



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Význam detekce polymorfismů v genech
pro methyilentetrahydrofolátreduktázu C667T
(MTHFR C667T) a apolipoproteinu E (ApoE)
v souvislosti s onemocněním osteoporózy**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

Specializace ve zdravotnictví/ Zdravotní laborant

Autor: Markéta Šilhová

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

České Budějovice 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Význam detekce polymorfismů v genech pro MTHFR667 a ApoE v souvislosti s onemocněním osteoporózy jsem vypracovala 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 jejich 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 3. 5. 2017

.....

podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat za odborné vedení, cenné rady mé vedoucí bakalářské práce, Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D., a za možnost realizovat praktickou část v laboratoři GENLABS. Dále bych chtěla poděkovat paní doktorce Ládové za poskytnutí vzorků periferní krve z laboratoře Stafila spol. s.r.o. Děkuji také rodičům za trpělivost v průběhu mého celého studia.

Význam detekce polymorfismů v genech pro methylenetetrahydrofolátreduktázu C667T (MTHFR C667T) a apolipoproteinu E (ApoE) v souvislosti s onemocněním osteoporózy

Abstrakt

Osteoporóza je metabolické onemocnění skeletu, charakterizované změnami kostní tkáně, poruchou mechanické odolnosti kosti s rizikem vzniku zlomenin. Tomuto onemocnění podléhají pacienti ve věku nad 60 let, nevyhýbá se však ani mužům a ženám v pokročilých věkových skupinách. Postihuje především ženy po menopauze. Prevalence osteoporózy stále stoupá, touto nemocí trpí ve světě více než 200 milionů lidí, v České republice téměř milion osob. Osteoporóza se stala problémem nejen zdravotnickým, ale i ekonomickým. Tomuto onemocnění by se mělo více věnovat i z pohledu genetických rizikových faktorů.

Cílem mé bakalářské práce bylo napsat odbornou rešerši na dané téma, shrnout poznatky o osteoporóze, věnovat pozornost diagnostice a genetickým dispozicím, věnovat se zejména genům ApoE a MTHFR677. Gen pro ApoE hraje silnou genetickou roli v kosterní homeostáze, přítomnost alely $\epsilon 4$ genu pro apolipoprotein E představuje nejvyšší riziko pro vznik osteoporózy. Gen MTHFR677 je nejvíce spojován s kostní minerální densitou na krčku stehenní kosti.

V experimentální části bylo cílem praktické zvládnutí některých molekulárně biologických metod především izolace DNA z periferní krve, příprava a provedení PCR reakce, detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy, vyšetření genu ApoE pomocí kitu MyTaq Red DNA Polymerase a 2x PCRBIO HS Taq Mix, vyšetření MTHFR pomocí kitu MyTaq Red DNA Polymerase. Princip detekce u ApoE je založen na ARMS PCR, u MTHFR677 je princip detekce založen na RFLP PCR. Veškeré metody jsem prováděla v genetické laboratoři GENLABS v Českých Budějovicích.

Klíčová slova

Osteoporóza; gen; DNA; ApoE; MTHFR677; RFLP-PCR; PCR ARMS

Significance of detection of the ApoE gene and MTHFR gene polymorphisms for osteoporosis

Abstract

Osteoporosis is the skeletal metabolic disease characterized by changes of bone tissue and disfunction of mechanic bone resistance which can lead to numerous bone fractures. Osteoporosis is frequently diagnosed in patients older than 60 years, also advanced age patients are not an exception for this disease. The most frequently affected group of patients is postmenopausal women. Prevalence of osteoporosis still rises. Nowadays more than 200 millions of people suffer from osteoporosis and one million of patients from Czech republic. Osteoporosis have become a serious complication affecting not only medical but also an economic field. Based on these findings, osteoporosis should be considered as an important topic even from the perspective of genetic risk factors.

The aim of my bachelor thesis is to write a specialized research focused on introduced topic, summarize accessible information about osteoporosis, including diagnosis and genetic predisposition. I have focused especially on genes ApoE and MTHFR677. ApoE plays an important role in sceletal homeostasis. The highest risk for osteoporosis development is the presence of alel $\epsilon 4$ gene for alipoprotein E. Gen MTHFR677 is mostly associated with bone mineral density located in femoral neck.

An experimental part of bachelor thesis was based on laboratory practice in molecular biology field including isolation of DNA from peripheral blood, PCR technique, detection of PCR products by gel agarose electrophoresis, analysis of ApoE gel by MyTaq Red DNA Polymerase kit and 2x PCRBIO HS Taq Mix, analysis of MTHFR677 gene by MyTaq Red DNA Polymerase kit. Analysis of ApoE gene is based on ARMS PCR method, on the other hand analysis of MTHFR677 is based on RFLP PCR method. I have performed the laboratory practice within the Laboratory of genetics GENLABS in České Budějovice.

Key words

Osteoporosis; gene; DNA; ApoE; MTHFR677; RFLP-PCR; PCR ARMS

Obsah

1	Teoretická část	9
1.1	Anatomie a fyziologie kostí	9
1.1.1	Kosterní soustava	9
1.1.2	Stavba kosti	9
1.1.3	Osifikace a vývoj kostí	11
1.2	Osteoporóza	12
1.2.1	Klasifikace a dělení osteoporózy	14
1.2.2	Rizikové faktory	15
1.2.3	Příznaky a projevy	17
1.2.4	Epidemiologie	17
1.2.5	Diagnostika	18
1.2.6	Prevence	19
1.2.7	Léčba	19
1.3	Genetika osteoporózy	20
1.3.1	Vybrané kandidátní geny pro osteoporózu	21
1.3.2	Polymorfismy v genu pro MTHFR	23
1.3.3	Polymorfismy v genu pro ApoE	26
2	Cíl práce a hypotézy	30
3	Metodika	31
3.1	Charakteristika souboru	31
3.2	Sběr primárních vzorků, technika sběru dat	31
3.3	Principy laboratorních metod	31
3.3.1	PCR – polymerázová řetězová reakce	32
3.3.2	AS PCR	33
3.3.2	RFLP PCR	35
3.3.4	Gelová elektroforéza	36
3.4	Postupy genetického vyšetření	36
3.4.1	Izolace DNA z periferní krve	36
3.4.2	Měření koncentrace DNA	38
3.4.3	Příprava a provedení gelové elektroforézy	38

3.4.4	ARMS PCR	39
3.4.5	RFLP PCR	46
4	Výsledky	48
4.1	Metoda PCR ARMS	49
4.2	Metoda PCR RFLP	50
5	Diskuze.....	52
6	Závěr	54
7	Seznam literatury	55
	Seznam tabulek a obrázků.....	61
	Seznam zkratk	63

Úvod

Osteoporóza je běžná metabolická kostní porucha, charakterizovaná řídnutím a změnami kostní tkáně. Nejčastější příčiny osteoporózy jsou pokles sekrece hormonu estrogeneru a nevhodný životní styl (nízký příjem vápníku, vitamínů D a K, nedostatečná pohybová aktivita, kouření a alkoholismus). Také vlivem genů se mohou uplatnit různé rizikové faktory tohoto onemocnění, jedná se tedy o geneticky dědičné onemocnění. Objevuje se u starších lidí, postihuje více než polovinu žen středního a vyššího věku.

U nás i celosvětově se jedná o vysoce frekventní onemocnění. Prevalence osteoporózy stále stoupá, v České republice trpí touto poruchou téměř milion osob. Náklady na léčbu osteoporózy neustále vzrůstají, proto se stala problémem nejen zdravotnickým, ale i ekonomickým. Je nazývána tichou epidemií, protože velmi často probíhá bez příznaků i desítky let a až později dochází ke komplikacím v podobě zlomenin. Zlomeniny vedou často k úplné závislosti na pomoci postiženým osobám.

V rámci bakalářské práce jsou zahrnuty informace o osteoporóze, především o genech ApoE a MTHFR677, oba geny jsou vztahovány ke kostní minerální denzitě. Gen pro ApoE hraje silnou genetickou roli v kosterní homeostáze a jsou známy 3 izoformy: ApoE2, ApoE3 a ApoE4. ApoE4 představuje nejvyšší riziko pro vznik osteoporózy, ApoE3 je nejrozšířenější izoformou. Gen MTHFR677 je nejvíce vztahován ke zlomeninám krčku stehenní kosti, tento typ zlomeniny je fatální pro 12 až 20% nemocných. Součástí teoretické části je i popis léčby a diagnostiky tohoto onemocnění.

V experimentální části práce jsou popsány laboratorní metody – izolace DNA z periferní krve, PCR a její modifikace; ARMS PCR a RFLP PCR, elektroforéza.

1 Teoretická část

1.1 Anatomie a fyziologie kostí

1.1.1 Kosterní soustava

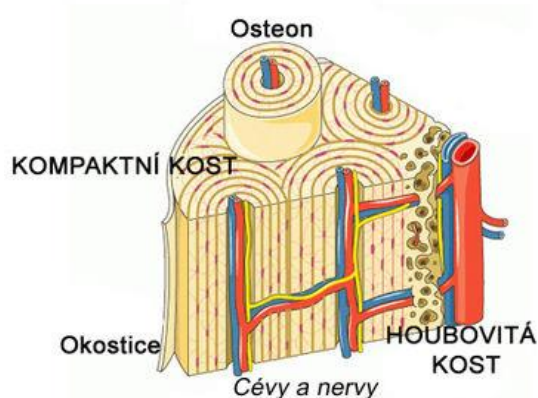
Kosterní soustava je tvořena kostmi, které slouží jako mechanická opora. Kosti charakterizujeme jako pevné, tvrdé a pružné orgány, které mají žlutobílou barvu (Čihák et al., 2011). Kostní tkáň vzniká z mezodermu a to přeměnou na kost přes chrupavčité stádium (Blahoš, 1995). Lidský skelet se skládá z 220 kostí a tvoří asi 15% celkové tělesné hmotnosti. Skelet lze rozdělit na axiální a periferní. K axiálnímu skeletu patří lebka, hrudník, páteř a pánev. Periferní skelet zahrnuje kosti končetin (Vyskočil, 2009).

Kostra je pevným základem těla, podpírající měkké krycí tkáně (tj. kůži, podkoží a kosterní svaly). Úponem jednotlivých svalů umožňuje pohyb těla a jeho částí. Kostra plní funkci ochrany pro smyslové orgány, mozek a některé vnitřní orgány. Kostra také představuje bohatou zásobárnu vápníku a fosforu (Merkunová, Orel, 2008).

1.1.2 Stavba kostí

Každá kost je kryta okosticí a periostem. K zevní ploše kosti se připojují vazy nebo šlachy (Rigutti, 2006). Protože je okostice tvořena krevními cévami a spojována nervovými vlákny, má zásadní význam pro výživu kosti (Fiala et al., 2015). Periost, obsahující kostitvorné buňky, se uplatňuje v růstu kostí do šířky a také při remodelaci kostí (Dylevský, 2009).

Pod okosticí se nachází hutná kostní tkáň, nazývaná kompaktní, tvořící diafýzu dlouhých kostí, a kostní tkáň houbovitá (spongiózní), která se nachází v epifýzách dlouhých kostí a v kostech krátkých. Houbovitá kostní tkáň je metabolicky aktivnější (Fiala et al., 2015) (obr. 1).



Obrázek č. 1: Kompaktní a houbovitá kost. Převzato ze zdroje: (Kosti a kostní tkáň, 2014).

Kostní tkáň je složena z kostních buněk také z vazivových vláken a mezibuněčné hmoty, která je mineralizována. Minerální složku kosti tvoří krystalidy fosforečnanu vápenatého, který je do prostoru uspořádán jako hydroxyapatit (Dylevský, 2009). Hydroxyapatit se podílí na pevnosti kosti při tlaku, odolnosti a její tvrdosti (Řehořková et al., 2008).

Kostní buňky, které nazýváme osteoblasty, osteoklasty a osteocyty, v kostní tkáni plní funkci metabolické aktivity kosti. Osteoklasty odbourávají kostní hmotu pomocí sekrece osteolytických enzymů. Osteoblasty plní funkci výstavby kostní hmoty (Broulík, 2009). Osteocyty jsou původní osteoblasty, které jsou uspořádány v nové kostní hmotě (Řehořková et al., 2008).

Ve střední části dlouhých kostí je dřevná dutina, která je vyplněna kostní dřeví (Fiala et al., 2015). Červená kostní dřev je tvořena vazivem, který je hustě prostoupený krevními vlásečnicemi, kde ze společné kmenové buňky vznikají červené a bílé krvinky i krevní destičky. Ve vazivu dřevě se nacházejí tukové buňky s přibývajícím věkem. Tím se červená dřev mění ve žlutou a časem až v šedou barvu. Červená dřev je zachována v plochých kostech lebečních, pánevních, hrudní kosti, žebrech, obratlích, také i v zápěstních a zánártních kostech (Čihák et al., 2011).

1.1.3 Osifikace a vývoj kostí

Remodelace kostí, jejich neustálá přestavba, při které dochází k odbourávání kostní tkáně a k novotvorbě, podléhá regulačnímu vlivu četných místních působků i v krvi, kde kolují hormony (Navrátil, 2008).

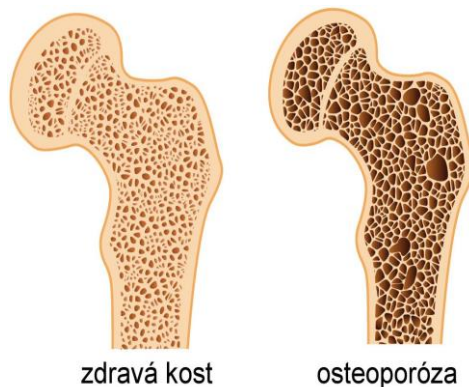
Osifikace je proces, kdy vznikají kosti (Fiala et al., 2015). V místě růstové chrupavky rostou kosti do délky. Do šířky umožňuje růst kostí okostice (Merkunová, Orel, 2008). Kosti se vyvíjí činností hypofýzy, štítné žlázy a příštítných tělísek, dále je pak důležitá přítomnost vápníku, fosforu, vitaminů D a slunečního záření (Křivánková, Hradová, 2009).

Remodelace kostí je ovládána osteotropním působením, zahrnující tyto základní mechanismy (Sotorník, 2016):

1. Mechanické vlivy – vývoj kostí ovlivňuje fyzická zátěž, která udržuje její pochody ve fyziologickém poměru. V případě, kdy kost není zatěžována, dochází k převaze osteoresorpce nad kostní novotvorbou.
2. Endokrinní vlivy zahrnují aktivní metabolity vitaminu D, parathormon z příštítných tělísek a kalcitonin z buněk štítné žlázy.
3. Lokálně působící cytokiny (například interleukiny) a růstové faktory z kostní dřene a kostních buněk, modulující kostní metody (Sotorník, 2016).

Kostní novotvorba a resorpce jsou navzájem propojené a probíhají souvisle po celý život. Přibližně do 25. roku života mají převahu anabolické děje nad osteoresorpcí, proces remodelace se tedy stále mění. Do 25. roku také dosahujeme vrcholu kostní hmoty, tzv. peak bone mass (PBM). Následující období, kdy dochází k vyrovnanosti obou dějů, trvá několik let. Od 40. roku života začne u obou pohlaví kost ubývat, a to o přibližně 0,3 – 0,5 % ročně. Pokud demineralizace dosahuje okolo 2 % za rok, jedná se o demineralizaci patologickou. Při 4 % úbytku kostní hmoty za rok se dostává úroveň kostního metabolismu na práh lomivosti kostí při 40 – 50 % ztrátě kostní hmoty (Sotorník, 2016).

