

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Katedra zoologie a ornitologická laboratoř



**Souvislost polymorfismu genu *BDNF*  
s vnímavostí k infarktu myokardu – genetická  
asociační studie u českých pacientů**

**Diplomová práce**

**Natálie Motáková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: MUDr. František Mrázek, Ph.D.

Pracoviště vedoucího práce: Ústav imunologie-LIGP, Lékařská fakulta UP

**Olomouc 2012**

**PALACKÝ UNIVERSITY OLOMOUČ**

**FACULTY OF SCIENCE**

Department of Zoology and Laboratory of Ornithology



**The relationship of *BDNF* gene polymorphism  
of gene *BDNF* with susceptibility to  
myocardial infarction – genetic association  
study in Czech patients**

**Diploma thesis**

**Natálie Motáková**

Study programme: Biology

Fields of study: Zoology

Form of study: Attendance

Supervisor: MUDr. František Mrázek, Ph.D.

The workplace of supervisor: Department of Immunology-LIGP, Faculty of  
Medicine and Dentistry PU

**Olomouc 2012**

Prohlašuji, že předložená diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně s pomocí vedoucího práce a použila jen uvedených pramenů a literatury, které v práci řádně cituji.

V Olomouci ..... Podpis .....

Souhlasím, aby má diplomová práce byla využívána ke studijním účelům a citována dle platných norem.

V Olomouci ..... Podpis .....

## SOUHRN

Ischemická choroba srdeční (ICHS) a její manifestace, zejména infarkt myokardu (IM), jsou stále jednou z nejčastějších příčin smrti (nejen) v rozvinutých zemích. Kromě prokázaných zevních faktorů se na vzniku uvedených chorob podílí významně dědičné faktory. Mezi geny, o kterých se uvažuje vzhledem k jejich možné účasti na dědičné složce ICHS, patří i gen pro růstový faktor nervové tkáně *BDNF* (z angl. Brain Derived Neurotrophic Factor). Studie v čínské populaci navíc nedávno zjistila spojitost mezi variantou *BDNF* genu Val66Met a nestabilní anginou pectoris, která je jednou z manifestací ICHS.

Cílem této diplomové práce proto bylo zjistit, zda existuje také souvislost mezi polymorfismem *BDNF* genu (konkrétně variantou Val66Met) a infarktem myokardu v české populaci.

Do studie bylo zařazeno 217 českých pacientů s prodělaným IM a 180 zdravých jedinců, jež sloužili jako srovnávací kontrola. Genotypizace byla u všech jedinců provedena paralelně pomocí metod PCR-SSP (z angl. polymerase chain reaction with sequence specific primers) a RT-PCR (z angl. real-time polymerase chain reaction, modifikace TaqMan).

Zjistili jsme, že se alelové, genotypové ani fenotypové frekvence polymorfismu *BDNF* rs6265 G/A (Val66Met) mezi skupinami pacientů s IM a kontrolních jedinců signifikantně nelišily. U pacientů s infarktem myokardu byla frekvence alely 66Met 18%, genotypu 66Met/Met 4% a podíl nosičů (fenotypová frekvence) pro alelu 66Met 31 %. Ve srovnávané skupině zdravých kontrol byly zjištěny tyto frekvence: 17% (alelová), 5% (genotypová) a 29 % (fenotypová) (hodnota  $p > 0,05$  pro všechna srovnání). Součástí práce byla také subanalýza srovnávající pacienty a kontroly zvlášť podle pohlaví. Ani v tomto případě nebyla zjištěna souvislost mezi *BDNF* polymorfismem Val66Met a IM.

Závěrem lze tedy shrnout, že naše studie nezjistila souvislost mezi *BDNF* polymorfismem Val66Met a IM u české populace. Uvedený polymorfismus tedy pravděpodobně nehraje zásadní roli v dědičné složce IM, přinejmenším v české populaci. Výsledky práce byly publikovány v časopise s impakt faktorem.

## SUMMARY

Coronary Heart Disease (CHD) and its manifestations, particularly myocardial infarction (MI), still remain among the most important causes of mortality in the developed world. Apart from the known causative environmental factors, CHD is characterized by important heritable component. The gene encoding for Brain Derived Neurotrophic Factor (*BDNF*) is considered as one of the candidate genes with possible implication in the genetic susceptibility to CHD. Furthermore, the study in the Chinese population reported recently an association of *BDNF* gene variant Val66Met with another manifestation of CHD, namely unstable angina pectoris.

The aim of the present thesis was, therefore, to investigate possible link between the *BDNF* gene variant Val66Met and myocardial infarction in the Czech population.

The study included 217 Czech patients with MI and 180 healthy control subjects who served as a comparative control population sample. Genotyping was performed in all subjects by two methods in parallel: the PCR-SSP (polymerase chain reaction with sequence specific primers) and RT-PCR (real-time polymerase chain reaction, TaqMan).

We found that the allele, genotype and phenotype frequencies of the polymorphism *BDNF* rs6265 G/A (Val66Met) did not significantly differ between the patients with MI and control subjects. In patients with MI the frequency of 66Met allele was 18%, the genotype 66Met/Met 4% and the carriage rate (phenotype frequency) of the 66Met allele corresponded to 31%. The frequencies *BDNF* Val66Met variants observed in the healthy control population were as follows: 17% (allele), 5% (genotype) and 29% (phenotype) ( $p > 0.05$  for all comparisons). Subanalysis comparing MI patients and control subjects separately according to gender was also a part of the study. Even in these comparisons no relationship between the *BDNF* Val66Met and MI was found.

In conclusion, this study did not find any association between *BDNF* Val66Met polymorphism and myocardial infarction in Czech population. Thus, this polymorphism does not probably contribute significantly to the genetic component of MI, at least in the Czech population. The results of this thesis were published in the journal with impact factor.

**Klíčová slova:** Ischemická choroba srdeční, ateroskleróza, polymorfismus Val66Met, neurotrofiny, brain-derived neurotrophic faktor (*BDNF*)

**Key words:** Coronary heart disease, atherosclerosis, polymorphism Val66Met, neurotrophins, brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*).

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování prof. MUDr. Martinovi Petřkovi, CSc. za poskytnutí prostoru k vytvoření diplomové práce a umožnění získání praxe v Laboratoři imunogenomiky a imunoproteomiky při Ústavu imunologie LF UP v Olomouci. Dále bych chtěla vřele poděkovat svému školiteli MUDr. Františkovi Mrázkovi, Ph.D. za připomínky, cenné rady, velkou trpělivost a ochotu při vedení diplomové práce. Zároveň děkuji Ing. Anně Sťahelové za pomoc při zpracovávání vzorků a praktické rady. Děkuji také MUDr. Janě Petřkové, Ph.D. z I. interní kliniky – kardiologické FN Olomouc za zajišťování klinické části studie. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem zaměstnancům Ústavu imunologie při LF UP v Olomouci za laskavý přístup během mé práce na diplomové práci.

Studie byla finančně podpořena institucionálním grantem UP v Olomouci (IGA UP Projekt LF\_20010\_008, Česká republika) a částečně také granty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (Projekty MSM6198959205 a ME-856).

|   |           |
|---|-----------|
| <b>OBSAH.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>ÚVOD.....</b>  | <b>10</b> |
| TEORETICKÁ ČÁST .....   | 12        |
| 1. ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDEČNÍ A INFARKT MYOKARDU .....  | 13        |
| 1.1 Ateroskleróza .....   | 13        |
| 1.1.1 Stavba cévní stěny .....  | 14        |
| 1.1.2 Patogeneze aterosklerózy.....   | 15        |
| 1.1.3 Aterosklerotický plát.....  | 16        |
| 1.1.4 Vývoj aterosklerózy .....   | 17        |
| 1.2 Klinické formy ICHS.....  | 19        |
| 1.3 Rizikové faktory ICHS.....  | 21        |
| 2. POLYMORFISMUS GENU BDNF .....  | 30        |
| 2.1 Genový (DNA) pOLYMORFISMUS.....   | 31        |
| 2.2 Genový polymorfismus a dědičná složka komplexních nemocí .....                                | 32        |
| 2.2 Gen BDNF .....  | 33        |
| PRAKTICKÁ ČÁST.....   | 39        |
| 3. VLASTNÍ EXPERIMENT .....   | 40        |
| 3.1 Hypotéza .....  | 40        |
| 3.2 Průběh experimentu.....   | 41        |
| 3.3 Soubor studované populace .....   | 42        |
| 3.4 Návrh primerů pro PCR-SSP.....  | 43        |
| 3.5 Izolace dna.....  | 45        |
| 3.5.1 Kolonková mikroizolace DNA .....  | 45        |
| 3.5.2 Izolace DNA vysolovací metodou .....  | 49        |
| 3.6 PCR-SSP (polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery)....                  | 52        |
| 3.7 Elektroforéza PCR produktů (amplikonů) na agarózovém gelu (dále ELFO): .....                  | 57        |
| 3.8 Genotypizace pomocí RT-PCR (real-time PCR – polymerázová řetězová reakce v reálném čase)..... | 60        |
| 4. VÝSLEDKY .....   | 63        |
| 4.1 Zavedení protokolů pro genotypizaci polymorfismu genu BDNF .....                              | 63        |
| 4.2 Genotypizace studovaných souborů, výpočet a porovnání frekvencí .....                         | 64        |
| 5. DISKUZE .....  | 71        |



|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| <b>ZÁVĚR .....</b>             | <b>74</b> |
| <b>SEZNAMY .....</b>           | <b>75</b> |
| SEZNAM ZKRATEK .....           | 75        |
| SEZNAM TABULEK .....           | 77        |
| SEZNAM OBRÁZKŮ .....           | 77        |
| SEZNAM GRAFŮ .....             | 78        |
| <b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b> | <b>79</b> |

## ÚVOD

Ze statistických dat poskytovaných Ústavem zdravotnických informací a statistiky (ÚZIS) vyplývá, že ještě v 80. letech patřila Česká republika mezi státy s největším podílem mortality na kardiovaskulární onemocnění (KVO). Po roce 1989 se na rozdíl od některých dalších států východního bloku tento podíl začal snižovat. Největší pokles byl zaznamenán v 1. polovině 90. let. Za příčiny tohoto poklesu lze považovat jednak podstatné změny v životním stylu (včetně poklesu podílu kuřáků) a stravovacích návyků, změnu režimu spojenou s rozšířením životních příležitostí apod. Dalším důvodem je dramatický posun v úrovni lékařské péče, zejména ve smyslu dostupnosti medicínských technologií, metod a farmak, které za bývalého režimu nebyly k dispozici, či ještě nebyly známy. (Jokl, 2005). Úmrtnost na KVO nicméně v České republice v současné době stagnuje, je stále vysoká a představuje závažný zdravotnický i společenský problém.

Nebezpečná a zároveň velmi běžná příčina KVO je ischemická choroba srdeční projevující se nedostatečným okysličením srdečního svalu v důsledku ztíženého proudění krve. Jednu z nejzávažnějších manifestací ICCHS reprezentuje infarkt myokardu. Ke vzniku IM přispívají lipidové pláty, které se hromadí na stěně cévy, až zcela její průchod uzavřou. V jiném případě může otvor ucpat trombotická sraženina. Dle informací, které poskytuje ročenka z roku 2010 (ÚZIS, 2011) bylo k 31.12.2010 registrováno a u lékařů léčeno 456 tisíc obyvatel České republiky na infarkt myokardu, z toho připadalo 14 766 na nově zjištěné případy. Během roku 2010 podlehl infarktu myokardu 3668 mužů a 2771 žen.

Velmi důležitou roli při vzniku ICCHS a IM hrají faktory vnějšího prostředí a životní styl (strava, kouření, stres, pohybová aktivita atd.). ICCHS však patří do skupiny komplexních nemocí s velmi významným podílem genetické predispozice. (Hamsten, 2008). V posledních letech je tak věnováno enormní úsilí k identifikaci genetických faktorů, které mohou riziko ICCHS a IM ovlivňovat. Jednou z molekul, které se ve vztahu k ICCHS a IM věnuje v poslední době pozornost, je růstový faktor Brain-derived neurotrophic factor. Jeho lokalizace v buňkách a tkáních kardiovaskulárního systému a biologické funkce naznačují možnou roli tohoto růstového faktoru v patogenezi ICCHS.

V nedávné publikaci byla u čínské populace poprvé uveřejněna asociace mezi výskytem polymorfismu genu *BDNF* a projevy nestabilní anginy pectoris (další typ manifestace ICCHS). S cílem pokračovat ve studiu vztahu mezi polymorfismem Val66Met genu *BDNF*

a manifestací ICHS (konkrétně infarktu myokardu) vznikla tato diplomová práce a publikace uveřejněná v časopise s impakt faktorem „Cytokine“, jež je uveden v příloze 4

**Byly stanoveny následující cíle diplomové práce:**

- Zpracovat rešerši o problematice aterosklerózy, ICHS, IM a genu *BDNF* (Teoretická část)
- Navrhnout a zavést metodické protokoly pro genotypizaci polymorfismu *BDNF* rs6265 G/A (Val66Met) technikami PCR-SSP a RT-PCR
- Provést genotypizaci uvedeného polymorfismu ve skupině pacientů s infarktem myokardu a ve skupině zdravých kontrolních jedinců
- Posoudit vztah studovaného polymorfismu genu *BDNF* k rozvoji ICHS

# **TEORETICKÁ ČÁST**

# 1. ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDEČNÍ A INFARKT MYOKARDU

Ischemická choroba srdeční patří k nejčastějším příčinám kardiovaskulární úmrtnosti jak v naší republice, tak ve světě. Za vznikem tohoto onemocnění stojí koronární ateroskleróza charakterizovaná ukládáním tzv. lipidových plátů, složených nejčastěji z cholesterolu a jiných tukových částic, do stěn cév. Tím dochází ke stenóze (zúžení) otvoru cévy, což se následně projevuje v omezeném transportu krve obohacené kyslíkem do srdeční tkáně. Kromě stenózy cévy se aterosklerotické pláty dále podílejí na rozvoji trombů, které ulpívají v místě poškození, kde mohou zcela uzavřít průchod arterie. Následkem takového uzavření cévního průchodu je znemožnění zásobení srdce kyslíkem a zároveň odvodu zplodin látkové výměny. (Veselka, 2009).

Existuje řada forem ICCHS, které se vyznačují právě zmíněnou ischemií (nedostatečným prokrvením) myokardu. Nejčastěji zaznamenávanými projevy ICCHS jsou zejména angina pectoris (AP) a v případě úplného uzavření tepen pak může dojít až k infarktu myokardu.

Diagnostika i léčba ICCHS jsou velice náročné medicínsky, ale také ekonomicky, a proto je důležité klást důraz především na prevenci vůči rizikovým faktorům ovlivňující rozvoj ICCHS.

## 1.1 ATEROSKLERÓZA

Dle Sošky (2003) je ateroskleróza definována jako chronické zánětlivé onemocnění cévní stěny, které je spojeno se změnami medie, akumulací cholesterolu a zároveň se zmnožením fibrózní tkáně a některých komponent krve.

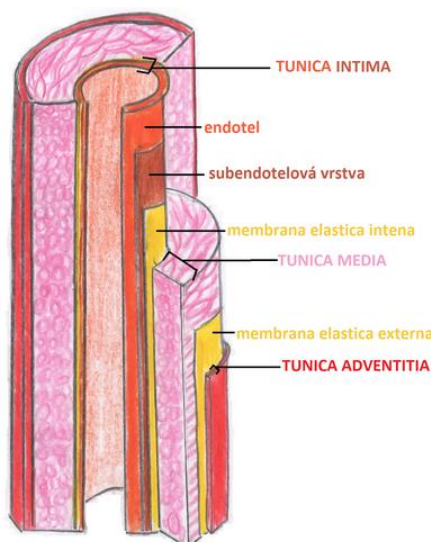
Během života působí na cévní stěnu řada biochemických a mechanických faktorů, které způsobují její funkční a strukturální narušení. Takové poruchy mohou časem vést ke vzniku aterosklerózy. (Mandovec, 2008).

Příčiny vzniku aterosklerózy nejsou zcela známy, víme pouze o rizikových faktorech, které se na její tvorbě významně podílejí. Tyto faktory poškozují hlavně endotel cévní stěny a účastní se na prvním vývojovém stádiu aterosklerózy, které se odborně nazývá endoteliální dysfunkce. Mezi tyto rizikové faktory patří zejména kouření, diabetes mellitus

(DM), dyslipoproteinemie, hypertenze, působení virů, bakterií, toxinů, cytostatik a dalších látek. (Soška, 2003).

### 1.1.1 Stavba cévní stěny

Každá céva sestává z vnitřní výstelky tvořené jednou vrstvou endoteliálních buněk. Tato část se spolu se subendoteliálním prostorem, jenž se nachází mezi endotelem a medií, nazývá intima. Za intimou následuje media složená z buněk hladké svaloviny a elastických vláken, která je z obou stran oddělena tuhou elastickou membránou. Povrch cévy chrání poslední vrstva tvořená vlákny kolagenu. Její úkol spočívá v zesílení cévní stěny a spojení tepny s okolím. (Hanzlová, Hemza, 2007; Soška, 2003).



**Obr. 1** Stavba cévy (Jirmanová, 2010)

Endoteliální buňky zastávají řadu významných úkolů důležitých pro normální funkci cévy. Mezi nejdůležitější patří např. udržení nesmáčivého a antitrombogenního povrchu, syntéza extracelulární matrix intimy, regulace permeability, remodelační a reparační procesy. Mimo to tyto buňky syntetizují a uvolňují oxid dusnatý, který je významný pro vazodilataci (rozšíření) cévy a ochranný účinek LDL (z angl. Low Density Lipoproteins) částic před jejich oxidací. Navíc působí oxid dusnatý jako inhibitor adheze i agregace trombocytů. (Soška, 2003). Porušení normální funkce endotelu při ICHS může způsobit zvýšenou propustnost některých molekul skrze bariéru mezi krví a okolními tkáněmi.

