

Při výpočtu s použitím kitu TAKARA inc. se vypočítává průměr z dvou hodnot $2^{\Delta Ct}$.

Tabulka 9. Příklad tabulky pro vyhodnocení počtu kopií mtDNA s použitím TAKARA inc.

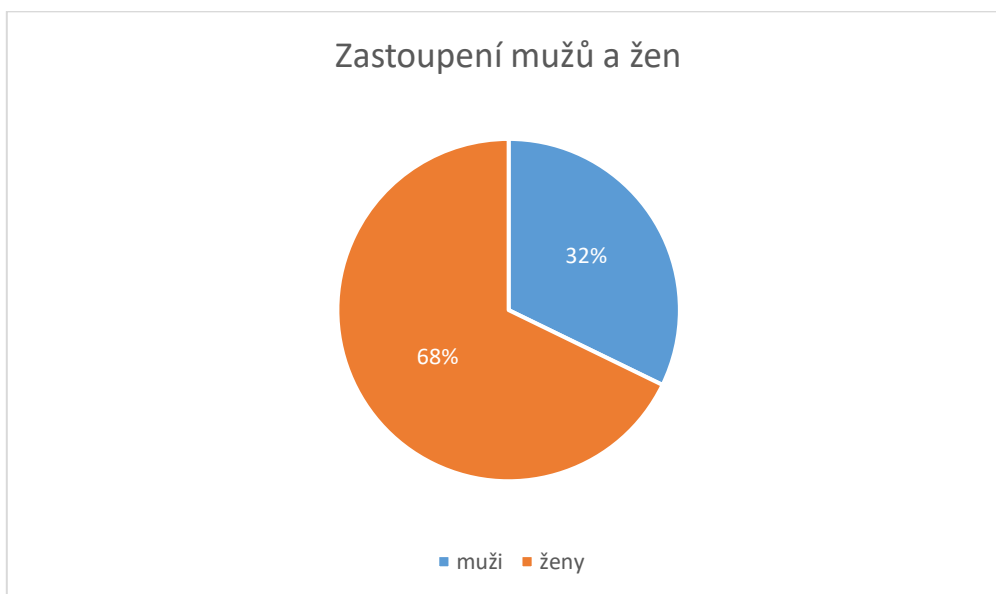
LIČ	Primer	gen	Ct Value	ΔCt	$2^{\Delta Ct}$	Copy Number of mtDNA
1	mix1	ND1	12,25	9,26	613	539
	mix2	SLCO2B1	21,51			
	mix3	ND5	11,59	8,86	465	
	mix4	SERPINA1	20,45			

Zdroj: Vlastní

8. Výsledky

8.1 Popis souboru

Celkem jsme získaly datový soubor pro měření mtDNA od 267 osob, 68 % tvořily ženy a 32 % muži. Velkou podskupinou o počtu 133 osob byli klienti společnosti Finclub Plus, a.s. Toto měření probíhalo ve dvou kolech s časovým odstupem min. 6 měsíců. Tabulka obsahující veškerá měření je uvedena v příloze 1. Měření byla kategorizována na základě věku a věkové kategorie byly rozčleněny po deseti letech viz Tabulka 9. Nejčetnější věkovou skupinou byla skupina od 61-70 let (118 klientů). Nejméně osob (10) bylo v kategorii 11-20 let. Statickou analýzu jsme provedli ze všech měření získaných pomocí metody využívající reagentie od firmy Top-Bio. Použitými vzorky byly jak bukalní stěry, tak periferní krev. Data jsme rozdělili na základě tří kritérií, které jsme chtěli testovat, tedy podle věku, pohlaví a typu odebíraného materiálu.



Obrázek 5. Graf znázorňující procentuální zastoupení mužů a žen v testovaném souboru.
Zdroj: Vlastní

Tabulka 10. Četnosti jedinců v jednotlivých věkových kategoriích.

Věkové kategorie	Četnosti	Procenta
do 10 let	32	12 %
11–20 let	8	3 %
21–30 let	16	6 %
31–40 let	13	5 %
41–50 let	24	9 %
51–60 let	44	16 %
61–70 let	53	20 %
71–80 let	35	13 %
81–90 let	26	10 %
nad 90 let	16	6 %
Celkem	267	100 %

Zdroj: Vlastní

8.2 Statistické vyhodnocení dat

Velký rozptyl mezi jednotlivými výsledky měření nás vedl k použití mediánu místo standardního aritmetického průměru, abychom odchyly v měření alespoň částečně eliminovali. Neboť aritmetický průměr všech měření byl 13563 a směrodatná odchylka $134 \cdot 10^3$. Je také důležité zdůraznit, že některá měření byla prováděna vícekrát pro ověření výsledku měření. Pro ověření stanovených hypotéz jsme využily statistických testů. Jmenovitě regresní analýzy a T testu.

Jako první jsme ověřovali následující hypotézy.

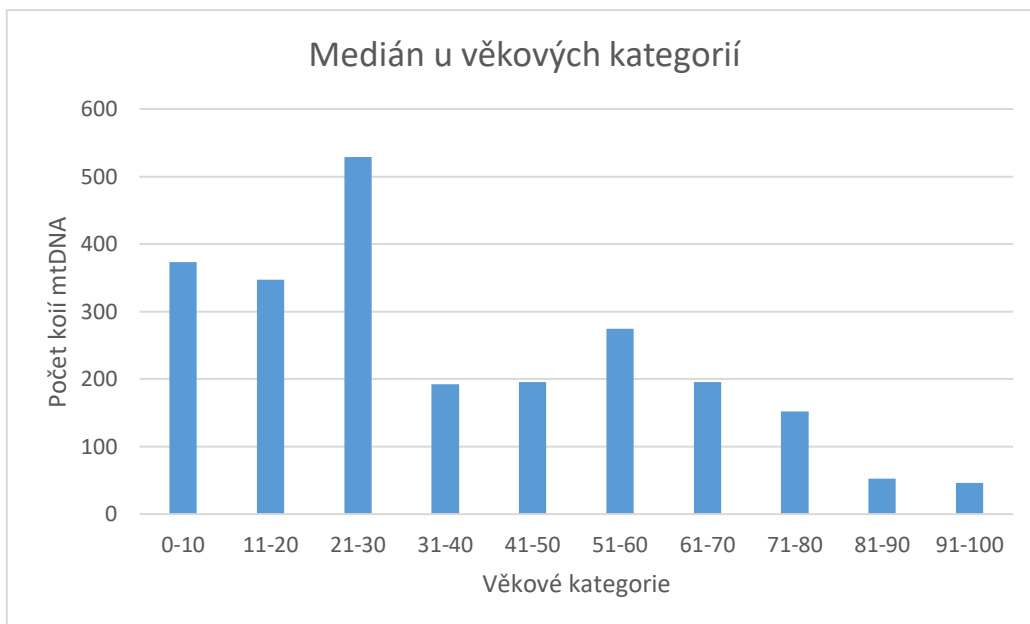
H_0 : „U lidí s vyšším věkem neklesá počet kopií mtDNA“

H_1 : „U lidí s vyšším věkem klesá počet kopií mtDNA“

Tabulka 11. Četnostní tabulka popisující zastoupení věkových kategorií a počet měření.

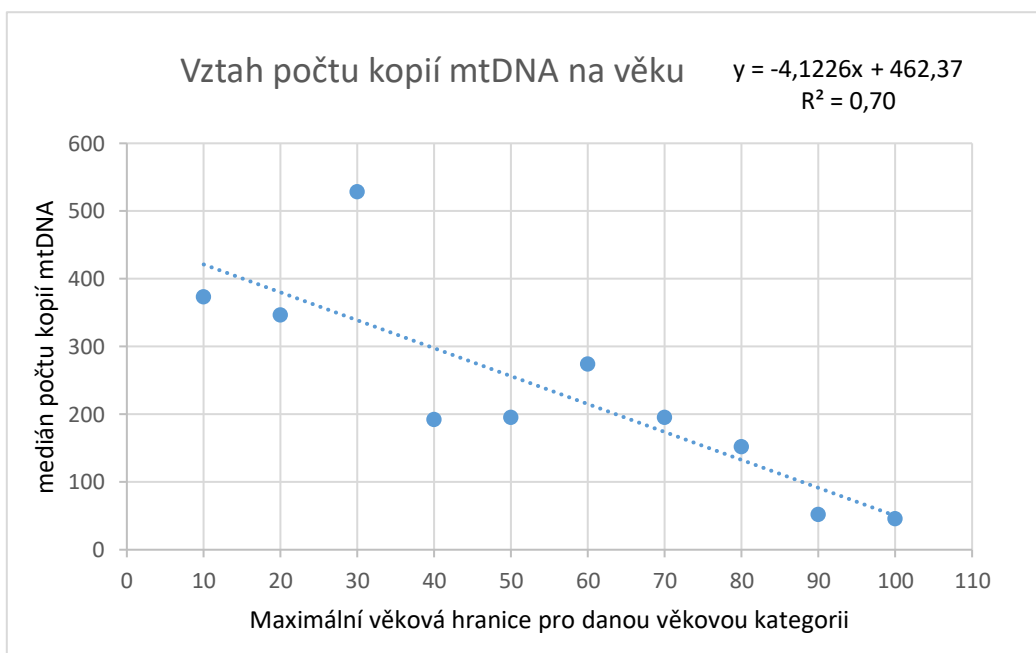
Věk	Medián	Počet měření
0–10	373	34
11–20	347	10
21–30	529	20
31–40	193	18
41–50	195	35
51–60	274	83
61–70	195	113
71–80	152	50
81–90	52	30
91–100	46	16

Zdroj: Vlastní



Obrázek 6. Graf zobrazující medián počtu kopií u věkových kategorií. Zdroj: Vlastní

Pro otestování hypotéz, zda s rostoucím věkem klesá počet kopií mtDNA, jsme použili lineární regresní analýzu. Regresní analýza se využívá, pokud zkoumáme vztah mezi závislou a nezávislou proměnnou. V našem případě studujeme vztah závislé proměnné tedy počtu kopií na nezávislé proměnné tedy na věku.



Obrázek 7. Graf zobrazující regresní křivku. Zdroj: Vlastní

V grafu viz obrázek 7. jsme si nechali zobrazit regresní křivku, kterou popisuje rovnice přímky $y = ax + b$, kde x = hodnoty na vodorovné ose, y = hodnoty na svislé ose, a = směrnice přímky neboli sklon přímky tj. o kolik se změní hodnota y , když x vzroste o 1 a b = průsečík – v jakém bodě protíná přímka osu y .

Předběžně můžeme vyhodnotit rovnici přímky. Statisticky nás zajímá a , tedy směrnice přímky. Pokud proměnná y není závislá na x pak se $a=0$ a platí H_0 . Pokud existuje závislost tak se $a \neq 0$, při rostoucí závislosti je $a > 0$, při klesající je $a < 0$. V našem případě je $a < 0$ a lze tedy očekávat klesající závislost počtu kopií mtDNA v souvislosti se zvyšujícím se věkem. Tento vztah hodnotí další statistické veličiny.