1.2 Osteoporóza



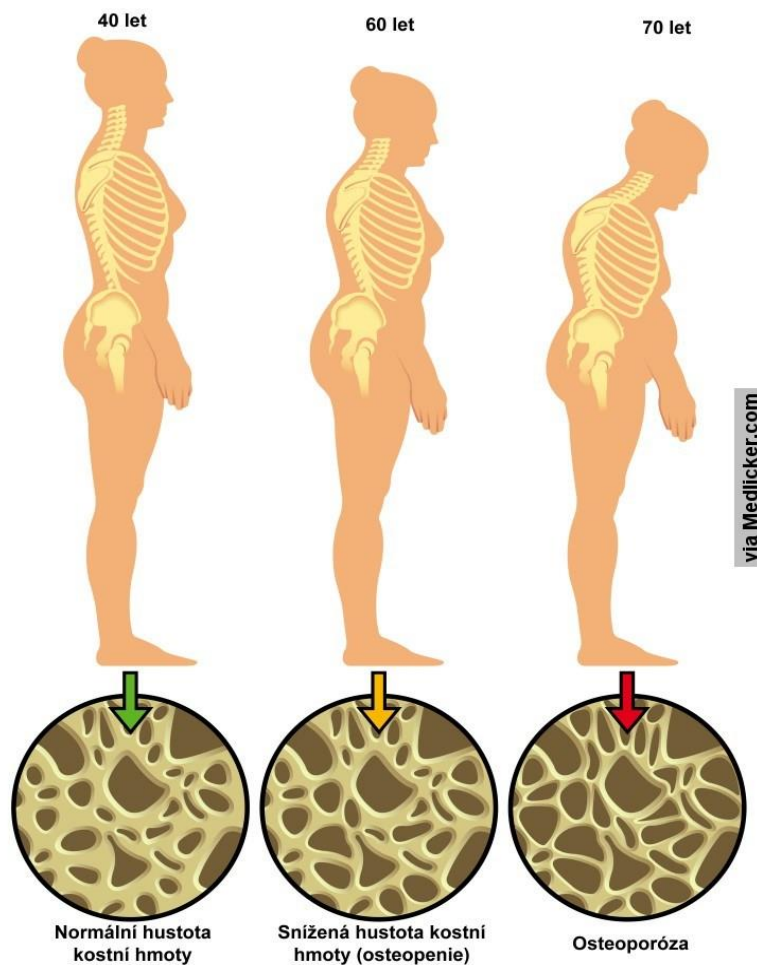
Obrázek č. 2: Rozdíl mezi zdravou kostí a kostí postiženou osteoporózou. Převzato ze zdroje: (Trápí vás osteoporóza?, 2016)

Osteoporóza je systémové metabolické onemocnění skeletu, charakterizované změnami kostní tkáně, poruchou mechanické odolnosti kosti a v důsledku toho zvýšením lomivosti a rizikem vzniku zlomenin (hlavně v oblasti kyčle, obratlů, dolního předloktí a pažní kosti) (obr. 2). Mechanická odolnost kosti je ovlivněna kvantitou a kvalitou kostního minerálu a organické matrix, mikroarchitekturou a makroarchitekturou kosti a dalšími prvky kvality kostní tkáně (Vyskočil, 2009). Tomuto onemocnění podléhají především ženy po menopauze, nevyhýbá se však ani mužům a ženám v pokročilých věkových skupinách (Palička et al., 2011).

Osteoporózu klasifikujeme dle porovnání zjištěné BMD (kostní minerální denzity) s průměrnou hodnotou u mladší dospělé populace stejného pohlaví a etnické příslušnosti. U pacienta je stanoveno tzv. T-skóre. To znamená, že je velikost standardních odchylek (SD) nad nebo pod průměrnou hodnotou BMD u zdravých mladších dospělých (Vyskočil, 2009):

1. Normální BMD je definována jako T-skóre, kde hodnoty jsou v rozsahu nižších než +2,5 a vyšších než – 1,0 SD (Vyskočil, 2009) (obr. 3).

2. Osteopenie je předstupeň osteoporózy, kdy je snížen minerální obsah. Je definována jako T-skóre v rozmezí $-1,0$ až $-2,5$ SD včetně (Vyskočil, 2009) (obr. 3).
3. Osteoporóza se definuje jako T-skóre nižší než $-2,5$ SD (Vyskočil, 2009) (obr. 3).



Obrázek č. 3: Rozdíl mezi normální hustotou kostní hmoty, osteopenií a osteoporózou. Převzato ze zdroje: (Vilímovský, 2014)

U nás i celosvětově se jedná o vysoce frekventní onemocnění s vysokou morbiditou a mortalitou v důsledku zlomenin (Brdička, 2014). V současné době ji WHO považuje za civilizační nemoc a přibližně z 80% se jedná o onemocnění dědičné (Palička et al., 2011).

1.2.1 Klasifikace a dělení osteoporózy

Osteoporóza se může projevit v generalizované nebo lokalizované formě. V generalizované formě postihuje celý skelet, v lokalizované formě jsou postiženy pouze určité ohraničené oblasti kosti. Rozlišujeme primární a sekundární osteoporózu. U primární osteoporózy je postížen osový skelet, sekundární osteoporóza je podmíněna různými onemocněními (endokrinními, dědičnými, chronickým onemocněním jater; ledvin a nádorovými onemocněními) (Vyskočil, 2009).

Osteoporózu dělíme následovně (Vyskočil, 2009):

- I. Generalizovaná osteoporóza
 - a) Primární
 1. Juvenilní idiopatická (autoimunitní), bez známé příčiny
 2. Postmenopauzální
 3. Senilní (involuční), přirozená
 - b) Sekundární
 1. Endokrinní
 2. Gastrointestinální
 3. Nutriční
 4. Renální
 5. Genetická
 6. Farmakogenní
 7. Imobilizační
- II. Lokalizovaná osteoporóza
 - a) Primární

b) Sekundární

1. Imobilizační
 2. Sudeckův syndrom, syndrom rameno – ruka, komplikace úrazů horní končetiny, léčí se znehybněním
 3. U zánětlivých revmatických onemocnění
 4. U hematologických onemocnění
 5. U osteolytických kostních metastáz
- (Vyskočil, 2009)

Primární osteoporóza postmenopauzální

Vyskytuje se pouze u žen během klimakteria (přechodu) a po něm. Tento typ osteoporózy je charakterizován věkem 55-65 let, je to nejčastější forma primární osteoporózy. Příčinou vzniku nemoci je nedostatečná tvorba pohlavních hormonů estrogenů. Charakterizující jsou zlomeniny obratlů a předloktí (Mačák et al., 2012). Dochází k poklesu pevnosti kosti, po 10 – 15 letech po menopauze dochází k útlumu funkce osteoblastů. Dále dojde ke zpomalení syntézy aktivního metabolitu vitamínu D a ke zvýšenému vyplavování hormonu příštítných tělísek. Osteoporóza může vzniknout až u 70% žen, pokud dojde k vymizení estrogenů v plodném období. Tento typ osteoporózy se léčí pomocí estrogenů (Broulík, 2010).

Primární osteoporóza senilní

Objevuje se v pozdějším věku (nad 70 let). Vyskytuje se u mužů i žen poměrem 2:1. Typické jsou zlomeniny krčku femuru a žeber. Příčinou je nedostatek hormonů, vápníků, vitamínu D a nedostatečná fyzická aktivita. Hladina parathormonu v séru je zvýšená, neboť je snižena hladina kalcia v krvi (Broulík, 2004).

1.2.2 Rizikové faktory

Nejčastější rizikové faktory osteoporózy jsou uvedeny v (tab. 1). Dělíme je na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Všechny ovlivnitelné faktory lze zmírnit nebo úplně odstranit a snížit tak riziko rozvoje tohoto onemocnění (Blažková et al, 2006)

Tabulka č. 1: Rizikové faktory osteoporózy.

Tab. 1 FAKTORY PŘÍSPÍVAJÍCÍ KE ZVÝŠENÝM ZTRÁTÁM KOSTNÍ HMOTY	
neovlivnitelné	ovlivnitelné
vyšší věk	nedostatečná fyzická aktivita
ženské pohlaví, předčasná menopauza	nízký příjem vápníku
europoidní nebo mongoloidní rasa	nedostatečné zásobení vitamínem D
rodinná anamnéza osteoporózy	kouření, nadměrný příjem alkoholu
rodinná anamnéza fraktury kostí stehenní	nízká tělesná hmotnost (BMI < 19 kg/m ²)
metabolické poruchy s vlivem na kost	nedostatek pohlavních hormonů navozený chirurgickým zákrokem či medikamentózně
některé malignity (myelom, lymfom)	terapie kortikoidy
laktózová intolerance	stres, deprese
BMI – body mass index	
podle [1, 2] – Wilkins, et al., 2005; Woolf, et al., 2003	

Převzato ze zdroje: (Blažková et al., 2006).

Klíčovými faktory osteoporotické zlomeniny jsou tedy: nízká BMD, předchozí zlomenina ze zvýšené lomivosti, věk a osteoporóza identifikovaná v rodině. K rizikovým faktorům se rovněž řadí i genetické dispozice k osteoporóze a nízké BMD, kde dědičnost odpovídá za 50 – 80 % variability BMD (Vyskočil, 2009). Dále hmotnost nižší než 57 kg, vysoký příjem kofeinu a nízký příjem vápníku, kouření, nedostatek tělesného pohybu, menopauza před 45. rokem mají také významný vliv na toto onemocnění (Vyskočil, 2009).

S přibývajícím věkem dochází k poklesu pohlavních hormonů a tím se zvyšuje riziko osteoporózy. U žen toto období nastává po menopauze, u mužů nastává pokles hladin pohlavních hormonů pozvolna a to ve vyšším věku (Vlček, Vytřísalová, 2014).

1.2.3 Příznaky a projevy

Osteoporóza se vyvíjí pomalu během několika let, kdy pacient nemusí trpět žádnými příznaky, v tom tkíví zákeřnost osteoporózy. Nicméně poté co dojde k úbytku nebo ztrátě určitého objemu kostní hmoty, onemocnění se projeví například následujícími projevy: zlomenina po drobném nárazu nebo pádu, snížení výšky, přetrvávající bolesti zad (nejvíce v oblasti střední části hrudní páteře a ve střední části bederní páteře) a shrbený postoj (nadměrný předklon) (Vilímovský, 2014).

Po zlomeninách obratlů se vyskytují příznaky jako jsou přetrvávající bolest zad a shrbený postoj. Obratel postižený osteoporózou se může zlomit i bez velké síly. V důsledku hmotnosti našeho těla pak dochází ke zmáčknutí obratlů, které vede k trvalému předklonu (shrbenému postoji) a to v konečném důsledku může způsobovat nejen problémy s chůzí, ale také s dýcháním, protože plíce se nemohou v hrudníku dostatečně rozpínat (Vilímovský, 2014).

U silně zakulacených zad dochází ke křeči paravertebrálních svalů s kořenovým drážděním a tím dojde ke zkracování trupu borcením obratlových těl. Objevují se často šikmé kožní záhyby, které se vyskytují v oblasti trupu (Paulová, Schubová, 2003).

1.2.4 Epidemiologie

V Evropě, USA a Japonsku trpí touto chorobou zhruba 75 milionů lidí; v České republice je to asi 700 tisíc lidí. Po 50. roce života osteoporóza postihuje asi třetinu žen a 15% mužů. Ve věku nad 70 let trpí tímto onemocněním až 47% žen a 39% mužů. Velmi častým následkem osteoporózy je zlomenina proximálního femuru, incidence v ČR je asi 150 případů na 100 tisíc obyvatel (Osteoporóza a její léčba, 2017).

První zlomenina je spojena s 86% nárůstem rizika jiných zlomenin. Pro zajímavost v UK ve věku nad 50 let utrpí zlomeninu v důsledku onemocnění jedna ze dvou žen a jeden z pěti mužů. V Dánsku se odhaduje, že ve věku nad 50 let má osteoporózu 41% žen a 18% mužů. V Brazílii má osteoporózu kolem 10 milionů lidí, v Mexiku jedna osoba ze čtyř. V Austrálii je zaznamenáno asi 11% mužů a 27% žen ve věku 60 let a více, osteoporózou jsou postiženy 2 miliony Australanů (Osteoporóza ve světě a u nás, 2011).

1.2.5 Diagnostika

Riziko výskytu osteoporózy se hodnotí podle vyšetření klinického, biochemického, rentgenového, denzitometrické a případně biopsií kostí (Broulík, 2010). Lékař klinickým vyšetřením vyhodnotí fyzikální nález, hmotnost a výšku pacienta. Dále lékař zjišťuje zdravotní, osobní i rodinnou anamnézu pacienta. Biochemické vyšetření se týká odběru vzorku krve pro zjištění hladin minerálních látek (především vápníku a fosforu), glukózy, lipidů. Z krve se stanoví i ukazatele jaterních a ledvinných funkcí, spektrum krevních bílkovin a hladiny pohlavních hormonů, hormonů štítné žlázy, příštítných tělísek, podvěsku mozkového a vitamínu D. Důležitý je i rozbor moči, kdy vzorek pochází z 24 hodinového sběru (Řehořková et al., 2008). Vyšetření skeletu se dá provést pomocí rentgenu, jeho změny jsou však zřejmé až při úbytku kostní tkáně o více než 30% (Broulík, 2010).

DXA (DEXA) (Dual Energy X-ray Absorptiometry) patří mezi nejpoužívanější metodu pro změření kostní denzity (hustoty kostí) (obr. 4). Jedná se o metodu denzitometrickou, která využívá dvojité rentgenové záření. Měří se podle ní především oblast bederní páteře a oblast proximálního femuru dolní končetiny (Palička et al., 2011).



Obrázek č. 4: Vyšetření pacienta pomocí DXA testu. Převzato ze zdroje: (DXA Body Composition for Weight Management, 2017).

Výsledkem DXA testu jsou dvě hodnoty, takzvané skóre Z a skóre T. Skóre T srovnává hustotu kostní hmoty pacienta s hustotou kostní hmoty u zdravého mladého dospělého jedince stejného pohlaví (Vilímovský, 2014).

Hodnoty větší než -1 jsou považovány za normální, hodnoty v rozmezí -1 až -2,5 (rozdíl mezi Z a T skóre) ukazují na sníženou hustotu (osteopenii) a hodnoty menší než -2,5 značí osteoporózu. Podle hodnoty T skóre lékař hodnotí riziko zlomeniny kostí. Skóre Z srovnává výsledek pacientova vyšetření s průměrnou hodnotou zjištěnou u osob stejného věku a pohlaví. Pokud je tato odchylka příliš vysoká provede lékař další vyšetření. Dalším testem při diagnostice osteoporózy je digitální rentgenová radiogrammetrie (DXR). Její provoz je jednodušší než u DXA proto, že vyžaduje méně technického vybavení. Jako screeningový test ho můžeme použít například v případě, kdy si pacient zlomí ruku v zápěstí. Tato metoda není tak citlivá jako DXA, a proto DXA zůstává ve screeningu na prvním místě (Vilímovský, 2014).

1.2.6 Prevence

Je doporučována změna jídelníčku a jeho doplnění o potravinové doplňky s vápníkem (alespoň 1200 mg) a vitamínem D (800-1200 jednotek denně), v závislosti na věku. Doporučován je také pohyb – alespoň 30 minutové cvičení, ideálně každý den – patří sem rychlá chůze, tenis, plavání, tanec apod. Dále se doporučuje nekouřit, kouření tabákových výrobků ovlivňuje negativně i kosti tím, že tabákový kouř snižuje vstřebávání vápníku z trávicí soustavy a potlačuje pozitivní efekt estrogenů na kvalitu kostí. Dále nepít mnoho alkoholu. Prevencí u žen může být nasazení náhradní hormonální terapie. U osob s vyšším rizikem vzniku osteoporózy je vhodné pravidelně sledovat hustotu kosti lékařem, který v případě potřeby nasadí adekvátní léčbu (Osteoporóza, 2016).

1.2.7 Léčba

Základem terapie je úprava životosprávy a dostatek pohybu také dietní opatření. Bez dostatku vápníku a vitamínu D nelze spoléhat na léčebný efekt (Palička et al., 2011).

Rozhodnutí o způsobu léčení toho onemocnění se odvíjí od stanovení individuálního rizika, zda pacient utrpí v dalších 10 letech osteoporotickou zlomeninu (Čillíková, 2010).