Jedná se zejména o transport LDL částic a aktivovaných monocytů. (Aschermann, Veselka, 2001; Piřha et al., 2001).

Pod vrstvou endoteliálních buněk se nachází pojivová tkáň, elastická vlákna, makrofágy a myointimální buňky, jež jsou podobné buňkám hladké svaloviny.

K dalším typům buněk vystýlajících intimu patří buňky hladké svaloviny, jejichž základními funkcemi jsou syntéza extracelulární matrix, schopnost proliferace a vychytávání lipoproteinů. (Sořka, 2003).

Přítomnost makrofágů ve zdravé intimě je velmi malá. Jejich počet vzrůstá při zesílení stěny či při progresi aterosklerózy. (Sořka, 2003). Zvýšené množství makrofágů bylo například zjiřtěno u pacientů s nestabilní anginou pectoris a IM. (Moreno, Bernardi, Lopez-Cuellar, 1996). Makrofágy se účastní na procesech jako jsou remodelace intimy, reakce na záněty a zprostředkování imunitní odpovědi. (Sořka, 2003).

Nejvíce zastoupeným prostorem v intimě je extracelulární matrix, která zaujímá přibližně 60% jejího objemu. Funkce této mezibuněčné hmoty spočívá především ve smyslu strukturálním, rovněž však zajiřřuje také permeabilitu cévní stěny a regulaci buněčné proliferace. Obsahuje kolagen, fibrin, adhezivní i antiadhezivní molekuly a proteoglykany, jejichž koncentrace narůstá s věkem a stoupá s rozvojem aterosklerózy. (Aschermann, Veselka, 2001; Sořka, 2003).

### **1.1.2 Patogeneze aterosklerózy**

Procesy vzniku aterosklerózy popisuje několik teorií. Předně se jedná o teorii lipidovou a teorii endoteliální dysfunkce. Obě byly později spojeny do jedné teorie, která se označuje jako sjednocená teorie aterosklerózy. Za zmínku stojí rovněž méně významná infekční teorie aterosklerózy.

Lipidová teorie spojuje vznik aterosklerózy s kumulací látek tukového charakteru, zejména LDL, IDL (z angl. Intermedial Density Lipoproteins) a VLDL (z angl. Very Low Density Lipoproteins) v endoteliálním prostoru cévní stěny. Nadměrné množství lipidů je vychytáváno prostřednictvím makrofágů a buněk hladké svaloviny v endotelu, kde následně počíná kaskádu aterosklerotického procesu. (Sořka, 2003).

Teorie endoteliálního poškození neboli Rossova teorie říká, že za prvotní příčinou rozvoje aterosklerózy může být léze (poškození) endotelu v místě cévní stěny. V narušené oblasti totiž dochází k akumulaci trombocytů, které produkují řadu působků stimulujících množení buněk hladké svaloviny a syntézu extracelulární matrix a které přispívají k aktivaci zánětlivých a proliferačních pochodů stimulujících proces aterosklerózy (Soška, 2003). Za takových podmínek pak endotel reaguje na poškození zvýšenou vazokonstrikcí a propustností výstelky. (Hansson , Libby, Schonbeck, 2002). Akumulace lipidových složek v místě poškození cévní stěny je v této teorii brána jako druhotný jev.

Dosti často se v poslední době mluví o infekční teorii aterosklerózy. Tato teorie zastává názor, že se na poruše endotelu a zánětlivých reakcích mohou zřejmě podílet bakterie a viry. Nejčastějšími agens jsou považovány například *Chlamydia pneumoniae* (Liuba, Karnani, Pesonen, 2000), *Helicobacter pylori*, cytomegalovirus (Aschermann, Veselka, 2001) a jiné herpetické viry. Nelze však zcela jasně konstatovat, že za příčinu procesu aterosklerózy zodpovídají právě tyto činitelé. Infekce může být zřejmě jen spouštěcím faktorem. (Soška, 2003).

Všechny zmíněné teorie vypovídající o vzniku aterosklerózy se vzájemně prolínají, mají mnoho společného. Úlohu v patogenezi aterosklerózy zastávají také fyzikální faktory, jakými jsou například tlakové a hemodynamické vlivy, změny srdeční frekvence, změny v proudění krve a jiné. Ateroskleróza se neprojevuje ve všech artériích, většinou se jedná o lokální postižení nejčastěji v místě rozvětvení cévy. (Aschermann, Veselka, 2001; Soška, 2003).

### **1.1.3 Aterosklerotický plát**

Aterosklerotický plát se skládá z cholesterolového jádra, které je od cirkulující krve odděleno fibrózním krytem. Čím více nabývá tato lipidová oblast na objemu a čím více obsahuje esterů cholesterolu, které jádro změkčují, tím více je fibrózní kryt slabší a náchylnější ke vzniku ruptury (trhliny) plátu. Jediné buňky schopné produkce extracelulární matrix a tedy tvorby fibrózního krytu jsou buňky hladké svaloviny. Jestliže je produkce kolagenu těchto buněk příliš malá, fibrózní kryt slábne a může dojít k jeho ruptuře. (Soška, 2003).



Existují dva druhy aterosklerotického plátu – stabilní a nestabilní. První typ obsahuje více buněk hladké svaloviny a kolagenu ve fibrózní čepičce, která je silná a s tuhým povrchem, proto je riziko ruptury malé. Stabilní pláty se vyznačují malým lipidovým jádrem a menším množstvím zánětlivých buněk. Bývají starší a po řadu let stálé. (Soška, 2003).

Druhý typ aterosklerotického plátu je na rozdíl od stabilního charakterizován jako měkký s velkým cholesterolovým jádrem složeným z esterů cholesterolu, tvořících více než 40 % objemu plátu, T-lymfocytů a pěnových buněk. Fibrózní kryt je tenký, obsahuje malé množství kolagenu a buněk hladké svaloviny. Výskyt nestabilního neboli vulnerabilního plátu není tak častý, avšak většinou stojí za akutními koronárními příznaky. Pláty bývají hemodynamicky nevýznamné, nezjistitelné při angiografickém vyšetření, a na rozdíl od stabilních mladé. (Aschermann, Veselka, 2001; Soška, 2003).

#### **1.1.4 Vývoj aterosklerózy**

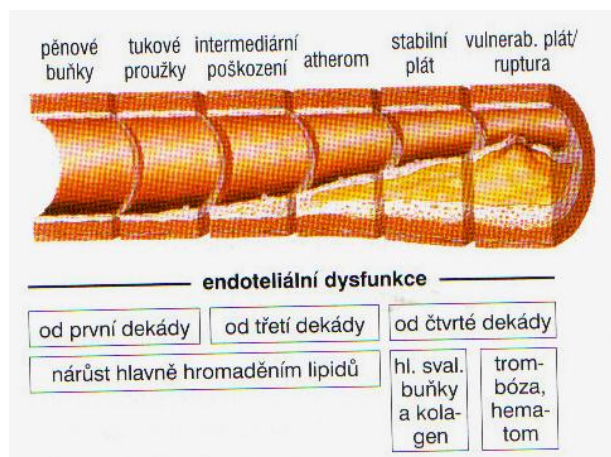
Progrese aterosklerózy probíhá v několika vývojových fázích a různých typech poškození.

Počáteční úlohu v rozvoji aterosklerózy zauímají makrofágy, které se prostřednictvím působení cytokinů přetvářejí z monocytů. Mimo již zmíněných funkcí produkují ještě enzymy oslabující sílu fibrózního krytu a tromboplastin podílející se na aktivaci koagulační kaskády. Základní úkol makrofágů spočívá v pohlcování nadměrného množství oxidované formy LDL. Lipidy se však v makrofázích neustále hromadí a zodpovídají za jejich přeměnu v pěnové buňky, které jsou podkladem pro vznik aterosklerotického ložiska. (Aschermann, Veselka, 2001).

Přítomnost makrofágů s kapičkami lipidů bývá zaznamenávána již v dětském věku, avšak nárůst poškození v tomto období bývá pomalá. (Soška, 2003).

Během života se pěnové buňky vrství a vytvářejí tukové proužky, které nabývají také na obsahu buněk hladké svaloviny s lipidy, extracelulární matrix, fibril a především dochází ke zvyšování hladiny tuků. V popisované fázi pláty sice ještě nepřispívají k velké stenóze cévy, roste však riziko vzniku ruptury. (Aschermann, Veselka, 2001; Soška, 2003).

Vývoj aterosklerózy pokračuje tak, že lipidy akumulující se pod proužky makrofágů a pěnových buněk rozdělují strukturu hladké svaloviny v intimě. (Soška, 2003).



**Obr. 2** Aterogeneze (Soška, 2003)

Pro následující stádium aterosklerózy je charakteristická tvorba ateromu (tukové usazeniny). Během tohoto stupně rozvoje aterosklerózy vzniká v důsledku rozpadu pěnových buněk lipidové jádro, k němuž dochází díky hustému seskupení extracelulárních lipidů. Toto jádro je složeno z krystalků cholesterolu a kalcia, která způsobují tvrdnutí plátů a snížení pružnosti stěny cévní. S velikostí cholesterolového jádra slábne fibrózní kryt, čímž s větší pravděpodobností může dojít k ruptuře cévy. Zmiňovaná léze se často objevuje u lidí kolem třiceti let. Popisované stádium se významně nepodílí na průtoku krve a je klinicky němé, což bylo u zdánlivě zdravých lidí v 9% prokázáno. Určitými symptomy se může projevat až v případě fisury (trhliny) či trombózy. (Soška, 2003).

Nejvyšší stupeň aterosklerózy představuje přetržení povrchu cévní stěny, vznik hematoma, krvácení nebo trombózy. V případě, že dojde k akutní ruptuře plátu, změní se jeho geometrie, započne vazokonstrikce a nástěnná trombóza. Tímto se zvyšuje stenóza projevující se jako nestabilní angina pectoris. Jestliže je ruptura doprovázena vznikem nástěnného či uzavíratelného trombu, který uzavře koronární tepnu, projeví se tyto děje jako symptomy infarktu myokardu, nestabilní anginy pectoris či náhlé smrti. (Aschermann, Veselka, 2001).

## 1.2 KLINICKÉ FORMY ICHS

Špinar (2003) rozděluje ICHS na formy bolestivé a nebolestivé.

### • Nebolestivé formy ICHS

#### Němá ischemie

Tento typ nebolestivé formy ICHS je charakteristický tím, že postižení nezaznamenávají bolest, onemocnění se projevuje pouze elektrokardiografickými změnami nebo při zátěžové elektrokardiografii. Je prokázáno, že 20 % IM a 60–80 % přechodných ischemií bývá provázeno právě nebolestivou formou němé ischemie. (Hradec, Býma, 2007; Špác, 2003).

Patogeneze spočívá v krátkých nedokrveních myokardu, kdy se proces ischemie zastavuje před projevem bolesti, jenž je poslední fází ischemické kaskády. Zároveň se během rozvoje onemocnění tvoří pouze malé množství mediátoru adenosinu, které nestačí podráždit nervové receptory. (Špác, 2003).

Němá ischemie bývá častá u diabetiků, hypertoniků, u žen a jedinců s prodělaným infarktem myokardu. (Špác, 2003).

#### Srdeční selhání

Srdeční selhání nastává v okamžiku, kdy dochází ke klesání minutového výdeje i přes to, že se uskutečňuje dostatečné plnění komor. V takovém případě srdce nestačí pokrýt potřebnou zásobu orgánů kyslíkem. Tento moment je zároveň doplněn o aktivaci neurohumorálních působků a apoptózu. Onemocnění se klinicky manifestuje celou řadou symptomů jako například otoky plic, tachykardií, dušností, kašlem, pocením aj. Nejčastější příčinou srdečního selhání bývá hypertenze, chlopenní vady a v 50–70 % ICHS. (Špinar, Vítovec, 2003).

#### Arytmie

Arytmie mohou být jediným projevem ICHS. (Danzig, 2006b). Za velmi nebezpečnou je považována tzv. maligní arytmie neboli komorová arytmie, která může vést k náhlé srdeční smrti, ke které dochází až v 80–90 %. (Semrád, 2003; Semrád, Kozák, 2003).

### Náhlá smrt (může ji předcházet bolest)

V současné době představuje náhlá smrt stále vážný problém. Dle evropských statistických dat na ni denně umírá asi 2500 osob. Je důsledkem srdečních poruch, které vedou do zhruba jedné hodiny od projevu k bezvědomí. Nejvíce se na příčinách vedoucích k náhlé smrti podílejí maligní arytmie a bradykardie. (Křivan, 2006). Smrt v těchto případech nastává nečekaně. (Semrád, 2003).

### • **Bolestivé formy ICHS**

#### Angina pectoris

AP se klinicky projevuje jako neostře ohraničená, tupá či palčivá bolest za hrudní kostí, doprovázená dušností, úzkostí, slabostí a nevolností. Jedná se o svíravý pocit, tlaku a tíhy. Bolest má tendenci vystřelovat do levé horní končetiny a dolní čelisti. (Aschermann, Veselka, 2001). Je vyvolána mediátorem adenosinem, jenž působí na nervová zakončení sympatiku v myokardu. Popsané symptomy bývají zaznamenávány při zátěži, hypertenzi, psychické námaze, emočním stresu, chladu, méně často se objevují i po jídle. Doba bolesti odpovídá několika minutám, při odpočinku dochází k jejímu rychlému ústupu. (Hradec, Býma, 2007; Špác, 2003).

Výskyt AP stoupá s věkem, u žen se běžněji objevuje ve věku nad 50 let. Prevalence (poměr počtu nemocných k počtu obyvatel) onemocnění se pohybuje okolo 1,1–2,6 % nemocných ve věku 30–59 let. (Špác, 2003).

Existují dvě formy anginy pectoris a ty se ještě dále dělí dle mnoha kritérií. Obecnou vlastností stabilní anginy pectoris je stabilita, neměnnost a trvalost při určité námaze. Typická bolest ustoupí až při ukončení fyzické zátěže či aplikaci vhodných farmak. (Veselka, 2009).

Nestabilní angina pectoris je charakterizována naopak jako nově vzniklá či zhoršená již stávající angina pectoris v posledních 30 dnech. Bolest se v tomto případě projevuje během klidu či při mírné zátěži. U některých jedinců se však typická bolest nemusí vůbec vyskytovat. Doba trvání příznaků při nestabilní angině pectoris se udává kolem 15 – 30 minut, pokud je doba trvání potíží delší, označuje se tento stav spíše jako infarkt myokardu. (Aschermann, Veselka, 2001; Hradec, Býma, 2007).

## Infarkt myokardu

Zcela typické a odlišitelné od ostatních forem ICHS je pro IM nedokrvění srdečního svalu s následkem odumření (nekrózou) některých srdečních buněk. V místě působení nekrózy se vytvoří jizva. S každou takovou jizvou se oslabuje funkce srdečního svalu. (Veselka, 2009). Odumírání buněk začíná zhruba za 20 minut po uzávěru tepny. Při zavedení opětovného transportu kyslíku se do této doby může ještě uskutečnit reparace postižených buněk. (Špaček, 2003b).

Z 95 % je IM způsoben aterosklerózou s rupturou intimy a trombózou lokalizovanou v místě lipidového plátu. (Hlinomaz, 2003; Špaček, 2003a).

Příznaky infarktu myokardu souvisí s bolestí již popsanou u anginy pectoris, která může přetrvávat desítky minut až několik hodin. Dále pacienta trápí dušnost, pocení, slabost až ztráta vědomí. Obvykle v tomto případě nezabírají analgetika ani aplikace nitroglycerinu. Vyskytují se však případy, u kterých jedinec nemusí dané symptomy vůbec zaznamenat. (Veselka, 2009). Právě infarkt myokardu a možné faktory jeho genetické podmíněnosti byly hlavním předmětem studia této diplomové práce.

### **1.3 RIZIKOVÉ FAKTORY ICHS**

K nejzávažnějším zevním rizikovým faktorům podílejícím se na rozvoji aterosklerózy, a tedy ICHS, náleží zejména kouření, hypertenze, DM, obezita a s tím spojená vysoká koncentrace lipidů a fyzická inaktivita, věk, pohlaví, alkohol a stresové faktory. Na výskytu ICHS jako komplexního onemocnění se však také významnou měrou podílí genetická predispozice.

Řada zmíněných faktorů je vůlí ovlivnitelná, proto mohou ohrožení jedinci svým vlastním přičiněním (zejména změnou životosprávy a životního stylu) podstatně omezit riziko vzniku a především závažné manifestace ICHS.

#### Kouření

Kouření je celosvětově spojováno s řadou nemocí, úmrtími a taktéž se stává stále více sociálním a ekonomickým problémem. V roce 2008 Evropské výběrové šetření o zdravotním stavu v ČR provedlo sledování na vzorku 1955 dotazovaných účastníků ve věku 15 a více let, které kromě jiných údajů hodnotilo aktuální stav týkající se kouření

a vystavení tabákovému kouři. V české populaci bylo mezi muži zjištěno celkem 30 % denních kuřáků z toho 13 % šlo považovat za kuřáky silné. U žen byly tyto hodnoty nižší, celkem se jednalo o 19 % denních kuřáček a z toho bylo 4,3 % žen, jež vykouřily více jak 20 cigaret za den. Příležitostných kuřáků se mezi muži vyskytovalo 7,6 % a mezi ženami 8,2 %. 19,7 % mužů a 13,5 % žen v dotaznících uvedlo, že se považují za bývalé denní kuřáky. Skupina dotazovaných, která nikdy nekouřila, byla složena ze 42,7 % mužů a 59 % žen. (EHIS ČR, 2011).

Velikost rizika kouření závisí na množství spotřebovaného tabáku, době užívání a druhu tabákového výrobku. (Šimon, 2001b). Nejhorší vliv na organismus mají složky jako jsou nikotin, oxid uhelnatý a polyaromatické uhlovodíky. (Špaček, 2001). Mimo jiné cigaretový kouř obsahuje volné radikály podílející se na inaktivaci oxidu dusnatého, jehož protektivní účinky byly zmíněny již výše. (Soška, 2003). Nejvíce ovlivňuje osoby začínající s tímto návykem před 15. rokem života. (Šimon, 2001b).