Korelační koeficient R

Udává míru těsnosti vztahu. Nabývá hodnot od -1 do +1. Pokud je v záporných hodnotách jedná se o negativní závislost, naopak pokud nabývá kladných hodnot, jedná se o pozitivní závislost. Pokud se $R=0$ závislost neexistuje. Dále nás informuje, jestli je závislost lineární. Pokud je $R > 0,8$ jedná se o lineární závislost. Zjistili jsme, že $R = -0,836$ z toho tedy vyplývá že sledovaná závislost je přímá, tj. lineární a negativní.

Koeficient determinace R^2

Pokud se prokáže závislost, udává se její síla. Jedná se o korelační koeficient R umocněný na druhou. Nabývá hodnot 0-1 a dává nám informaci kolik % variability v závislé proměnné tedy x , je vysvětleno nezávislou proměnnou y . V našem případě jsme vypočítali, že $R^2 = 0,68 = 68\%$.

Hodnota p

Hodnota p neboli dosažená hladina významnosti. Jedná se o testovací kritérium, informuje nás, jestli je korelační koeficient statisticky významný nebo není, tj. jestli zjištěná závislost není pouze náhodná. Existuje smluvená hodnota 5%. Pokud je $p < 0,05 \Rightarrow H_1$, pokud je $p > 0,05 \Rightarrow H_0$. Pomocí statistického testu ANOVA, jehož výsledky jsou uvedeny v Tabulce 11., jsme vypočítali hodnotu p , která je 0,006, zjišťovaná závislost je tedy statisticky významná, čímž zamítáme H_0 a platí H_1 .

Tabulka 12. Test ANOVA zobrazující hodnotu p.

ANOVA					
Rozptyl	SS	DF	MS	F	P
Regresní	122738	1	122738	15,2	0,006
Reziduální	56505	7	8072		
Celkem	179244	8			

Zdroj: Vlastní

Dále jsme testovaný statistický soubor rozdělili podle pohlaví na muže a ženy. Vypočetli jsme medián u jednotlivých skupin. Při porovnání výsledků uvedených v Tabulce 12, je zřejmé, že v případě našeho měření mají muži vyšší hladiny mtDNA než ženy.

Tabulka 13. Tabulka zobrazuje medián, průměr, směrodatnou odchylku a počet měření u pohlaví.

Pohlaví	Medián	Průměr	SD	Počet měření
Muži	263	11264	51333	86
Ženy	177	14571	157313	181

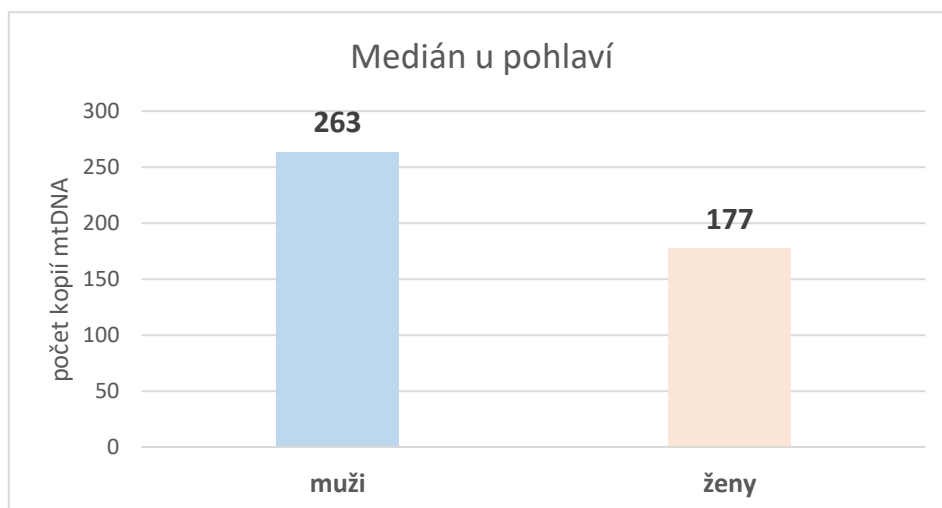
Zdroj: Vlastní

Hypotézy:

H_0 : „Muži a ženy mají stejné hladiny mtDNA“

H_1 : „Ženy mají vyšší hladiny mtDNA než muži“

Pro otestování hypotézy jsme použili dvouvýběrový T test, který se používá pro srovnání dvou skupin na sobě nezávislých. Výsledek T testu je $p=0,751$. Tedy $p>0,05$ tudíž nemůžeme zamítnout H_0 , protože mezi hodnotami není statisticky významný rozdíl.



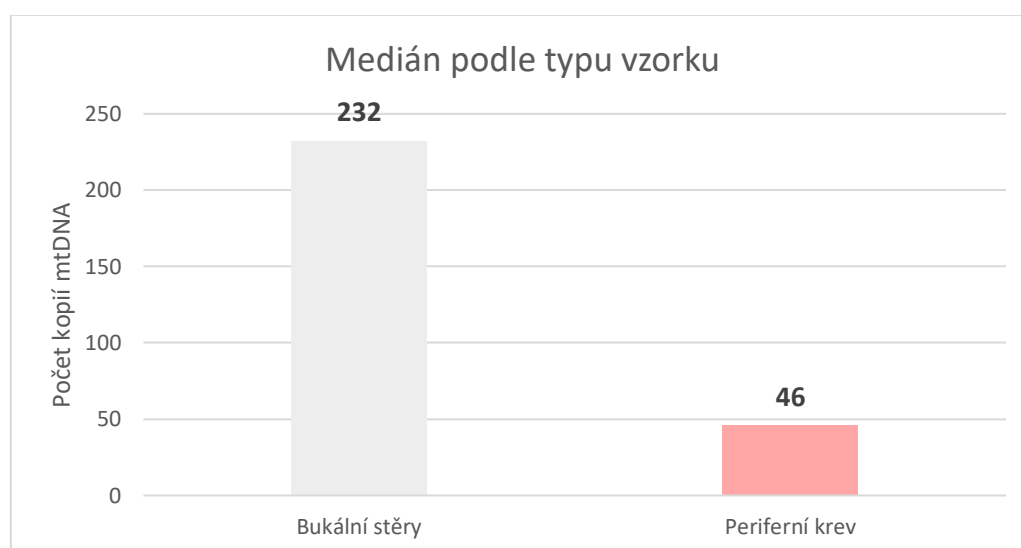
Obrázek 8. Graf zobrazující medián u vzorků z bukálních stěrů a periferní krve.
Zdroj: Vlastní

V posledním případě jsme rozdělili data podle druhu primárního vzorku, ze kterého se prováděla izolace. Medián počtu kopií měřený z bukálních stěrů vyšel 232 a z periferní krve 46.

Tabulka 14. Tabulka zobrazuje medián u typů vzorků.

Materiál	Medián	Počet měření
Bukální stěr	232	339
Periferní krev	46	87

Zdroj: Vlastní



Obrázek 9. Graf zobrazující medián u vzorků z bukálních stěrů a periferní krve. Zdroj: Vlastní

8.3 Optimalizace metody

V rámci optimalizace jsme provedli řadu experimentů. Pro porovnání obou metod jsme použili dva vzorky. V prvním případě jsme použili reagentie od firmy Top-Bio s.r.o. dále označovaná jako „metoda Top-Bio“ V druhém případě jsme použili kit pro stanovení mtDNA od firmy TAKARA inc. dále označováno jen jako „metoda TAKARA“ Vzorek 155/23 pocházel od ženy a 175/23 pocházel od muže. Každý vzorek jsme měřili ve čtyřech opakováních ve stejný čas na stejném přístroji. Pro přípravu vzorků jsme použili postup popsáný v metodice metody, v kapitole 7.4.

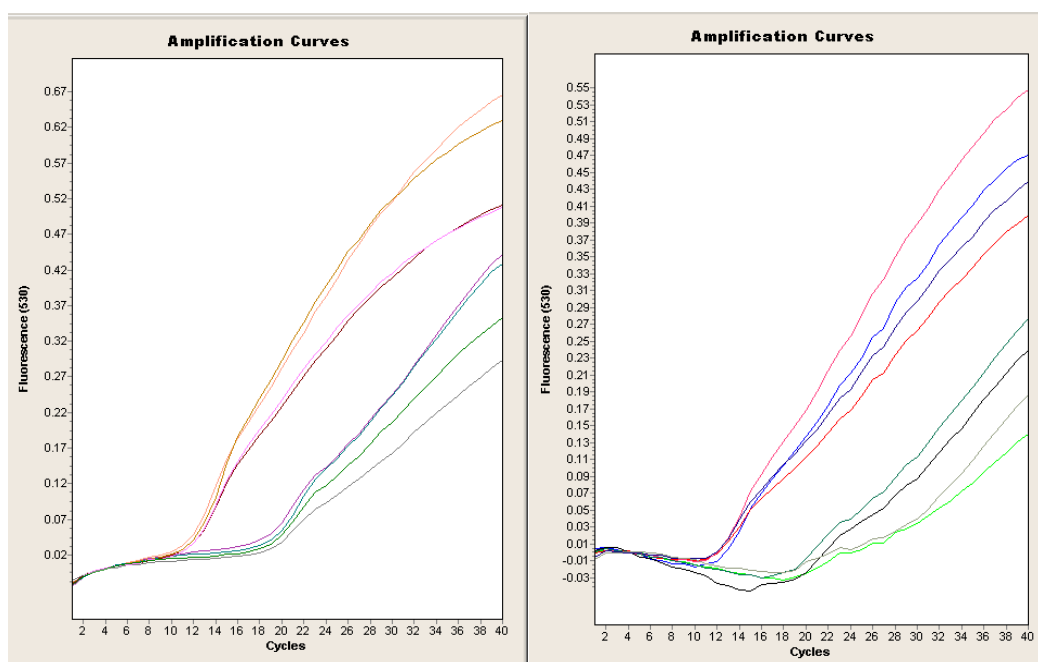
Tabulka 15. Výsledky měření metody Top-Bio v tetraplikátech.

Vzorek	Primer	Ct Value	ΔCt	Copy Number of mtDNA
155/23	mix1 mtDNA	10,59	6,66	101
	mix2 cDNA	17,25		
155/23	mix1 mtDNA	10,16	7,22	149
	mix2 cDNA	17,38		
155/23	mix1 mtDNA	10,50	6,28	78
	mix2 cDNA	16,78		
155/23	mix1 mtDNA	10,28	18,55	383801
	mix2 cDNA	28,83		
175/23	mix1 mtDNA	10,19	6,98	126
	mix2 cDNA	17,17		
175/23	mix1 mtDNA	10,69	6,96	124
	mix2 cDNA	17,65		
175/23	mix1 mtDNA	10,53	6,96	124
	mix2 cDNA	17,49		
175/23	mix1 mtDNA	10,51	6,98	126
	mix2 cDNA	17,49		

Zdroj: Vlastní

U čtvrtého měření vzorku 155/23 vyšla velice vysoká hodnota Ct pro jaderný genom, což neumíme přesně vysvětlit, proto toto měření vyloučíme.

Na následujícím obrázku jsou vidět amplifikační křivky jednotlivých měření.