Antiresorpční léky (brání dalšímu úbytku a také zhoršování struktury kosti) zahrnují: pohlavní hormony (estrogeny), syntetické látky působící fyziologicky na kost jako estrogeny, kalcitonin tlumí fyziologickým mechanismem odbourávání kosti. Aminobisfosfonáty zvyšují hustotu minerálů v kostech, tím snižují riziko vzniku zlomenin, podávají se v tabletách jednou týdně nebo v injekcích jednou za tři měsíce, jsou vázány na předpis lékaře (Čillíková, 2010).

Osteoanabolické léky (navozují novotvorbu zdravé kostní hmoty a zlepšují strukturu kosti): teriparatid je účinný úsek molekuly lidského parathormonu, který výrazně snižuje riziko i neobratlových zlomenin, vhodný pro léčení osteoporózy navozené glukokortikoidy. Parathormon se podobně jako teriparatid podává 2 roky denně podkožní injekcí (Čillíková, 2010).

1.3 Genetika osteoporózy

Dědičnost osteoporózy je polygenní. Každý z kostních fenotypů (denzita, kvalita, metabolismus) je důsledkem interakce mezi mnoha slabými geny, kdy jejich efekt je podmiňován vlivy vnějšími. Jedince disponované k osteoporóze můžeme identifikovat podle analýzy chromozomových lokusů, určujících hodnotu kostní hmoty a její fragilitu (lokusy 1p36, 2p21, 5q33-35, 6p11-12 a 11q12-13), kostní geometrii (4p, 4q, 5q, 17q a 19p) a remodelaci kosti (16q a 20q) (Žofková, 2014).

Vztah tzv. kandidátních genů pro osteoporózu k variabilitě vybraného fenotypu má prediktivní význam především variabilita v exonech, které determinují sekvenci aminokyselin v příslušné bílkovině. Byly zjištěny alelické varianty jednonukleotidových polymorfismů (SNP) genů, které kódují mineralizaci a kvalitu kosti, procesy novotvorby a odbourávání kostní hmoty i expresi humorálních faktorů regulujících kostní remodelaci nebo jejich receptorů (polymorfismy v genech pro ESR1 α (estrogen receptor gen α), VDR (vitamin D receptor), CTR (receptor pro kalcitonin), růstové faktory TGF β 1 (transformující růstový faktor β 1), IGF-1 (inzulinový růstový faktor 1) nebo CYP17 (cytochrom 17)) (Žofková, 2014).

Kostní parametry mohou být kódovány také mutací v jednom genu. Příkladem je aktivační mutace Val667Met v genu LRP5 (LDL receptor protein) (determinuje signalizaci Wnt (Wingless)), která je asociována s vysokou hodnotou kostní denzity, zatímco inaktivační mutace v genu určuje nízkou kostní denzitu (Žofková, 2014).

1.3.1 Vybrané kandidátní geny pro osteoporózu

Geny pro receptory osteotropních hormonů

První zprávy o vztahu kostní denzity ke kandidátním genům pro toto onemocnění se týkaly genu pro receptor vitamínu D (VDR) (Thakkestian et al., 2004). Tento jaderný receptor pro vitamín D patří mezi steroidové receptory a účinkuje jako transkripční faktor aktivovaný ligandem. Gen pro tento receptor je lokalizován na chromozomu 12, receptorový protein má hmotnost 50 – 70 kDa (Dusilová Sulková, 2007). Metaanalýza publikovaná v roce 2004 ukázala významnou asociaci B alely v polymorfismu BsmI (restrikční enzym z *Bacillus stearothermophilus*) s kostní denzitou v páteři; jedinci s BB genotypem měli nižší hodnotu kostní denzity než nositelé alely b (Thakkestian et al., 2004).

Studie u normálních nesubstituovaných postmenopauzálních žen střeoevropské populace potvrdila vztah kostní denzity v kyčli a polymorfismu FokI (enzym nalezený ve *Flavobacterium okeanoikoites*) opět v genu pro VDR, ale asociaci s dalšími polymorfismy v exonech genu VDR se prokázat nepodařilo (Zajickova et al., 2002). Výsledky mohou být vysvětlitelné vazebnou nerovnováhou, ale také vlivem interakcí genu pro VDR s jinými geny, například pro ESR (estrogenní receptor) (Willing et al., 1998).

Z dalších polymorfismů pro receptory osteotropních hormonů byl ve vztahu ke kostní hmotě vyšetřován polymorfismus AluI (z *Arthrobacter luteus*) v genu pro receptor kalcitoninu (CTR) (Žofková, 2014). Studie provedená na 729 postmenopauzálních ženách asijského etnika prokázala vyšší hodnoty kostní denzity v krčku femuru i páteře u žen s kombinací alel CC a CT než TT (Lee et al., 2010).

Vztah genu pro receptor kalcitoninu (polymorfismus C1377T) ke kostní denzitě krčku femuru byl nalezen i u menšího souboru normálních postmenopauzálních žen bílé rasy (Žofková et al., 2003). Kontroverzní výsledky studií částečně souvisí i s etnickými a sexuálními rozdíly (Žofková, 2014).

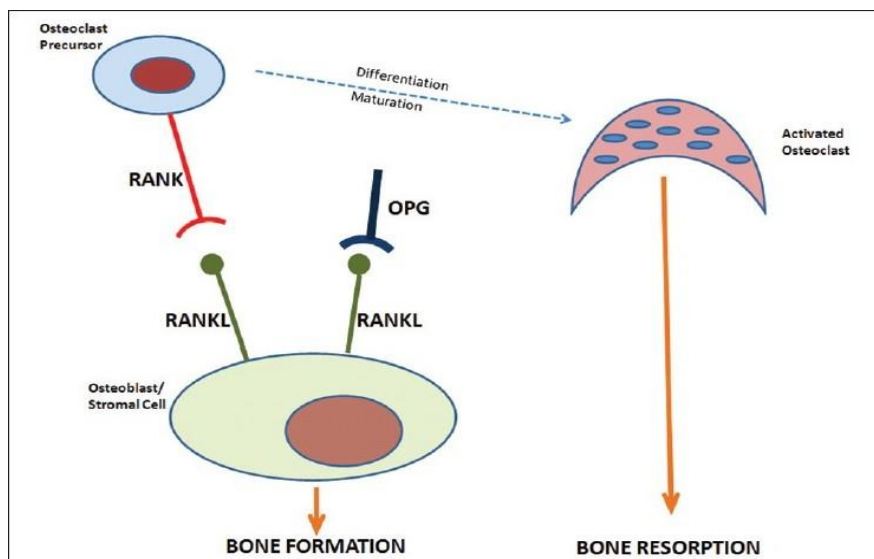
Denzita a kvalita kosti jsou kódovány geny pro estrogenní receptory ESR α a ESR β , gen ESR α má spíše vztah k frakturám, ke kvalitě kosti než k její denzitě. Identifikace tohoto genu by mohla mít význam při výběru pacientek pro léčbu estrogeny (Obermayer-Pietsch B., 2006). Intenzivně studovaným genem z hlediska rizika osteoporózy je gen pro kolagen typu 1 (polymorfismus COL1A1 Sp1), determinující kostní denzitu i kvalitu. Velká multicentrická studie GENOMOS provedená u téměř 20 000 Evropanů zjistila nezávislý prediktivní význam tohoto polymorfismu (kombinace alel G a T) pro kostní denzitu krčku femoru i páteře a k výskytu vertebrálních fraktur (Ralston et al., 2006).

K zajímavým výsledkům dospěli vědci, kteří našli vztah kostní denzity v páteři a krčku femuru a polymorfismu Sp1, ale pouze u nesubstituovaných postmenopauzálních žen (MacDonald et al., 2001). Znamená to, že tato asociace je stavem estrogenní aktivity. Kvalitu kosti determinuje i gen pro receptor leptinu (polymorfismus Gln223Arg), který byl asociován s kostní denzitou a rizikem vertebrálních fraktur u evropských postmenopauzálních žen (Fairbrother et al., 2007).

Geny kódující remodelaci kosti

Zánětlivé interleukiny (IL) prostřednictvím RANK (jaderný aktivátor) a jeho ligandu RANKL (cytokin, produkující osteoblasty a T-lymfocyty) aktivují osteoklasty a urychlují kostní resorpci. Autoři sledovali asociaci mezi geny pro interleukiny a mezi kostními parametry. Studie u souborů 226 osteoporotických a 224 neosteoporotických postmenopauzálních žen našla vztah polymorfismu 174 G/C v genu pro IL-1 α ke kostní denzitě, ale pouze u souboru žen s osteoporózou (Žofková, 2014) (obr. 5).

Kostní novotvorby se účastní i osteoprotegerin (OPG), solubilní falešný receptor pro RANKL, produkovaný osteoblasty. Brání vazbě RANKL na RANK a tím tlumí proces osteoklastogeneze. Poměr OPG/RANKL je tedy měřítkem kostní remodelace (Žofková, 2014) (obr. 5).



Obrázek č. 5: Interakce komplexu RANKL-RANK/OPG Převzato ze zdroje: (Kohli, 2011).

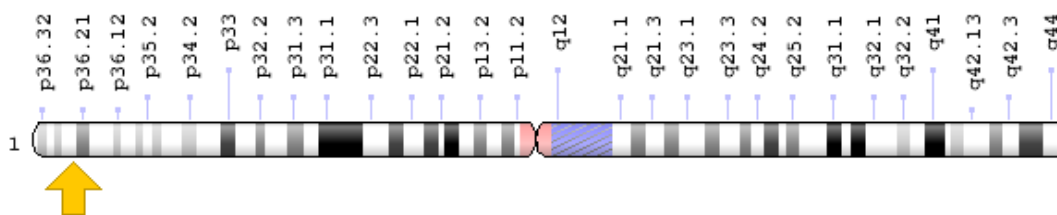
Další potenciální modulátory kostních fenotypů

Gen ALDH7A1 (Aldehyd dehydrogenáza 7), na chromozomu 31, je odpovědný za detoxikaci acetaldehydu, který tlumí novotvorbu kosti. Gen byl analyzován v souboru 700 seniorů asijského původu. SNP rs13182402 v tomto genu byl silně spojován s osteoporotickými frakturami (Guo et al., 2010). U bílé populace není známa podobná studie (Žofková, 2014).

Riziko fraktur je dáno i rozměry a geometrickými parametry skeletu. Protein PLCL1 (fosfolipáza C1), který tlumí kalciový signál aktivovaný inositol 1,4,5-trifosfátem reguluje zřejmě odpověď senzitivních kostních buněk (především v kyčli) na mechanickou nálož. U mužů a žen bílé rasy byl nalezen vztah rozměrů kyčle ke genu PLCL1 (Liu et al., 2008).

1.3.2 Polymorfismy v genu pro MTHFR

Gen pro enzym methylenetetrahydrofolátreduktázu (MTHFR) je lokalizována na chromozomu 1p36.6 a skládá se ze 12 exonů (MTHFR gene, 2017) (obr. 6).



Obrázek č. 6: Lokalizace MTHFR genu na chromozomu 1. Převzato ze zdroje: (MTHFR gene, 2017).

Byly popsány dva polymorfismy genu pro MTHFR snižující jeho aktivitu: A1298C (adenin, cytosin) a C677T (cytosin, thymin) (Mutace v genu pro MTHFR, 2015- 2016).

Frekvence výskytu MTHFR genotypů je 40% pro CC, 48% pro CT a 12% pro TT. Frekvence výskytu genotypů je 49% pro AA, 41% pro AC a 10% pro CC (Zhu, 2009).

MTHFR gen kóduje enzym, který se nazývá methylenetetrahydrofolátreduktáza. Tento enzym hraje roli při zpracování aminokyselin. Methylenetetrahydrofolátreduktáza je důležitá pro chemické reakce, zahrnující formy vitamínu kyseliny listové (také nazýván vitamin B9). Konkrétně, tento enzym převádí molekuly zvané 5,10-methylenetetrahydrofolát na molekuly zvané 5-methyltetrahydrofolát, během přeměny homocysteinu na methionin. Methionin je v těle důležitý jako zdroj bílkovin a dalších látek (MTHFR gene, 2017).

MTHFR má tedy zásadní význam v metabolismu homocysteinu. Homocystein je neesenciální aminokyselina, vznikající v organismu člověka jako vedlejší produkt metabolismu esenciální aminokyseliny methioninu. Při normálně fungujícím metabolismu v buňce se vznikající homocystein přeměňuje v užitečnou a neškodnou látku. Foláty jsou důležité pro metabolické pochody včetně metylace homocysteinu a syntézy nukleotidů, neurotransmiterů, proteinů a fosfolipidů. Změny v genu pro MTHFR mohou způsobit zvýšenou hladinu homocysteinu v krevní plazmě. Tu může způsobit i nedostatek vitamínů (kyseliny listové, B6 a B12) (Mutace v genu pro MTHFR, 2015- 2016).

1.3.2.1 MTHFR 677

Polymorfismus MTHFR 677C/T je způsoben substitucí (záměnou) cytosinu za thymin v pozici 677 nukleotidového řetězce. Touto substitucí dochází k záměně alaninu za valin v pozici 222 v aminokyselinovém řetězci, čímž dojde ke snížení katalytické aktivity enzymu a dochází i ke zvýšení hladiny homocysteinu v krevním séru až o 20 %. Dědičnost tohoto polymorfismu je autozomálně recesivní. V Evropské populaci je 12 % homozygotů TT, 43 % heterozygotů CT a 45 % zdravých homozygotů CC s tímto polymorfismem (Prinz-Langenohi et al., 2009).

1.3.2.2 MTHFR 1298

Polymorfismus MTHFR A1298C je způsoben substitucí (záměnou) adeninu za cytosin v pozici 1298 nukleotidového řetězce. Touto substitucí dochází k záměně glutamátu za alanin v aminokyselinovém řetězci v pozici 429. To vede ke snížení katalytické aktivity MTHFR (Van Der Put et al., 1998).

Nedochází zde ke zvýšení homocysteinu, proto nemá tak vysoce negativní účinky jako MTHFR 677. Avšak kombinace těchto dvou polymorfismů (677C/T a 1298A/C) může vést k řadě abnormalit. U nositelek některých polymorfních variant (677TT/1298AC nebo 677CT/1298CC) se zjistilo vyšší procento spontánních potratů a varianta 677TT/1298CC je považována za nonviabilní (Van Der Put et al., 1998).

1.3.2.3 Polymorfismy MTHFR a osteoporóza

Vztah hladin homocysteinu v séru k riziku fraktur inspirovala dánské autory k analýze asociace genu pro tetrahydrofolát reduktázu ke kostním parametrům. Jejich studie seniorské populace dvojčat našla asociaci polymorfismu C677T k riziku fraktur, které bylo 1,5 krát vyšší u varianty CT než CC a 1,5 krát vyšší u varianty TT než CT. Význam pro riziko fraktur má tedy alela T (Žofková, 2014).

Další metaanalýza prokázala asociaci mezi MTHFR C677T polymorfismem a rizikem osteoporotické zlomeniny u postmenopauzálních žen (Guan, 2014). Postmenopauzální ženy mají vyšší hladiny homocysteinu než premenopauzální, právě proto je vyšší riziko zlomenin u postmenopauzálních žen (Hak et al., 2000).

C677T polymorfismus na frakturách způsobuje také vazebnou nerovnováhu lyzyl hydroxylázy 1 (LH1) genu. Mutace v LH genu oslabuje vlákna v kolagenu a zvyšuje tak riziko osteoporotických zlomenin (Guan, 2014). TT genotyp je asociován s biochemickými změnami, u TT genotypu byla nalezena asociace s chybějící kostní hmotou. TT genotyp byl zjištěn v obratlových (vertebrálních) zlomeninách žen. Regresní analýza prokázala, že zlomeniny obratlů jsou významně spojené s BMD bederní páteře a výškou, ale pouze okrajově s genotypem MTHFR. Tato analýza ukázala, že hmotnost, věk a MTHFR polymorfismy jsou prediktory BMD bederní páteře u žen (Villadsen, 2005).

Polymorfismy v MTHFR genu jsou také spojeny se zvýšeným rizikem rozštěpu páteře, spina bifida, dalším běžným typem vady nervové trubice. Kostí páteře nejsou kompletně uzavřené kolem rozvojových nervů míchy. Část míchy může vyčnívat přes otvor v oblasti páteře, což vede k trvalému poškození nervů (MTHFR gene, 2017).