Z kardiovaskulárního hlediska kouření toxicky ovlivňuje především endotel cévy způsobující její vazodilataci. Špaček (2001) ve svém článku uvádí, že studie ARIC (z angl. Atherosclerosis Risk in Communities) v období tří let sledovala 10 914 pacientů, kterým se měřila tloušťka intimy a medie. Studie zjistila silnou souvislost mezi rozvojem aterosklerózy a kouřením a to včetně pasivního kouření. Čím více jedinec vykouřil cigaret, tím více byly zaznamenávány projevy aterosklerózy. Další studie CCAIT (z angl. Canadian Coronary Atherosclerosis Intervention Trial Substudy) uvádí, že kuřáci podléhají rychlejšímu postupu změnám aterosklerózy a dochází u nich k častějšímu vzniku nových plátů, než je tomu u nekuřáků. Nejsignifikantnější nárůst se projevoval u diabetiků a hypertoniků. U chronických kuřáků dochází ke zvýšení krevního tlaku a zrychlení tepové frekvence, vyšší klidové spotřebě kyslíku a zvýšení srdeční práce. Bylo zjištěno, že kuřáci mívají také zpomalenou fibrinolýzu, kdy je podporována agregace destiček a tvorba trombů, a snížené množství HDL cholesterolu. (Šimon, 2001b).

Kouření prokazatelně zvyšuje riziko vzniku aneurysmatu aorty, ischemické choroby dolních končetin (ICHDK), nestabilní AP, cévní mozkové příhody (CMP), akutního infarktu myokardu, mozkové mrtvice a náhlé smrti. (Jokl, 2005). Riziko k ICHS bývá vyšší u jedinců trpících hypercholesterolemií, DM a hypertenzí. (Šimon, 2001b).

Jokl (2005) uvádí, že osoby aktivně kouřící si v 50 % přispívají k rozvoji aterosklerózy. Špaček (2001) zmiňuje, že při kouření 20 cigaret za den riziko výskytu infarktu myokardu ve srovnání s nekuřáky bývá u žen 6krát a u mužů 3x vyšší. Dále uvádí, že při ukončení kouření se po roce snižuje riziko vzniku IM na 50 % a po dvou letech se bývalý kuřák dostává na úroveň nekuřáka.

Kouření u žen představuje větší riziko než je tomu u mužů, jelikož kouření znemožňuje estrogenům vykonávat svou ochranu kardiovaskulárního systému. (Šimon, 2001b). Vzestup kardiovaskulárních problémů u žen dokazuje The Nurses Health Study v USA, jež monitorovala 121 700 žen během asi 20 let. Riziko celkové mortality u žen se dostalo na úroveň nekuřáček až po 10-14 letech. Ženy současně kouřící a užívající antikoncepci, která navíc zvyšuje srážlivost krve a krevní tlak (TK), by měly tuto kombinaci zcela vyloučit, jelikož zvyšuje riziko IM a cévní mozkové příhody. (Mandovec, 2008).

Riziko ICHS vyplývající z kouření se však může týkat i nekuřáků. U pasivních kuřáků je nárůst výskytu aterosklerózy až 20 % (Jokl, 2005) a riziko vzniku ICHS se zvyšuje v průměru o 23 %. (Špaček, 2001).

### Hypertenze

Hypertenze patří spolu s kouřením k nejčastějším rizikovým činitelům KVO. Vysoký TK přispívá ke dvojnásobnému riziku oběhových chorob a významně se podílí na zrychlení rozvoje aterosklerózy. (Cifková, 2011).

Prevalence hypertoniců ve věkovém rozmezí 25-64 let v roce 2000 až 2001 z náhodně vybraného vzorku populace v ČR činila okolo 35 %. (Widimský et al., 2008). U mužů se vysoký TK vyskytuje celkově více, avšak v absolutních počtech trpí hypertenzí ženy více než muži. Po 70. roce života žen je hypertenze přítomna v 80-90 %. (Mandovec, 2008). Zřetelněji se nárůst TK projevuje u starší populace a se zvýšeným příjmem kuchyňské soli. (Rosolová, 2001b).

Vysoký krevní tlak je úzce spojen s projevem ICHS, uvádí se, že je přítomen u 40 – 60 % nemocných trpících touto chorobou. Hypertonicí mívají vyšší sklony k infarktu myokardu, a taktéž se u nich vyskytuje vysoké riziko náhlé smrti. (Souček, 2003).

Hypertenze bývá, stejně jako kouření, spojována s mechanických poškozením endotelu. Při vysokém TK dochází k napětí cévní stěny, což vede ke strukturálním změnám – zúžení

cév, tloušťky medií (Špác, 2003) a produkci superoxidového radikálu, jenž inaktivuje oxid dusný. (Soška, 2003).

Muži středního věku mající TK nad 160/95 mm Hg jsou ohroženi 5x vyšším rizikem aterosklerózy než je tomu u osob s normálními hodnotami TK. (Soška, 2003).

### Diabetes mellitus

Incidence a prevalence diabetes mellitus se na celém světě neustále zvyšuje. Ročenka ÚZIS z roku 2009 uvádí, že téhož roku bylo v lékařské péči více jak 783 000 diabetiků - z toho 364 tisíc mužů a 419 tisíc žen. Většina pacientů trpěla diabetem II. typu, což představovalo 91,6 % z uvedených nemocných. V průběhu stejného roku byla nově nalezena cukrovka u 61 000 mužů a žen. V přepočtu má podíl nově zjištěných případů v ČR na tisíc obyvatel o 9 % větší hodnoty, než tomu bylo předešlého roku.

Diabetes přispívá k rozvoji ICHS oslabením pružnosti cévní stěny, modifikací lipidových a koagulačních faktorů (Špác, 2003) a zvýšením rizika trombózy. (Aschermann, Veselka, 2001).

U diabetiků je charakteristická zvýšená glykace proteinů a zvýšená koncentrace LDL, které se snadněji přetvářejí na oxidativní formu. U hyperglykemie se setkáváme se sníženou syntézou oxidu dusnatého a naopak se zvýšením produkce vazokonstrikčních prostaglandinů, jež narušují endotel. Kromě zmíněných prostaglandinů se na lézi cévní stěny podílí také glykovaný albumin. (Soška, 2003).

Špác (2003) ve své knize zmiňuje, že asi 55 % diabetiků doprovází ICHS. Nebezpečí rozvoje ICHS a vzniku IM u diabetické populace je 2-4x vyšší než u nediabetické, kdy u mužů bývá dvojnásobně a u žen čtyřnásobně vyšší riziko. Diabetik postižený ICHS má stejnou pravděpodobnost prodělání IM jako nediabetik, u kterého byl IM již zaznamenán. (Špaček, 2003b).

### Obezita

Obezita se stává stále závažnějším společenským a zdravotním problémem. Ze statistických údajů na celém světě trpí obezitou nebo nadváhou více jak polovina lidí. Také v ČR s nadváhou a obezitou bojuje každý druhý člověk, což představuje asi 5 milionů lidí. (Mandovec, 2008).



Bylo zjištěno, že osoby disponující indexem tělesné hmotnosti (BMI, z angl. Body Mass Index ) v rozsahu 25 -29 bývají náchylnější k rozvoji aterosklerózy 1,8x více než lidé neobézní. Při BMI nad 29 se riziko zvyšuje až 3,3x. (Špaček, 2003b).

Danzig (2006a) uvádí, že u obézních lidí dochází častěji ke vzniku a rozvoji srdečního selhání.

Obezita je rizikovým faktorem týkající se nejen ICHS, ale také DM 2. typu, hypertenze, vysoké hladiny cholesterolu, onemocnění žlučníku, artritid a primární artrózy.

Primární příčinou vzniku obezity je nepoměr mezi energetickým příjmem a výdejem. (Danzig, 2006b). S obezitou také souvisí nízká či žádná fyzická aktivita, vysoký příjem lipidů v potravě a svou roli zastupují také genetické vlivy. (Danzig et al., 2006c).

### Lipidy

Největší význam ve vztahu k ICHS mají z lipidů cholesterol a triglyceridy. Jejich hladina stoupá s příjmem nasycených tuků v potravě. K nadměrnému příjmu těchto látek přispívá převažující složení stravy v českém prostředí - nadbytek živočišných tuků a nedostatek ovoce a zeleniny. Protektivní účinek rostlinné stravy tkví v obsahu kyseliny alfa linolenové a olejové, které před rozvojem ICHS chrání. Vlákna obsažená v ovoci a zelenině zase snižuje cholesterol a zlepšuje glukózovou toleranci. Ochranný účinek na kardiovaskulární systém mají také antioxidanty. (Šimon, 2001a).

Na rozvoji aterogeneze se nejvíce účastní LDL a částečně také IDL částice. Jak již bylo popisováno dříve, přispívají k endoteliální dysfunkci a tvorbě aterosklerotického plátu. Naopak antitrombogenní efekt má HDL. S každým jeho snížením se zvyšuje riziko ICHS. Jestliže dojde ke snížení tohoto typu cholesterolu o 0,1 mmol/l, riziko ICHS stoupá o 10 %. Naopak, jestliže dojde k 1% zvýšení celkového cholesterolu v krvi, znamená to zvýšení rizika ICHS o 2 %. Metaanalýza Hokansonova a Austinové pocházející z přelomu nového století udává, že 1 mmol/l triglyceridů zvyšuje riziko ICHS u mužů o 32 % a u žen dokonce o 76 %. (Vaverková, 2001).

### Fyzická inaktivita

Jelikož se v rozvinutých zemích čím dál tím více do popředí dostává sedavý způsob života, který je navíc doprovázen nadbytečně vysokým příjmem potravy, stává se nedostatečný výdej fyzické energie problémem až u 70 % populace vyspělého světa. Uvádí se, že každé

desáté předčasné úmrtí bývá spojováno s nedostatkem fyzické činnosti. (Danzig et al 2006c).

Výskyt ICHS je například 2x pravděpodobnější u mužů bez fyzické aktivity ve srovnání s těmi, kteří se pravidelné fyzické aktivitě dostatečně věnují. (Soška, 2003).

Chaloupka (2003) uvádí u mužů s energetickým výdejem nad 2000 kcal týdně snížení rizika kardiovaskulárního úmrtí o 24 %.

Pravidelné a uvážené cvičení podporuje srdeční kapacitu, snižuje riziko vzniku náhlé smrti, hypertenze, zvyšuje hladinu HDL, příznivě působí na fibrinolytický systém a zlepšuje funkci endotelu. Nadměrná zátěž však na druhé straně může způsobit náhlou smrt či infarkt myokardu. (Chaloupka, 2001, 2003).

Pravidelné a uvážené cvičení podporuje srdeční kapacitu, snižuje riziko vzniku náhlé smrti, hypertenze, při zvyšování zátěže stoupá hladina HDL, příznivě působí na fibrinolytický systém, zlepšuje funkci endotelu. Na druhou stranu všeho s mírou, protože přílišné zátěžové námahy mohou způsobit náhlou smrt či infarkt myokardu. (Chaloupka, 2001, 2003).

### Věk

Se stoupajícím věkem výskyt ICHS vzrůstá. Hrubá věková hranice, od které prevalence ICHS výrazně narůstá, činí u mužů přibližně 45 let a u žen 55 let. (Špác, 2003). V souladu s tím se evropské státy častěji potýkají s KVO úmrtím ve věkovém rozmezí do 65 let u mužů. U žen mladšího věku bývá organismus před KVO chráněn prostřednictvím estrogenů. (Mandovec, 2008).

### Pohlaví

Manifestace a prognóza ICHS mezi muži a ženami je srovnatelná, i když existují menší rozdíly. Ženy jsou náchylnější k vyššímu výskytu anginy pectoris, u mužů bývá naopak ve vyšší míře diagnostikován infarkt myokardu. (Berecki-Gisolf et al., 2009).

Ženy s ICHS se obecně primárně rozpoznávají obtížněji než muži, protože zaznamenávají častěji bolest na hrudníku, avšak s nižší prevalencí výskytu ICHS. Méně se u nich vyskytuje DM, hypertenze, kouření; jsou také nositelkami nižší koncentrace LDL a naopak vyšší koncentrace HDL. (Špác, 2003). Do počátku období menopauzy jsou chráněny proti ateroskleróze prostřednictvím estrogenů. Po úbytku těchto hormonů se

ženám zvyšuje krevní tlak, přibývají na váze a dochází ke změnám lipidového složení v abdominální oblasti těla. Tímto jsou více vystaveny riziku infarktu myokardu, srdečnímu selhání či mozkové příhodě. V řadě zemí je podíl úmrtnosti na kardiovaskulární onemocnění celkově vyšší u žen, než je tomu u mužů. V roce 2007 podlelo 55 % žen na nemoci oběhové soustavy na rozdíl od mužů, kde se číslo pohybovalo kolem 43 %. (Mandovec, 2008).

Aterosklerotické pláty žen mají podobu více buněčnou a fibrózní, vyskytuje se u nich vyšší trombogenní potenciál. Dále u nich dochází k častější erozi plátu, u mužů naopak vzniká ruptura. Rozdíly mezi pohlavími existují i v úrovni apoptózy a nekrózy myocytů při stárnutí. (Janota, 2006).

### Alkohol

Kromě toho, že vysoká a dlouhodobá konzumace alkoholu způsobuje karcinomy orgánů a cirhózu jater, negativně ovlivňuje oběhový, nervový a rozmnožovací systém, přispívá taktéž k projevům diabetu, hypertenze a arytmiím, poškození srdce aj. Tyto důsledky mohou vyústit až k srdeční zástavě nebo náhlé smrti. V mnoha studiích se však při konzumaci malého množství alkoholu prokazuje v rámci ICHS také protektivní účinek. Z řady studií vyplývá, že pravidelná konzumace malého množství alkoholu zvyšuje hladinu HDL a naopak snižuje množství fibrinogenu a agregaci trombocytů, což snižuje srážlivost krve. (Jokl, 2005; Šamánek, Urbanová, 2009; Šimon, 2001c). Mužům tak bývá doporučováno pravidelné požívání alkoholu do 30g a ženám v rozmezí 15 – 20g. (Zajíček, 2004).

### Psychosociální faktory

Dlouhodobý emoční stres navozuje produkci katecholaminů, jež mají protrombotický charakter. (Aschermann, Veselka, 2001).

Na konci 20. a začátku 30. let minulého století byla v Americe uskutečněna Malbergova studie, jejímž úkolem bylo sledovat mortalitu spojenou s depresivními stavy pacientů. Zjistilo se, že 40 % úmrtí bylo způsobeno KVO. U lidí, kteří trpěli depresivními stavy, byla mortalita spojená s KVO 8x častější než u skupiny jedinců bez psychického onemocnění (Pidrman, 2007).

Jiným příkladem ukazujícím na účast psychosociálních faktorů v patogenezi ICHS byla studie Systolic Hypertension in Elderly Program. Po zhodnocení dotazníků byla pětiletá

incidence depresivních stavů častější u žen než u osob opačného pohlaví. Depresivní stavy byly asociovány se zvýšeným výskytem úmrtí na IM a mozkové mrtvice zejména u žen v postklimakterickém období. (Šimon, 2001d).

### Genetické faktory

Již dlouho je známo, že výskyt časných klinických projevů aterosklerózy (např. infarktu myokardu) v blízké rodině významně zvyšuje individuální riziko obdobného postižení a souvisí s genetickou výbavou jedince. ICHS je považována za komplexní onemocnění s významnou genetickou složkou (Hamsten 2008, Kubistova 2009, Poledne, 2001). Z výsledků epidemiologických studií je zřejmé, že genetická komponenta ICHS a IM má převážně polygenní charakter; ve vzácnějších případech však může být podmíněna defektem jediného genu (např. kritické familiární defekty lipidového metabolismu). Příbuzní pacientů s časnou ICHS nebo trpících dědičnou hypercholesterolemií či dyslipidemií bývají proto sledováni právě kvůli riziku vzniku srdečních onemocnění. Vyšetření bývá u rodinných členů, kde se ICHS vyskytuje, prováděno také z důvodu možnosti kumulace rizikových faktorů. (Mandovec,2008).

V posledním desetiletí zaznamenáváme enormní snahu o identifikaci konkrétních genových variant, které k rozvoji ICHS přispívají (genové varianty susceptibility), nebo ovlivňují charakter její klinické manifestace (modifikující genové varianty). Tyto studie využívají 1) přístup kandidátních genů („hypothesis driven“), kdy jsou ve vztahu k nemoci vyšetřovány varianty genů s prokázaným vztahem k její patogenezi, 2) systematický přístup („hypothesis free“), kdy jsou rizikové varianty identifikovány na základě vyšetření obrovského množství polymorfismů v rozsahu celého genomu (Ouweland, 2009). Celogenomový přístup (GWAS, z angl. Genome Wide Association Study), který se v souvislosti k ICHS poprvé objevuje v roce 2007 (WTCCC, 2007), zásadním způsobem rozšířil úroveň poznání podstaty genetické vnímavosti k ICHS a umožnil identifikaci řady nových významných rizikových variant (Musunuru, 2010). Jelikož existují značné etnické a rasové rozdíly v polymorfismech genů spojených s ICHS a IM, je důležité vytvořit pro tyto polymorfismy databázi v každé rasové a etnické skupině. (Yamada et al., 2002).

Předpokládá se, že se na dědičné složce ICHS mohou podílet „nepřímou“ také genové varianty ovlivňující její další rizikové faktory. Např. u obezity bylo popsáno několik desítek kandidátních genů, které se vyskytují na všech chromozomech kromě chromozomu Y. (Danzig et al, 2006c). Genetické predispozice mají taktéž onemocnění DM obou typů

(Šimková, 2006b) a hypercholesterolemie (Poledne, 2001). Podle novějších studií se odhaduje, že na koncentraci lipidů se přibližně v 50 % podílí genetické faktory; vznik hyperlipidemie může být podmíněn kombinací vlivu přinejmenším 25 – 30 kandidátních genů. (Hubáček, 2006).