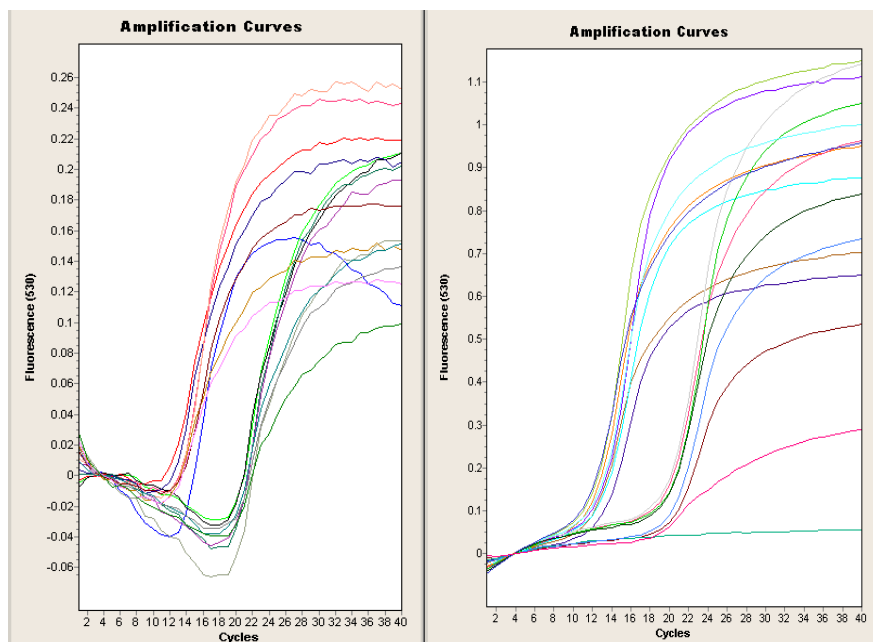
Obrázek 10. Nalevo Amplifikační křivky u vzorku 175/23 napravo amplifikační křivky u vzorku 155/23 s použitím metody Top-bio. Zdroj: Vlastní

Tabulka 16. Výsledky měření metodou TAKARA tetraplikátech.

Vzorek	Primer	gen	Ct Value	ΔCt	$2^{\Delta Ct}$	Copy Number of mtDNA
155/23	mix1	ND1	11,88	6,46	88	117
	mix2	SLCO2B1	18,34			
	mix3	ND5	10,75	7,19	146	
	mix4	SERPINA1	17,94			
155/23	mix1	ND1	11,98	6,27	77	109
	mix2	SLCO2B1	18,25			
	mix3	ND5	10,77	7,13	140	
	mix4	SERPINA1	17,9			
155/23	mix1	ND1	11,87	6,42	86	110
	mix2	SLCO2B1	18,29			
	mix3	ND5	10,81	7,08	135	
	mix4	SERPINA1	17,89			
155/23	mix1	ND1	11,9	6,37	83	107
	mix2	SLCO2B1	18,27			
	mix3	ND5	10,91	7,04	132	
	mix4	SERPINA1	17,95			
175/23	mix1	ND1	11,65	7,31	159	79
	mix2	SLCO2B1	18,96			
	mix3	ND5	30,59	-19,91	0	
	mix4	SERPINA1	10,68			
175/23	mix1	ND1	11,77	7,2	147	188
	mix2	SLCO2B1	18,97			
	mix3	ND5	10,77	7,84	229	
	mix4	SERPINA1	18,61			
175/23	mix1	ND1	11,86	7,3	158	197
	mix2	SLCO2B1	19,16			
	mix3	ND5	10,93	7,88	236	
	mix4	SERPINA1	18,81			
175/23	mix1	ND1	11,44	7,18	145	131
	mix2	SLCO2B1	18,62			
	mix3	ND5	10,34	6,86	116	
	mix4	SERPINA1	17,2			

Zdroj: Vlastní

U vzorku 175/23 při prvním měření vyšla hodnota Ct pro gen ND5 30,59 a pro gen SERPINA1 10,68. Hodnoty pro mitochondriální gen ND5 by ale měly být nižší než pro jaderný gen SERPINA. Toto měření jsme proto vyloučili.



Obrázek 11. Nalevo Amplifikační křivky u vzorku 175/23 napravo amplifikační křivky u vzorku 155/23 s použitím metody TAKARA. Zdroj: Vlastní

Pro stanovené tetraplikáty jednotlivých vzorků jsme pro každou metodu vypočetli směrodatnou odchylku (SD) a porovnali je navzájem.

Tabulka 17. Porovnání směrodatných odchylek u použitých metod měřených v tetraplikátech.

TAKARA			Top-Bio		
Vzorek	Copy Number of mtDNA	SD	Vzorek	Copy Number of mtDNA	SD
155/23	117	4,36	155/23	101	36,39
155/23	109		155/23	149	
155/23	110		155/23	78	
155/23	107		175/23	126	1,00
175/23	188	175/23	124		
175/23	197	175/23	124		
175/23	131	175/24	126		

Zdroj: Vlastní

U vzorků, u kterých jsme kvůli chybě museli odstranit jedno měření, byly směrodatné odchylky výrazně vyšší než u vzorků, u kterých proběhla všechna čtyři měření. To by mohlo značit, že tato měření neproběhla úplně v pořádku. Pokud budeme hodnotit pouze kompletní měření, zdá se, že metoda Top-bio poskytla konzistentnější výsledky.

Stejný experiment, kdy jsme porovnávali směrodatné odchylky u obou metod, jsme provedli ještě jednou s jiným vzorkem. Tentokrát jsme vzorek měřili v triplikátech. Pro přípravu vzorků jsme použili postup popsáný v kapitole 7.4.

Tabulka 18. Výsledky měření metodou TAKARA v triplikátech.

Vzorek	Primer	gen	Ct Value	ΔCt	$2^{\Delta Ct}$	Copy Number of mtDNA
FC74/22	mix1	ND1	12,12	7,96	249	265
	mix2	SLCO2B1	20,08			
	mix3	ND5	11,48	8,13	280	
	mix4	SERPINA1	19,61			
FC74/22	mix1	ND1	12,13	7,93	244	259
	mix2	SLCO2B1	20,06			
	mix3	ND5	11,5	8,1	274	
	mix4	SERPINA1	19,6			
FC74/22	mix1	ND1	12,15	7,91	241	256
	mix2	SLCO2B1	20,06			
	mix3	ND5	11,5	8,09	272	
	mix4	SERPINA1	19,59			

Zdroj: Vlastní

Tabulka 19. Výsledky měření metodou Top-Bio v triplikátech.

Vzorek	Primer	Ct Value	ΔCt	Copy Number of mtDNA
FC74/22	mix1 mtDNA	10,15	7,37	165
	mix2 cDNA	17,52		
FC74/22	mix1 mtDNA	10,29	7,21	148
	mix2 cDNA	17,50		
FC74/22	mix1 mtDNA	10,25	7,31	159
	mix2 cDNA	17,56		

Zdroj: Vlastní

Tabulka 20. Porovnání směrodatných odchylek u použitých metod při měření v triplikátech.

TAKARA inc.			Top-Bio s.r.o.		
Vzorek	Copy Number of mtDNA	SD	Vzorek	Copy Number of mtDNA	SD
FC74/22	265	4,12	FC74/22	165	8,75
FC74/22	259		FC74/22	148	
FC74/22	256		FC74/22	159	

Zdroj: Vlastní

V tomto experimentu nedošlo k žádným neočekávaným změnám v hodnotách Ct. Naopak ale vyšla směrodatná odchylka. Směrodatná odchylka vyšla naopak menší u metody TAKARA.

Provedli jsme měření od dobrovolníků z řad studentů, u kterých jsme vyzkoušeli přímou izolaci podle postupu uvedeného v kapitole 7.2.3. K měření jsme použili metodu TopBio.

Tabulka 21. Výsledky měření z přímé izolace.

Vzorek	Primer	Ct Value	Δ Ct	Copy Number of mtDNA
MT 01/22	mix1 mtDNA	12,20	7,76	216
	mix2 cDNA	19,96		
MT 02/22	mix1 mtDNA	13,16	7,74	213
	mix2 cDNA	20,9		
MT 03/22	mix1 mtDNA	11,28	11,86	3717
	mix2 cDNA	23,14		
MT 04/22	mix1 mtDNA	14,37	7,42	171
	mix2 cDNA	21,79		
MT 05/22	mix1 mtDNA	-	-	-
	mix2 cDNA	7,88		
MT 06/22	mix1 mtDNA	12,69	8,38	333
	mix2 cDNA	21,07		
MT 07/22	mix1 mtDNA	13,97	10,11	1105
	mix2 cDNA	24,08		
MT 08/22	mix1 mtDNA	11,25	9,38	666
	mix2 cDNA	20,63		
MT 09/22	mix1 mtDNA	13,58	12,00	4096
	mix2 cDNA	25,58		
MT 10/22	mix1 mtDNA	13,58	14,43	22073
	mix2 cDNA	28,01		
MT 11/22	mix1 mtDNA	13,03	7,07	134
	mix2 cDNA	20,10		
MT 12/22	mix1 mtDNA	-	-	-
	mix2 cDNA	-		

Zdroj: Vlastní

Vzorky MT 05/22 a MT 12/22 uvedené v Tabulce 20. nevyšly ani po opakovaném měření.

Dále jsme chtěli ověřili, zda poloviční reakce poskytuje stejné výsledky jako reakce při použití plného množství reagensů. Postup byl stejný jako při přípravě plné reakce pouze s použitím polovičního objemu reagensů. Koncentraci templátové DNA jsme ponechali stejnou.

Vyzkoušeli jsme také různé koncentrace templátové DNA. Dále jsme namíchali ředící řadu, abychom zjistili optimální vstupní koncentraci DNA pro reakci. Postupovali jsme stejně jako je uvedeno v kapitole 7.4. s jediným rozdílem. Při pipetování templátové DNA jsme její objem upravili podle požadované koncentrace v reakční směsi.

Tabulka 22. Porovnání reakce z plné a poloviční dávky.

Použitá dávka na reakci	TAKARA inc.						Top-Bio s.r.o.				
	Vzorek	Primer	Ct Value	ΔCt	$2^{\Delta Ct}$	Copy Number of mtDNA	Vzorek	Primer	Ct Value	ΔCt	Copy Number of mtDNA
Plná dávka	1101/21	mix 1	13,64	6,08	68	70	FC50/22	mix1 mtDNA	10,76	8,31	317
		mix 2	19,72					mix2 cDNA	19,07		
		mix 3	12,85	6,16	72			mix1 mtDNA	10,18		
		mix 4	19,01					mix2 cDNA	18,57		
Poloviční dávka	1101/21	mix 1	13,57	5,84	57	66	FC50/22	mix1 mtDNA	10,18	8,39	335
		mix 2	19,41					mix2 cDNA	18,57		
		mix 3	12,77	6,21	74			mix1 mtDNA	10,18		
		mix 4	18,98					mix2 cDNA	18,57		

Zdroj: Vlastní

Výsledné hodnoty se u obou vzorků významně nelišily.

Tabulka 23. Použití koncentrací 50 ng a 100 ng DNA na reakci a porovnání výsledků u obou metod.