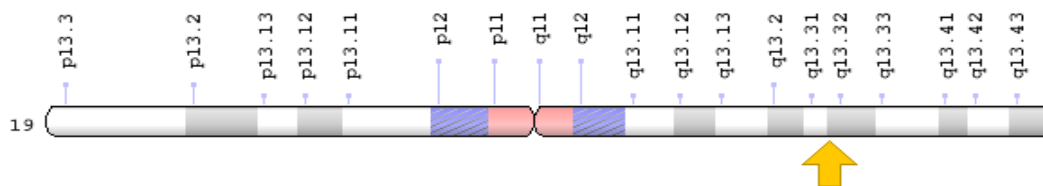
Polymorfismy v MTHFR genu mohou způsobit problémy související s nervovou trubicí změnou reakcí methylenetetrahydrofolát reduktázy s kyselinou listovou. Tyto změny jsou běžné v mnoha populacích po celém světě (MTHFR gene, 2017).

I další analýza se zabývala TT genotypem u postmenopauzálních žen. Bylo zjištěno, že postmenopauzální ženy s TT genotypem mají nižší hodnotu BMD krčku femuru než ženy s CC/CT genotypem., TT genotyp představuje tedy rizikový faktor zlomeniny u postmenopauzálních žen (Li, 2010).

Vysoká hladina homocysteinu a MTHFR genotypy mají u starších žen vliv i na větší kostní ztrátu kosti kyčelní, ale nepředstavují riziko její zlomeniny (Zhu, 2009).

1.3.3 Polymorfismy v genu pro ApoE

Apolipoprotein E (ApoE) je lokalizován na dlouhém rameni chromozomu 19 v oblasti 19q13.32 (APOE gene, 2017) (obr. 7).



Obrázek č. 7: Lokalizace ApoE na chromozomu 19. Převzato ze zdroje: (APOE gene, 2017).

APOE gen poskytuje instrukce pro výrobu bílkoviny zvané apolipoprotein E. Tento protein se spojuje s tuky (lipidy) a v těle tvoří molekuly zvané lipoproteiny. Lipoproteiny jsou zodpovědné za metabolismus cholesterolu a jiných tuků přítomných v krevním řečišti (APOE gene, 2017). Apolipoprotein E je tedy cholesterol transportující protein, tvořící důležitou součást chylomikronů, VLDL a HDL (ApoE polymorfismus (E2, E3, E4), 2009). Udržování normální hladiny cholesterolu je nezbytné pro prevenci některých onemocnění (APOE gene, 2017).

Gen ApoE se vyskytuje ve třech kodominantních alelách označených jako $\epsilon 2$ (ApoE2), $\epsilon 3$ (ApoE3) a $\epsilon 4$ (ApoE4), které kódují izoformy proteinu, lišící se jedinou aminokyselinou na pozicích 112 a 158. Alela $\epsilon 3$ je nejběžnější v populaci a kóduje izoformu proteinu E3 obsahující v pozici 112 cystein a v pozici 158 arginin, izoforma E2 obsahuje v obou pozicích cystein a izoforma E4 obsahuje v obou pozicích arginin (ApoE polymorfismus (E2, E3, E4), 2009). Každý jedinec nese 2 kopie ApoE genu, variantní alely se tedy dědí v homozygotním nebo heterozygotním stavu. Jedná se vždy o jednu z šesti možných alelových kombinací: $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$, kdy mohou vzniknout 3 různé homozygoti ApoE2/E2, ApoE3/E3, ApoE4/E4 nebo tři různé heterozygoti ApoE2/E4, ApoE2/E3, ApoE3/E4 (Genetics of dementia, 2012).

1.3.3.1 Polymorfismy ApoE a osteoporóza

ApoE byl objeven jako potenciální kandidátní gen se silnou genetickou rolí v kosterní homeostáze včetně formování a udržení kostní hmoty (Singh, 2010).

S kostní densitou mohou být asociovány některé geny, které primárně kontrolují systémy mimo kalcium-fosfátový metabolismus. Zjistilo se, že postmenopauzální nositelky alely $\epsilon 4$ v genu pro apolipoprotein E vykazují v průměru nižší hodnoty minerální kostní denzity v bederní páteři než ženy s ostatními alelami. Pozorování ukazuje na integraci kalcium-fosfátového systému do fyziologických regulací celého organismu během evoluce (Žofková, 2014).

Další dvě studie ukázaly asociaci mezi ApoE alelami a osteoporózou. U Japonských žen byly ApoE4 alely nalezeny v souvislosti s nízkou hodnotou kostní hmoty, v jiné studii U.S. žen byla stejná alela asociována s osteoporotickými zlomeninami nezávislými na kostní hmotě. Mechanismus vlivu ApoE alel v souvislosti s osteoporózou není jasný, ale bylo zjištěno, že vliv hydroxylace (enzymová reakce hydroxylových skupin) osteokalcinu může mít nepřímý efekt na transport vitamínu K (Ralston, 2009).

Asociace ApoE4 polymorfismu souvisí s kostním fenotypem, kostní densitou, plní úlohu v rámci kosterní homeostázy. Byla také zjištěna nižší hodnota BMD bederní páteře bez ApoE4 alely, avšak tato asociace nebyla nalezena u BMD kyčle (Peter, 2011).

ApoE genotyp nebyl významný prediktor BMD u mužů. U mužů se ukázalo přesto nízké riziko obratlových (vertebrálních) zlomenin u ApoE4 alely (Peter, 2011).

Další studie ukázala, že BMD hodnoty v bederní páteři a krčku femuru u osteoporotických a osteopenických žen byly nižší než u zdravých žen. Studie zkoumala dále relevantní roli exonu 4 ApoE SNPs (jednonukleotidového polymorfismu) (rs440446, rs429358) pro riziko osteoporózy s haplotypem CGTC v ApoE genu, jaký má vliv BMD bederní páteře a krčku femuru u postmenopauzálních žen v Indii (Singh, 2010).

Frekvence rs440446 a rs429358 minoritních alel (alely s menším vlivem) vykazuje vyšší hodnoty u osteoporotických žen. Efekt minoritní alely rs440446 je evidentní asociací analýzy haplotypu, kde ženy s osteoporózou měly vyšší frekvenci haplotypů s C u prvního SNP (CGTC a CATC) než ženy zdravé a s osteopenií. Avšak efekt minoritní alely frekvence rs42938 nebyl nalezen v souvislosti s osteoporózou v haplotypech GGCT a GACC. Studie odhalila citlivost haplotypu CGTC v ApoE genu. Bylo zjištěno, že tento haplotyp je spojen s BMD a rizikem osteopenie a osteoporózy u postmenopauzálních žen v Indii (Singh, 2010).

Další studie potvrdila asociaci mezi ApoE +113C/G (rs440446) polymorfismem a BMD u Čínské populace v Singaporu. U ženy s heterozygotním genotypem (CG) byla nalezena spojitost v souvislosti se sníženou hodnotou BMD bederní páteře a krčku femuru, dále je u nich zvýšené procento osteopenie a osteoporózy. U mužů se tato asociace nepotvrdila. Jedná se tedy o pohlavně specifickou asociaci (Tong, 2010).

2 Cíl práce a hypotézy

Cílem mé bakalářské práce bylo:

- Napsat odbornou rešerši z odborné literatury
- Praktické zvládnutí laboratorních molekulárně biologických metod – izolace DNA z periferní krve, PCR a její modifikace, PCR ARMS, PCR RFLP, gelová elektroforéza
- Vyhodnocení a diskuze získaných výsledků

Hypotézy:

Osteoporóza se vyskytuje častěji u žen než u mužů. Toto onemocnění se týká spíše lidí ve věku nad 50 let, po 65. roce dochází k úbytku kostní hmoty, k nárůstu zlomenin a proximálního femuru. Oba geny ApoE i MTHFR mají vliv na toto dědičné onemocnění. MTHFR C667T je rizikovější než A1298C. Také gen ApoE je vztahován ke kosterní homeostáze, ApoE4 polymorfismus je nejvíce spojován s tímto onemocněním.

3 Metodika

3.1 Charakteristika souboru

Laboratorní část bakalářské práce byla vykonána v Českých Budějovicích, na ambulantní klinice, Matice školské 1786/17 v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. pod vedením Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D. Veškerá vyšetření byla prováděna pod odborným dohledem kvalifikovaného pracovníka.

3.2 Sběr primárních vzorků, technika sběru dat

V rámci našeho projektu jsme sesbírali vzorky periferní krve od 20 pacientů s diagnostikovanou osteoporózou, abychom prokázali vliv genů a jejich polymorfismů ApoE a MTHFR. Primárním vzorkem pro genetickou analýzu byla tedy nesražená periferní krev, která byla pacientům odebrána zdravotní sestrou v Osteologické ambulanci (kostní denzitometrii) MUDr. Ládové. Každý odebraný vzorek byl odeslán do laboratoře spolu s vyplněným informovaným souhlasem s účastí na projektu. Genetická laboratoř je oprávněna k práci s lidským biologickým materiálem a splňuje veškerá kritéria ustanovená zákony ČR. Projekt byl dále zaštitěn schválením etické komise, která působí při Zdravotně sociální fakultě JČU.

3.3 Principy laboratorních metod

Před každou PCR reakcí byla provedena izolace DNA, DNA byla izolována z periferní krve. Periferní krev byla odebrána kvalifikovaným pracovníkem, zdravotní sestrou. Poté, co vzorek přijme laboratoř, musí být uchován v ledničce při teplotě cca 4°C. Součástí každého vzorku musí být vyplněný informovaný souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením s potřebnými informacemi. Po přijetí je každému vzorku přiřazeno identifikační číslo.

3.3.1 PCR – polymerázová řetězová reakce

Mezi základní amplifikační metody (metody k namnožení DNA) se řadí polymerázová řetězová reakce (PCR). Tato metoda je široce využívána a má mnoho modifikací jako např. PCR – RFLP (polymerázová řetězová reakce - polymorfismus délky restričních fragmentů), AS – PCR (alelově specifická polymerázová řetězová reakce) typ PCR – ARMS (polymerázová řetězová reakce – amplifikační refrakční mutační systém), real – time PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase) a další (Zima, 2007).

PCR umožňuje enzymatickou amplifikaci in vitro syntézou vybrané sekvence DNA v cyklické reakci, kdy za použití termostabilní DNA polymerázy se mění teploty (Zima, 2013). Daný úsek, který chceme amplifikovat, musí být ohraničen, jak na začátku, tak na konci vybrané části genomu pomocí krátkých oligonukleotidových sekvencí tzv. primerů (Polymerázová řetězová reakce, 2001). Tyto oligonukleotidové sekvence, primery se připojí ke komplementárním úsekům DNA a řídí syntézu nových vláken ve směru 5'→3' (Zima, 2013). Výsledkem PCR jsou až miliony kopií vzorového fragmentu DNA o délce až 10 tisíc nukleotidů. Každá reakční směs se skládá z templátové DNA, primerů, z nukleotidů dNTP, reakčního pufru a termostabilního enzymu DNA polymerázy. Nejvíce se používá tzv. *Taq* polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus*. dNTP, DNA polymeráza a reakční pufr jsou většinou součástí dodávaného master mixu (Bártová, 2011).

Celá tato reakce probíhá v přístroji zvaném termocykler. Tento přístroj je schopný rychle během několika sekund měnit teploty tak, aby byly dodrženy tepelné a časové podmínky pro jednotlivé kroky PCR reakce (Zima, 2007).

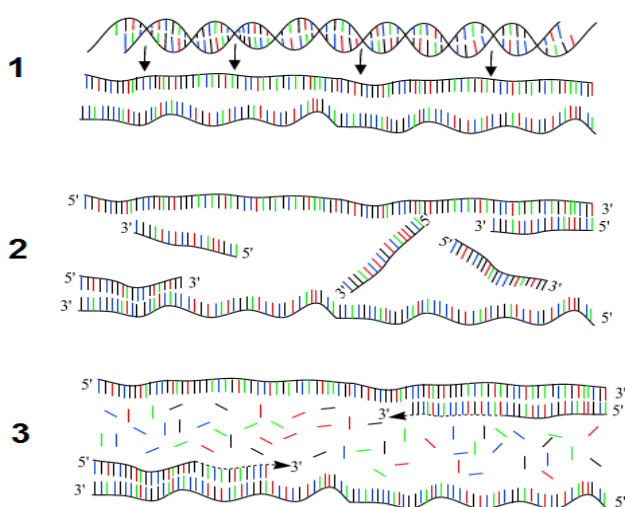
Kroky PCR reakce:

1. Denaturace – DNA se po dobu 20-30 sekund zahřívá na teplotu 94-98°C. Dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a k rozvolnění dvoušroubovice. Vzniká tak jednovláknová DNA, na kterou mohou v dalším kroku nasednout oligonukleotidové sekvence, primery (obr. 8) (Polymerázová řetězová reakce, 2001).
2. Annealing – nasednutí primerů, teplota se sníží na 50-65°C, to umožňuje nasednutí primerů na specifická místa DNA.

Na dvouvláknové úseky DNA-primer se váže polymeráza (obr. 8) (Polymerázová řetězová reakce, 2001).

3. Extension – syntéza DNA, teplota použitá v této fázi závisí na použité DNA polymeráze. Nejběžnější Taq polymeráza má optimum aktivity na 75-80°C. Dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru od 5' konce ke 3' konci se syntetizuje nové vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA (obr. 8) (Polymerázová řetězová reakce, 2001).

Tyto kroky se cyklicky opakují, pro dostatečnou amplifikaci původní molekuly DNA obvykle postačuje 30 cyklů (Polymerázová řetězová reakce, 2001).



Obrázek č. 8: Průběh PCR reakce, 1 – denaturace, 2 – annealing, 3 – extension. Převzato ze zdroje: (Bártová, 2011).

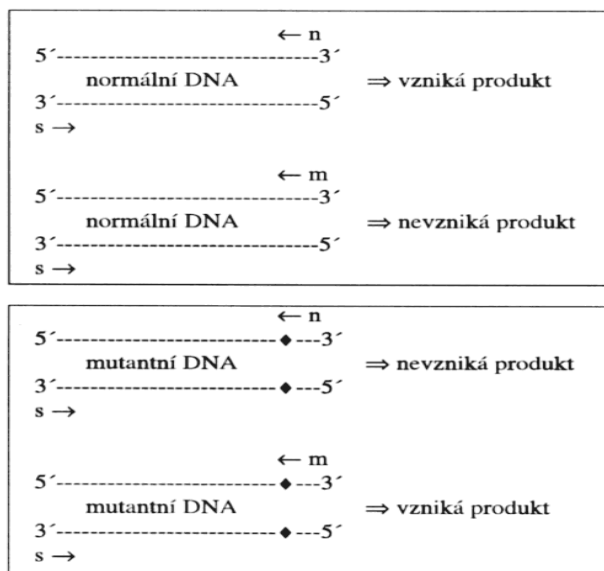
3.3.2 AS PCR

AS – PCR neboli alelově specifická PCR byla použita poprvé pro detekci subtypů HLA (human leukocyte antigens) (Olerupem et al., 1991), to je hlavní histokompatibilní systém člověka, plní hlavní funkci v imunitním systému člověka (Penka et al., 2012). AS-PCR je jednoduchá, také spolehlivá a dokáže rozlišit heterozygota od homozygota pro jednu nebo druhou alelu (Ferrie et al., 1992).

Tato metoda se využívá pro detekci malých delecí a bodových mutací (Zima, 2007). Principem je využití tří různých primerů, které jsou vybrány na základě sekvenční komplementarity s mutovanou, nemutovanou či variantní alelou. Tyto primery se hybridizují k mutované nebo standartní alele, kdy jeden primer je společný pro obě alely. Nejčastěji používanou variantou je PCR ARMS (amplification refractory mutation detection system neboli amplifikační refrakční mutační systém) (Zima, 2007).