Cílem úsilí nalézt geny, které souvisejí s rizikem vzniku ICHS a IM, což je také primární cíl této diplomové práce, je zejména přesnější pochopení molekulárních mechanismů vzniku a rozvoje tohoto onemocnění. Identifikace genů asociovaných s ICHS může v důsledku přispět k prevenci, časně diagnóze či nalezení nových způsobů léčby ICHS a IM. Vyšetření relevantních genetických faktorů by v budoucnu mohlo pomoci při odhadu prognózy ICHS a individualizace nastavení léčby. Specifické přístupy k léčbě u konkrétních pacientů na základě znalosti genetické podmíněnosti účinků léčiv mohou rovněž omezit jejich toxické účinky (Yamada, Ichihara, Nishida, 2008).

## 2. POLYMORFISMUS GENU BDNF

Úroveň znalostí o lidském genomu i jeho polymorfismu zásadním způsobem rozšířily projekty HUGO (z angl. Human Genom Project), jenž byl dokončen v roce 2003, a o dva roky později International HapMap Project. Tyto projekty spolu s navazujícím výzkumem položily základ pro rychle se rozšiřující databáze genových polymorfismů a taktéž přispěly ke zrychlení vývoje technologických platforem pro studium genové variability jako takové. Získané poznatky jsou široce využívány při studiu genetiky/genomiky chorob, např. v podobě tzv. genetických asociačních studií. S využitím klasických i nových genotypizačních metod tak můžeme získat významné informace týkající se distribuce jednonukleotidových (i dalších) polymorfismů (SNP, z angl. single nucleotide polymorphism) a jejich možné interakce se specifickým onemocněním.

Gen, jehož polymorfismus je ve vztahu k onemocnění na základě znalostí patogenetických mechanismů studován, označujeme jako kandidátní. Pokud je v primární genetické asociační studii zjištěna souvislost mezi kandidátním genem (polymorfismem) a nemocí, je zpravidla třeba ji dále nezávisle ověřit. U genových variant s prokázaným vztahem k chorobě pak dále probíhají studie zaměřené na identifikaci konkrétních mechanismů, které zjištěnou asociaci podmiňují. Cílem těchto snah je identifikace co nejkompletnějšího souboru genových variant, které podmiňují dědičnou složku konkrétní nemoci. Znalost těchto genů a polymorfismů může následně pomoci např. při identifikaci nových molekulárních cílů pro léčbu, při vyšetřování jednotlivců se zvýšeným rizikem vzniku daného onemocnění nebo jako prediktivní (prognostické) „markery“ v diagnostice (Souček, 2009).

Pro účely této diplomové práce byl ve vztahu ke genetické složce ICHS a IM vybrán jako kandidátní gen pro molekulu Brain Derived Neurotrophic Factor, který je polymorfní a jeden z jeho funkčních (strukturních) polymorfismů byl již v posledních letech studován ve vztahu k řadě onemocnění.

## 2.1 GENOVÝ (DNA) POLYMORFISMUS

Genový polymorfismus lze chápat jako variabilitu v dané sekvenci genového lokusu, při které frekvence záměn (alternativních alel) dosahuje alespoň 1 %. (Petrella, Mattay, Doraiswamy; 2008). V situaci, kdy je frekvence těchto variant nižší než 1 %, již nelze hovořit o polymorfismu, nýbrž o mutacích. (Hubáček, 2006).

Nejběžnější změnu (variabilitu) v lidském genomu představuje jednonukleotidový polymorfismus. (Souček, 2009). V lidském genomu se SNP objevují velice hojně, jejich počet v celosvětové populaci dosahuje několika milionů. V průměru se jeden SNP vyskytuje asi na každých 2000 párů bází. (Petrella, Mattay, Doraiswamy; 2008). Obecně platí, že jejich přítomnost je mnohem menší v kódujících oblastech genomu než v nekódujících. (Kim, Misra, 2007; Macek; 2007;Průša,). SNP jsou také využívány jako genetické markery, jež plní důležitou úlohu v řadě studií, které umožňují spojovat fenotypové změny s variabilitou sekvence DNA. (deoxyribonukleová kyselina) (Kim, Misra; 2007).

Existuje celá řada mechanismů, kterými se může polymorfismus (např. typu SNP) funkčně projevit. Jestliže se např. nachází v regulačním místě genu, může být ovlivněna míra transkripce genu nebo stabilita mRNA (mediátorová ribonukleová kyselina) a následně i produkce kódované molekuly. Nesynonymní polymorfismus v kódující oblasti genu způsobí změnu aminokyselinové sekvence (struktury) a tím potenciálně i funkci kódovaného proteinu. Těmito způsoby se také nejčastěji vysvětluje efekt kauzálních variant (polymorfismů) na vnímavost k rozvoji nemoci nebo ke změně odpovědi na lék či toxin. Proto je také jedním z hlavních cílů genetických asociačních studií najít geny, jejichž produkty jsou potenciálně důležité pro prevenci a možnosti léčby onemocnění. (Kim, Misra, 2007).

## 2.2 GENOVÝ POLYMORFISMUS A DĚDIČNÁ SLOŽKA KOMPLEXNÍCH NEMOCÍ

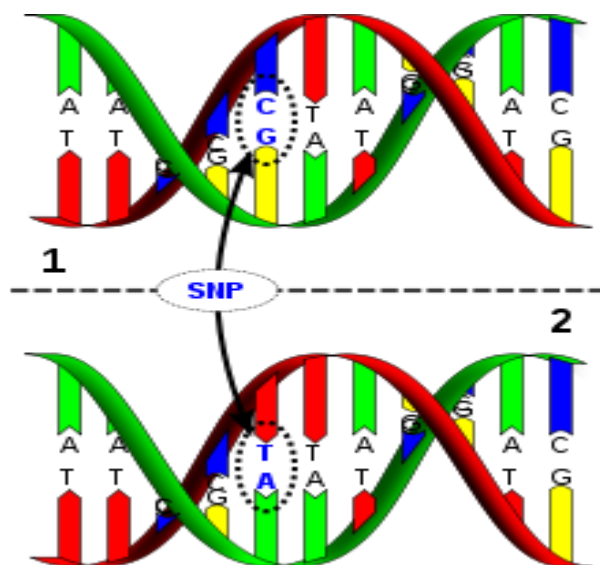
Podle současných předpokladů můžeme u konkrétního jedince odhadnout dědičnou vnímavost ke komplexnímu onemocnění na základě vyšetření relevantních (asociovaných) genových variant (markerů). Možnosti primární identifikace takových genových variant pro konkrétní nemoc (např. ICHS) byly popsány v kapitole o dědičné složce ICHS. V současné době zahrnují zejména rozsáhlé studie založené na genotypizaci skupiny jednoznačně charakterizovaných pacientů a zároveň genotypizaci zdravé populace; následně se sledují rozdíly v zastoupení kandidátních alel mezi soubory. Vztah mezi konkrétním genotypem a fenotypem je pak využit k charakterizaci genů vnímavosti k onemocnění.

Asociované genové varianty mohou s nemocí souviset přímo (jsou kauzální) nebo je jejich vztah k nemoci nepřímý (jsou ve vazebné nerovnováze s kauzální variantou). Obecné mechanismy účinku kauzálních genových variant byly popsány výše; v řadě případů mohou tyto polymorfismy vyústit ve změny v imunitních, zánětových či enzymových reakcích.. (Šimon, 2001e). Předpokládá se také, že se efekt řady polymorfismů projevuje také změnou účinku léčiv či řízení odpovědi na působení nepříznivých faktorů, zvláště chemických či biologických škodlivin. (Souček, 2009).

Jedním z obecných cílů studia polymorfismu lidského genomu je vytvořit komplexní soubor genových variant, které by následně posloužily v odvětvích farmakogenomiky, asociačních studiích multifaktoriálních onemocnění (Průša, Macek; 2007) a v neposlední řadě pro hlubší poznání molekulárních mechanismů v oblasti lidské fyziologie a patofyziologie. (Kim, Misra; 2007). Výzkumy polymorfismů ve farmakogenetice mohou např. přinést odpovědi na otázky týkající se předpovědi negativní reakce pacientů na podaný lék a dále mohou usnadnit predikci pravděpodobného účinku farmaka ještě před tím, než se pacientovi aplikuje. (Nussbaum et al, 2004). Vyšetření genových variant může být využito ke sledování některých dědičných rodinných onemocnění, např. diabetes mellitus, kardiovaskulárních či nádorových onemocnění. (Souček, 2009). Výhodou pro monitorování SNP variant ve vztahu k chorobám je dědičný přenos tzv. haplotypů (skupina lokusů ve vazbě). Tím, že jsou takové polymorfismy děděny společně, je do značné míry usnadněno sledování jejich přenosu mezi generacemi a ve vztahu k nemocem. Při hodnocení významu konkrétní genové varianty pro danou nemoc je však třeba mít na



paměti podstatné rozdíly v distribuci polymorfismů mezi populacemi a etniky – výsledky studií nelze automaticky přenášet na jiné populace. (Průša, Macek; 2007).



**Obr. 3** Jednonukleotidový polymorfismus (Hall, 2007)

## 2.2 GEN BDNF

V lidském mozku se nachází okolo 85 biliónů nervových buněk. Ve většině jeho oblastí je počet neuronů stanoven již ve vývoji, obvykle v době, kdy neurony rozšiřují své axony. Nejméně dochází k dělení buněk v období dospělosti. Počet neuronů a růst dendritů z těla nervových buněk je kontrolován skupinou nervových růstových faktorů zvaných neurotrofiny (NT). (Bibel, Barde, 2000).

Neurotrofiny představují homodimerické proteiny (Hashimoto, 2010), jež se významně podílí na proliferaci (množení) a diferenciaci neuronů, vedení axonů a dendritů, synapsích a uvolňování neurotransmiterů, dále přežívání a zániku nervových a jiných buněk. Neméně významnou funkci zastávají také ve zprostředkování paměti, učení a chování. (Chao, 2003; Chao et al, 2006).

Vzhledem k tomu, že neurotrofiny regulují četné nervové funkce během vývoje, v dospělosti a účastní se reakcí při nervových zraněních, podílejí se na řadě neurodegenerativních a psychiatrických onemocnění. (Chao, Rajagopal, 2006).

Kromě výše zmíněného skupina NT zaujímá významné postavení také v molekulárních procesech kardiovaskulárního systému. Během kardiovaskulárního vývoje bývají neurotrofiny a jejich receptory uplatňovány jako významné faktory pro formování srdce,

v jiných situacích jsou rozhodujícími regulátory ve vývoji cév. Neurotrofiny se v postnatálním vývoji zaslouhují svými autokrinními a parakrinními mechanismy zejména o přežívání endoteliálních buněk, cévních buněk hladkého svalstva, kardiomyocytů a přispívají taktéž v procesu angiogeneze a vaskulogeneze (vznik cév). Snížená afinita k NT receptoru p75 způsobuje apoptózu endoteliálních buněk a buněk vaskulárního hladkého svalstva, zhoršuje navíc průběh angiogeneze. NT patří do skupiny nadějných molekul v oblasti léčby mikrovaskulárních komplikací diabetu nebo ve snížení apoptózy myocytů v srdci, které prodělalo infarkt. (Caporalli, Emanuelli, 2009).

Prvním identifikovaným členem rodiny neurotrofinů se stal v 50. letech minulého století nervový růstový faktor (NGF, z angl. Nerve Growth Factor). V roce 1982 Barde a jeho společníci úspěšně izolovali z prasečího mozku druhý neurotrofin - Brain Derived Neurotrophic factor. Později byly nalezeny ještě dva další růstové faktory a to neurotrofin-3 (NT-3) a neurotrofin-4/5 (NT 4/5). (Bibel; Barde, 2000; Binder, 2004; Lessmann, Gottmann, Malsangio, 2002).

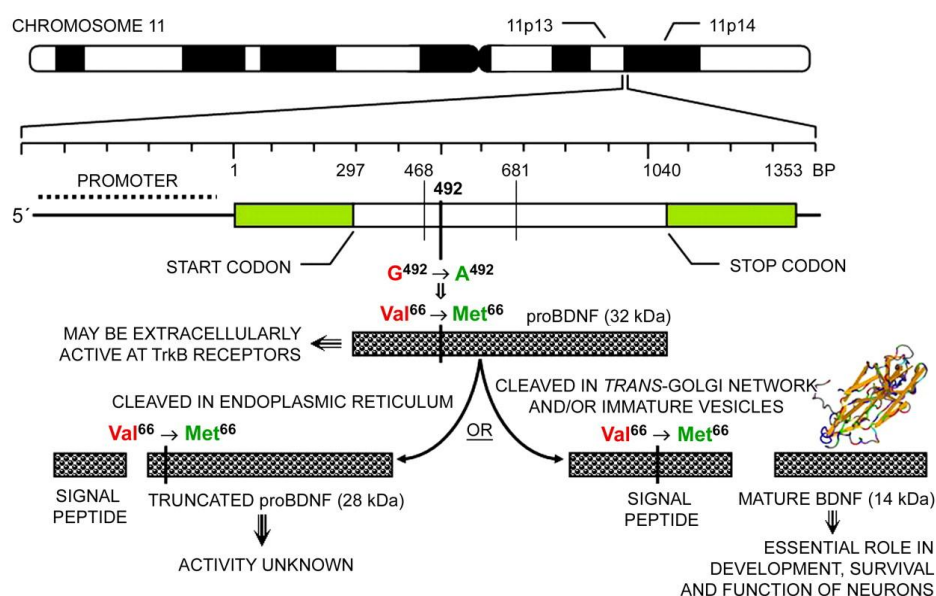
Všechny čtyři zmíněné růstové faktory se podařilo objevit pouze u savců. Kromě nich jsou však ještě také známy další dva neurotrofiny vyskytující se však pouze u ryb, a to neurotrofin 6 (NT-6) a neurotrofin 7 (NT-7). (Huang, Reichardt, 2001; Lessmann, Gottmann, Malsangio, 2002).

Buněčná aktivita neurotrofinů je zprostředkovávána pomocí dvou typů receptorů. V prvním případě se jedná o receptorovou tyrosin kinázu (Trk, z angl. Tropomyosin-Related Kinase), která je charakterizována vysokou afinitou. Každý Trk receptor je přednostně aktivován jedním či více neurotrofiny. (Poo, 2001; Tyler et al., 2002). NGF se nejvíce váže k receptoru typu TrkA. Růstové faktory *BDNF* a NT-4 jsou vázány prostřednictvím TrkB a konečně NT-3 je spojován s TrkC receptorem. (Chao et al, 2006; Tyler et al., 2002). Druhý typ receptoru je označován jako p75 neurotrofinový receptor a náleží do „nadrodiny“ receptorů pro faktor nádorové nekrózy (TNFR, z angl. Tumor Necrosis Factor Receptor). Právě tento neurotrofinový receptor specificky váže všechny uvedené růstové faktory a zajišťuje zprostředkování navázání prvního typu transmembránového receptoru – Trk. (Donovan et al., 2000; Chao, 2003).

Exprese neurotrofinů v mozku savců je během vývoje regulována nervovou elektrickou činností. Nejvyšší stupeň exprese vykazuje NT-3 a to během perinatálního vývoje v hipokampu, neokortexu a mozečku. Exprese *BDNF* bývá při narození poměrně nízká,

avšak během prvních týdnů postnatálního vývoje se jeho hladina zvyšuje. Výskyt bývá hojný především v hipokampu, neokortexu, amygdale a mozečku. Hipokampus je oblast mozku charakteristická nejvyšší expresí *BDNF* a jeho TrkB receptoru. (Tyler et al., 2002). V období dospělosti jsou hladiny *BDNF* a NT-3 v mnoha oblastech mozku srovnatelné. (Huang, Reichardt, 2001; Lessmann, Gottmann, Malcangio, 2002;).

Exprese mRNA pro *BDNF* a taktéž jeho receptor TrkB probíhá kromě nervové tkáně např. ve svalech, srdci a cévách. (Donovan et al., 2000). Neurotrofiny jsou syntetizovány jako prekurzory nebo pro-neurotrofiny, které se štěpí a následně se uvolňují ve formě zralých aktivních proteinů. (Chao et al, 2006).



**Obr. 4** Lidský 11. chromozom s polymorfismem Val66Met genu *BDNF* (Jeffrey et al., 2008)

V případě neurotrofinu *BDNF* gen kóduje prekurzorový peptid pro*BDNF*. Primárně je však *BDNF* syntetizován jako prekurzorový protein (prepro*BDNF*) v endoplazmatickém retikulu. Následně probíhá štěpení signálního peptidu a vzniklý pro*BDNF* je záhy transportován do Golgiho aparátu, kde se třídí buď do konstitutivních nebo sekrečních váčků. (Hashimoto, 2010; Yoshida, 2012).

Lidský *BDNF* gen se skládá z 11 exonů a 9 funkčních promotorových oblastí. Gen se nachází na krátkém raménku jedenáctého chromozomu v oblasti p13 (11p13)(obr. 4). Rozpětí genu dosahuje 70 kb a kóduje stejnojmenný protein *BDNF*. (Pruunsild et al., 2007; Xu et al., 2007). *BDNF* protein se účastní mnoha fyziologických i patologických reakcí a poznatky o něm jsou uplatňovány při výzkumu různých onemocnění.

*BDNF* gen je znám také pro svůj významný jednonukleotidový polymorfismus, který je lokalizován na nukleotidu 196 (záměna G/A – Guanin/Adenin), který je součástí kodonu 66. Uvedená nukleotidová záměna vede k charakteristické substituci aminokyseliny valinu (Val) za methionin (Met). (Egan et al., 2003; Sen et al., 2003). Uvedený SNP je spojován s řadou neurologických i kardiovaskulárních onemocnění a byl proto také vyšetřován v této diplomové práci.

Varianta *BDNF* 66 Val/Met hraje významnou roli v oblasti lidské paměti a funkci hipokampu, ovlivňuje také přenos a sekreci *BDNF*. (Egan et al, 2003). Egan et al. (2003) dále zjistili, že nositelé Met alely mají slabší episodickou paměť a v přítomnosti zmíněné alely dochází ke snížení sekrece *BDNF*.