TAKARA inc.						Top-Bio s.r.o.				
Vzorek/ koncentrace DNA	Primer	Ct Value	Δ Ct	2^{Δ Ct}	Copy Number of mtDNA	Vzorek/ koncentrace DNA	Primer	Ct Value	Δ Ct	Copy Number of mtDNA
FC115/22 50 ng	mix1	12,04	15,02	33225	21253	FC115/22 50 ng	mix1	10,18	13,3	10086
	mix2	27,06					mix2	23,48		
	mix3	11,26	13,18	9281			mix1	9,19		
	mix4	24,44					mix2	22,62		
FC115/22 100 ng	mix1	11,27	14,73	27175	18039	FC115/22 100 ng	mix1	9,19	13,43	11037
	mix2	26					mix2	22,62		
	mix3	10,51	13,12	8903			mix1	9,19		
	mix4	23,63					mix2	22,62		

Zdroj: Vlastní

Při porovnání v rámci metod, byl u metody TAKARA vyšší výsledek při použití 50 ng, naopak u metody Top-Bio byl výsledek vyšší v reakci se 100 ng DNA. Je zajímavé, že metoda TAKARA poskytuje celkově vyšší hodnoty mtDNA.

Tabulka 24. Různé koncentrace templátové DNA (50 ng a 100 ng) na reakci s použitím metody Top-bio.

Vzorek/použitá koncentrace DNA	Primer	Ct Value	Δ Ct	Copy Number of mtDNA
FC115/22 50 ng	mix1	10,18	13,3	10086
	mix2	23,48		
FC115/22 100 ng	mix1	9,19	13,43	11037
	mix2	22,62		
227/22 B 50 ng	mix1	11,14	10,85	1846
	mix2	21,99		
227/22 B 100 ng	mix1	9,9	11,02	2077
	mix2	20,92		

Zdroj: Vlastní

Při použití metody Top-Bio si u vzorku FC115/22 s 50 ng a 100 ng výsledky neodpovídaly. Menší rozdíl byl u vzorku 227/22 B.

Tabulka 25. Ředící řada 25 ng, 50 ng a 100 ng na reakci s použitím metody Top-Bio.

Top-Bio s.r.o.					
Koncentrace DNA	Vzorek	Primer	Ct Value	ΔCt	Copy Number of mtDNA
25 ng	1101/21	mix1	13,50	6,59	96
		mix2	20,09		
50 ng	1101/21	mix1	13,24	6,52	92
		mix2	19,76		
100 ng	1101/21	mix1	11,83	9,55	750
		mix2	21,38		
Opakování					
25 ng	1101/21	mix1	12,16	6,30	79
		mix2	18,46		
50 ng	1101/21	mix1	11,25	6,22	75
		mix2	17,47		
100 ng	1101/21	mix1	10,58	6,23	75
		mix2	16,81		

Zdroj: Vlastní

V případě použití ředící řady 25 ng, 50 ng a 100 ng se u prvního vzorku vyskytla velká odchylka u měření s použitím 100 ng. Pro ověření jsme experiment opakovali, kdy už hodnoty u jednotlivých ředění korelovaly.

Tabulka 26. Ředící řada 25 ng, 50 ng a 100 ng na reakci s použitím metody TAKARA.

TAKARA inc.						
Koncentrace DNA	Vzorek	Primer	Ct Value	ΔCt	$2^{\Delta Ct}$	Copy Number of mtDNA
25 ng	FC50/22	mix 1	14,83	7,81	224,41	334
		mix 2	22,64			
		mix 3	12,77	8,79	442,64	
		mix 4	21,56			
50 ng	FC50/22	mix 1	12,81	9,26	613,11	550
		mix 2	22,07			
		mix 3	12,08	8,93	487,75	
		mix 4	21,01			
100 ng	FC50/22	mix 1	11,92	11,02	2076,59	1271
		mix 2	22,94			
		mix 3	11,21	8,86	464,65	
		mix 4	20,07			

Zdroj: Vlastní

Při stejném experimentu s využitím metody TAKARA, kde jsme provedli ředící řadu 25 ng, 50 ng a 100 ng došlo k postupnému nárůstu počtu kopií mtDNA společně s rostoucí koncentrací.

Tabulka 27. Ředící řada 5ng, 12,5 ng, 50 ng, 75ng a 100ng na reakci s použitím metody Top-Bio.

Top-Bio s.r.o.					
Koncentrace DNA	Vzorek	Primer	Ct Value	Δ Ct	Copy Number of mtDNA
5 ng	MT12/22	mix1	13,53	7,13	140
		mix2	20,66		
12,5 ng	MT12/22	mix1	12,81	6,35	82
		mix2	19,16		
50 ng	MT12/22	mix1	10,90	6,27	77
		mix2	17,17		
75 ng	MT12/22	mix1	10,54	6,30	79
		mix2	16,84		
100 ng	MT12/22	mix1	10,97	5,81	56
		mix2	16,78		

Zdroj: Vlastní

Při ředící řadě 5 ng, 12,5 ng, 50 ng, 75 ng a 100 ng byla vyšší hodnota mtDNA u koncentrace 5 ng na reakci a snížená hodnota u 100 ng na reakci.

Provedli jsme proto měření s použitím 5 ng a 50 ng DNA na reakci, abychom otestovali nízké koncentrace DNA. Koncentraci 50 ng DNA, jsme použili jako kontrolní vzorky. Měření přineslo rozporuplné výsledky, které neodpovídaly kontrolním vzorkům.

Tabulka 28. Koncentrace 5 ng DNA na reakci s použitím metody Top-Bio.

Top-Bio s.r.o.						
Koncentrace DNA	Vzorek	Primer	Ct Value	Δ Ct	Copy Number of mtDNA	kontrolní vzorky
5 ng	FC31/22	mix1	28,84	6,16	72	102
		mix2	35			
5 ng	FC59/22	mix1	12,17	13,85	14766	4608
		mix2	26,02			
5 ng	FC71/22	mix1	-	-	-	228
		mix2	-			
5 ng	FC72/22	mix1	-	-	-	124
		mix2	-			
5 ng	FC87/22	mix1	-	-	-	205
		mix2	-			
5 ng	FC115/22	mix1	12,73	15,78	56267	10085
		mix2	28,51			

Zdroj: Vlastní

9. Diskuse

Shrnutí informací o mitochondriální DNA a její úloze v organismu a při onemocněních poskytují studie Picard. (2021), Castellani et al. (2020) Filograna et al. (2021). To, že jsou mitochondrie důležité pro energetický metabolismus a hrají významnou roli v procesu stárnutí a apoptózy, je obecně uznávaným faktem. Začíná být všeobecně akceptován fakt, že počet kopií mtDNA s věkem klesá (Ashar et al., 2015). Ding et al. (2015) provedli rozsáhlou studii u více než 2000 subjektů, která prokázala mírné, ale významné snížení mtDNA s rostoucím věkem. Naše výsledky těmito tvrzením odpovídají. Jednak se nám podařilo dokázat vztah mezi klesajícím počtem kopií mtDNA s rostoucím věkem, zároveň jsme pomocí statistických nástrojů prokázali, že platí stanovená hypotéza H_1 : „U lidí s vyšším věkem klesá počet kopií mtDNA“. Také jsme dokázali, že zjištěná závislost je silná, neboť koeficient determinace R^2 je roven 0,68. Výzkumná skupina Van Leeuwen et al. (2014) zjistila, že počet kopií ve vzorcích krve byl zřetelně snížen u jedinců mezi 50. a 70. rokem života. V našem případě došlo k nárůstu počtu kopií u věkových skupin 51–60 a 61–70 oproti starším věkovým skupinám a skupinám ve věku 31–40 let a 41–50 let. Tento nárůst mohl být způsoben tím, že věková kategorie 51–70 let byla nejvíce zastoupenou v počtu měření a jednalo se o participanty dbající o své zdraví více než normální populace. Dále mohl být tento nárůst způsoben vyšší nemocností u této skupiny, která se dá vzhledem k pokročilému věku předpokládat. Ve věkové skupině 71–100 let byly zahrnuty osoby trpící Alzheimerovou chorobou, u kterých byl zřetelný propad v počtu kopií mtDNA. To odpovídá zjištění Wei et al. (2017), který pozoroval snížení počtu kopií mtDNA v souvislosti s Alzheimerovou chorobou. Tato studie ovšem stanovovala počty kopií mtDNA z biopsií mozku.

Studie provedená skupinou Ding et al. (2015) prokázala, že ženy mají v průměru výrazně více kopií mtDNA než muži. Jiná studie Ashar et al. (2015) také uvádí vyšší počet kopií mtDNA u žen ve srovnání s muži. Studie Knez et al. (2016) vyšetřovala od roku 2009 do roku 2013 celkem 689 osob a prokázala negativní vztah mezi relativním počtem kopií mtDNA a věkem. Dále prokázala významně vyšší počet kopií mtDNA u žen. V případě našeho měření nám vyšel medián u mužů 263 a u žen 177, což je v rozporu s uvedenými studiemi, které jednoznačně prokázaly, že ženy mají zvýšené průměry počtu kopií mtDNA. Navíc statistická hladina významnosti námi provedeným T testem nedosáhla mezní hodnoty, takže nemůžeme vyloučit stanovenou hypotézu H_0 : „Muži a ženy mají

stejně hladiny mtDNA“. Tento nesoulad ve výsledcích mohl být způsoben nerovnoměrným zastoupením pohlaví ve vyšetřovaném souboru. Také to mohlo být způsobeno tím, že ve skupině žen byly zaznamenány velké rozdíly mezi jednotlivými měřeními viz Tabulka 13. U mužů byla směrodatná odchylka o řád nižší, než u skupiny žen. Proč měli muži vyšší hladiny nedokážeme zcela vysvětlit. Je možné, že v testovaném souboru mužů mohlo být více jedinců se zánětlivým onemocněním. Tento fakt podporuje studie Boyapati et al. (2017), která se zabývala mtDNA u zánětlivých onemocnění a říká, že u řady zánětlivých onemocnění jsou zvýšené počty kopií mtDNA.

Pokud je nám známo, zatím nikdo neporovnával rozdíl počtu kopií mtDNA měřených z periferní krve a bukálních stěrů. Vesměs se většina studií zabývá měřením počtu kopií z periferní krve. Z našeho pozorování je patrné, že medián počtu kopií mtDNA měřený z periferní krve je výrazně nižší než z bukálních stěrů. Konkrétně u bukálních stěrů byl medián 232 a u vzorků periferní krve 87. Je důležité zmínit, že většina měření, konkrétně 83 %, pocházela z bukálních stěrů a výsledek tím může být významně ovlivněn.

Stanovení počtu kopií mtDNA je složitá problematika, kterou se zabývala řada studií včetně Fazzini et al. (2018) a Refinetti et al. (2017). Pro porovnání metody TAKARA a Top-Bio jsme měřili dva vzorky v tetraplikátech. U každé metody bylo odstraněno jedno měření z důvodu chybné reakce. Pokud porovnáme směrodatné odchylky, u kompletního měření v tetraplikátech vyšla nižší odchylka u metody Top-Bio. Porovnávali jsem ale odlišné vzorky 155/23 a 175/23, což určitě ovlivnilo výsledky. Pokud však porovnáme amplifikační křivky u vzorku 175/23 za použití metody Top-Bio, vidíme, že u jednotlivých opakování se křivky prolínají, a reakce tak probíhaly stejně viz Obrázek 10. U vzorku 155/23 již můžeme spatřit větší rozdíly v amplifikačních křivkách. Situace u metody TAKARA byla přesně opačná, kdy proces amplifikace proběhl v pořádku u vzorku 155/23 a u vzorku 175/23 neměly křivky optimální tvar viz Obrázek 11. Amplifikace genů závisí na kvalitě odebraného vzorku. Častým problémem je také amplifikace jaderných pseudogenů, jak udává studie Malik et al. (2011). Na druhou stranu článek Refinetti et al. (2017), ze kterého jsme převzali primery pro metodu Top-Bio udává, že mitochondriální primer byl zvolen tak, aby se nemohl amplifikovat v jaderném genomu a naopak.