ARMS PCR

Základním principem je přesná komplementarita bazí na 3' konci primeru. Pokud nedojde ke komplementaritě, nedojde ke specifické amplifikaci a to je základním principem AS-PCR. Důležité je proto použití vnitřní kontroly reakce, která určí, jestli jde o specifické chybění amplifikace nebo o nespécifickou poruchu PCR reakce. Samotný test je založen na dvou samostatných reakcích. Jedna reakce je specifická pro normální DNA sekvenci. Druhá reakce je specifická pro mutovanou nebo variantní sekvenci DNA (obr. 9), (Zima, 2007).



Obrázek č. 9: Princip PCR ARMS reakce. Převzato ze zdroje: (Zima, 2007).

Tabulka č. 2: Princip hodnocení ARMS PCR podle typu produktu reakce.

Genotyp	Oligonukleotidy	Produkt reakce
Homozygot normální	s+n	ano
	s+m	ne
Heterozygot	s+n	ano
	s+m	ano
Homozygot mutantní	s+n	ne
	s+m	ano

s - společný, n - normální, m- mutantní primer
Převzato ze zdroje: (Zima, 2007).

Pokud je jedinec nemutovaný homozygot, vytvoří se PCR produkt pouze při použití společného primeru a primeru pro nemutovanou formu genu. Pokud se jedná o mutovaného homozygota, pak dochází k vytvoření PCR produktu v amplifikační reakci se společným primerem a primerem komplementárním k mutované nebo variantní alele daného genotypu. Když dojde ke vzniku produktu v obou amplifikačních reakcích se společným a nemutovaným primerem i společným a mutovaným primerem, jedná se o heterozygota (tab. 2), (Zima, 2007).

3.3.2 RFLP PCR

PCR – RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragmen lenght polymorphism, polymerázová řetězová reakce – polymorfismus délky restrikčních fragmentů) je metodou, využívající identifikaci amplifikovaného PCR produktu pro vybrané oblasti genomové DNA, tyto oblasti DNA jsou následně štěpeny pomocí bakteriálních endonukleáz (restriktáz). Endonukleáz je velké množství (přes 1000) a liší se schopností rozpoznat různě dlouhé sekvence nukleotidů a také je štěpit na dlouhé fragmenty na základě jejich sekvenční specifity (Kosinová, 2007). Palindromické sekvence jsou místa rozpoznána endonukleázami. Jsou to takové sekvence, které mají stejné pořadí nukleotidů na komplementárních vláknech DNA ve směru od 5' konce (Zima, 2007).

Během restričního štěpení někdy dochází ke štěpení nukleotidů, neležících naproti sobě. Pak vznikají nestejně dlouhé konce rozštěpené dvoušroubovice. Jedná se o tzv. kohezní lepivé konce. Dále může docházet ke štěpení protilehlých nukleotidů. Pak vznikají stejně dlouhé konce (Kosinová, 2007).

1.3.4 Gelová elektroforéza

Velikost PCR produktů jsme zkontrolovaly pomocí gelové elektroforézy. Tyto fragmenty se vyznačují různou pohyblivostí v agarózovém gelu (větší fragmenty se pohybují pomaleji, menší rychleji). Díky působení stejnosměrného elektrického pole dochází k pohybu fragmentů. DNA je nabitá záporně, proto se DNA pohybuje vždy ke kladnému konci (anodě).

3.4 Postupy genetického vyšetření

3.4.1 Izolace DNA z periferní krve

Před každým molekulárně – genetickým vyšetření (kde se pracuje s DNA), se musí provést izolace DNA, která byla izolována z lymfocytů periferní krve.

K izolaci DNA z periferní krve byl použit Genomic DNA Mini Kit dle doporučení výrobce.

Reagencie:

- 96% ethanol
- Proteináza K
- GB Buffer
- Elution Buffer
- W1 Buffer
- Wash Buffer
- Lysis Buffer

Spotřební materiál:

- GD column
- 2 ml collection tube

- 1,5 ml mikrozkušavky
- Špičky a rukavice

Před začátkem izolace byl vytemperován termostat na 60°C. Pro 1 vzorek byly připraveny 2 x 1,5 ml mikrozkušavky, jedna zkušavka pro lyzační reakci a druhá pro finální eluci. Každá zkušavka byla označena číslem vzorku.

Postup:

Nejprve bylo napipetováno 200 µl krve do označené 1,5 ml mikrozkušavky. Poté bylo přidáno 30 µl Proteinázy K (10mg/ml) do 1,5 ml mikrozkušavky a 200 µl Lysis Buffer. Následovala inkubace 10 minut při pokojové teplotě. Vzorek byl vortexován 15 sekund a krátce centrifugován (5 minut při 3 tisíc ot/min) a směs byla inkubována při 60°C po dobu 15 minut. Dále bylo přidáno 200 µl GB Buffer do 1,5 ml mikrozkušavky a zkušavka byla dále zvortexována a krátce stočena. Následovala inkubace při 60°C v termostatu ve vodní lázni na 15 minut. Při této inkubaci se zkušavka každé tři minuty promíchala převrácením v ruce. Do zkušavky bylo přidáno 200 µl 96% ethanolu, následně byla zkušavka zvortexována a stočena.

Připravený lyzát byl přepipetován na kolonku (GD column), která byla vložena do čisté sběrné zkušavky (2 ml Collection Tube). Tato kolonka se zkušavkou byla zcentrifugována při 14-16 tisíc otáčkách po dobu 5 minut. Poté byla kolonka přendána do nové sběrné zkušavky a použitá sběrná zkušavka s tekutinou byla vyhozena. Na tuto kolonku bylo napipetováno 400 µl W1 Bufferu, opět proběhla centrifugace při 14-16 tisíc otáčkách po dobu 30 sekund. Ze sběrné zkušavky byla vylita tekutina a dále kolonka byla vrácena zpět do stejné sběrné zkušavky. Na kolonku bylo přidáno 600 µl Wash Bufferu a proběhla centrifugace při 14-16 tisíc otáčkách po dobu 30 sekund. Tekutina byla naposledy vylita ze sběrné zkušavky, kolonka byla vrácena do sběrné zkušavky a zcentrifugována při 14-16 tisíc otáčkách po dobu 3 minut tak, aby byla kolonka suchá.

Suchá kolonka s navázanou DNA byla přesunuta do připravené čisté 1,5 ml mikrozkušavky označené šítem s číslem vzorku. Na filtr kolonky bylo napipetováno 60 µl předehřátého Elution Buffer, dále následovala inkubace 3 minuty při pokojové teplotě. Kolonka byla zcentrifugována při 14-16 tisíc otáček po dobu 30 sekund.

Výtěžek byl 50 μ l vyizolované DNA. DNA byla dána do mrazicího boxu (-20°C) pro pozdější využití.

3.4.2 Měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla naměřena pomocí přístroje Qubit® 2.0 Fluorometer. Naměřené hodnoty byly uváděny v jednotkách ng/ μ l. Konečné výsledky jsou uváděny ve výsledcích v (tab. 12).

3.4.3 Příprava a provedení gelové elektroforézy

Reagencie:

- Crystal 10x TBE Buffer – prášek
- 10x TBE – roztok připravený z 10x TBE Buffer
- Pracovní roztok 1x TBE – 50 ml 10x TBE a 450 ml destilované vody
- Agarózový prášek
- DNA Loading Buffer Blue
- Midori Green Advanced DNA Stain a 100bp DNA LADDER H3RTU z FastGene® Electrophoresis Reagent Kit (dodávané Elisabeth Pharmacon)

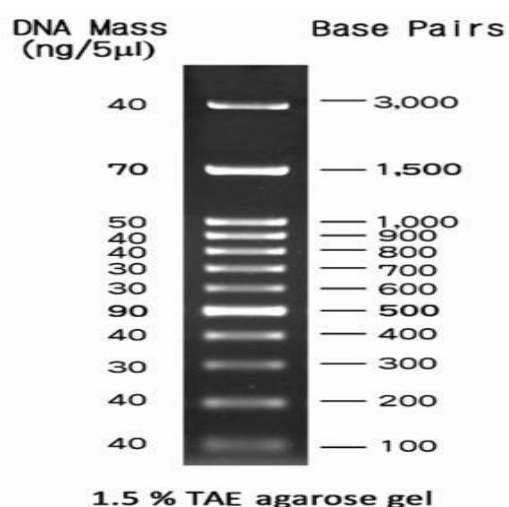
Postup:

Do kádinky z plastu o objemu 150 ml bylo naváženo příslušné množství agarózy, 0,5 g (2% roztok se připravuje ze 2 tablet, 4% ze čtyř). Bylo přidáno 50/100 ml 1x TBE pufru vzhledem k velikosti gelu. Roztok TBE pufru a agarózy byl zahříváný v mikrovlnné troubě. Zahřívání proběhlo minimálně dvakrát po dobu alespoň 3 minut, tak aby vznikl průhledný gelový roztok bez bublin. Do něj bylo přidáno 12 μ l barvičky Midori Green Advanced DNA Stain, promícháno. Dále byl gel ponechán, aby zchladnul. Byla připravena elektroforetická podložka, do které byly vloženy hřebeny. Gelový roztok byl nalit na elektroforetickou podložku. Po 15 minutách byly vyndány hřebeny ze ztuhlého gelu a gel byl vložen do elektroforetické vany s 1x TBE puftrem. Během elektroforézy musel být gel zcela ponořen.

Do první nebo poslední jamky bylo napipetováno 5 μ l markeru 100 bp DNA Ladder H3RTU, pro kontrolu velikosti PCR produktů (obr. 10).

Elektroforéza probíhala při 100 – 135 V po dobu 15 minut. Průběh bylo možné sledovat pomocí iluminátoru MupidTMLED Illuminator díky použité barvě v gelu.

Po ukončení byl gel přenesen na detekční systém FastGene[®] GelPic LED Box. Tento systém umožňuje vyfotit gel a pomocí datového nosiče můžeme fotografii přenést do počítače k vyhodnocení.



Obrázek č. 10: Primer pro kontrolu velikostí PCR fragmentů na agarózovém gelu. Převzato ze zdroje: (DNA ladder (Molecular Weight Marker), 2017).

3.4.4 ARMS PCR

Pro polymorfismus ApoE byla použita metoda PCR ARMS. Metoda byla prováděna pomocí kitu MyTaq Red DNA Polymerase dle doporučení výrobce a nebo pomocí kitu 2x PCRBIO HS Taq Mix dle doporučení výrobce. Pro PCR reakci byl použit dimethylsulfoxid (DMSO), který je používán pro zvýšení výtěžku amplifikační reakce.

Reakční směs pro MyTaq Red DNA Polymerase:

Použité reagensy:

H₂O

MyTaq Red Reaction Buffer

MyTaq polymerase

DMSO

Primery F+R

Primery F - forward, R – reverse (tab.3)

Tabulka číslo 3: Sekvence primerů.

Číslo	Primery	Sekvence primerů (5'-3')	Délka PCR produktu(bp)
1	Cys158	ATGCCGATGACCTGCAGAATT	588
2	Arg158	ATGCCGATGACCTGCAGAATC	588
3	Cys112	CGCGGACATGGAGGACGTTC	451
4	Arg112	CGCGGACATGGAGGACGTTT	451
5	COMMON	GTTCAGTGATTGTTCGCTGGGCA	-

Převzato ze zdroje: (Zende, 2013)

Primery byly používány ze zdroje: (Zende, 2013)

Postup:

PCR reakce byla připravena v dekontaminovaném laminárním boxu, aby se zabránilo případné kontaminaci použitých chemikálií.

Do chladicího stojánu byly připraveny dvě PCR mikrozkušavky (0,2 ml) A a B pro každý vzorek, dvě mikrozkušavky pro pozitivní i negativní kontrolu (0,2 ml) a dvě (1,5 ml) mikrozkušavky pro společné master mixy A a B. Mix A obsahoval primer Arg 158 + Arg112 a 0,8 µl Common primer. Mix B obsahoval primer Cys158 + Cys112 a 0,8 µl Common primer. Do dvou zkumavek (1,5 ml) bylo napipetováno stejné množství H₂O, MyTaq Red Reaction Buffer, MyTaq pol., DMSO a dále příslušné primery (tab. 4)

Každý master mix byl rozpipetován do jednotlivých popsaných PCR mikrozkušavek, které byly připraveny pro každý vzorek po 48 µl. Do každého reakčního mixu byly přidány 2 µl DNA vzorku, DNA byla přidána i do pozitivní kontroly. Negativní kontrola neobsahovala DNA.

Tabulka č. 4: Reakční PCR mix pro gen ApoE

	Pro 1 reakci	Pro 22+22 reakcí
H ₂ O	33,8 µl	743,6 µl
MyTaqRed Reaction Buffer	10 µl	220 µl
MyTaq polymerase	0,5 µl	11 µl
DMSO	2,5 µl	55 µl
Primery F+R	0,8 (Arg 158/ Cys 158) µl + 0,4 (Arg 112/ Cys 112) µl + 0,8 Common primer	17,6 (Arg 158/ Cys 158) µl + 8,8 (Arg 112/ Cys 112) µl + 17,6 Common primer
Celkem	48 µl	1056+1056 µl
DNA	2 µl	

Po napipetování reagensů byly mikrozkušavky zavřeny, zvortexovány a stočeny. Poté byly mikrozkušavky vloženy do termocykleru, následně mohl být spuštěn PCR reakční protokol (tab. 5).

Tabulka č. 5: PCR reakční protokol pro ApoE

PCR protokol		Čas	Teplota
počáteční denaturace		4 min	95 °C
denaturace		45 s	94 °C
annealing	35 cyklů	45 s	66 °C
extenze		45 s	72 °C
extenze		5 min	72 °C

Po ukončení amplifikační reakce byla provedena kontrola PCR produktu na 4% agarózovém gelu. Na gel byl napipetován marker 100 bp DNA LADDER H3RTU. Dále bylo napipetováno po 10 µl PCR produktu z každého vzorku. Vzorky byly nejprve smíchány s barvičkou 0,5 µl Midory Green Advanced DNA Stain. Na gel byl napipetován vždy vzorek vedle sebe A pak B (1A, 1B, 2A, 2B...). Poté byla spuštěna elektroforéza po dobu alespoň 10 minut a napětí 135 V. Následně byl gen přenesen na detekční systém a vyfocen. Výsledkem PCR byly produkty o velikostech uvedených v (tab. 6). Na základě referenčních hodnot bylo vyhodnoceno o jaký genotyp ApoE genu se jedná viz. (tab. 6).

Tabulka č. 6: Tabulka s referenčními hodnotami pro analýzu genu ApoE

ApoE	E3/E2	E4/E2	E4/E3	E4/E4	E3/E3	E2/E2
Mix A	451 bp	451 bp	451 bp	451 bp	451 bp	-
Mix A	-	588 bp	588 bp	588 bp	-	-
Mix B	451 bp	451 bp	-	-	-	451 bp
Mix B	588 bp	588 bp	588 bp	-	588 bp	588 bp

Pro nejednoznačnost výsledků bylo zapotřebí změnit reakční směs. Byl použit kit 2x PCR BIO HS Taq Mix dle doporučení výrobce. Jedná se o polymerázovou techniku, využívající hot – startovou polymerázu, která pomáhá zlepšit rychlost a specifitu samotné PCR reakce. 2x PCR BIO HS Taq Mix obsahuje PCR BIO HS DNA Polymerase, 6 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs, enhancery a stabilizátory.

Postup:

PCR reakce byla připravena v dekontaminovaném laminárním boxu, aby se zabránilo případné kontaminaci použitých chemikálií.

Do chladicího stojánku byly připraveny mikrozkušavky (0,2 ml) pro každý vzorek a pro kontrolu, dále (1,5 ml) mikrozkušavka pro společný mix. Do zkušavky (1,5 ml) byla napipetována směs H₂O, HS master mix, primer (tab. 7).

Každý master mix byl rozpipetován do jednotlivých popsaných PCR mikrozkušavek, které byly připraveny pro každý vzorek po 22 µl. Do každého reakčního mixu byly přidány 2 µl DNA vzorku.