Yu et al. (2009) a Hariri et al. (2003) došli k závěru, že polymorfismus *BDNF* Val66/Met vede ke změně objemu hipokampu. Hipokampus je oblast mozku, kde probíhá intenzivní neurogeneze (tvorba neuronů); má také význam v procesech paměti. (Malberg et al., 2000). Změna vedoucí ke snížení objemu hipokampu pak může znamenat poškození paměti a procesů učení. (Hariri et al., 2003).

Dalším příkladem možných důsledků snížení objemu hipokampu je studie Malberga et al. (2000). Zde se výzkum soustředil na prokázání spojitosti mezi účinky stresu vztahujícího se k depresi a signifikantního snižování objemu hipokampu. Ke stejným závěrům došel ve srovnání se zdravými pacienty taktéž Sen et al. (2003). Jakmile se však pacientům aplikovala vhodná antidepresiva, nastalo opětovné zvýšení neurogeneze v hipokampu, která podporuje diferenciaci a přežívání neuronů během jejich vývoje. (Malberg et al., 2000).

Skupina Sasakiho (2011) již dříve našla výrazně nižší koncentraci *BDNF* v séru u dospělých pacientů s depresivní poruchou, poruchy v příjmu potravy (mentální anorexie a bulimie), než bylo zjištěno u kontrolní skupiny jedinců. Jakmile se však začaly aplikovat nemocným s depresivní poruchou vhodné antidepresivní medikamenty, množství *BDNF* v séru se signifikantně zvýšilo. Nedávno našli tentýž vztah u dětských pacientů mužského pohlaví s depresí, kteří ve srovnání se zdravými chlapci jeví nižší hladinu *BDNF*.

Ho et al. (2007) našli vztah mezi *BDN* 66 Met alelou a schizofrenií, kdy se pacienti trpící touto nemocí vyznačovali menší frontální a temporální šedou kůrou mozkovou než homozygoti s Val alelou.

Jinou asociační studií provedenou Pereirem et al. (2002) bylo zjištěno, že u jedinců nesoucích Val alelu bývá častější maniodepresivní psychóza. Xu et al. (2007) zase poskytli data, která ukazují na spojení *BDNF* polymorfismu s poruchou pozornosti a hyperaktivitou (ADHD, z angl. Attention Deficit Hyperactivity Disorder). K nejnovějším studiím patří práce Yoshida (2012), která detekovala přítomnost *BDNF* v krvi a jeho vysokou koncentraci v mozkové tkáni. Uvádí, že v signifikantně menší míře najdeme *BDNF* u pacientů, u kterých se objevuje deprese, poruchy v příjmu potravy a vysokofunkční autismus.

*BDNF* se uplatňuje také při ochraně proti zranění nebo ischemii v centrálním i periferním nervovém systému. Příkladem toho je fakt, že po intravenózní aplikaci *BDNF* do těla krysy dochází v experimentu ke snížení velikosti tkáňové nekrózy. Na druhou stranu existují důkazy, které ukazují na možnost, že růstový faktor potencuje za určitých podmínek smrt neuronů.

Kromě toho, že *BDNF* podporuje přežívání a vývoj neuronů a synaptickou plasticitu, své důležité postavení zaujímá taktéž v procesu angiogeneze (tvorba a vývoj nových cév) a to jak v normální, tak v ischemické tkáni, např. po vzniku infarktu myokardu. (Caporali, Emanuelli, 2009; Qin et al., 2011). *BDNF* totiž spouští produkci bazického fibroblastového růstového faktoru, který navozuje angiogenezi a zároveň také zlepšení srdeční funkce po prodělání infarktu myokardu. (Caporali, Emanuelli, 2009).

Na základě studie Ejiri et al. (2005) je *BDNF* spojován také s koronární aterosklerózou a nestabilní anginou pectoris. Z imunohistochemické analýzy vyplynulo, že se exprese *BDNF* objevuje také v lidských aterosklerotických artériích. Zde byl neurotrofin lokalizován hlavně v intimě cévy postižené atheromem. Naopak výskyt *BDNF* nebyl pozorován v cévách, ve kterých se ateroskleróza neprojevovala.

Dále byla v přítomnosti *BDNF* zjištěna zvýšená aktivita NAD(P)H oxidázy a tvorba superoxidu v kultivovaných buňkách hladké svaloviny. Za této situace vznikají kyslíkové radikály a oxidativní stres, díky kterým aterosklerotické pláty podléhají nestabilitě. Na druhou stranu *BDNF* zastupuje roli ochranného faktoru účastnícím se na přežívání a vývoji endoteliálních buněk. (Ejiri et al., 2005).

Donovan et al (2000) ve svém výzkumu prokázali redukci kontaktu endoteliálních buněk v myším srdci, která byla navozena snížením hladiny *BDNF*. Uvedený proces zapříčinil intraventrikulární krvácení a omezení kontrakce srdečního svalu.

Dongqiong et al. (2006) zase popisují možnou roli *BDNF* a jeho receptoru TrkB vzhledem ke stáří. Důkazem toho se staly výsledky experimentů na srdcích hlodavců, kde byl v souvislosti se změnou produkce uvedených molekul pozorován vyšší výskyt patologických projevů. Změny v drahách *BDNF* a receptoru TrkB mohou naznačovat u starších jedinců s kardiovaskulárním onemocnění přítomnost závažnějších srdečních patologií a navodit zesílení zánětu a zvětšení srdečního poškození po infarktu myokardu.

Výše uvedená charakteristika neurotrofinu *BDNF*, jeho významná role v kardiovaskulárním systému včetně účasti v patogenezi aterosklerózy (IACS) a existence strukturního polymorfismu jeho genu s prokázaným funkčním efektem, byly základními východisky pro hypotézu možného uplatnění *BDNF* 66 Val/Met polymorfismu ve vnímavosti k infarktu myokardu, která byla testována v této diplomové práci.

## **PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3. VLASTNÍ EXPERIMENT

#### 3.1 HYPOTÉZA

Je prokázáno, že *BDNF* a jeho receptory jsou exprimovány také v jiných než nervových tkáních. Příkladem mohou být různé buněčné typy, jako jsou srdce ve vývoji (Donovan et al., 2000), aterosklerotické žíly (Ejiri et al., 2005; Kraemer et al., 2005), lymfocyty (Kruse et al., 2007) nebo endoteliální buňky (Donovan et al., 2000). Kromě toho regulují *BDNF* a jeho receptory vývoj cév, uplatňují se při odpovědi na poranění a jejich deficit vede k apoptóze endoteliálních buněk, nebo snížení kontraktility srdce. (Donovan et al., 2000).

Na tato fakta navazují svou výzkumnou práci Jiang et al. (2009), kteří jako vůbec první demonstrovali vztah mezi *BDNF* Val66Met polymorfismem a ICHS. Ve své studii pracovali se vzorky pocházejícími od 904 pacientů s anginou pectoris a od 513 zdravých kontrolních jedinců. U všech zařazených pacientů s AP byla diagnóza podpořena průkazem více než padesátiprocentní stenózy v nejméně jedné hlavní koronární tepně; diagnostika stenózy byla provedena prostřednictvím koronární angiografie. Všichni pacienti i zdraví kontrolní jedinci pocházeli z čínské populace. Skupina o počtu 628 pacientů trpěla nestabilní AP a skupina se stabilní AP zahrnovala 276 pacientů.

Konečné výsledky uvedené čínské studie prokázaly signifikantní rozdíly ve frekvenci výskytu polymorfismu *BDNF* Val66Met u pacientů s nestabilní anginou pectoris, stabilní anginou pectoris a kontrolní skupinou. U pacientů s nestabilní anginou pectoris byla zjištěna signifikantně nižší frekvence výskytu genotypu *BDNF* Met/Met než u zdravých jedinců a pacientů se stabilní anginou pectoris. Autoři své výsledky shrnuli tak, že homozygoti se dvěma Met alelami (*BDNF* Met/Met) jsou chráněni proti nestabilní angině pectoris.

Studie se zabývala také případným vztahem mezi *BDNF* Val66Met polymorfismem a dalšími klinickými/laboratorními parametry. Nebyla nalezena spojitost mezi *BDNF* Val66Met polymorfismem a kouřením, hypertenzí, diabetes mellitus, počtem postižených cév, glykemií, celkovým cholesterolem, triglyceridy nebo fibrinogenem.

Výsledky získané Jiangem et al. (2009) dále ukázaly, že pacienti s nestabilní anginou pectoris měli v průměru nižší koncentraci *BDNF* v plazmě než pacienti se stabilní anginou



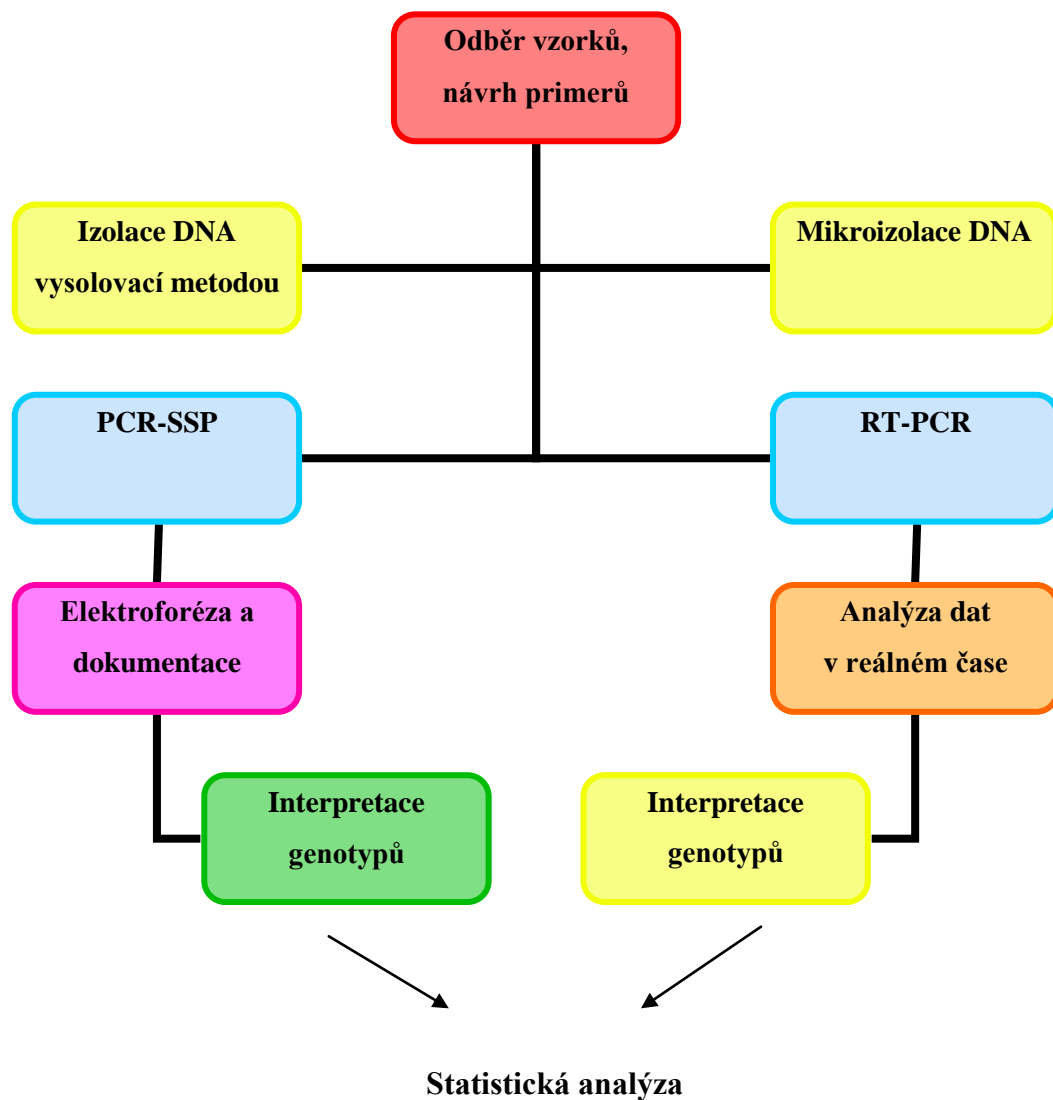
pectoris či zdraví jedinci; koncentrace *BDNF* však nebyla závislá na genotypch *BDNF* Val66Met polymorfismu.

Vhledem k výše uvedeným informacím dokládajících vztah mezi výskytem polymorfismu Val66Met genu *BDNF* a projevy nestabilní anginy pectoris u čínské populace, významnou rolí *BDNF* v regulaci vývoje kardiovaskulárního systému a jeho expresí v aterosklerotických lézích, jsme se rozhodli ověřit, zda *BDNF* Val66Met polymorfismus může souviset také s infarktem myokardu u české populace.

### **3.2 PRŮBĚH EXPERIMENTU**

Celá praktická část této diplomové práce byla sestavena do několika po sobě následujících kroků zahrnujících příslušné metody. V první fázi byl sestaven soubor pacientů s IM a zdravých kontrolních jedinců, kterým byla odebrána periferní krev. Na základě známé sekvence *BDNF* genu a umístění polymorfismu Val66Met byly navrženy odpovídající primery (pro metodu PCR-SSR) a vybrána komerční genotypizační souprava (pro metodu real time-PCR). K vlastní genotypizaci bylo nutné nejdříve provést izolaci DNA pacientů a kontrolní skupiny zdravých jedinců. Pro izolaci DNA vzorků byly zvolena metoda vysolovací a technika mikroizolace na kolonce.

V dalším kroku byla reakční směs pro PCR-SSP s primery, testovanou DNA a dalšími komponenty podrobena vlastní PCR v termocykléru. PCR produkty (amplikony) byly detekovány pomocí agarózové elektroforézy a vizualizovány ethidium-bromidem. V případě metody genotypizace pomocí RT-PCR byl postup podobný, avšak amplikony byly detekovány v reálném čase a genotypy vyhodnoceny pomocí speciálního programu. Výsledky paralelní genotypizace oběma metodami byly porovnány a následně statisticky vyhodnoceny.



**Obr. 5** Rozvržení experimentu

### 3.3 SOUBOR STUDOVANÉ POPULACE

Do studie bylo zahrnuto celkem 397 jedinců české národnosti převážně z Olomouckého kraje. Skupina pacientů s prokázaným výskytem infarktu myokardu byla tvořena 217 jedinci. Diagnóza IM byla u nich stanovena v souladu s obecně uznávanými mezinárodními kritérii („The European Society of Cardiology and the American College of Cardiology, 2000“). Průměrný věk pacientů dosahoval 53 let a pohyboval se v rozmezí od 25 do 79 let; bylo v něm zastoupeno 185 mužů a 32 žen. Pacienti byli porovnáváni s etnicky/populačně odpovídající skupinou, která sestávala ze 180 zdravých kontrolních

jedinců. Mezi kontrolami bylo 95 mužů a 85 žen, jejich průměrný věk dosahoval 29 let (v rozmezí od 18 do 64 let). Studie byla schválena místní etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci. Všichni pacienti i zdraví jedinci podepsali informovaný souhlas s poskytnutím jejich vzorků a údajů pro daný výzkum. Soubory pacientů i kontrolní skupiny jsou uvedeny v přílohách 1 (pacienti) a 2 (kontroly).

### 3.4 NÁVRH PRIMERŮ PRO PCR-SSP

Abychom zjistili, jaké konkrétní varianty Val66Met polymorfismu se v *BDNF* molekule ( genu) vyskytují u konkrétních jedinců, museli jsme prvně navrhnout pro metodu PCR-SSP vhodné primery (aminokyselina valin odpovídá guaninu v DNA sekvenci, aminokyselina methionin adeninu).

U metody PCR-SSP komplementární primery nasedají specificky k daným alelám. Tímto procesem se nastartuje amplifikace cílového úseku vyšetřované DNA. Pokud však primery „nenaleznou“ zcela komplementární sekvenci, k níž by se připojily, k amplifikaci nedojde. Prostřednictvím elektroforézy (nejčastěji agarózové) následně určíme, zda PCR produkty vznikly (pozitivní reakce) či nikoli (negativní reakce).

Při designu primerů by měl být brán ohled na několik základních pravidel. Jejich délka by se měla optimálně pohybovat v rozmezí 18-24 bází. (Holasová, Radilová, Bunčec, 2006). Kratší oligonukleotidy sice dobře hybridizují s templátem, ale mají vyšší předpoklad pro nespecifické nasedání na templát. Dlouhé oligonukleotidy zase směřují k tvorbě vlásenky, která zabraňuje připojení primeru k templátové DNA a mohou vést k nespecifické vazbě s jiným primerem. (Knoll, Vykoukalová, 2002).

Dalším významným faktorem pro tvorbu primerů je teplota tání ( $T_m$ , z angl. Meeting Temperature). Jedná se o teplotu, při které se 50% dvouřetězcové DNA (dsDNA) rozloží na jednořetězcovou DNA (ssDNA). Teplota tání by měla být u obou primerů zhruba stejná.  $T_m$  je závislá zejména na obsahu a opakování nukleotidových bází guaninu a cytosinu (C). Ty obecně hodnotu  $T_m$  zvyšují. Když se použijí primery s vyšší  $T_m$ , ve výsledku dochází ke specifitější reakci. Poměr G/C bází by měl dosahovat asi 40-60 %. (Holasová, Radilová, Bunčec, 2006; Knoll, Vykoukalová, 2002).

Jiným významným parametrem pro PCR je volba vhodné koncentrace primerů, protože příliš vysoká koncentrace může způsobit chybné připojování a shromažďování

nespecifických produktů. Na druhou stranu primery o nízké koncentraci snižují výtěžek reakce. Primery by si neměly být navzájem komplementární a neměly by tedy tvořit vnitřní sekundární struktury. V případě, že jsou primery silně komplementární, může docházet ke snižování výtěžku či k vzájemné blokaci primerů. (Knoll, Vykoukalová, 2002).