Při dalším experimentu, který jsme měřili v triplicátech proběhly reakce v pořádku, v tomto případě vyšla směrodatná odchylka menší u metody TAKARA. Při porovnání výsledků s použitím reagensií o plném objemu a polovičním objemu nedošlo k výraznému odlišení. V experimentu, kdy jsme vyzkoušeli dvě rozdílné koncentrace templátové DNA 50 ng a 100 ng, neposkytly obě metody srovnatelné výsledky. Zajímavé ovšem je, že při porovnání obou metod vyšel u metody TAKARA počet kopií přibližně dvojnásobný viz Tabulka 23., což je jev, který jsme pozorovali i u jiných měření. Rozdíly v měření metodou TAKARA a Top-Bio ovlivňuje mnoho faktorů, velmi záleží na laboratorní přípravě vzorků, zejména na pipetování správného objemu reagensií, i když jsme se této chybě snažili maximálně zabránit přípravou premixů ve větším objemu reagensií. Dále velice záleží na správném provedení odběru vzorku pro izolaci DNA. Zejména u bukalních stěrů záleží na tom, zda byl odběr učiněn řádně a po dostatečně dlouhou dobu. Z toho vychází koncentrace izolované DNA. Pokud je velmi nízká nebo nekvalitní, dochází k chybám v měření. Jak již bylo diskutováno výše, ukazuje se, že také závisí na zdravotním stavu vyšetřovaných osob. Z ekonomického hlediska je TAKARA nákladnější a nelze s ní vyšetřit tolik vzorků najednou (kapacita přístroje je 32 pozic), lze tedy změřit pouze 8 vzorků najednou. Metodou Top-Bio můžeme změřit až 16 vzorků současně. Jistá výhoda metody TAKARA spočívá v tom, že se vlastně měří v duplikátech a konečný výsledek se průměruje, takže pokud by reakce s jedním primerem nevyšla, druhý primer nám poskytuje částečnou kontrolu. Experimentálně jsme vyzkoušeli měření s použitím metody Top-Bio u přímé (bezkolonkové) izolace, přičemž dva vzorky neposkytly výsledky měření. To mohlo být způsobeno nesprávným odběrem, protože se jednalo o vzorky studentů, u kterých nebyl dodržen řádný čas transportu vzorků do laboratoře.

Při opakování experimentu s použitím 50 ng a 100 ng DNA jsme použili dva vzorky viz Tabulka 24. Měření jsme provedli metodou Top-Bio. U vzorku FC115/22 si výsledky neodpovídaly. Větší rozdíl byl u vzorku 227/22 B. Všimli jsme si, že u vzorků s vysokým počtem kopií, jako je vzorek FC 115/22, dochází k velkým rozdílům mezi jednotlivými měřeními, protože relativní počet kopií mtDNA souvisí se skutečným zastoupením mitochondrií v organismu. V jistých případech, kdy jsou mitochondrie extrémně namnožené, dochází ke změně poměru mtDNA a nDNA, což ovlivňuje měření.

Pro zjištění optimální koncentrace DNA jsme si připravili ředící řadu u obou metod 25 ng, 50 ng a 100 ng. U metody Top-Bio došlo u koncentrace 100 ng k navýšení hodnot

mtDNA, viz Tabulka 25. Při opakování experimentu si hodnoty odpovídaly. V případě metody TAKARA došlo k postupnému nárůstu hodnot mtDNA společně s rostoucí koncentrací vstupního množství DNA. Dále jsme provedli ředící řadu 5 ng, 12,5 ng, 50ng, a 100 ng u metody Top-Bio, kdy se výsledky významně nelišily. Výjimkou bylo vstupní množství DNA 5 ng, kdy došlo k neočekávanému nárůstu a při použití 100 ng DNA naopak došlo k poklesu počtu kopií mtDNA. Z těchto výsledků uvedených v Tabulce 26 předpokládáme, že koncentrace 50 ng je vhodnější než použití 100 ng. Provedli jsme experiment s použitím vstupní DNA do reakce o koncentraci 5 ng. Zjistili jsme, že výsledky neodpovídaly kontrolním vzorkům s použitím 50 ng na reakci. Z toho usuzujeme, že při nízkých koncentracích neprobíhá reakce správně. Článek Malik et al. (2011) také uvádí, že při nízké koncentraci a nízkém počtu kopií se přesnost liší více než při vyšších koncentracích DNA.

Ze statistických analýz jsem potvrdili tvrzení ostatních autorů, že počet kopií mtDNA s věkem klesá. (Ashar et al., 2015). Ding et al. (2015). U porovnání počtu kopií mtDNA u mužů a žen jsme dospěli k opačným závěrům než většina studií, to ale připisujeme nerovnoměrnému zastoupení mužů a žen a dalším diskutovaným faktorům. Z porovnání metod nelze přesně určit, která metoda podává konzistentnější výsledky, ale zdá se být důležitá kontrola průběhu reakce sledováním amplifikačních křivek. Z provedených experimentů jsem zjistili, že optimální koncentrace pro reakci je 50 ng templátové DNA a nízké koncentrace templátové DNA nejsou vhodné. Také jsme zjistili, že u vysokého počtu kopií dochází i u opakovaných měření k velkým odchylkám. Toto zjištění je ale potřeba dále ověřit.

10. Závěr

Bakalářská práce byla rozdělena do dvou částí, v teoretické části bylo cílem práce shrnout současné poznání v oblasti mitochondriální DNA a její asociace s lidskými onemocněními. Na základě výzkumů je prokázáno, že počet kopií mitochondriální DNA je spojen s celou řadou onemocnění. Měření obsahu mtDNA z periferní krve je užitečným indikátorem mitochondriální funkce a v budoucnu může být používán pro sledování zdravotního stavu pacienta. Tato metoda může sloužit jako doplňkové vyšetření pro diagnostiku různých onemocnění, včetně neuromuskulárních chorob, nádorů a v neposlední řadě mitochondriálních onemocnění. Nicméně, pro zavedení této metody do praxe je potřeba dalšího výzkumu a standardizace metodiky měření. Interpretace počtu kopií mtDNA však není jednoznačná a nelze říci, zda je patologické snížení, nebo zvýšení počtu kopií mtDNA. Mnoho lidí se sníženým počtem kopií nemá žádné zdravotní potíže. Organismus je vybaven řadou reparačních mechanismů a počty kopií mtDNA se během života s jistotou mění. Záleží na mnoha faktorech jako je stres, přítomnost onemocnění, typ stravy a v neposlední řadě fyzická kondice.

Druhá část práce se zaměřila na praktické provedení základních genetických metod, jako je izolace DNA, měření koncentrace DNA a příprava reakčních směsí pro real-time PCR. Součástí také bylo zavedení metody do praxe. To bylo splněno, neboť se nám osvědčila metoda Top-Bio, kterou jsme nakonec používali více. Metoda v sobě skrývá několik výhod. Je jednodušší na provedení, protože používá pouze dvě kapiláry na měření jednoho vzorku namísto čtyř. To s sebou také nese menší riziko lidské chyby. Je ekonomicky výhodná a lze z ní vyšetřit větší počet vzorků za určitý čas. U této metody jsme také používali poloviční reakci, kterou jsme si experimentálně ověřili. V neposlední řadě bylo cílem práce otestovat stanovené hypotézy, což bylo splněno.

11. Seznam použité literatury

ALEXEYEV, M.F., 2009. Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species?. *FEBS Journal* [online]. 276(20), 5768-5787 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07269.x. ISSN 1742464X.

ALI, Z., WASEEM, S., ANIS, R.A., ANEES, M., 2020. Assessment of cell free mitochondrial DNA as a biomarker of disease severity in different viral infections. *Pakistan Journal of Medical Sciences* [online]. 36(5) [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.12669/pjms.36.5.2476. ISSN 1681-715X.

ANDERSON, S. et al., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* [online]. 290(5806), 457-465 [cit. 2023-2-20]. DOI: 10.1038/290457a0. ISSN 0028-0836.

ANDREU, A.L., MARTINEZ, R., MARTI, R., GARCÍA-ARUMÍ, E., 2009. Quantification of mitochondrial DNA copy number: Pre-analytical factors. *Mitochondrion* [online]. 9(4), 242-246 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1016/j.mito.2009.02.006. ISSN 15677249.

ASHAR, F.N. et al., 2015. Association of mitochondrial DNA levels with frailty and all-cause mortality. *Journal of Molecular Medicine* [online]. 93(2), 177-186 [cit. 2023-4-15]. DOI: 10.1007/s00109-014-1233-3. ISSN 0946-2716.

ASHAR, F.N. et al., 2017. Association of Mitochondrial DNA Copy Number With Cardiovascular Disease. *JAMA Cardiology* [online]. 2(11) [cit. 2023-4-15]. DOI: 10.1001/jamacardio.2017.3683. ISSN 2380-6583. Dostupné z: <http://cardiology.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamacardio.2017.3683>

BAYKARA, O., SAHIN, S. K., AKBAS, F., GUVEN, M., ONARAN, I. 2016. The effects of mitochondrial DNA deletion and copy number variations on different exercise intensities in highly trained swimmers. *Cellular and molecular biology*, 62(12), 109–115. <https://doi.org/10.14715/cmb/2016.62.12.19>

BEITER, T., FRAGASSO, A., HUDEMANN, J., NIESS, A.M., SIMON, P., 2011. Short-Term Treadmill Running as a Model for Studying Cell-Free DNA Kinetics In Vivo. *Clinical Chemistry* [online]. 57(4), 633-636 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1373/clinchem.2010.158030. ISSN 0009-9147.

BENDER, A. et al., 2006. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature Genetics* [online]. 38(5), 515-517 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1038/ng1769. ISSN 1061-4036.

BEREGI, E., REGIUS, O., 1987. Comparative morphological study of age related mitochondrial changes of the lymphocytes and skeletal muscle cells. *Acta Morphol Hung.* [online]. 35(3-4), 219-24. [cit. 2023-4-4] PMID: 3137786.

BIANCO, A. et al., 2017. High Mitochondrial DNA Copy Number Is a Protective Factor From Vision Loss in Heteroplasmic Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) [online]. 58(4) [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1167/iovs.16-20389. ISSN 1552-5783.