Tabulka č. 7: Reakční 2x PCR BIO HS Taq Mix mix pro gen ApoE

Počet zkušavek	1	6
HS master mix	12,5 µl	75 µl
H ₂ O	7,5 µl	45 µl
primer (20 pmol, R+F)	0,8 + 0,8 + 0,4	4,8 + 4,8 + 2,4
DNA	3 µl	18 µl

Po napipetování reagentů byly mikrozkušavky zavřeny, zvortexovány a stočeny. Poté byly mikrozkušavky vloženy do termocyklu, následně mohl být spuštěn stejný PCR reakční protokol.

Po ukončení amplifikační reakce byla provedena kontrola PCR produktu na 4% agarózovém gelu. Na gel byl napipetován marker 100 bp DNA LADDER H3RTU. Dále bylo napipetováno po 10 µl PCR produktu z každého vzorku. Vzorky byly nejprve smíchány s barvičkou 0,5 µl Midory Green Advanced DNA Stain. Poté byla spuštěna elektroforéza po dobu alespoň 10 minut a napětí 135 V. Následně byl gel přenesen na detekční systém a vyfocen.

DNA bylo nutné precipitovat, tzv. ji přechistit. Precipitace (=vysrážení) DNA byla použita z důvodu potřeby vyčistit ji od případných příměsí. Byla použita také za účelem zvýšení koncentrace DNA nebo zbavení inhibitorů, které brání normálnímu průběhu PCR reakce. Znovu bylo nutné změřit koncentraci DNA.

Precipitace

Reagencie:

- 50 µl DNA (izolované)
- 5 µl 3M acetátu sodného
- 250 µl 100 % ethanolu

Postup:

Po změření objemu izolátu bylo do jednotlivých zkumavek přidáno 5 µl 3M acetátu sodného (pH 5,2). Následně bylo přidáno 2 až 2,5 objemu chlazeného 100% ethanolu do každé zkumavky a proběhlo promíchání zkumavek převrácením v ruce. Dále byly zkumavky uloženy do mrazícího boxu při -20° C na více než 20 minut. Centrifuga byla nastavena při maximálních otáčkách na 20 minut, zkumavky byly vloženy do centrifugy. Opatrně byl odstraněn supernatant bez porušení pelety. Dále bylo přidáno 1 ml 70% ethanolu, zkumavky byly opět vloženy do centrifugy na 10 minut při maximálních otáčkách. Opatrně byl odstraněn supernatant, ten byl odpipetován, tak aby dole po straně zůstala peletka (s obsahem DNA). Peletka byla vysušena na vzduchu a resuspendována v destilované vodě. Tímto postupem došlo k přechištění a zakoncentrování DNA.

Po precipitaci následovala PCR s MyTaq Red DNA Polymerase kitem dle doporučení výrobce. Pro PCR reakci byl použit dimethylsulfoxid (DMSO), který je používán pro zvýšení výtěžku amplifikační reakce.

Reagencie:

H₂O

MyTaq Red Reaction Buffer

MyTaq polymerase

DMSO

Primery F+R

Primery F - forward, R - reverse

Postup:

PCR reakce byla připravena v dekontaminovaném laminárním boxu, aby se zabránilo případné kontaminaci použitých chemikálií.

Do chladicího stojánku byly připraveny dvě PCR mikrozkušavky (0,2 ml) A a B pro každý vzorek, mikrozkušavky pro negativní a pozitivní kontroly (0,2 ml) a dvě (1,5 ml) mikrozkušavky pro společné master mixy A a B. Mix A obsahoval primer Arg 158 + Arg112 a 0,8 µl Common primer, Mix B obsahoval primer Cys158 + Cys112 a 0,8 µl Common primer. Do dvou zkumavek (1,5 ml) bylo napipetováno stejné množství H₂O, MyTaq Red Reaction Buffer, MyTaq pol., DMSO a dále primery (tab. 8).

Každý master mix byl rozpipetován do jednotlivých popsaných PCR mikrozkušavek, které byly připraveny pro každý vzorek po 48 µl. Do každého reakčního mixu byly přidány 2 µl DNA (přečištěné DNA) vzorku, DNA byla přidána i do pozitivní kontroly.

Tabulka č. 8: Reakční PCR mix pro gen ApoE

	Pro 1 reakci	Pro 7+7 reakcí
H ₂ O	33,8 µl	236,6 µl
MyTaqRed Reaction Buffer	10 µl	70 µl
MyTaq polymerase	0,5 µl	3,5 µl
DMSO	2,5 µl	17,5 µl
Primery F+R	0,8 (Arg 158/ Cys 158) µl + 0,4 µl (Arg 112/ Cys 112) + 0,8 µl Common primer	5,6 (Arg 158/ Cys 158) µl + 2,8 (Arg 112/ Cys 112) µl + 5,6 µl Common primer
Celkem	48 µl	336 + 336 µl
DNA	2 µl	

Po napipetování reagensů byly mikrozkušavky zavřeny, zvortexovány a stočeny. Poté byly mikrozkušavky vloženy do termocyklu, následně mohl být spuštěn PCR reakční protokol.

Po ukončení amplifikační reakce byla provedena kontrola PCR produktu na 2% agarózovém gelu. Po napipetování vzorků, byla spuštěna elektroforéza na 10 minut. Dále byl gel přenesen na detekční systém a vyfocen.

Dále po přečištění byla použita reakční směs (kit 2x PCR BIO HS Taq Mix dle doporučení výrobce pro gen ApoE. Jedná se o polymerázovou techniku, která pomáhá zlepšit rychlost a specifitu PCR. 2x PCR BIO HS Taq Mix obsahuje PCR BIO HS DNA Polymerase, 6 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs, enhancery a stabilizátory.

Postup:

PCR reakce byla připravena v dekontaminovaném laminárním boxu, aby se zabránilo případné kontaminaci použitých chemikálií.

Do chladicího stojánku byly připraveny dvě PCR mikrozkušavky (0,2 ml) A a B pro každý vzorek, mikrozkušavky pro negativní a pozitivní kontroly (0,2 ml) a dvě (1,5 ml) mikrozkušavky pro společné master mixy A a B. Mix A obsahoval primer Arg 158 + Arg112, Common primer. Mix B obsahoval primer Cys158 + Cys112, Common primer. Do dvou zkumavek (1,5 ml) bylo napipetováno stejné množství H₂O, 2x PCR Bio HS Taq Mix, DMSO a dále primery (Arg 158, Arg 112, Comm.) (tab. 9).

Každý master mix byl rozpipetován do jednotlivých popsaných PCR mikrozkušavek, které byly připraveny pro každý vzorek po 23 µl. Do každého reakčního mixu byly přidány 2 µl DNA (přečištěné DNA) vzorku, DNA byla přidána i do pozitivní kontroly.

Tabulka č. 9: Reakční 2x PCR BIO HS Taq Mix mix pro gen ApoE

	Pro 1 reakci	Pro 20+20 reakcí
H ₂ O	8,5 µl	170 µl
2x PCR Bio HS Taq Mix	12,5 µl	250 µl
DMSO	1,25 µl	25 µl
Arg 158	0,8 µl	16 µl
Arg 112	0,4 µl	8 µl
Comm.	0,8 µl	16 µl
DNA	2 µl	

Po napipetování reagensů byly mikrozkušavky zavřeny, zvortexovány a stočeny. Poté byly mikrozkušavky vloženy do termocykleru, následně mohl být spuštěn stejný PCR reakční protokol.

Po ukončení amplifikační reakce byla provedena kontrola PCR produktu na 2% agarózovém gelu. Na gel byl napipetován 4 µl marker 50 bp fastgene DNA marker.

Dále bylo napipetováno po 10 µl PCR produktu z každého vzorku. Vzorky byly nejprve smíchány s barvičkou 1 µl Midory Green Advanced DNA Stain. Poté byla spuštěna elektroforéza po dobu alespoň 10 minut a napětí 135 V. Následně byl gel přenesen na detekční systém a vyfocen.

3.4.5 RFLP PCR

Pro polymorfismus MTHFR 677 byla použita metoda PCR RFLP. Metoda byla prováděna pomocí kitu MyTaq Red DNA Polymerase dle doporučení výrobce. Pro PCR reakci byl použit dimethylsulfoxid (DMSO), který je používán pro zvýšení výtěžku amplifikační reakce.

Reagencie:

MyTaq Red Reaction Buffer

MyTaq polymerase

H₂O

DMSO

Primery F+R

Sekvence primerů:

MTHFR 677F 5' - TGAAGG AGAAGG TGT CTG GGG GA - 3'

MTHFR 677R 5' - AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG - 3'

Postup:

PCR reakce byla prováděna v dekontaminovaném laminárním boxu z důvodu zabránění kontaminace použitých chemikálií.

Do chladicího stojánku bylo připraveno množství PCR mikrozkušavek (0,2 ml) odpovídající počtu vzorků, jedna PCR mikrozkušavka pro pozitivní kontrolu a pro negativní kontrolu, jedna 1,5 ml mikrozkušavka pro přípravu společného master mixu. Zkušavky byly řádně popsány. Do 1,5 ml mikrozkušavky byly napipetovány

jednotlivé reagentie společné pro všechny reakce. Po 48 μl byl společný master mix rozpipetován do jednotlivých PCR mikrozkušavek a do každé byly přidány 2 μl DNA (přečištěné DNA) izolátu testovaných vzorků a DNA pozitivní kontroly (tab. 10).

Tabulka č. 10: Reakční PCR mix pro gen MTHFR 677

	Pro 1 reakci	Pro 20+20 reakcí
H ₂ O	33,3 μl	666 μl
MyTaqRed Reaction Buffer	10 μl	200 μl
MyTaq polymerase	0,2 μl	4 μl
DMSO	2,5 μl	50 μl
Primery F+R	1 μl +1 μl	20 μl + 20 μl
Celkem	48 μl	960 μl
DNA	2 μl	

Po napipetování byly mikrozkušavky zavřeny, zvortexovány a krátce stočeny. Poté byly vloženy do termocyklu a byl spuštěn příslušný PCR program (tab. 11).

Tabulka č. 11: PCR reakční protokol pro MTHFR 677

PCR protokol		Čas	Teplota
počáteční denaturace		5 min	95 °C
denaturace		60 s	95 °C
annealing	35 cyklů	60 s	60 °C
extenze		60 s	72 °C
extenze		5 min	72 °C

Po ukončení amplifikační reakce byla provedena kontrola PCR produktů na 2 % agarózovém gelu. Byla použita barvička Midory Green Advanced DNA stain a marker 100 bp DNA H3RTU Ladder. Na gel bylo napipetováno 10 μl z každého vzorku, kontroly a marker (5 μl) byl také přidán. Poté byla spuštěna elektroforéza, která trvala 10 minut, byla spuštěna při napětí 135 V. Následně byl gel přenesen na detekční systém a vyfocen. U vzorků došlo k správnému naamplifikování DNA. Výsledkem byl PCR produkt o velikosti 198 bp.

Restrikční štěpení:

Reagentie:

- 0,5 μl restrikční enzym Hinf I
- 4,5 μl pufr k restrikčnímu štěpení

Potřeby: 19 zkumavek

Oblasti restrikčního štěpení:

Hinf I

5' ... G ↓ A N T C ... 3'

3' ... C T N A ↑ G ... 5'

Pro restrikční štěpení byly připraveny PCR mikrozkušavky, do kterých bylo rozpipetováno 5 µl směsi pufru + Hinf I enzymu. Dále směs byla inkubována 1 hodinu v termostatu při 37°C tak, aby se PCR produkty dostatečně rozštěpily.

Na 2% agarózový gel byly napipetovány vzorky s příslušnou barvičkou a marker, referenční hodnoty PCR produktů po restrikčním štěpením:

- Variantní genotyp MTHFR 677TT o velikosti: 175 + 23 bp
- Variantní genotyp MTHFR 677CC (wild type) o velikosti: 198 bp
- MTHFR 677CT Heterozygot o velikosti: 198 + 175 + 23 bp

4 Výsledky

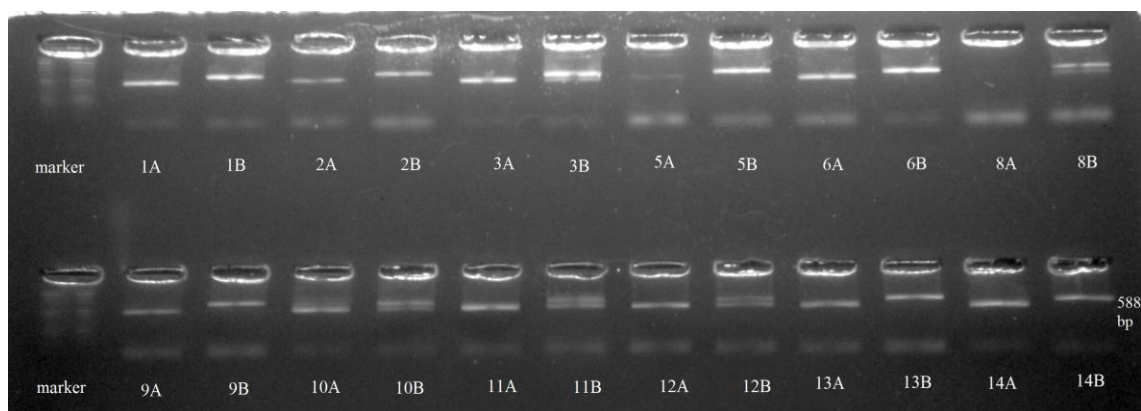
Výsledné koncentrace DNA byly naměřené pomocí fluorometru Qubit® 2.0, při druhém měření koncentrace došlo ke ztrátě 2 vzorků DNA (tab. 12).

Tabulka č. 12: Výsledné koncentrace DNA periferní krve

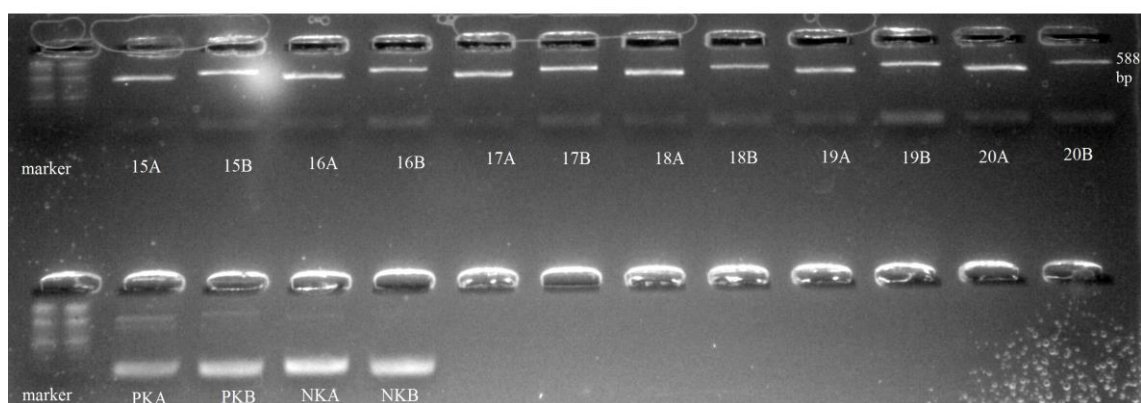
Vzorek	Koncentrace DNA [ng/µl]	Koncentrace přečištěné DNA [ng/µl]
1	53	91,4
2	2,91	3,64
3	54	112
4	0,838	0
5	13	14,9
6	36,7	74
7	14,8	0
8	1,74	17,7
9	8,13	6,89
10	55	58,6
11	21,5	40,1
12	23	13,8
13	8,13	7,97
14	24,2	42,5
15	19,5	31,3
16	23,2	46,1
17	38,1	36,2
18	12,1	13,9
19	8,59	6,17
20	11	4,76

4.1 Metoda PCR ARMS

Touto metodou jsem vyšetřovala polymorfismus ApoE. Byla použita přečištěná DNA pro jednoznačnost výsledků (obr. 10, obr. 11).



Obrázek č. 10: Kontrola výsledků PCR na 2% agarózovém gelu, metoda PCR ARMS, polymorfismus ApoE genu, 50 bp fastgene DNA marker, čísla vzorků.



Obrázek č. 11: Kontrola výsledků PCR na 2% agarózovém gelu, metoda PCR ARMS, polymorfismus ApoE genu, 50 bp fastgene DNA marker, čísla vzorků, pozitivní a negativní kontrola.