Při volbě primerů bychom neměli zapomínat na specifitu na 3' konci primeru (to je i princip rozlišení alel u PCR-SSP). Aby Taq polymeráza vykonávala svou činnost, je nezbytné, aby na 3' konci primeru nukleotidy hybridizovaly s templátem DNA. Potom může dojít k zahájení prodlužování řetězce. (Knoll, Vykoukalová, 2002).

Pro PCR-SSP se volí dva tzv. specifické primery (dopředné nebo zpětné), které končí zároveň s pozicí polymorfismu. Jsou identické s mateřským nebo komplementárním vláknem, liší se poslední nukleotidovou bází charakterizující polymorfismus. Dále se musí navrhnout jeden konstantní primer, který ohraničí amplikovaný DNA fragment z opačné strany. Konstantní primer se obvykle navrhuje v monomorfní části sekvence tak, aby se k cílové sekvenci navazoval vždy. (Rohoň et al., 2009). V reakci mají zastoupení také dva kontrolní primery, které indikují, zda vlastní PCR proběhla správně (pozitivní vnitřní kontrola reakce).

Primery ke genotypizaci polymorfismu *BDNF* Val66Met jsme navrhli s pomocí veřejné databáze „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Nejprve jsme vyhledali referenční genomickou sekvenci *BDNF* genu a lokalizovali na ní jednonukleotidový polymorfismus se systematickým označením rs6265 (odpovídá variantě Val66Met). Sekvence bezprostředně obklopující SNP rs6265 (pozice výskytu polymorfismu je označena červeně) je uvedena zde (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>):

CATCATTGGCTGACACTTTCGAACAC[A/G]TGATAGAAGAGCTGTTGGATGAGGA

Pro rozlišení genotypů byly navrženy dva specifické a jeden konstantní primer, které byly následně kombinovány ve dvou reakcích pro jednotlivé alely:

1) Pro běžnou (66Val) alelu

5'GGCTGACACTTTCGAACACG a 5'GTTACCCACTCACTAATACTG

2) Pro méně častou (66Met) alelu

5'GGCTGACACTTTCGAACACA a 5'GTTACCCACTCACTAATACTG

Primery byly navrženy tak, aby za standardních podmínek (lokální univerzální program v termocykléru, standardní reakční směs všech potřebných komponent) a při vhodné koncentraci optimálně rozlišovaly jednotlivé alely. Pro určení optimální délky primeru jsme použili jednoduché pravidlo, že na každou bázi cytosinu nebo guaninu přidáváme 4°C a na bázi adeninu či thyminu 2°C. Optimální teplotu pro jednotlivé primery lze tedy vypočítat následovně:

$$T_m = 4x (G + C) + 2x (A + T)$$

Primery podle uvedeného návrhu byly vyrobeny firmou GENERI BIOTECH s. r. o. (Hradec Králové).

### **3.5 IZOLACE DNA**

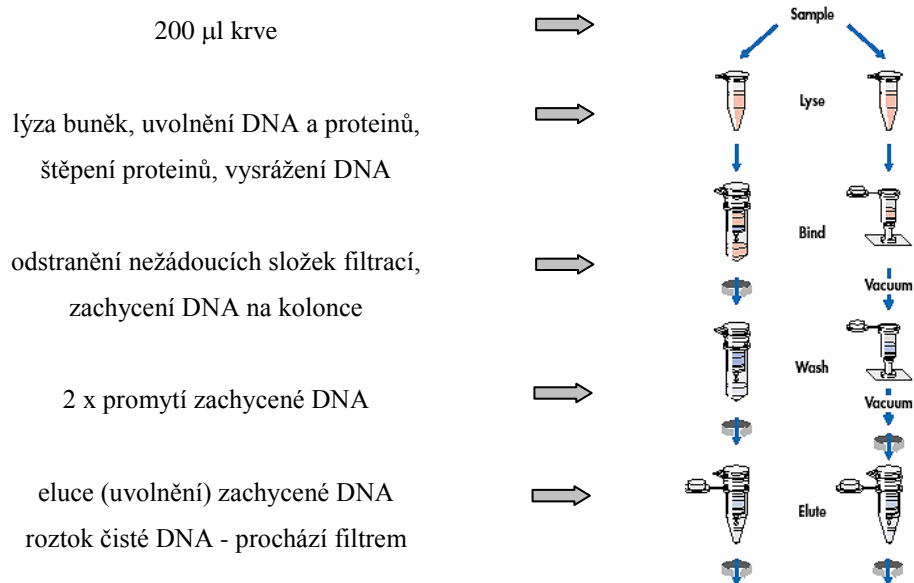
Prvním krokem u molekulárně genetických technik bývá ve většině případů izolace nukleových kyselin. V tomto případě se jednalo o izolaci DNA. Jelikož kontaminace DNA může výrazně ovlivnit výsledky analýz, je velmi důležité zachovat při práci s ní čisté prostředí. Možná kontaminace vzorku jinou DNA (např. i amplikonem z předchozí PCR) tak může ve výsledku podat falešně pozitivní nebo neinterpretovatelné výsledky. (Holásová, Radilová, Bunčec, 2006).

Pro izolaci DNA byly v této diplomové práci zvoleny dvě laboratorní metody (na různé vzorky, zejména podle objemu krve), a to kolonková mikroizolace a vysolovací technika dle Millera. Získaná DNA se uchovávala v mikrozkuhavce a skladovala při -20°C.

#### **3.5.1 Kolonková mikroizolace DNA**

##### Princip metody:

V současné době se již ve většině laboratoří pracuje s dostupnými komerčními sety pro izolaci DNA, které poskytují rychlou a snadnou možnost pro izolaci DNA. Tyto sety zahrnují všechny potřebné reagenty a roztoky pro uskutečnění izolace. V této práci jsme konkrétně použili izolaci DNA na kolonce od firmy Qiagen („QIAamp DNA Blood Mini Kit“).



**Obr. 6** Zjednodušené schéma protokolu mikroizolace DNA na kolonce, upraveno podle materiálů firmy Qiagen. Podrobný popis v textu.

Kolonková izolace DNA „QIAamp“ zahrnuje čtyři kroky a je prováděna pomocí centrifugační kolonky ve standardní mikrocentrifuze.

Po úvodní lýze buněk a precipitaci ethanolem je DNA pomocí centrifugace adsorbována na silikagelovou membránu QIAamp kolonky. Soli a pH podmínky v lyzátu zajišťují, že proteiny a další kontaminanty, které mohou inhibovat PCR a jiné enzymové reakce, nejsou na QIAamp membráně zadrženy.

DNA navázaná na QIAamp membránu je promývána ve 2 krocích pomocí centrifugace. K tomu se využívají dva pufrů – „AW1“ a „AW2“, které výrazně zvyšují čistotu eluované DNA. Složení promývacích pufrů zajišťuje odstranění všech zbytkových nečistot bez ovlivnění navázané DNA.

Čistá DNA je uvolněna z QIAamp centrifugačních kolonek v koncentrované formě buď rozpuštěním v pufru „AE“ nebo ve vodě pro PCR. Před aplikací na kolonku by měl být pufr „AE“ temperován na teplotou 15-25°C. Výnos DNA se zvýší, jestliže je QIAamp centrifugační kolonka před centrifugací inkubována 5 minut spolu s vymývacím pufrům při pokojové teplotě. Získaná DNA je vhodná pro přímé použití v PCR. (QIAamp® DNA mini kit and QIAamp DNA blood mini kit handbook, 2003).

Při práci s pufrů „AL“ a „AW1“ je třeba dbát opatrnosti a pracovat v rukavicích, jelikož obsahují velice dráždivou chaotropní sůl. Rukavice používáme i jako ochranu před biologickým rizikem zpracovávané krve a jako prevenci kontaminace vzorků.

Biologický materiál: odebraná periferní krev pacientů a jedinců kontrolní skupiny

Použité chemikálie a roztoky:

Obsah setu pro 250 izolací DNA:

- QIAamp kolonky 250 ks
- Mikrozumavky 750 ks
- Pufr AL 54 ml
- Pufr AW1 (koncentrát) 95 ml
- Pufr AW2 (koncentrát) 66 ml
- Pufr AE 60 ml
- QIAGEN<sup>®</sup> Proteáza 1 lahvička
- Roztok proteázy 5,5 ml

Další spotřební materiál:

- jednorázové pipetovací špičky (Eppendorf)
- vinylové rukavice (Kimberly-Clark)

Laboratorní přístroje a pomůcky:

- centrifuga (Hettich 16 R)
- box s laminárním prouděním (Bio-II-A TELSTAR)
- mikropipety (Eppendorf, rozsah od 0,2 µl do 1 ml)
- minicentrifuga (MINI-LABNET)
- mrazák (Brandt)
- stojánky na mikrozumavky (Kartell)
- termoblok (Grant QBT1)
- vortex (VELP scientifica)

Postup práce:

1. Ze zásobního roztoku proteázy (QIAGEN) bylo opatrně přeneseno 20 µl do sterilní mikrozumavky o objemu 1,5 ml.

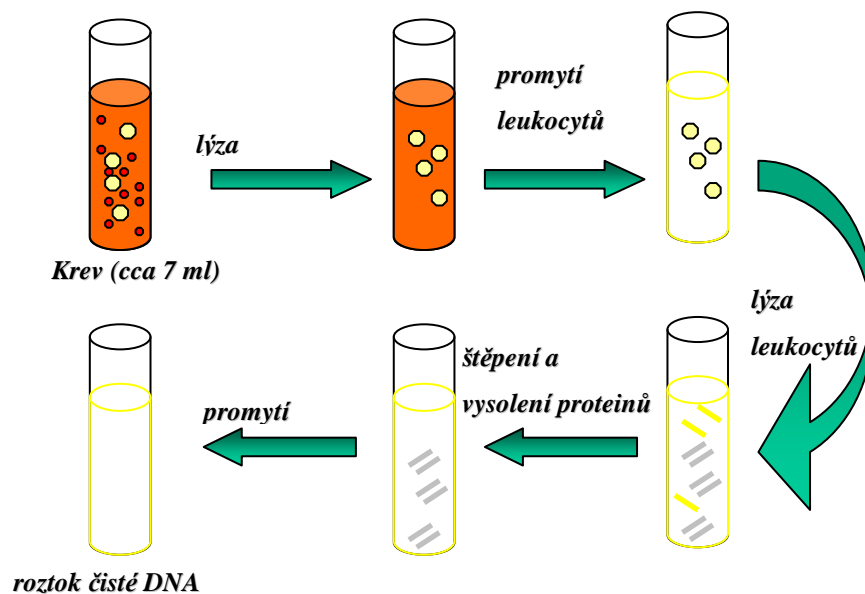
2. Ze zkumavky s periferní krví pacienta či jedince z kontrolní skupiny bylo odebráno 200  $\mu$ l vzorku. Krev byla přidána do mikrozkušavky k proteáze a promíchána s enzymem opakovaným pipetováním tam a zpět.
3. Ke směsi bylo dále přidáno 200  $\mu$ l pufru „AL“. Směs se poté v mikrozkušavce uzavřela víčkem a důkladně promíchala vortexem po dobu 15 s.
4. Směs byla dále inkubována při 56°C po dobu 10 minut.
5. Mikrozkušavka byla krátce zcentrifugována, aby se odstranily kapky vzniklé na vnitřní části víčka.
6. Po přidání 200  $\mu$ l absolutního etanolu (koncentrace 96–100 %) se směs opět promíchala vortexem po dobu 15 s. Mikrozkušavka se krátce zcentrifugovala, aby se odstranily kapky vzniklé během vortexování.
7. Směs vzniklá v šestém kroku postupu se opatrně přepipetovala na QIAamp centrifugační kolonku, která se po uzavření víčka centrifugovala při 8000 otáčkách po dobu jedné minuty. Kolonka se zachycenou DNA se přemístila do čisté 2 ml mikrozkušavky a jímací zkumavka s odpadovým filtrátem byla odstraněna.
8. Do QIAamp kolonky bylo přidáno 500  $\mu$ l pufru „AW1“. Uzavřená kolonka se centrifugovala při 8000 otáčkách po dobu jedné minuty. Kolonka se zachycenou DNA se přemístila do čisté 2 ml mikrozkušavky a jímací zkumavka s odpadovým filtrátem byla odstraněna.
9. Do QIAamp kolonky bylo přidáno 500  $\mu$ l pufru „AW2“. Uzavřená kolonka se centrifugovala při 14000 otáčkách po dobu tří minut.
10. QIAamp kolonka byla přesunuta do čisté 1,5 ml mikrozkušavky, zkumavka s filtrátem byla odstraněna. Do kolonky bylo pipetováno 200  $\mu$ l pufru „AE“. Kolonka byla následně inkubována při pokojové teplotě (15-25 °C) 3 minuty.
11. Po závěrečné centrifugaci (8000 otáček, 1 minuta) byla eluovaná DNA zachycena na dně mikrozkušavky a přenesena do skladovací mikrozkušavky. Každý vzorek byl označen identifikačním číslem a uchován při -20°C.



### 3.5.2 Izolace DNA vysolovací metodou

#### Princip metody:

Metoda je zahájena lýzou erytrocytů prostřednictvím vhodného detergentu, centrifugací, protřepáním na vortexu s následným promytím leukocytů. Pokračuje se v lýze leukocytů. K tomu, abychom zajistili štěpení proteinů a histonů je zapotřebí přidat proteinázu K a směs inkubovat. Zbytků proteinů se zbavíme jejich „vysolením“ (vysokou koncentrací NaCl) a centrifugací. Precipitace DNA dosáhneme použitím ethanolu, precipitát DNA následně promyjeme a rozpouštíme ve skladovacím pufru. Jak je DNA čistá a v jaké koncentraci jsme ji získali, zjistíme pomocí spektrofotometrie. (Vlášková, Trešlová, 2008).



**Obr. 7** Zjednodušené schéma izolace DNA pomocí vysolovací techniky (dle Millera), podrobněji v textu.

Biologický materiál: odebraná periferní krev pacientů a jedinců kontrolní skupiny

Použité chemikálie a roztoky:

- absolutní ethanol (Fagron Olomouc)
- ethanol 70% (Fagron Olomouc)
- NaCl (Serva)
- roztok LBI – 5 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (Sigma)

- 300 mM sacharóza (Lachner)
- 10 mM TRIS Cl – pH 7,5 (Sigma)
- 1% Triton X100 (Serva)
- *roztok P*
  - 4 mM CaCl<sub>2</sub> (Promega)
  - 40 mM EDTA (Sigma)
  - 300 mM NaCl (Serva)
  - 4% SDS (dodecylsulfát sodný)(Serva)
  - 10 mM TRIS Cl (Sigma)
- *roztok proteázy*
  - 1 mM CaCl<sub>2</sub> (Promega)
  - 40% glycerol (Sigma)
  - 20 mg/ml proteináza K (Serva)
  - 10 mM TRIS – pH 7,5 (Sigma)
- *roztok R*
  - 10 mM TRIS – pH 7,5 (Sigma)
- 10 mM TRIS – pH 8,0 (Sigma)

Spotřební materiál:

- jednorázové pipetovací špičky (Eppendorf)
- vinylové rukavice (Kimberly-Clark)
- mikrozumavky o objemu 2 ml, 15 ml (Axygen)
- 1,5 ml šroubovací mikrozumavka (Axygen)

Laboratorní přístroje a pomůcky:

- centrifuga (Hettich 16 R)
- box s laminárním prouděním (Bio- II- A TELSTAR)
- minicentrifuga (MINI-LABNET)
- mrazák (Brandt)
- pH metr (Jenway 3310)

- spektrofotometr (Nanodrop ND-1000)
- termoblok (Grant QBT1)
- vortex (VELP scientifica)
- mikropipety (Eppendorf, rozsah od 0,2 µl do 1 ml)
- stojánky na mikrozkušavky (Kartell)

Postup práce:

1. Z primárního vzorku se do mikrozkušavky odpipetovalo 0,5 ml, která byla následně zamrazena a posloužila jako záloha.
2. Zbývající vzorek o objemu asi 8 ml byl doplněn roztokem LB1 do celkového objemu 45 ml.
3. Na vortexu byl vzorek protřepán pro navození lýze krevních buněk a následně se vzorek vložil centrifugoval (5'/4000 rpm/5°C). Po slití supernatantu bylo k sedimentu připipetováno 5 ml roztoku R. Důsledným protřepáním na vortexu byl sediment rozrušen a znovu centrifugován při 5'/4000 rpm.
4. Opětovně byl supernatant slit a k sedimentu se dále přidalo 930 µl roztoku R.
5. Po vortexování se ke vzorku připipetovalo 40 µl proteázy o koncentraci 20 mg/ml a následně 370 µl roztoku P.
6. Přes noc se vzorek vložil do termostatu k inkubaci na nastavenou teplotu 37°C.
7. Po vytemperování vzorku na pokojovou teplotu další den ráno, se k němu přidalo 300 µl 5M NaCl.
8. Vzorek byl rozmíchán na vortexu a centrifugován (15'/4000 rpm/RT).
9. Dalším krokem bylo přelití supernatantu do 2 ml mikrozkušavky, která byla znovu centrifugována (10'/14000 rpm/RT).
10. V laminárním boxu byl supernatant přenesen do zkumavky o objemu 15 ml a přítomná DNA se vysrážela prostřednictvím přidání 3,5 ml absolutního ethanolu.

11. Precipitát DNA byl zachycen na sterilní jednorázovu mikrobiologickou kličku a za pomoci 70% ethanolu o objemu 0,5 ml byl 2x promyt a nakonec uvolněn do 10 mM TRIS pufru, pH8 ve skladovací šroubovací mikrozkuhavce.
12. Posledním krokem bylo rozpuštění DNA zahřátím na 5 minut při teplotě 70 °C.
13. DNA se uchovávala v mrazáku při teplotě -20 °C.