- BLIKSØEN, M. et al., 2016. Extracellular mtDNA activates NF- κ B via toll-like receptor 9 and induces cell death in cardiomyocytes. *Basic Research in Cardiology* [online]. 111(4) [cit. 2023-4-16]. DOI: 10.1007/s00395-016-0553-6. ISSN 0300-8428.
- BOGENHAGEN, D., CLAYTON, D.A., 1977. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* [online]. 11(4), 719-727 [cit. 2023-4-14]. DOI: 10.1016/0092-8674(77)90286-0. ISSN 00928674.
- BOUDREAU, L.H. et al., 2014. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood* [online]. 124(14), 2173-2183 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1182/blood-2014-05-573543. ISSN 0006-4971.
- BOYAPATI, R.K., TAMBORSKA, A., DORWARD, D.A., HO, G.-T., 2017. Advances in the understanding of mitochondrial DNA as a pathogenic factor in inflammatory diseases. *F1000Research* [online]. 6 [cit. 2023-4-16]. DOI: 10.12688/f1000research.10397.1. ISSN 2046-1402. Dostupné z: <https://f1000research.com/articles/6-169/v1>
- BRATIC, I. et al., 2009. Mitochondrial DNA level, but not active replicase, is essential for *Caenorhabditis elegans* development. *Nucleic Acids Research* [online]. 37(6), 1817-1828 [cit. 2023-4-15]. DOI: 10.1093/nar/gkp018. ISSN 0305-1048.
- BRINKMANN, V. et al., 2004. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* [online]. 303(5663), 1532-1535 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1126/science.1092385. ISSN 0036-8075.
- CASTELLANI, C.A., LONGCHAMPS, R.J., SUN, J., GUALLAR, E., ARKING, D.E., 2020. Thinking outside the nucleus: Mitochondrial DNA copy number in health and disease. *Mitochondrion* [online]. 53, 214-223 [cit. 2023-4-15]. DOI: 10.1016/j.mito.2020.06.004. ISSN 15677249.
- CUI, H.H. et al., 2013. Association of decreased mitochondrial DNA content with the progression of colorectal cancer. *BMC Cancer* [online]. 13(1) [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1186/1471-2407-13-110. ISSN 1471-2407.
- CURRAN, J.E. et al., 2007. Genetic determinants of mitochondrial content. *Human Molecular Genetics* [online]. 16(12), 1504-1514 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1093/hmg/ddm101. ISSN 1460-2083.
- DAVIS, C. F. et al., 2014. The Somatic Genomic Landscape of Chromophobe Renal Cell Carcinoma. *Cancer Cell* [online]. 26(3), 319-330 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.07.014. ISSN 15356108.
- DE GAETANO, A. et al., 2021. Molecular Mechanisms of mtDNA-Mediated Inflammation. *Cells* [online]. 10(11) [cit. 2023-4-16]. DOI: 10.3390/cells10112898. ISSN 2073-4409.
- D'ERCHIA, A.M. et al., 2015. Tissue-specific mtDNA abundance from exome data and its correlation with mitochondrial transcription, mass and respiratory activity.

Mitochondrion [online]. 20, 13-21 [cit. 2023-2-20].
DOI: 10.1016/j.mito.2014.10.005. ISSN 15677249.

DIMMOCK, D., TANG, L.-Y., SCHMITT, E.S., WONG, L.-J.C., 2010. Quantitative Evaluation of the Mitochondrial DNA Depletion Syndrome. *Clinical Chemistry* [online]. 56(7), 1119-1127 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1373/clinchem.2009.141549. ISSN 0009-9147.

DING, J. et al., 2015. Assessing Mitochondrial DNA Variation and Copy Number in Lymphocytes of ~2,000 Sardinians Using Tailored Sequencing Analysis Tools. *PLOS Genetics* [online]. 11(7) [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005306. ISSN 1553-7404.

DUAN, M., TU, J., LU, Z., 2018. Recent Advances in Detecting Mitochondrial DNA Heteroplasmic Variations. *Molecules* [online]. 23(2) [cit. 2023-4-14]. DOI: 10.3390/molecules23020323. ISSN 1420-3049.

DUDLEY, G.A., ABRAHAM, W.M., TERJUNG, R.L., 1982. Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* [online]. 53(4), 844-850 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1152/jappl.1982.53.4.844. ISSN 8750-7587. Dostupné z: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/jappl.1982.53.4.844>

EKSTRAND, M.I., 2004. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Human Molecular Genetics* [online]. 13(9), 935-944 [cit. 2023-2-20]. DOI: 10.1093/hmg/ddh109. ISSN 1460-2083.

FAZZINI, F. et al., 2018. Plasmid-normalized quantification of relative mitochondrial DNA copy number. *Scientific Reports* [online]. 8(1) [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1038/s41598-018-33684-5. ISSN 2045-2322.

FAZZINI, F. et al., 2019. Mitochondrial DNA copy number is associated with mortality and infections in a large cohort of patients with chronic kidney disease. *Kidney International* [online]. 96(2), 480-488 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1016/j.kint.2019.04.021. ISSN 00852538.

FILOGRANA, R., MENNUNI, M., ALSINA, D., LARSSON, N.-G., 2021. Mitochondrial DNA copy number in human disease: The more the better?. *FEBS Letters* [online]. 12 December 2020, 595(8), 976-1002 [cit. 2022-4-11]. DOI: 10.1002/1873-3468.14021. ISSN 0014-5793.

FRAHM, T. et al., 2005. Lack of age-related increase of mitochondrial DNA amount in brain, skeletal muscle and human heart. *Mechanisms of Ageing and Development* [online]. 126(11), 1192-1200 [cit. 2023-4-18]. DOI: 10.1016/j.mad.2005.06.008. ISSN 00476374.

FUKUNAGA, H., 2021. Mitochondrial DNA Copy Number and Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 22(12) [cit. 2023-4-12]. DOI: 10.3390/ijms22126634. ISSN 1422-0067.

GARCÍA, N., GARCÍA, J.J., CORREA, F., CHÁVEZ, E., 2005. The permeability transition pore as a pathway for the release of mitochondrial DNA. *Life Sciences*

[online]. 76(24), 2873-2880 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.12.012. ISSN 00243205.

GARCIA-MARTINEZ, I. et al., 2016. Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 126(3), 859-864 [cit. 2023-4-16]. DOI: 10.1172/JCI83885. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <https://www.jci.org/articles/view/83885>

GIORDANO, C. et al., 2014. Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* [online]. 137(2), 335-353 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1093/brain/awt343. ISSN 1460-2156.

GRADY, J.P. et al., 2018. Mt DNA heteroplasmy level and copy number indicate disease burden in m.3243A>G mitochondrial disease. *EMBO Molecular Medicine* [online]. 10(6) [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.15252/emmm.201708262. ISSN 1757-4676.

GRÜNEWALD, A. et al., 2016. Mitochondrial DNA Depletion in Respiratory Chain–Deficient Parkinson Disease Neurons. *Annals of Neurology* [online]. 79(3), 366-378 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1002/ana.24571. ISSN 0364-5134.

GUO, W., JIANG, L., BHASIN, S., KHAN, S.M., SWERDLOW, R.H., 2009. DNA extraction procedures meaningfully influence qPCR-based mtDNA copy number determination. *Mitochondrion* [online]. 9(4), 261-265 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1016/j.mito.2009.03.003. ISSN 15677249.

HAMMOND, E.L. et al., 2003. Assessment of precision and concordance of quantitative mitochondrial DNA assays: a collaborative international quality assurance study. *Journal of Clinical Virology* [online]. 27(1), 97-110 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1016/S1386-6532(02)00134-8. ISSN 13866532.

HARRINGTON, J.S. et al., 2019. Circulating Mitochondrial DNA as Predictor of Mortality in Critically Ill Patients. *Chest* [online]. 156(6), 1120-1136 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1016/j.chest.2019.07.014. ISSN 00123692.

HE, Y. et al., 2010. Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature* [online]. 464(7288), 610-614 [cit. 2023-4-14]. DOI: 10.1038/nature08802. ISSN 0028-0836.

HOLLOSZY, J.O., 2011. Regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 expression by exercise. *Comprehensive Physiology*. [online]. 1(2), 921-40 [cit. 2023-4-17]. doi: 10.1002/cphy.c100052. PMID: 23737207.

HOLLOSZY, J.O., COYLE, E.F., 1984. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *Journal of Applied Physiology* [online]. 56(4), 831-838 [cit. 2023-4-17]. DOI: /10.1002/cphy.c100052. ISSN 8750-7587. Dostupné z: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/jappl.1984.56.4.831>

HOSGOOD, H.D. et al., 2010. Mitochondrial DNA copy number and lung cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis* [online]. 31(5), 847-849 [cit. 2023-4-18]. DOI: 10.1093/carcin/bgq045. ISSN 0143-3334. Dostupné z: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgq045>

HUANG, B. et al., 2014. Association of Leukocyte Mitochondrial DNA Copy Number with Colorectal Cancer Risk: Results from the Shanghai Women's Health

Study [online]. 23(11), 2357-2365 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0297. ISSN 1055-9965.

HUMMEL, E.M. et al., 2018. Cell-free DNA release under psychosocial and physical stress conditions. *Translational Psychiatry* [online]. 8(1) [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1038/s41398-018-0264-x. ISSN 2158-3188.

CHANG, Y.K., KIM, D.E., CHO, S.H., KIM, J.-H., 2016. Association between Leukocyte Mitochondrial DNA Copy Number and Regular Exercise in Postmenopausal Women. *Korean Journal of Family Medicine* [online]. 37(6) [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.4082/kjfm.2016.37.6.334. ISSN 2092-6715.

CHEN, S. et al., 2014. Association between leukocyte mitochondrial DNA content and risk of coronary heart disease: A case-control study. *Atherosclerosis* [online]. 237(1), 220-226 [cit. 2023-4-15]. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.08.051. ISSN 00219150.

CHEN, X., PROSSER, R., SIMONETTI, S., SADLOCK, J., JAGIELLO, G., SCHON, E.A., 1995 Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am J Hum Genet.* Aug;57(2):239-47. PMID: 7668249; PMCID: PMC1801549.

CHEN, Y., HILL, H.Z., LANGE, G., FALVO, M.J., 2017. Salivary Mitochondrial DNA Copy Number Is Associated With Exercise Ventilatory Efficiency. *Journal of Strength and Conditioning Research* [online]. 31(7), 2000-2004 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1519/JSC.0000000000001932. ISSN 1064-8011

CHIAL, H., CRAIG, J., 2008. MtDNA and Mitochondrial Diseases. *Nature Education* [online]. 1(1), 217 [cit. 2023-4-12]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/mtdna-and-mitochondrial-diseases-903/>

CHIPUK, J.E., BOUCHIER-HAYES, L., GREEN, D.R., 2006. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death & Differentiation* [online]. 13(8), 1396-1402 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401963. ISSN 1350-9047.

JAMES, C.R., IWASIOU, M., BIRNBOIM, H.C., 2008. Human Genomic DNA Content of Saliva Samples Collected in Oragene®• DNA [online]. [cit. 2023-4-18].

KACZMAREK, A., VANDENABEELE, P., KRYSKO, D. V., 2013. Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Immunity* [online]. 38(2), 209-223 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.02.003. ISSN 10747613.

KAUPPILA, J.H.K. et al., 2018. Base-excision repair deficiency alone or combined with increased oxidative stress does not increase mtDNA point mutations in mice. *Nucleic Acids Research* [online]. 46(13), 6642-6669 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1093/nar/gky456. ISSN 0305-1048.

KENNEDY, S.R., SALK, J.J., SCHMITT, M.W., LOEB, L.A., VAN HOUTEN, B., 2013. Ultra-Sensitive Sequencing Reveals an Age-Related Increase in Somatic Mitochondrial Mutations That Are Inconsistent with Oxidative Damage. *PLoS*

Genetics [online]. 9(9) [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003794. ISSN 1553-7404.