Referenční hodnoty ApoE (PCR ARMS) jsou uvedeny níže (tab. 13).

Tabulka č. 13: Tabulka s referenčními hodnotami pro analýzu genu ApoE

ApoE	E3/E2	E4/E2	E4/E3	E4/E4	E3/E3	E2/E2
Mix A	451 bp	451 bp	451 bp	451 bp	451 bp	-
Mix A	-	588 bp	588 bp	588 bp	-	-
Mix B	451 bp	451 bp	-	-	-	451 bp
Mix B	588 bp	588 bp	588 bp	-	588 bp	588 bp

Výsledky analýzy genotypu ApoE (metodou PCR ARMS) jsou uvedeny v (tab. 14).

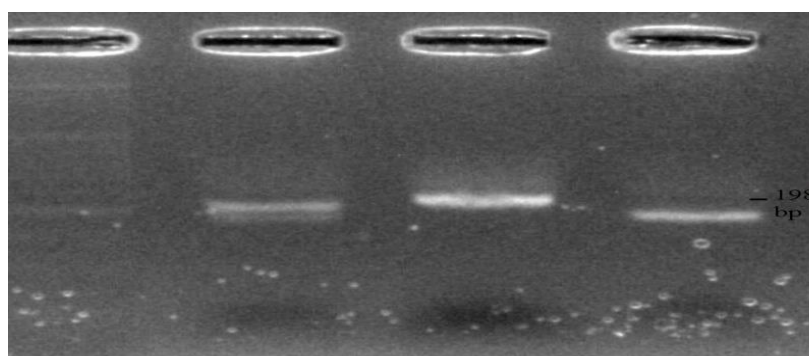
Tabulka č. 14: Výsledky genotypizace pro ApoE

Vzorek	Genotyp ApoE	Vzorek	Genotyp ApoE
1A/1B	E3/E3	13A/13B	E3/E3
2A/2B	E3/E3	14A/14B	E3/E3
3A/3B	E3/E2	15A/15B	E3/E3
5A/5B	E3/E3	16A/16B	E3/E3
6A/6B	E3/E3	17A/17B	E3/E3
8A/8B	E2/E2	18A/18B	E3/E3
9A/9B	E3/E3	19A/19B	E3/E3
10A/10B	E3/E2	20A/20B	E3/E3
11A/11B	E3/E2	PAK/PKB	E4/E2
12A/12B	E3/E2	NKA/NKB	-

Téměř u všech testovaných pacientů s identifikovaným onemocněním byla detekována alela $\epsilon 3$ genu, v homozygotní formě ApoE3/E3 nebo v heterozygotní ApoE3/E2. U jednoho z pacientů byla nalezena izoforma ApoE2 v homozygotním stavu, ApoE2/E2.

4.2 Metoda PCR RFLP

Touto metodou jsem vyšetřovala polymorfismus MTHFR677. Byla použita opět přečištěná DNA pro jednoznačnost výsledků (obr. 12).



marker 198bp

8

2

5

Obrázek č. 12: Ukázka výsledků polymorfismu MTHFR677, marker 100 bp DNA H3RTU Ladder, čísla vzorků 8; 2 a 5, 8 heterozygot MTHFR 677CT, 2 MTHFR 677CC wild type, 5 MTHFR 677TT.

Referenční hodnoty PCR produktů po restrikčním štěpením:

Velikost PCR produktu 198 bp.

- Variantní genotyp MTHFR 677TT o velikosti: 175 + 23 bp
- Variantní genotyp MTHFR 677CC (wild type) o velikosti: 198 bp
- MTHFR 677CT Heterozygot o velikosti: 198 + 175 + 23 bp

Výsledky analýzy genotypu MTHFR677 (metodou PCR RFLP) jsou uvedeny v (tab. 15).

Tabulka č. 15: Výsledky genotypizace pro MTHFR677

Číslo vzorku	Výsledný genotyp
1	heterozygot
2	nemutovaný homozygot (wild type)
3	nemutovaný homozygot (wild type)
5	mutovaný homozygot
6	nemutovaný homozygot (wild type)
8	heterozygot
9	nemutovaný homozygot (wild type)
10	heterozygot
11	nemutovaný homozygot (wild type)
12	nemutovaný homozygot (wild type)
13	nemutovaný homozygot (wild type)
16	nemutovaný homozygot (wild type)
17	nemutovaný homozygot (wild type)
18	mutovaný homozygot
PK	nemutovaný homozygot (wild type)
NK	-

Výsledným genotypem u většiny pacientů byl variantní genotyp MTHFR 677CC. Pouze u dvou pacientů bylo nalezeno, že se jedná o variantní genotypy MTHFR 677TT. Dále byli nalezeni 3 heterozygoti, MTHFR 677CT.

5 Diskuze

Více než 10 let aktivního hledání „major“ genu pro osteoporózu se ukázalo, že takový gen vůbec neexistuje, kostní hmota a její kvalita je ovlivňována vzájemnou interakcí mezi mnoha „slabými“ geny a vnějšími vlivy (Žofková, 2011). Mezi tzv. „slabé“ geny se řadí i geny ApoE a MTHFR, kterým je věnována tato bakalářská práce, zejména praktická část, zabývající se metodami k jejich určení pro toto onemocnění. Gen MTHFR je vztahován ke kostnímu fenotypu, gen ApoE souvisí s kostní denzitou.

Pro vyšetření ApoE genu byly použity kity MyTaq Red DNA Polymerase a 2x PCR BIO HS Taq Mix, tento gen byl vyšetřen metodou ARMS PCR. Jelikož metody zpočátku nevycházely, bylo nutné DNA přechistit. PCR ARMS metoda je časově i finančně méně náročná, probíhá pouze dvě paralelní PCR reakce pro každý vzorek a jedna kontrola PCR produktů na agarózovém gelu, gen ApoE byl vícekrát vyšetřován touto metodou. Celkem bylo testováno 18 jedinců, došlo ke ztrátě 2 vzorků s DNA, všichni pacienti měli identifikované onemocnění osteoporózu. Gen ApoE se vyskytuje ve třech alelách $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ a $\epsilon 4$. Všechny tyto alely mají vliv na osteoporózu, avšak mnoho studií uvádí, že alela $\epsilon 4$ v genu pro apolipoprotein E vykazuje vyšší riziko pro vznik osteoporózy a v průměru nižší hodnoty minerální kostní denzity v porovnání s ostatními alelami. Alela $\epsilon 3$ je nejběžnější v populaci, což potvrzují i mé výsledky genotypizace pro ApoE. Téměř u všech testovaných pacientů s identifikovaným onemocněním byla detekována alela $\epsilon 3$ genu, ať už v homozygotní formě ApoE3/E3 nebo v heterozygotní ApoE3/E2. U jednoho z pacientů byla nalezena pouze izoforma ApoE2 v homozygotním stavu, tedy ApoE2/E2. Alela E4 nebyla u pacientů detekována.

Pro vyšetření MTHFR677 genu byl použit kit MyTaq Red DNA Polymerase, tento gen byl vyšetřen metodou RFLP PCR. Jedná se o přesnější a specifitější metodu než je metoda ARMS PCR, avšak RFLP PCR je metodou zdlouhavější z důvodu kombinace metody PCR a následného restrikčního štepení. Výsledným genotypem u většiny pacientů byl variantní genotyp MTHFR 677CC. Pouze u dvou pacientů bylo nalezeno, že se jedná o variantní genotypy MTHFR 677TT. Dále byli nalezeni 3 heterozygoti, MTHFR 677CT.

Na základě výsledků bakalářské práce bylo zjištěno, že frekvence sledovaných polymorfismů se nijak zásadně neliší ve sledovaném souboru ve srovnání s daty uváděnými pro normální populaci. Vzhledem k malému počtu pacientů, ale nelze vyvozovat žádné závěry a porovnávat je se statistickými hodnotami uváděnými v literatuře.

V současnosti je známo, že všechny geny související s tímto onemocněním mohou představovat významný rizikový faktor, ovšem ne absolutní pro vznik tohoto onemocnění. Jedná se o multifaktoriální onemocnění, které je ovlivňováno i vnějšími vlivy. Riziko osteoporózy je také zvyšováno faktory životního stylu (narušení výživy, nadměrné solení, alkohol, kouření, nedostatek fyzické aktivity).

Osteoporózu nelze vyléčit, ale je možné ji zpomalit. Pacient může předejít tomuto onemocnění tedy i tím, že změní svůj životní styl a vyvaruje se např. rizikovým sportům nebo zvedáním těžkých břemen, zařadí do svého jídelníčku stravu bohatou na vitamin D a vápník (Řeháková, 2017). V České republice je několik osteologických ambulancí, denzitometrií, které se věnují BMD, kvalitou kosti i osteoporózou. Osteocentrum v Brně je specializované zařízení, které je schopno jako jedno z mála léčit osteoporózu a další poruchy kostního metabolismu komplexně, nejen že se zabývají diagnostikou, jako většina ostatních osteologických ambulancí, ale řeší toto onemocnění i farmakoterapií, rehabilitací, cvičením a řízenou úpravou životosprávy, po vzoru světových osteologických center (Řeháková, 2017). Dále Revmatologický ústav v Praze se zabývá nejen léčbou, ale i genetickým výzkumem tohoto onemocnění.

Dle mého názoru je tomuto onemocnění potřeba věnovat více pozornosti, avšak problémem zůstává, že není snadné včas zachytit průběh tohoto onemocnění, protože se ze začátku nikterak neprojevuje a nebolí. Mnoho pacientů přijde do ambulance až po delší době v průběhu této nemoci, kdy pak dále dochází často ke zlomeninám až pomalému ochrnutí osob. Pro stanovení diagnózy je nezbytné klinické vyšetření a osteodenzitometrie, avšak osteodenzitometrie nic nevyovídá o příčině nemoci, tu lze odhalit laboratorním vyšetřením. Pokud se zjistí zrychlený úbytek kostní hmoty, jsou k dispozici účinné léky, které zpomalují nebo dokonce zastavují řídnutí kostí, tím se sníží i riziko zlomenin. Pro pacienty s těžkou osteoporózou je k dispozici dostupný lék, který vytváří novou kostní hmotu. Jedná se o nového pomocníka v léčbě osteoporózy tzv. „biologické lék“, který se podává v podkožní injekci jednou za půl roku (Osteoporóza se nevyhýbá ani mužům, 2016).

V současné době je lékařská věda na vysoké úrovni a neustále se vyvíjí. Do budoucna mohou být vyvinuty nové léky, které by při včasné diagnóze mohly zabránit tomuto onemocnění, a nebo alespoň zmírnit důsledky tohoto onemocnění. Dle mého názoru by měla být věnována větší pozornost genetickému vyšetření. Ne všechny geny a jejich polymorfismy byly v souvislosti s tímto onemocněním objeveny, protože osteoporóza může vzniknout i v souvislosti s jiným onemocněním. Velice důležitou roli hraje také včasná diagnóza lékaře. Lékař by měl doporučit pacientovi, jakými metodami tuto nemoc léčit. V budoucnu by bylo dobré, kdyby lékař měl možnost prodiskutovat s pacientem anamnézu rodiny, tedy genetické předpoklady pro vznik osteoporózy, zareagovat včas a tím zabránit rozvoji nebo zpomalit průběh tohoto onemocnění.

6 Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo shrnutí informací o Osteoporóze a sepsání rešerše na toto odborné téma.

V teoretické části jsem se zabývala definicemi a charakteristikou osteoporózy, rozdělením tohoto onemocnění, etiologií, diagnostikou, léčbou a genetickými predispozicemi zejména geny ApoE a MTHFR677.

V experimentální části bylo mým úkolem praktické zvládnutí molekulárně biologických metod v genetické laboratoři jako izolace DNA z periferní krve, příprava PCR reakce, metody PCR ARMS a RFLP PCR, elektroforetická separace a detekce PCR produktů na agarózovém gelu a restrikční štěpení. Výsledky jednotlivých metod jsem zhodnotila, porovnála.

Snažila jsem se zjistit frekvenci jednotlivých polymorfismů v genech pro ApoE a MTHFR677 pacientů s osteoporózou.

7 Seznam literatury

1. *APOE gene*, 2017 [online]. Genetics Home Reference. [cit. 2017-03-20].
Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/APOE#location>
2. *ApoE polymorfizmus (E2, E3, E4)*, 2009 [online]. Imalab s.r.o. [cit. 2017-03-21]. Dostupné z: <http://www.imalab.cz/clanek/187-apoe-polymorfizmus-e2-e3-e4.aspx>
3. BÁRTOVÁ, Eva, 2011. *PCR (polymerázová řetězová reakce)*. Molekulární biologie. [online]. [cit.2017-01-01]. Dostupné z: http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz
4. BLAHOŠ, J. 1995. *Osteoporóza*. 1. vydání PRAHA: Galén, 162 s. ISBN 80-85824-26-4.
5. BLAŽKOVÁ, Š. et al., 2006. *Osteoporóza: léčebně-preventivní opatření* [online]. Praha: Remedia [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Okruhy-temat/Osteologie/Osteoporóza-lecebne-preventivni-opatreni/8-li-gp.magarticle.aspx>
6. BRDIČKA, Radim. 2014. *Genetika v klinické praxi*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-106-3, ISBN 978-80-7492-107-0 (soubor).
7. BROULÍK, Petr, 2004. *Kostní onemocnění ve stáří - metabolické osteopatie*. KALVACH, Zdeněk et al. *Geriatric a gerontologie*. Vyd. 1. Praha 7: Grada Publishing, a.s., ISBN 80-247-0548-6.
8. BROULÍK, Petr, 2009. *Osteoporóza a její léčba*. 2. rozš. vyd. Praha: Maxdorf, 159 s. ISBN 978-80-7345-176-9.
9. BROULÍK, Petr, 2010. *Postmenopauzální osteoporóza: Praktické rady lékaře*. Vyd. 1. Praha 4: Mladá fronta, a.s., 47 s. ISBN 978-80-204-2342-9.
10. ČIHÁK, Radomír, Miloš GRIM a Oldřich FEJFAR, 2011. *Anatomie*. 3., upr. a dopl. vyd. Praha: Grada, 552 s. ISBN 978-80-247-3817-8.
11. ČILLÍKOVÁ K, 2010. *Osteoporóza* [online]. Sanquis. [cit. 2017-03-04]. Dostupné z: <http://www.sanquis.cz/index1.php?linkID=art3262>
12. DUSILOVÁ SULKOVÁ S, 2007. *Syndrom deficitu vitamínu D – teorie, nebo klinická realita?* [online]. Postgraduální medicína. [cit. 2017-03-24]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/syndrom-deficitu-vitaminu-d-teorie-nebo-klinicka-realita-308615>

13. DYLEVSKÝ, Ivan, 2009. *Funkční anatomie*. 1. vyd. Praha: Grada, 532 s. ISBN 978-80-247-3240-4.
14. FAIRBROTHER, UL, LB TANKO, AJ WALLEY, C CHRISTIANSEN, P FROGUEL a AIF BLAKEMORE, 2007. Leptin receptor genotype at Gln223Arg is associated with body composition, BMD, and vertebral fracture in postmenopausal Danish women. *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH*. **22**(4), 544-550. ISSN 08840431.
15. FERRIE, R . M ., M . J . SCHWARZ, N . H . ROBERTSON, S . VAUDIN, M . SUPER, G . MALONE a S . LITTLE, 1992. Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. *Am. J. Hum. Genet.* **51**(2), 251-262.
16. FIALA, Pavel, Jiří VALENTA a Lada EBERLOVÁ, 2015. *Stručná anatomie člověka*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 244 s. ISBN 978-80-246-2693-2.
17. *Genetics of dementia, 2012* [online]. In: Alzheimer's Society. [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: https://www.alzheimers.org.uk/site/scripts/documents_info.php?documentID=168
18. GUAN, JZ, M WU, YZ XIAO, JS ZHOU a ZD WANG, 2014. MTHFR C677T polymorphism and osteoporotic fracture in postmenopausal women: a meta-analysis. *GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH*. **13**(3), 7356-7364. ISSN 16765680.
19. HAK, A.E., I.C.D. WESTENDORP, A. HOFMAN, J.C.M. WITTEMAN, K.H. POLDERMAN, C. JAKOBS a C.D.A. STEHOUWER, 2000. Increased plasma homocysteine after menopause. *Atherosclerosis*. **149**(1), 163 – 168. DOI: 10.1016/S0021-9150(99)00321-4. ISSN 00219150.
20. KOSINOVÁ, Eva, 2007. *Expresa strukturálních proteinů živočišných virů v eukaryotních systémech*. Brno. Disertační práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Doc. RNDr. Miroslav Němec, CSc.
21. KŘIVÁNKOVÁ, Markéta a Milena HRADOVÁ, 2009. *Somatologie: učebnice pro střední zdravotnické školy*. 1. vyd. Praha: Grada, 214 s. ISBN 978-80-247-2988-6.