#### Měření koncentrace a čistoty DNA pomocí spektrofotometrie:

Spektrofotometrie je metoda vhodná pro detekci koncentrace DNA ve vzorku. Maximum absorbance DNA spadá do oblasti vlnové délky 260nm. Čistota nukleové kyseliny se zjistí podle poměru absorbance při 260nm : 280nm (280 nm je maximální absorbance pro proteiny); optimální hodnota tohoto poměru spadá do rozmezí 1,8 – 2. Nižší hodnota poměru než je uvedené optimum indikuje kontaminaci proteiny (Holasová, Radilová, Bunčec, 2006; Vlášková, Trešlová, 2008). V našem experimentu jsme koncentraci a čistotu vzorků DNA měřili pomocí spektrofotometru Nanodrop ND-1000, který vyžaduje jen velmi malé množství měřeného vzorku.

### **3.6 PCR-SSP (POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE SE SEKVENČNĚ SPECIFICKÝMI PRIMERY)**

#### Princip metody:

Polymerázová řetězová reakce byla objevena v roce 1984 v Kalifornii v Cetus Corporation v Ermwille a zasloužil se o to Kary Mullis. (Rohoň et al., 2009; Špíšek, 2011). Zásadním krokem pro vyvinutí metody byl objev termostabilní DNA polymerázy. Tato DNA polymeráza byla primárně izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* žijící v horkých pramenech, proto se enzym (DNA polymeráza) z tohoto mikroorganismu označuje jako Taq polymeráza. (Knoll, Vykoukalová, 2002; Špíšek, 2011). Význam Taq polymerázy spočívá v tom, že i v případech, kdy je opakovaně vystavována vysokým teplotám pohybujících se okolo 95°C zůstává stabilní. Po navázání na ssDNA je Taq polymeráza schopna prodlužovat řetězce od 5'konce k 3'konci za optimální teploty 72°C a tvořit kopie templátové DNA. (Špíšek, 2011). Pro PCR je nezbytné stanovit

optimální množství Taq polymerázy, při jejím nadbytku dochází k tvorbě nespecifických produktů.

Metoda PCR obecně slouží k mnohonásobnému namnožení určité sekvence (fragmentu) DNA *in vitro*. (Rohoň et al., 2009). Modifikace PCR-SSP se využívá, když chceme zjistit, zda zkoumaný vzorek obsahuje určitou sekvenci DNA, či chceme-li přítomnost dané sekvence ve vzorku vyloučit. Princip PCR-SSP je uveden na obr. 8.

K PCR je třeba několik základních složek. V prvním případě se jedná o „templátovou“ DNA, u které chceme provést testování. Opět je důležité zvolit optimální množství testované DNA; v případě, že jí je mnoho, může být proces PCR inhibován nebo docházet k nespecifické amplifikaci. Další nedílnou součástí jsou primery, jež na základě zákona o komplementaritě bází umožní prokázat, zda cílový úsek DNA nese specifickou sekvenci či nikoli. Taq polymeráza, jak bylo dříve zmíněno, zprostředkovává „replikaci“ (syntézu) specifického fragmentu. Jako stavební kameny pro syntézu nového vlákna slouží deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTP) čtyř typů - dATP, dTTP, dCTP a dGTP. Důležitou součástí směsi PCR tvoří také hořečnaté kationy. Ty představují kofaktory DNA polymerázy, kdy kontrolují kontakty fosfátových skupin a aktivního místa DNA polymerázy. (Rohoň et al., 2009; Špišek, 2011). Také optimální koncentrace hořečnatých iontů je při PCR velmi důležitá, protože při vyšších koncentracích může docházet k tvorbě nespecifických produktů.

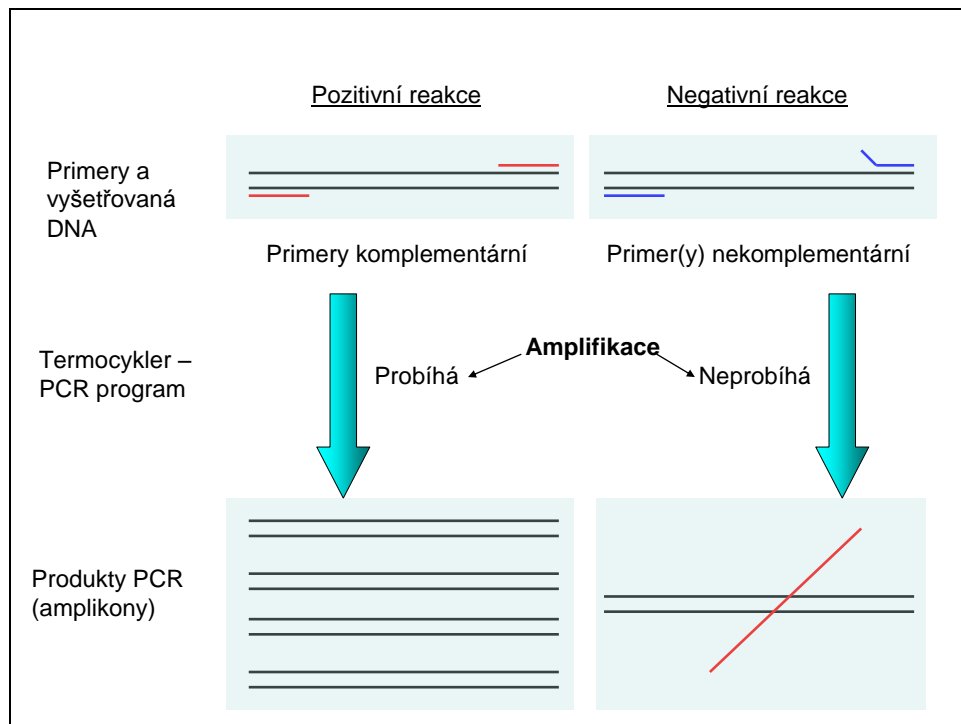
Metoda PCR se provádí v automatizovaných přístrojích tzv. termocyklérech. PCR je složena z cyklického opakování tří na sebe navazujících kroků. Prvním krokem, který probíhá většinou za teploty 90-95°C, je denaturace deoxyribonukleové kyseliny na 2 řetězce ssDNA.

Druhá fáze spočívá v ochlazení vzorku na teplotu pohybující se většinou v rozmezí 50 – 60 °C, kdy primery nasedají na komplementární sekvence ssDNA (angl. „annealing“).

V posledním kroku při teplotě 72°C zprostředkovává Taq DNA polymeráza prodlužování vláken od 5' konce ke konci 3' (angl. „extension“). V průběhu prvního cyklu PCR pokračuje syntéza nového úseku za stanovený úsek, ale při dalších cyklech je již syntéza úseku ohraničena primery. (Rohoň et al., 2009, Špišek, 2011).

Každý cyklus v PCR teoreticky zdvojnásobí množství amplifikovaného fragmentu DNA. Jedná se v podstatě o logaritmický nárůst počtu kopií, kterých jsou v závěru PCR přinejmenším miliony. Amplifikuje se pouze ta část DNA, kterou chceme, ostatní úseky

DNA se neamplifikují. PCR umožňuje amplifikaci DNA o velikosti až 10 kb. (Špišek, 2011).



**Obr. 8** Princip metody PCR-SSP. Pro každou alelu se kombinuje sekvenčně specifický primer a konstantní primer. Pokud je daná alela přítomná, dojde v reakci k namnožení cílového úseku DNA (vzniká amplicon, pozitivní reakce), který dále identifikujeme. Pokud primery alelu „nenajdou“ (negativní reakce), amplifikace neproběhne. Genotyp vyšetřovaného určíme na základě přítomnosti/absence ampliconů odpovídajících konkrétním alelám.

Biologický materiál: izolovaná DNA pacientů a jedinců kontrolní skupiny

Použité chemikálie a roztoky:

- *primerový mix* – konstantní primer s označením P1056 (Generi Biotech s. r. o.)
  - kontrolní primery s označením P33 a P34 (Generi Biotech s. r. o.)
  - specifický primer pro alelu G (P1054) a alelu A (P1055) (Generi Biotech s. r. o.)
  - TRIS Cl pufr (Sigma)

Pozn. Sekvence primerů jsou uvedeny v kapitole „Návrh primerů pro PCR-SSP“.

- *fototyp master* – 10x koncentrovaný PCR pufr (0,166 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Sigma; 0,67 M TRIS Cl – pH8,8, Sigma; 1% TWEEN 20, Sigma)
  - PCR voda (Fresenius)
  - Taq polymeráza (Top-Bio Praha)

- 12,5 mg/ml spermidin (Sigma)
- 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma)
- 25 mM dNTPs (Promega)

#### Spotřební materiál:

- jednorázové pipetovací špičky (Eppendorf)
- vinylové rukavice (Kimberly-Clark)
- mikroskopické skleničky (Axygen)
- mikroskopické skleničky pro PCR (Thermo Scientific)
- víčka na mikroskopické skleničky (Thermo Scientific)

#### Laboratorní přístroje a pomůcky:

- automatická mikropipeta (Hamilton)
- box s laminárním prouděním (Bio- II- A TELSTAR)
- centrifuga (MLW T 62.1)
- mikropipety (Eppendorf, rozsah od 0,2 μl do 1 ml)
- pinzeta
- minicentrifuga (MINI-LABNET)
- mrazák (Brandt)
- stojánky na mikroskopické skleničky (Kartell)
- termocykler DNA ENGINE TETRAD 2 (Bio-Rad)
- vortex (VELP scientifica)
- „uzavírač“ víček mikroskopických skleniček

#### Postup práce:

1. V prvním kroku byly shromážděny zamražené DNA vzorky pacientů a zdravých jedinců a ponechány k rozmražení při pokojové teplotě.
2. Do stojánku byly přichystány všechny potřebné primery (specifický primer pro alelu A, specifický primer pro alelu G, zpětný primer, kontrolní primery) a rozmražené vzorky DNA.
3. Každý vzorek byl testován ve dvou PCR (dvouzkušková metoda) - jednou na přítomnost alely A a jednou na přítomnost alely G (ve studovaném polymorfismu genu *BDNF* rs6265).
4. Příprava primerových směsí (rozpis na 100 μl): Do směsi pro alelu A se napipetovalo 88,6 μl TRIS pufru, 5 μl specifického primeru pro alelu A (P1054)

a 5  $\mu$ l zpětného primeru P1056; navíc také po 0,7  $\mu$ l z obou kontrolních primerů P33 a P34. Pro alelu G se napipetovalo 88,6  $\mu$ l TRIS pufru, 5  $\mu$ l specifického primeru P1055, 5  $\mu$ l zpětného primeru P1056 a po 0,7  $\mu$ l kontrolních primerů P33 a P34. Přípravný protokol pro práci je uveden v příloze 3.

5. Do stojánku bylo připraveno příslušné množství mikrozkušavek pro PCR, do kterých se pipetovalo 5  $\mu$ l primerových směsí (do lichých řad pro alelu A, do sudých řad pro alelu G). Do jednotlivých mikrozkušavek byly přidány vzorky vyšetřovaných DNA v objemu 0,2  $\mu$ l (po promíchání a centrifugaci). Nakonec byly přidány všechny zbylé komponenty PCR v jediném „master-mixu“ („fototypové míchání“, tab. 1) v objemu 8  $\mu$ l.
6. Po zavíčkování mikrozkušavek byl stojánek vložen do centrifugy MLW T 62.1 s nastavením na 400 otáček po dobu 1 minuty.
7. Poté byl stojánek s mikrozkušavkami vyjmut z centrifugy a vložen do termocykléru, kde byl zvolen přednastavený vhodný program (program „Fototyp“; teplotní profil uveden níže).
8. Po vyjmutí z termocykléru byly všechny vzorky dále podrobeny elektroforéze na agarózovém gelu a následně vizuálně vyhodnoceny.

#### **Teplotní profil programu pro genotypizaci *BDNF* polymorfismu rs6265 („Fototyp“)**

96°C 1 min

(96°C - 20 s, 70°C - 45 s, 72°C - 25 s) 5 cyklů

(96°C - 25 s, 65°C - 50 s, 72°C - 30 s) 21 cyklů

(96°C - 30 s, 55°C - 1 min, 72°C - 1 min 30 s) 4 cykly

4°C do ukončení programu

|             | <b>12 ks</b> | <b>24 ks</b> | <b>48 ks</b> | <b>72 ks</b> | <b>96 ks</b> |
|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>FM</b>   | 117          | 234          | 433          | 667          | 863          |
| <b>Voda</b> | 3,8          | 7,6          | 14           | 21,6         | 28           |
| <b>Taq</b>  | 1,1          | 2,2          | 4            | 6,2          | 8            |

**Tab. 1** Rozpis na přípravu „fototypového míchání“ pro různé počty typizací (FM - „fototyp master“, Taq - Taq DNA polymeráza). Objemy jsou uvedeny v mikrolitech.



### 3.7 ELEKTROFORÉZA PCR PRODUKTŮ (AMPLIKONŮ) NA AGARÓZOVÉM GELU (DÁLE ELFO):

#### Princip metody:

Elektroforéza je technika umožňující separaci, analýzu a purifikaci nukleových kyselin (NK). Princip elektroforézy spočívá v mobilitě nabitých částic v elektrickém poli. (Holasová, Radilová, Bunček, 2006). Rychlost, s jakou se DNA v gelu pohybuje, závisí na velikosti její molekulové hmotnosti, elektrickém náboji a prostorovém uspořádání, dále na vlastnostech gelu, pufru a přivedeném napětí. Pravidlem je, že molekuly NK s větší velikostí a složitější prostorovou strukturou se v gelu pohybují pomaleji; po ukončení elektroforézy se tedy vyskytují blíže startu než molekuly menší. Molekuly NK nesou za neutrálního pH záporný náboj, za jejichž polaritu zodpovídají fosfátové skupiny.

Elektroforéza se uskutečňuje ve vhodném nosiči, kterým bývá nejčastěji agarózový či polyakrylamidový gel. (Holasová, Radilová, Bunček, 2006). V případě provedení elektroforézy v této diplomové práci bylo použito agarózového gelu.

Agarózový gel má sice na rozdíl od polyakrylamidového gelu nižší rozlišovací schopnost, avšak jeho výhodou je snadnější příprava, a také to, že se může separovat zároveň fragmenty DNA o větším rozsahu (cca od 50 bp do 20 000 bp).

Gel se nejčastěji získává z přírodního polysacharidu agarózy, který je izolován z červených řas rodu *Gelidium*. Při zahřátí agarózy na teplotu varu dojde k narušení vodíkových můstků ve struktuře a polysacharid přejde do tekuté formy. Po ochlazení roztoku se vytvoří gel. Aby agaróza přešla z kapalného skupenství na gel, musí být její koncentrace větší než 0,2 %.

Pro zviditelnění naneseného vzorku DNA na agarózovém gelu se nejčastěji využívá ethidium bromid (EtBr). Princip spočívá v interakci EtBr s bázemi fragmentu NK. Po ozáření UV světlem se v místech výskytu dvouvláknové DNA dostaví mnohem intenzivnější fluorescence, než záření samotného ethidium bromidu v pozadí. Fragmenty na gelu poznáme jako zářící oranžovo-růžově zabarvené proužky. Jelikož EtBr patří mezi mutageny, potenciální karcinogeny a teratogeny, je nutné při práci s ním používat ochranných nitrilových rukavic. (Holasová, Radilová, Bunček, 2006).

#### Použité chemikálie a roztoky:

- agaróza (Serva)
- DNA size marker (Olerup)
- nanášecí ELFO pufr
- TBE pufr
  - 500 mM TRIS Cl (Sigma)
  - 660 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Sigma)
  - 5 mM EDTA (Sigma)

ethidium bromid (Top-Bio Praha)

#### Laboratorní přístroje a pomůcky:

- dokumentační systém Gel Logic 112 (Kodak)
- elektroforetická vana (Owl Scientific)
- film Polaroid 667
- fotoaparát Polaroid DS34 s nástavcem
- mikrovlnná trouba
- miska s vodou k chlazení gelu
- misky pro nalévání gelu, hřebínky do misek, pryžová chňapka
- pipety vyhrazené pro práci v postPCR prostoru (Labnet)
- skleněné Erlenmayerovy baňky
- skleněný odměrný válec 250 ml
- teploměr laboratorní min. 100 °C
- laboratorní váhy (AND-FA 200)
- UV-transluminátor MEB 20 (Ultralum)
- zdroj k elektroforéze (Bio-Rad Power-Pac 300)
- zdroj k elektroforéze (Major Science MP-500P)

#### Spotřební materiál:

- jednorázové pipetovací špičky (Eppendorf)
- rukavice nitrilové jednorázové (Kimberly-Clark)
- lepící páska bílá
- buničina

### Postup práce:

1. Dvouprocentní agarózový gel byl připraven z 2 g agarózy a 100 ml 0,5 krát koncentrovaného TBE pufru. Krouživým pohybem Erlenmayerovy baňky se obsah (směs agarózy a pufru) promíchal a vložil do mikrovlnné trouby, kde se nechal projít důkladným varem .
2. Pryžovou chňapkou se Erlenmayerova baňka s vřelým gelem přenesla na vodní lázeň k chlazení, zatímco se teploměrem sledovala teplota gelu. Jakmile teplota na stupnici sestoupila na 70°C, byl přidán EtBr (4 µl na 100 ml gelu). Krouživým pohybem se EtBr promíchal s gelem, který se vлил misky s připravenými nasazenými hřebínky.
3. Po ochlazení a zatuhnutí gelu se opatrně vyjmuly hřebínky tak, aby gel nebyl porušen. Celý gel se vložil do elektroforetické vany s 0,5 krát koncentrovaným TBE pufrem.
4. Po vytáhnutí mikrozkuřavek z termocyklieru po PCR z nich byla opatrně odstraněna víčka a pomocí vícekanálové pipety se ke každé PCR směsi přidalo 5 µl nanášecí barvičky. Po promíchání byly všechny PCR směsi naneseny opět vícekanálovou pipetou do jamek na gelu, do jedné jamky byl přidán také referenční velikostní DNA značkovač (z angl. DNA size marker). Mezi jednotlivými nanášeními se špičky pipety vymývaly v elektroforetickém pufru.
5. Elektroforetická vana byla uzavřena víkem a na zdroji napětí mohla být spuštěna elektroforéza (130 V, 20 minut)
6. Po ukončení elektroforézy byl gel položen na plochu UV transluminátoru a po ozáření UV světlem byl obraz gelu vyfocen na analogový snímek (Polaroid) nebo se fotodokumentace provedla elektronicky pomocí přístroje Kodak Gel Logic Imaging system.
7. Software přístroje Kodak Gel Logic Imaging systém umožnil zachycení a analýzu obrazu přímo na monitoru nebo po vytištění.
8. Vyhodnocení genotypů bylo provedeno následovně: V případě, že u daného jedince byla pozorována pozitivní reakce (specifický amplikon) pouze u reakce A, jednalo se o *BDNF* rs6265 AA homozygota. Přítomnost specifického amplikonu v obou reakcích (pro alely A i G) indikovala heterozygotní genotyp *BDNF* rs6265 AG. Pozitivita pouze u reakce pro alelu G byla vyhodnocena jako homozygotní genotyp *BDNF* rs6265 GG.