KIM, E.K., CHO, Y.M., 2019. Response to Comment on Kim et al. The Effect of a Smartphone-Based, Patient-Centered Diabetes Care System in Patients With Type 2 Diabetes: A Randomized, Controlled Trial for 24 Weeks. *Diabetes Care* 2019;42. *Diabetes Care* [online]. 42(7), e126-e126 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.2337/dci19-0021. ISSN 0149-5992.

KNEZ, J. et al., 2016. Correlates of Peripheral Blood Mitochondrial DNA Content in a General Population. *American journal of epidemiology*, 183(2), 138–146. [cit. 2023-2-27]. DOI:/10.1093/aje/kwv175

KUJOTH, G.C. et al., 2005. Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging. *Science* [online]. 309(5733), 481-484 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1126/science.1112125. ISSN 0036-8075.

KUKAT, C. et al., 2011. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 108(33), 13534-13539 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1073/pnas.1109263108. ISSN 0027-8424.

LA MORGIA, C., MARESCA, A., CAPORALI, L., VALENTINO, M.L., CARELLI, V., 2020. Mitochondrial diseases in adults. *Journal of Internal Medicine* [online]. 287(6), 592-608 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1111/joim.13064. ISSN 0954-6820.

LARMAN, T.C. et al., 2012. Spectrum of somatic mitochondrial mutations in five cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 109(35), 14087-14091 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1073/pnas.1211502109. ISSN 0027-8424.

LARSSON, N.-G. et al., 1998. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nature Genetics* [online]. 18(3), 231-236 [cit. 2023-2-20]. DOI: 10.1038/ng0398-231. ISSN 1061-4036.

LARSSON, N.-G., 2010. Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Mammalian Aging. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 79(1), 683-706 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060408-093701. ISSN 0066-4154.

LAX, N.Z., TURNBULL, D.M., REEVE, A.K., 2011. Mitochondrial Mutations: Newly Discovered Players in Neuronal Degeneration. *The Neuroscientist* [online]. 17(6), 645-658 [cit. 2023-4-12]. DOI: 10.1177/1073858411385469. ISSN 1073-8584.

LEMNRAU, A. et al., 2015. Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood Cells and Risk of Developing Breast Cancer. *Cancer Research* [online]. 75(14), 2844-2850 [cit. 2023-4-18]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1692. ISSN 0008-5472.

LIM, S. et al., 2000. Effect of exercise on the mitochondrial DNA content of peripheral blood in healthy women. *European Journal of Applied Physiology* [online]. 82(5-6), 407-412 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1007/s004210000238. ISSN 1439-6319.

LIN, P.-C. et al., 2008. Expression of β -F1-ATPase and mitochondrial transcription factor A and the change in mitochondrial DNA content in colorectal cancer: clinical

data analysis and evidence from an in vitro study. *International Journal of Colorectal Disease* [online]. 23(12), 1223-1232 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1007/s00384-008-0539-4. ISSN 0179-1958.

LIU, C.-S. et al., 2006. Alteration in the copy number of mitochondrial DNA in leukocytes of patients with mitochondrial encephalomyopathies. *Acta Neurologica Scandinavica* [online]. [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1111/j.1600-0404.2006.00586.x. ISSN 0001-6314.

LIU, Y. et al., 2015. Hypoxia induced HMGB1 and mitochondrial DNA interactions mediate tumor growth in hepatocellular carcinoma through Toll-like receptor 9. *Journal of Hepatology* [online]. 63(1), 114-121 [cit. 2023-4-16]. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.02.009. ISSN 01688278.

LONGCHAMPS, R.J. et al., 2020. Evaluation of mitochondrial DNA copy number estimation techniques. *PLOS ONE* [online]. 15(1) [cit. 2023-4-14]. DOI: 10.1371/journal.pone.0228166. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0228166>

LÓPEZ-OTÍN, C., BLASCO, M.A., PARTRIDGE, L., SERRANO, M., KROEMER, G., 2013. The Hallmarks of Aging. *Cell* [online]. 153(6), 1194-1217 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.039. ISSN 00928674.

LYNCH, S.M. et al., 2011. Mitochondrial DNA Copy Number and Pancreatic Cancer in the Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Cancer Prevention Research* [online]. 4(11), 1912-1919 [cit. 2023-4-18]. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0002. ISSN 1940-6207. Dostupné z: <https://aacrjournals.org/cancerpreventionresearch/article/4/11/1912/49637/Mitochondrial-DNA-Copy-Number-and-Pancreatic>

MALIK, A.N., SHAHNI, R., RODRIGUEZ-DE-LEDESMA, A., LAFTAH, A., CUNNINGHAM, P., 2011. Mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker: Accurate quantification using real time quantitative PCR without co-amplification of pseudogenes and dilution bias. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 412(1), 1-7 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.067. ISSN 0006291X. Do

MCGLYNN, M.L., SCHNITZLER, H., SHUTE, R., RUBY, B., SLIVKA, D., 2021. The Acute Effects of Exercise and Temperature on Regional mtDNA. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 18(12) [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.3390/ijerph18126382. ISSN 1660-4601.

MENGEL-FROM, J. et al., 2014. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells declines with age and is associated with general health among elderly. *Human Genetics* [online]. 133(9), 1149-1159 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1007/s00439-014-1458-9. ISSN 0340-6717.

MI, J. et al., 2015. The Relationship Between Altered Mitochondrial DNA Copy Number And Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Scientific Reports* [online]. 5(1) [cit. 2023-4-18]. DOI: 10.1038/srep10039. ISSN 2045-2322.

MILENKOVIC, D. et al., 2013. TWINKLE is an essential mitochondrial helicase required for synthesis of nascent D-loop strands and complete mtDNA replication.

Human Molecular Genetics [online]. 22(10), 1983-1993 [cit. 2023-4-12]. DOI: 10.1093/hmg/ddt051. ISSN 0964-6906.

NACHEVA, E. et al., 2017. DNA isolation protocol effects on nuclear DNA analysis by microarrays, droplet digital PCR, and whole genome sequencing, and on mitochondrial DNA copy number estimation. PLOS ONE [online]. 12(7) [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1371/journal.pone.0180467. ISSN 1932-6203.

NAKAHIRA, K. et al., 2011. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. Nature Immunology [online]. 12(3), 222-230 [cit. 2023-4-16]. DOI: 10.1038/ni.1980. ISSN 1529-2908.

NAKAHIRA, K. et al., 2013. Circulating Mitochondrial DNA in Patients in the ICU as a Marker of Mortality: Derivation and Validation. PLoS Medicine [online]. 10(12) [cit. 2023-4-16]. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001577. ISSN 1549-1676.

NASI, M. et al., 2016. Decreased Circulating mtDNA Levels in Professional Male Volleyball Players. International Journal of Sports Physiology and Performance [online]. 11(1), 116-121 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1123/ijsp.2014-0461. ISSN 1555-0265.

PICARD, M., 2021. Blood mitochondrial DNA copy number: What are we counting?. Mitochondrion [online]. 60, 1-11 [cit. 2023-4-14]. DOI: 10.1016/j.mito.2021.06.010. ISSN 15677249.

PODLESNIY, P. et al., 2013. Low cerebrospinal fluid concentration of mitochondrial DNA in preclinical Alzheimer disease. Annals of Neurology [online]. 74(5), 655-668 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1002/ana.23955. ISSN 03645134.

PYLE, A. et al., 2016. Reduced mitochondrial DNA copy number is a biomarker of Parkinson's disease. Neurobiology of Aging [online]. 38, 216.e7-216.e10 [cit. 2023-4-15]. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.033. ISSN 01974580.

PYLE, A. et al., 2016. Reduced mitochondrial DNA copy number is a biomarker of Parkinson's disease. Neurobiology of Aging [online]. 38, 216.e7-216.e10 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.033. ISSN 01974580.

REFINETTI, P., WARREN, D., MORGENTHALER, S., EKSTRØM, P.O., 2017. Quantifying mitochondrial DNA copy number using robust regression to interpret real time PCR results. BMC Research Notes [online]. 10(1) [cit. 2023-4-23]. DOI: 10.1186/s13104-017-2913-1. ISSN 1756-0500.

REZNIK, E. et al., 2016. Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. ELife [online]. 5 [cit. 2023-4-15]. DOI: 10.7554/eLife.10769. ISSN 2050-084X.

RODRÍGUEZ-SANTIAGO, B., CASADEMONT, J., NUNES, V., 2001. Is mitochondrial DNA depletion involved in Alzheimer's disease?. European Journal of Human Genetics [online]. 9(4), 279-285 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200629. ISSN 1018-4813.

ROSSIGNOL, R. et al., 2003. Mitochondrial threshold effects. *Biochemical Journal* [online]. 370(3), 751-762 [cit. 2023-4-14]. DOI: 10.1042/bj20021594. ISSN 0264-6021.

SANCHEZ-MARTINEZ, A. et al., 2012. Modeling Pathogenic Mutations of Human Twinkle in *Drosophila* Suggests an Apoptosis Role in Response to Mitochondrial Defects. *PLoS ONE* [online]. 7(8) [cit. 2023-4-12]. DOI: 10.1371/journal.pone.0043954. ISSN 1932-6203.

SANCHIS-GOMAR, F., GARCIA-GIMENEZ, J., GOMEZ-CABRERA, M., PALLARDO, F., 2014. Mitochondrial Biogenesis in Health and Disease. *Molecular and Therapeutic Approaches. Current Pharmaceutical Design* [online]. 20(35), 5619-5633 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.2174/1381612820666140306095106. ISSN 13816128.

SCIACCO, M., BONILLA, E., SCHON, E.A., DIMAURO, S., MORAES, C.T., 1994. Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy. *Human Molecular Genetics* [online]. 3(1), 13-19 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1093/hmg/3.1.13. ISSN 0964-6906.

SCOZZI, D. et al., 2021. Circulating mitochondrial DNA is an early indicator of severe illness and mortality from COVID-19. *JCI Insight* [online]. 6(4), 22 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1172/jci.insight.143299. ISSN 2379-3708.

SHEN, J. et al., 2015. Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood and Melanoma Risk. *PLOS ONE* [online]. 10(6) [cit. 2023-4-18]. DOI: 10.1371/journal.pone.0131649. ISSN 1932-6203.

SHOCKETT, P.E. et al., 2016. Plasma cell-free mitochondrial DNA declines in response to prolonged moderate aerobic exercise. *Physiological Reports* [online]. 4(1) [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.14814/phy2.12672. ISSN 2051817X.

STAWSKI, R. et al., 2017. Repeated bouts of exhaustive exercise increase circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA without development of tolerance in healthy men. *PLOS ONE* [online]. 12(5) [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1371/journal.pone.0178216. ISSN 1932-6203.

STEELE, H. et al., 2020. Metabolic effects of bezafibrate in mitochondrial disease. *EMBO Molecular Medicine* [online]. 12(3) [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.15252/emmm.201911589. ISSN 1757-4676.

SUN, J. et al., 2019. Association Between HIV Infection and Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood: A Population-Based, Prospective Cohort Study. *The Journal of Infectious Diseases* [online]. 219(8), 1285-1293 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1093/infdis/jiy658. ISSN 0022-1899.

TAYLOR, R.W., TURNBULL, D.M., 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics* [online]. 6(5), 389-402 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1038/nrg1606. ISSN 1471-0056.