22. LEE, H.-J., S.-Y. KIM, G. S. KIM, et al., 2010. Fracture, bone mineral density, and the effects of calcitonin receptor gene in postmenopausal Koreans. *Osteoporosis international*. **21**, no. 8(8). ISSN 0937941X.
23. LI, Donghua a Jie WU, 2010. Research Paper: Association of the MTHFR C677T polymorphism and bone mineral density in postmenopausal women. *Journal of Biomedical Research*. **24**(6), 417-423. DOI: 10.1016/S1674-8301(10)60056-5. ISSN 16748301.
24. MACDONALD, HM, FA MCGUIGAN, SA NEW, MK CAMPBELL, MHN GOLDEN, SH RALSTON a DM REID, 2001. COL1A1 Sp1 polymorphism predicts perimenopausal and early postmenopausal spinal bone loss. *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH*. **16**(9), 1634-1641. ISSN 08840431.
25. MAČÁK, Jirka, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ, 2012. *Patologie. 2., doplněné vydání*. Praha 7: Grada Publishing, a.s., 376 s. ISBN 978-80-247-3530-6.
26. MERKUNOVÁ, Alena a Miroslav OREL, 2008. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. 1.vyd. Praha: Grada, 304 s. ISBN 978-80-247-1521-6.
27. *MTHFR gene, 2017* [online]. Genetics Home Reference. [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR#location>
28. *Mutace v genu pro MTHFR, 2015-2016* [online]. Trombofilik.cz. [cit. 2017-03-21]. Dostupné z: <https://trombofilik.cz/mutace-v-genu-pro-mthfr/>
29. NAVRÁTIL, Leoš, 2008. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory*. 1. vyd. Praha: Grada, 424 s. ISBN 978-80-247-2319-8.
30. OBERMAYER-PIETSCH B, 2006. Genetics of osteoporosis. *Wien Med Wschr*. 156:162-163. DOI: 10.1007/s10354-005-0249-2.
31. OLERUP, O . a H . ZETTERQUIST, 1991. HLA-DRB1*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: a sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens*. **37**(5), 197-204.
32. *Osteoporóza, 2016*. [online]. GHC GENETICS - Prevence je základ pevného zdraví. [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: <file:///C:/Users/PC/Desktop/internet%20zdroje%20bc%20práce/Osteoporóza a.html>
33. *Osteoporóza ve světě a u nás*, 2011. [online]. Liga proti osteoporóze. [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: <http://www.osteoliga.cz/index.php/osteoporoz/a/osteoporoz-a-ve-svete-a-u-nas>

34. *Osteoporóza se nevyhýbá ani mužům*, 2016. Novinky.cz [online]. [cit.2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.novinky.cz/zena/zdravi/404412-osteoporoz-a-se-neyhyba-ani-muzum.html>
35. *Osteoporóza a její léčba*, 2017. [online]. Projekt OSTEO CZ. [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: file:///C:/Users/PC/Desktop/internet%20zdroje%20bc%20práce/OSTEO_%20Osteoporóza%20a%20její%20léčba.html
36. PALÍČKA, Vladimír, Jaroslav BLAHOŠ a Svatopluk BÝMA, © 2011. *Osteoporóza: doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné lékaře 2011*. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP. Doporučené postupy pro praktické lékaře. ISBN 978-80-86998-44-2.
37. PAULOVÁ, G., SCHUBOVÁ, 2003. V. *Stop osteoporóze!* 1. vyd. Praha: Ivo Železný, 121 s. ISBN 80-237-3759-7.
38. PENKA, Miroslav, Eva TESAŘOVÁ, Jan BLATNÝ, et al., 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1 . vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3459-0 .
39. PETER, I, MD CROSIER, M YOSHIDA, et al., 2011. Associations of APOE gene polymorphisms with bone mineral density and fracture risk: a meta-analysis. *OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL*. **22**(4), 1199-1209. ISSN 0937941X.
40. *Polymerázová řetězová reakce*, 2001. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce#cite_ref-Kary_Mullis_Nobel_Lecture_4-0
41. PRINZ-LANGENOHL, R , S BRÄMSWIG, O TOBOLSKI, YM SMULDERS, DEC SMITH, PM FINGLAS a K PIETRZIK, 2009. [6S]-5 -methyltetrahydrofolate increases plasma folate more effectively than folic acid in women with the homozygous or wild-type 677C→T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase. *British Journal of Pharmacology*. 2009,**158**(8), 2014-2021. DOI: 10.1111/j .1476-5381.00492.x . ISSN 00071188. Dostupné také z : <http://doi.wiley.com/10.1111/j .1476-5381.2009.00492.x>
42. RALSTON, Stuart H., 2009. Genetic Control of Susceptibility to Osteoporosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **87**(6), 1-9. DOI: dx.doi.org/10.1210/jcem.87.6.8621.
43. RIGUTTI, Adriana, 2006. *Ilustrovaný atlas anatomie*. 1. vyd. Praha: Sun, 239 s. ISBN 80-7371-142-7.

44. ŘEHÁKOVÁ, Veronika, 2017. *Osteoporózu nelze vyléčit, řídnutí kostí je ale možné zpomalit*. Vitalia.cz. [online]. [cit.2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.vitalia.cz/clanky/osteoporozu-nelze-vylecit-ridnuti-kosti-je-ale-mozne-zpomalit/>
45. ŘEHOŘKOVÁ, Pavla, Monika ŠPIČKOVÁ a Miroslava ŠPIČKOVÁ, 2008. *Odvápnění kostí čili osteoporóza. Dieta bohatá vápníkem*. 1. vyd. Praha: Forsapi, 106 s. ISBN 978-80-87250-00-6.
46. SINGH, Monica, Puneetpal SINGH, Surinder SINGH, Pawan Kumar JUNEJA a Taranpal KAUR, 2010. A susceptible haplotype within APOE gene influences BMD and intensifies the osteoporosis risk in postmenopausal women of Northwest India. *Maturitas*. **67**(3), 239-244. DOI: 10.1016/j.maturitas.2010.06.017. ISSN 03785122.
47. SOTORNÍK, Ivo, 2016. Osteoporóza – patogeneze a diagnostika. *Synlabianer* [online]. č. 1, s. 16-17 [cit. 2017-02-19]. Dostupné z: <http://www.synlab.cz/media/files/synlabianer/synlabianer-2016-01.pdf>
48. STUART H RALSTON, ANDRÉ G UITTERLINDEN, MARIA LUISA BRANDI, et al., 2006. Large-scale evidence for the effect of the COLIA1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study. *PLoS Medicine*, Vol 3, Iss 4, p e90 (2006). **3**(4), e90. [DOI: 10.1371/journal.pmed.0030090. ISSN 15491277.
49. THAKKINSTIAN, A, C D'ESTE, J EISMAN, T NGUYEN a J ATTIA, 2004. Meta-analysis of molecular association studies: Vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH*. **19**(3), 419-428. ISSN 08840431.
50. TONG, Terry Y.Y., Rita Y.Y. YONG, Victor H.H. GOH, et al., 2010. Association between an intronic apolipoprotein E polymorphism and bone mineral density in Singaporean Chinese females. *Bone*. **47**(3), 503-510. DOI: 10.1016/j.bone.2010.05.028. ISSN 87563282.
51. VAN DER PUT, Nathalie M .J ., Fons GABREËLS, Erik M .B . STEVENS, Jan A .M . SMEITINK, Frans J .M . TRIJBELS, Tom K .A .B . ESKES, Lambert P . VAN DEN HEUVEL a Henk J . BLOM, 1998. A Second Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects? *The American Journal of Human Genetics*. **62**(5), 1044-1051. DOI: 10.1086/301825. ISSN 00029297. Dostupné také z : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707615249>

52. VILÍMOVSKÝ, M., 2014. *Osteoporóza* [online]. Praha. [cit. 2017-03-04]. Dostupné z: file:///C:/Users/PC/Desktop/internet%20zdroje%20bc%20práce/Osteoporóza%20a%20její%20léčba.html
53. VILLADSEN, MM, MH BUNGER, M CARSTENS, L STENKJAER a BL LANGDAHL, 2005. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism is associated with osteoporotic vertebral fractures, but is a weak predictor of BMD. *OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL*. **16**(4), 411-416. ISSN 0937941X.
54. VLČEK, Jiří a Magda VYTRŽÍŠALOVÁ, 2014. *Klinická farmacie II*. 1. vyd. Praha: Grada, 256 s. ISBN 978-80-247-4532-9.
55. VYSKOČIL, Václav. c2009. *Osteoporóza a ostatní nejčastější metabolická onemocnění skeletu*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-637-3.
56. WILLING, M., M.K. CLARK, T. BURNS, et al., 1998. Bone mineral density and its change in white women: Estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *Journal of Bone and Mineral Research*. **13**(4), 695 – 705. DOI: 10.1359/jbmr.1998.13.4.695. ISSN 08840431.
57. YAN GUO, LI-JUN TAN, SHU-FENG LEI, et al., 2010. Genome-Wide Association Study Identifies ALDH7A1 as a Novel Susceptibility Gene for Osteoporosis. *PLoS Genetics*. **6**(1), 1-8. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000806. ISSN 15537390
58. YAO-ZHONG LIU, Scott G. WILSON, LIANG WANG, et al., 2008. Identification of PLCL1 Gene for Hip Bone Size Variation in Females in a Genome-Wide Association Study. *PLoS ONE*. **3**(9), 1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0003160. ISSN 19326203.
59. ZAJICKOVA, K, I ZOFKOVA, R BAHBOUH a A KREPELOVA, 2002. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mineral density and bone turnover: FokI genotype is related to postmenopausal bone mass. *PHYSIOLOGICAL RESEARCH*. **51**(5), 501-509. ISSN 08628408.
60. ZENDE, P. D., M. P. BANKAR, P. S. KAMBLE a A. A. MOMIN, 2013. Apolipoprotein E Gene Polymorphism And Its Effect On Plasma Lipids In Arteriosclerosis. *Journal of Clinical*. **7**(10), 2149-2152. DOI: 10.7860/JCDR/2013/6195.3455. ISSN 0973709X.

61. ZIMA, Tomáš, 2007. *Laboratorní diagnostika*. Druhé, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-372-3 .
62. ZIMA, Tomáš, 2013. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-062-2.
63. ŽOFKOVÁ, I, 2011. *Význam genetiky v predikci rizika osteoporózy*. proLékaře.cz. [online]. [cit.2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/vnitri-lekarstvi-clanek/vyznam-genetiky-v-predikci-rizika-osteoporozy-35604>
64. ŽOFKOVÁ, I., K. ZAJÍČKOVÁ, M. HILL a A. KŘEPELOVÁ, 2003. Does Polymorphism C1377T of the Calcitonin Receptor Gene Determine Bone Mineral Density in Postmenopausal Women? *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. **111**(7), 447 – 449. [DOI: 10.1055/s-2003-44293. ISSN 09477349.

Seznam tabulek a obrázků

Tabulky:

1. BLAŽKOVÁ et al., 2006. *Osteoporóza: léčebně-preventivní opatření* [online]. Remedia. [cit. 2017-03-04]. Dostupné z: <http://www.remmedia.cz/Okruhy-temat/Osteologie/Osteoporozalecebne-preventivni-opatreni/8-li-gp.magarticle.aspx>
2. ZIMA, Tomáš, 2007. *Laboratorní diagnostika*. Druhé, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-372-3 .
3. ZHU, K., J. BEILBY, I. M. DICK, A. DEVINE, M. SOÓS a R. L. PRINCE, 2009. Effects of homocysteine and MTHFR genotype on hip bone loss and fracture risk in elderly women. *Osteoporosis international*. **20**, no. **7**(7), ISSN 0937941X.

Obrázky:

1. *APOE gene*, 2017 [online]. Genetics Home Reference. [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/APOE#location>

2. BÁRTOVÁ Eva, 2011. *PCR (polymerázová řetězová reakce)*. Molekulární biologie. [online]. [cit.2017-01-01]. Dostupné z: http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz
3. DNA ladder (Molecular Weight Marker), 2017. In: *Nippon Genetics Europe* [online]. Dueren - Germany [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <http://www.nippongenetics.eu/products/dnarna-electrophoresis/dna-ladder-molecular-weight-marker/>
4. *DXA Body Composition for Weight Management, 2017*. Obesity : one of the greatest public health challenges of the 21st century [online]. GE Healthcare. [cit. 2017-03-10]. Dostupné z: http://www3.gehealthcare.co.uk/en-gb/products/categories/metabolic_health/dxa_for_metabolic_health/dxa_body_composition_for_weight_management
5. KOHLI, 2011. *Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications* [online]. Indian Journal of Endocrinology and Metabolism. [cit. 2017-03-10]. Dostupné z: <http://www.ijem.in/article.asp?issn=2230-8210;year=2011;volume=15;issue=3;spage=175;epage=181;aulast=Kohli>
6. *Kosti a kostní tkáň, 2014* [online]. Mojemedicina.cz [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: <https://www.mojemedicina.cz/pro-pacienty/lecba/kosti-a-kostni-tkan/>
7. *MTHFR gene, 2017* [online]. Genetics Home Reference. [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR#location>
8. *Trápí vás osteoporóza?, 2016*. [online]. Videolékárna. [cit. 2017-03-15]. Dostupné z: <http://www.videolekarna.cz/clanky-rady/trapi-vas-osteoporoz-a-37.html>
9. VILÍMOVSKÝ, M., 2014. *Osteoporóza* [online]. Praha. [cit. 2017-03-04]. Dostupné z: <file:///C:/Users/PC/Desktop/internet%20zdroje%20bc%20práce/Osteoporóza%20a%20její%20lčba.html>
10. ZIMA, Tomáš, 2007. *Laboratorní diagnostika*. Druhé, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-372-3 .

Seznam zkratek

dsDNA	double – stranded DNA, dvouvláknová DNA
MTHFR	methylenetetrahydrofolatreduktase, methylenetetrahydrofoláteduktáza
ApoE	Apolipoprotein E
PBM	peak bone mass
BMD	bone mineral density
SD	standart deviation, standartní odchylka
WHO	World Health Organization
DXA (DEXA)	Dual Energy X-ray Absorptiometry
DXR	digitální rentgenová radiogrammetrie
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
HLA	human leukocyte antigens
ESR1 α	estrogen receptor gen α
VDR	vitamin D receptor
CTR	receptor calcitonin
TGF β 1	transforming grow factor β 1
IGF-1	insulin grow factor 1
CYP 17	cytochrom 17
LRP 5	LDL receptor protein
Wnt	gen Wingless
ESR	estrogen receptor
COL1A1 Sp1	polymorfismus v genu pro kolagen typu 1, collagen 1
Gln	glutamin
Arg	arginin
IL	interleukin
OPG	osteoprotegerin
ALDH7A1	Aldehyddehydrogenase 7
PLCL 1	phospholipase C-like protein, fosfolipáza C1
C	cytosin
T	thymin
LH 1 gen	lyzyl hydroxylase 1

VLDL	very low - density lipoprotein, velmi nízkodenzitní lipoprotein
HDL	high density lipoprotein, vysokodenzitní lipoprotein
PCR	polymerase chain reaction
PCR RFLP	polymerase chain reaction – restriction fragmen lenght polymorphism
PCR ARMS	amplification refractory mutacion detection systém