THEDA, C. et al., 2018. Quantitation of the cellular content of saliva and buccal swab samples. *Scientific Reports* [online]. 8(1) [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1038/s41598-018-25311-0. ISSN 2045-2322.

THIEDE, C., PRANGE-KREX, G., FREIBERG-RICHTER, J., BORNHÄUSER, M., EHNINGER, G., 2000. Buccal swabs but not mouthwash samples can be used to obtain pretransplant DNA fingerprints from recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplantation* [online]. 25(5), 575-577 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1038/sj.bmt.1702170. ISSN 0268-3369.

THYAGARAJAN, B., WANG, R., BARCELO, H., KOH, W.-P., YUAN, J.-M., 2012. Mitochondrial Copy Number is Associated with Colorectal Cancer Risk [online]. 21(9), 1574-1581 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0138-T. ISSN 1055-9965.

TKACH, M., THÉRY, C., 2016. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* [online]. 164(6), 1226-1232 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.043. ISSN 00928674.

TLR9 toll like receptor 9 [Homo sapiens (human)], [online]. National Library of Medicine. Washington D.C., 10 Apr 2023 [cit. 2023-4-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=54106>

TRUMPF, C. et al., 2021. Stress and circulating cell-free mitochondrial DNA: A systematic review of human studies, physiological considerations, and technical recommendations. *Mitochondrion* [online]. 59, 225-245 [cit. 2023-4-15]. DOI: 10.1016/j.mito.2021.04.002. ISSN 15677249.

URATA, M., KOGA-WADA, Y., KAYAMORI, Y., KANG, D., 2008. Platelet contamination causes large variation as well as overestimation of mitochondrial DNA content of peripheral blood mononuclear cells. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* [online]. 45(5), 513-514 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1258/acb.2008.008008. ISSN 0004-5632.

VALDÉS-AGUAYO, J.J. et al., 2021. Peripheral Blood Mitochondrial DNA Levels Were Modulated by SARS-CoV-2 Infection Severity and Its Lessening Was Associated With Mortality Among Hospitalized Patients With COVID-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 11 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.3389/fcimb.2021.754708. ISSN 2235-2988.

VALERO, T., 2014. Editorial (Thematic Issue: Mitochondrial Biogenesis. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 20(35), 5507-5509 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.2174/138161282035140911142118. ISSN 13816128. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24606795/>

VAN LEEUWEN, N. et al., 2014. Low mitochondrial DNA content associates with familial longevity: the Leiden Longevity Study. *AGE* [online]. 36(3) [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1007/s11357-014-9629-0. ISSN 0161-9152.

VISCOMI, C., 2016. Toward a therapy for mitochondrial disease. *Biochemical Society Transactions* [online]. 44(5), 1483-1490 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1042/BST20160085. ISSN 0300-5127.

- WACHSMUTH, M. et al., 2016. Age-Related and Heteroplasmy-Related Variation in Human mtDNA Copy Number. *PLOS Genetics* [online]. 12(3) [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005939. ISSN 1553-7404.
- WARBURG, O., 1956. On the Origin of Cancer Cells. *Science* [online]. 123(3191), 309-314 [cit. 2023-4-18]. DOI: 10.1126/science.123.3191.309. ISSN 0036-8075.
- WEI, W. et al., 2017. *Acta Neuropathologica Communications* [online]. 5(1) [cit. 2023-4-15]. DOI: 10.1186/s40478-016-0404-6. ISSN 2051-5960.
- WREDENBERG, A. et al., 2002. Increased mitochondrial mass in mitochondrial myopathy mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 99(23), 15066-15071 [cit. 2023-4-17]. DOI: 10.1073/pnas.232591499. ISSN 0027-8424.
- XING, J. et al., 2008. Mitochondrial DNA Content: Its Genetic Heritability and Association With Renal Cell Carcinoma. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* [online]. 100(15), 1104-1112 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1093/jnci/djn213. ISSN 0027-8874.
- YANG, H., 2011. Correlation between increased copy number of mitochondrial DNA and clinicopathological stage in colorectal cancer. *Oncology Letters* [online]. [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.3892/ol.2011.322. ISSN 1792-1074.
- YANG, S.Y. et al., 2021. Blood-derived mitochondrial DNA copy number is associated with gene expression across multiple tissues and is predictive for incident neurodegenerative disease. *Genome Research* [online]. 31(3), 349-358 [cit. 2023-4-15]. DOI: 10.1101/gr.269381.120. ISSN 1088-9051.
- YONEDA, M., MIYATAKE, T., ATTARDI, G., 1995. Heteroplasmic mitochondrial tRNA^{Lys} mutation and its complementation in MERRF patient-derived mitochondrial transformants [online]. 18(S14), S95-S101 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1002/mus.880181420. ISSN 0148-639X.
- YUAN, Y. et al., 2020. Comprehensive molecular characterization of mitochondrial genomes in human cancers. *Nature Genetics* [online]. 52(3), 342-352 [cit. 2023-2-27]. DOI: 10.1038/s41588-019-0557-x. ISSN 1061-4036.
- ZHANG, J.I.A.N.-Z.H.E.N.G., LIU, Z.H.I., LIU, J.I.A., REN, J.I.-X.I.N., SUN, T.I.A.N.-S.H.E.N.G., 2014. Mitochondrial DNA induces inflammation and increases TLR9/NF- κ B expression in lung tissue. *International Journal of Molecular Medicine* [online]. 33(4), 817-824 [cit. 2023-4-16]. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1650. ISSN 1107-3756.

12. Seznam tabulek

Tabulka 1. Přehled sekvencí použitých primerů.....	36
Tabulka 2. Přehled reagensií a objemů použitých pro 1 a 32 reakcí (Top-Bio s.r.o.)....	37
Tabulka 3. Pipetovací protokol primerů a vzorků. Čísla v tabulce označují čísla vzorků.	38
Tabulka 4. Přehled reagensií a objemů použitých pro 1 a 32 reakcí (TAKARA BIO INC).	39
Tabulka 5. Pipetovací protokol primerů a vzorků. Čísla v tabulce označují čísla vzorků.	39
Tabulka 6: Reakční profil pro qPCR 2x SYBR Master Mix od výrobce Top-Bio s.r.o.	40
Tabulka 7: Reakční profil pro Human Mitochondrial DNA (mtDNA) Monitoring Primer Set a TB Green® Premix Ex Taq™ II (TAKARA)	40
Tabulka 8. Příklad tabulky pro vyhodnocení počtu kopií mtDNA s použitím Top-Bio s.r.o.....	42
Tabulka 9. Příklad tabulky pro vyhodnocení počtu kopií mtDNA s použitím TAKARA inc.....	42
Tabulka 10. Četnosti jedinců v jednotlivých věkových kategoriích.....	44
Tabulka 11. Četnostní tabulka popisující zastoupení věkových kategorií a počet měření.	44
Tabulka 12. Test ANOVA zobrazující hodnotu p.	47
Tabulka 13. Tabulka zobrazuje medián, průměr, směrodatnou odchylku a počet měření u pohlaví a.....	47
Tabulka 14. Tabulka zobrazuje medián u typů vzorků.....	48
Tabulka 15. Výsledky měření metody Top-Bio v tetraplikátech.....	49
Tabulka 16. Výsledky měření metodou TAKARA tetraplikátech.	50
Tabulka 17. Porovnání směrodatných odchylek u použitých metod měřených v tetraplikátech.....	51
Tabulka 18. Výsledky měření metodou TAKARA v triplikátech.	52
Tabulka 19. Výsledky měření metodou Top-Bio v triplikátech.	52
Tabulka 20. Porovnání směrodatných odchylek u použitých metod při měření v triplikátech.	53
Tabulka 21. Výsledky měření z přímé izolace.	53
Tabulka 22. Porovnání reakce z plné a poloviční dávky.	54
Tabulka 23. Použití koncentrací 50 ng a 100 ng DNA na reakci a porovnání výsledků u obou metod.	55
Tabulka 24. Různé koncentrace templátové DNA (50 ng a 100 ng) na reakci s použitím metody Top-bio.....	55
Tabulka 25. Ředící řada 25 ng, 50 ng a 100 ng na reakci s použitím metody Top-bio.	56

Tabulka 26. Ředící řada 25 ng, 50 ng a 100 ng na reakci s použitím metody TAKARA.	56
Tabulka 27. Ředící řada 5ng, 12,5 ng, 50 ng, 75ng a 100ng na reakci s použitím metody Top-Bio.....	57
Tabulka 28. Koncentrace 5 ng DNA na reakci s použitím metody Top-Bio.....	57

13. Seznam obrázků

Obrázek 1. Schéma zobrazující stavbu mitochondrie.....	10
Obrázek 2. Obrázek znázorňující proces segregace mitochondrií.....	13
Obrázek 3. Graficky znázorněný reakční profil real-time PCR.....	41
Obrázek 4. Obrázek znázorňující místo záznamu hodnoty Ct na amplifikační křivce... 41	
Obrázek 5. Graf znázorňující procentuální zastoupení mužů a žen v testovaném souboru.....	43
Obrázek 6. Graf zobrazující medián počtu kopií u věkových kategorií	45
Obrázek 7. Graf zobrazující regresní křivku	45
Obrázek 8. Graf zobrazující medián u vzorků z bukálních stěrů a periferní krve. í.....	47
Obrázek 9. Graf zobrazující medián u vzorků z bukálních stěrů a periferní krve.....	48
Obrázek 10. Nalevo Amplifikační křivky u vzorku 175/23 napravo amplifikační křivky u vzorku 155/23 s použitím metody	49
Obrázek 11. Nalevo Amplifikační křivky u vzorku 175/23 napravo amplifikační křivky u vzorku 155/23 s použitím metody TAKARA.....	51

14. Seznam zkratek

AMP – adenosin monofosfát

ATP – adenosintrifosfát

BAK – Bcl-2 homologous antagonist killer

BAX – Bcl-2-associated X protein

BOZP – bezpečnost a ochrana zdraví při práci

cf – cDNA – cirkulující mimobuněčná jaderná DNA

cf – mtDNA – cirkulující mimobuněčná mtDNA

cGAS – cyclic GMP-AMP synthase

DAMP – damage associated molecular patterns

GMP – guanosin monofosfát

GPT – guanosin trifosfát

HBV – hepatitis B virus

HCV – hepatitis C Virus

HIV – human immunodeficiency virus

JIP – jednotka intenzivní péče

KSS – Kearns–Sayre syndrome

LHON – Leber hereditary optic neuropathy

MDS – mitochondrial depletion syndrome

MELAS – mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes

MERF – myoclonic epilepsy with ragged red fibers

mtDNA – mitochondriální DNA

nDNA – nukleární DNA

NET – neutrophil Extracellular Traps

NSG – next generation sequencing

OXPHOS – oxidativní fosforylace

PCR – polymerázová řetězová reakce

PGC-1 α – peroxisome proliferator – activated receptor gamma coactivator 1alpha

POL γ – heterotrimerická DNA polymeráza gama

qPCR – PCR v reálném čase

ROS – reactive Oxygen Species

STING – stimulator of interferon genes

TFAM – mitochondriální transkripční faktor A

TLR – toll like receptor

TLR9 – toll like receptor 9

VDAC – voltage-dependent anion channels

WES – whole exome sequencing

WGS – whole genome sequencing