### 3.8 GENOTYPIZACE POMOCÍ RT-PCR (REAL-TIME PCR – POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE V REÁLNÉM ČASE)

#### Princip metody:

Princip metody „real-time PCR“ spočívá v průběžném měření intenzity fluorescenčního signálu, který odpovídá úrovni amplifikace DNA. Základem genotypizační metody jsou dvě fluorescenčně značené sondy, které jsou sekvenčně specifické ke konkrétním alelám a značené odlišnou fluorescenční molekulou. Fluorescence, kterou uvolňují, souvisí s množstvím PCR produktu a hodnotí se pomocí amplifikační křivky. Tak lze určit, zda cílová DNA, kterou jsme podrobili PCR, obsahuje specifickou sekvenci (konkrétní alelu).

Každá sonda je označena dvěma fluorochromy. Ten, který se nachází na 5' konci, se nazývá reporter, zhášedčem se pak označuje fluorochrom na 3' konci. K fluorescenci nedochází, jestliže se na jedné molekule DNA nacházejí oba dva fluorochromy. Když však Taq polymeráza svou exonukleázovou aktivitou degraduje specificky navázané sondy a reportérový fluorochrom se uvolní, dochází k fluorescenci. (Knoll, Vykoukalová, 2002). Množství PCR produktu je pak přímo úměrné intenzitě signálu; čím více produktu je syntetizováno, tím vyšší signál je zaznamenán. Speciální cyklier pro PCR v reálném čase umí kromě amplifikace taktéž odečítat intenzitu fluorescence. Přístroj je napojen na počítač, který pomocí speciálního software vyhodnotí výsledky (Knoll, Vykoukalová, 2002).

Určitou nevýhodou metody jsou vyšší pořizovací náklady zařízení (ve srovnání s konvenčním termocyklérem), jinak se však jedná o metodu velmi nenáročnou a reprodukovatelnou, která umožňuje zpracovávat několik vzorků najednou. (Špišek, 2011). V této diplomové práci byla ke genotypizaci polymorfismu *BDNF* rs6265 G/A (Val66Met) využita komerční modifikace RT-PCR genotypizace označovaná jako „TaqMan SNP Genotyping Assay“ od firmy Applied Biosystems, označení setu (Assay ID) C\_11592758\_10. Při genotypizaci jsme postupovali podle návodu výrobce (stručně dále).

Biologický materiál: izolovaná DNA pacientů a jedinců kontrolní skupiny

#### Použité chemikálie a roztoky:

- Master Mix (Applied Biosystems)
- PCR voda (Fresenius)

- sondy na SNP Genotypizaci (Applied Biosystems, Assay ID C\_11592758\_10)
- 10 mM TRIS pufru (Sigma)

#### Laboratorní přístroje a pomůcky:

- box s laminárním prouděním (Bio- II A TELSTAR)
- kovová destička pro zkumavky (Corbett Research)
- minicentrifuga (MINI-LABNET)
- miska s ledem
- vortex (VELP scientifica)
- rozkapávací pipeta (Hamilton)

#### Spotřební materiál:

- PCR zkumavky 0,2 ml (Axygen)
- polystyren
- mikrozkušavky 0,1 ml (Corbett Research)

#### Pracovní postup:

1. Nejdříve byla uložena kovová destička do lednice, aby byla vychlazená pro pozdější zpracování vzorků.
2. RT-PCR sonda (ve skutečnosti směs sond), která je uchovávána při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v temnu, je 40krát koncentrovaná (oproti finální koncentraci v PCR směsi). Proto se nejdříve naředí tak, aby byla 20krát koncentrovaná pomocí 10 mM TRIS pufru v poměru 1:1 na požadovaný objem potřebný do reakcí dle počtu vzorků. Se sondou se pracuje velmi opatrně v laminárním boxu v misce s ledem a nesmí být ani vystavena světlu.
3. Na jednu reakci je třeba  $0,5\ \mu\text{l}$  naředěné sondy. Tento objem odpovídal  $0,25\ \mu\text{l}$  originální sondy a  $0,25\ \mu\text{l}$  TRIS pufru. Tato směs se připravovala těsně před mícháním reakčního mixu včetně jedné reakce navíc pro negativní kontrolu.
4. Vzorky k typizaci (izolovaná DNA) byly naředěny na požadovanou koncentraci (přibližně  $10\text{ng}/\mu\text{l}$ ).
5. Při přípravě reakčního mixu byl nejprve na ledu připraven do mikrozkušavek potřebný objem ředěné sondy.
6. Do již předchlazené kovové destičky byl připraven odpovídající počet mikrozkušavek (Corbett Research o objemu  $0,1\ \text{ml}$ ). K nim byla připravena ještě jedna zkumavka navíc, která sloužila pro negativní kontrolu.

7. Dle rozpisu uvedeném v tab. 2 byla připravena reakční směs o mírně vyšším objemu z důvodu vzniklých ztrát během pipetování. Na každých 10 vzorků DNA byl objem zvýšen o jednu reakci:

| reakce                          | 1   | n reakcí |
|---------------------------------|-----|----------|
| <b>TaqMan PCR Master Mix</b>    | 5   |          |
| <b>Genotyping Assay Mix 20X</b> | 0.5 |          |
| <b>celkový objem</b>            | 5.5 |          |

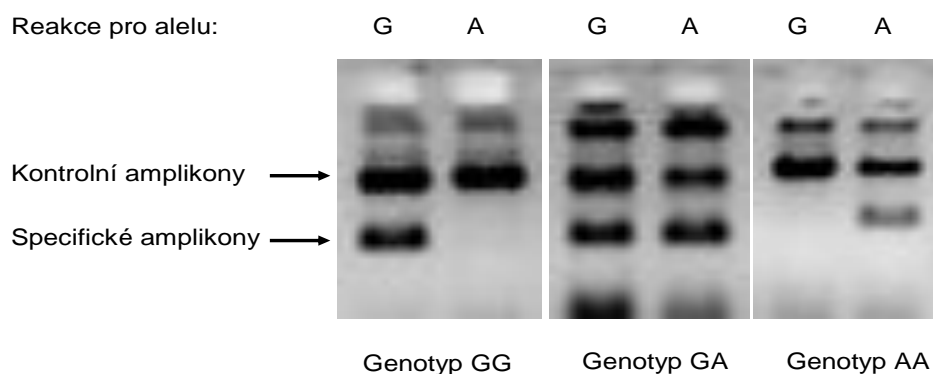
**Tab. 2** Rozpis na přípravu reakční směsi

8. Na dno zkumavek se rozpipetovalo po 5,5  $\mu$ l reakčního mixu, pak následně 4,5  $\mu$ l naředěné DNA.
9. Mikrozkušavky se rychle zavíčkovaly a správně označily, aby nebylo zaměněno jejich pořadí. Celý soubor zkumavek byl uzavřen adhezivní hliníkovou fólií a vložen do real-time cykléru (Corbett Research).
10. Na počítači byl následně spuštěn program Rotor-Gene, kde byl zvolen specifický genotypizační program. V tabulce pro zadávání vzorků bylo uvedeno označení vzorků.
11. Po ukončení programu v cykléru byla posledním krokem analýza dat prováděná s využitím modulu „Analysis“ v ovládacím software. Všechny výsledky a vyhodnocení se následně otevřely v novém okně programu a analýza genotypů polymorfismu *BDNF* rs6265 probíhala pomocí univerzálního genotypizačního algoritmu.

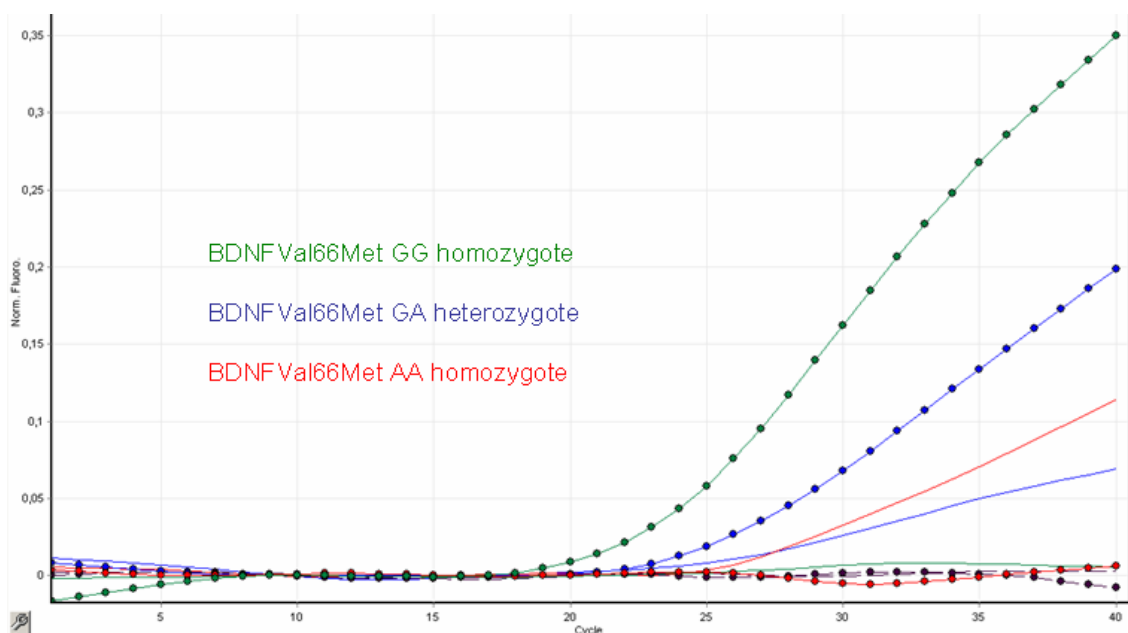
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 ZAVEDENÍ PROTOKOLŮ PRO GENOTYPIZACI POLYMORFISMU GENU *BDNF*

Pro genotypizaci vzorků pacientů s infarktem myokardu (N=217) a zdravých kontrolních jedinců (N=180) bylo využito několik laboratorních metod. Vysolovací metodou dle Millera nebo komerční mikroizolací na kolonkách byla z periferní krve získána DNA. K vlastnímu stanovení genotypů polymorfismu *BDNF* rs6265 G/A (Val66Met) jsme využili paralelně dvě nezávislé metody: PCR-SSP a RT-PCR (TaqMan). V případě PCR-SSP byly navrženy primery podle referenční sekvence *BDNF* genu a optimalizován genotypizační protokol. Příklad výsledku genotypizace (vyhodnocení po agaróзовé elektroforéze) je uveden na obr. 9. Výsledek genotypizace byl dále ověřen metodou kvantitativní RT-PCR (TaqMan) s využitím komerčně dostupného typizačního setu. Reprezentativní výsledek (hrubá data z RT-PCR) je ukázán na obr. 10. Provedením a zvládnutím genotypizace vzorků tak bylo dosaženo jednoho z prezentovaných cílů diplomové práce.



**Obr. 9** Příklad interpretace genotypizace polymorfismu *BDNF* rs6265 G/A (Val66Met) metodou PCR-SSP, uvedeny všechny tři genotypy. U vzorku vlevo byl specifický produkt (amplikon) pozorován pouze v reakci pro alelu G – jedná se tedy o genotyp GG. U vzorku vpravo vidíme naopak produkt pouze u alely A (AA homozygot), konečně vzorek uprostřed má pozitivní reakce pro obě alely – jedná se o genotyp GA (heterozygot).



**Obr. 10** Genotypizace jednonukleotidového polymorfismu BDNF rs6265 G/A pomocí RT-PCR (TaqMan Assay). Zobrazeny jsou výsledky pro všechny tři možné genotypy (GG, GA, AA). Každý vzorek reprezentují dvě amplifikační křivky příslušné barvy pro jednotlivé alely. Např. u zeleně označeného vzorku (GG homozygot) byl amplifikační signál zaznamenán pouze u alely G (zelená tečkovaná křivka), nikoli však u alely A (zelená „holá“ křivka).

## 4.2 GENOTYPIZACE STUDOVANÝCH SOUBORŮ, VÝPOČET A POROVNÁNÍ FREKVENCÍ

Všichni studovaní jedinci (pacienti s infarktem myokardu a kontrolní jedinci) byli genotypizováni na polymorfismus *BDNF* rs6265 G/A (Val66Met) oběma výše uvedenými metodami. Při interpretaci výsledků nebyly zjištěny odlišnosti v genotypech určených pomocí metod PCR-SSP a RT-PCR. Absolutní počty jednotlivých genotypů polymorfismu Val66Met kandidátního genu *BDNF* byly přesně vypočteny a soubor dat byl zahrnut do tab. 3. Získaná data dále sloužila ke statistické analýze, kdy pro signifikantní nálezy byla stanovena hodnota  $p < 0.05$ . Za použití chí-kvadrátového testu (modifikace „test dobré shody“) bylo ověřeno, že distribuce genotypů pro polymorfismus *BDNF* Val66Met vyhovuje Hardy-Weinbergově rovnováze v obou studovaných skupinách (hodnota  $p > 0.05$ , 1 stupeň volnosti).

Jak ukazuje tab. 4, pro každou vyšetřovanou skupinu byly vypočteny alelové, fenotypové a genotypové frekvence (výpočty jsou uvedeny dále). Pro přehlednější zobrazení výsledků byly vytvořeny grafy, které jsou zaměřeny na porovnání mezi frekvencemi pacientů



s infarktem myokardu a skupinou zdravých kontrolních jedinců (Grafy 1, 2, 3). Zastoupení *BDNF* Val66Met genotypů, alel a nosičství bylo porovnáno mezi skupinami pacientů a kontrolních jedinců pomocí chí-kvadrátového testu s příslušným počtem stupňů volnosti. Nejvýznamnějším nálezem celé práce bylo zjištění, že mezi skupinami pacientů s IM a zdravých kontrolních jedinců nejsou statisticky signifikantní rozdíly v zastoupení genotypů, alel ani nosičství polymorfismu Val66Met genu *BDNF* (hodnota  $p > 0.05$  pro všechna srovnání).

Součástí studie byla také subanalýza, v níž se srovnávaly jednotlivé frekvence *BDNF* polymorfismu Val66Met mezi pacienty a kontrolami zvlášť podle pohlaví. Distribuci polymorfismu Val66Met genu *BDNF* u pacientů s IM a zdravých kontrol rozdělených na mužské a ženské pohlaví ukazuje tab. 5. Vzájemné porovnání nosičství mezi skupinami rozdělenými dle pohlaví pak graf číslo 4. Ani při subanalýze podle pohlaví nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi pacienty s IM a kontrolami.

|                | Varianty | Pacienti s infarktem myokardu<br>(N = 217) | Kontrolní skupina<br>(N = 180) |
|----------------|----------|--|--------------------------------|
| Počet genotypů | GG       | 149  | 127                            |
|                | GA       | 59   | 44                             |
|                | AA       | 9  | 9                              |
| Počet alel     | G        | 357  | 298                            |
|                | A        | 77   | 62                             |
| Počet nosičů   | A        | 68   | 53                             |

**Tab. 3** Absolutní počty zjištěných genotypů, alel a nosičů polymorfismu *BDNF* rs6265 G/A (Val66Met) ve skupinách pacientů s IM a kontrolních jedinců. Pozn: Nosičství je uvedeno pro vzácnější alelu A (66Met).

|                      | Varianty | Pacienti s infarktem myokardu<br>(N = 217) | Kontrolní skupina<br>(N = 180) |
|----------------------|----------|--|--------------------------------|
| Genotypová frekvence | GG       | 0,687                                      | 0,706                          |
|                      | GA       | 0,272                                      | 0,244                          |
|                      | AA       | 0,041                                      | 0,050                          |
| Alelová frekvence    | G        | 0,823                                      | 0,828                          |
|                      | A        | 0,177                                      | 0,172                          |
| Nosičství            | A        | 0,313                                      | 0,294                          |

**Tab. 4** Srovnání alelové, fenotypové a genotypové frekvence polymorfismu Val66Met genu *BDNF* u pacientů s IM a kontrolní skupiny. Mezi skupinami nebyly zjištěny statisticky signifikantní rozdíly.

#### Postup při výpočtu alelové frekvence

Pojem alelová frekvence charakterizuje podíl zastoupení alely v dané populaci. V případě polymorfismu Val66Met genu *BDNF* byla hodnota alelové frekvence vypočtena tak, že počet homozygotů (GG pro alelu G, AA pro alelu A) byl z důvodu přítomnosti dvou stejných alel vynásoben dvěma. K součinu byl přičten počet heterozygotů a celé číslo (absolutní počet dané alely ve skupině) se vydělilo dvojnásobkem celkového počtu jedinců ve skupině (celkový počet všech alel ve skupině). Při výpočtu alelové frekvence byl použit obecný vzorec:

$$f_a = (2n_{AA} + n_{Aa}) / 2N$$

$f_a$  ..... alelová frekvence  
 $n_{AA}$  ..... počet homozygotů  
 $n_{Aa}$  ..... počet heterozygotů  
 $N$  ..... celkový počet jedinců

Výpočet alelové frekvence (alely *BDNF* G/A neboli Val66Met) pro skupinu pacientů s IM:

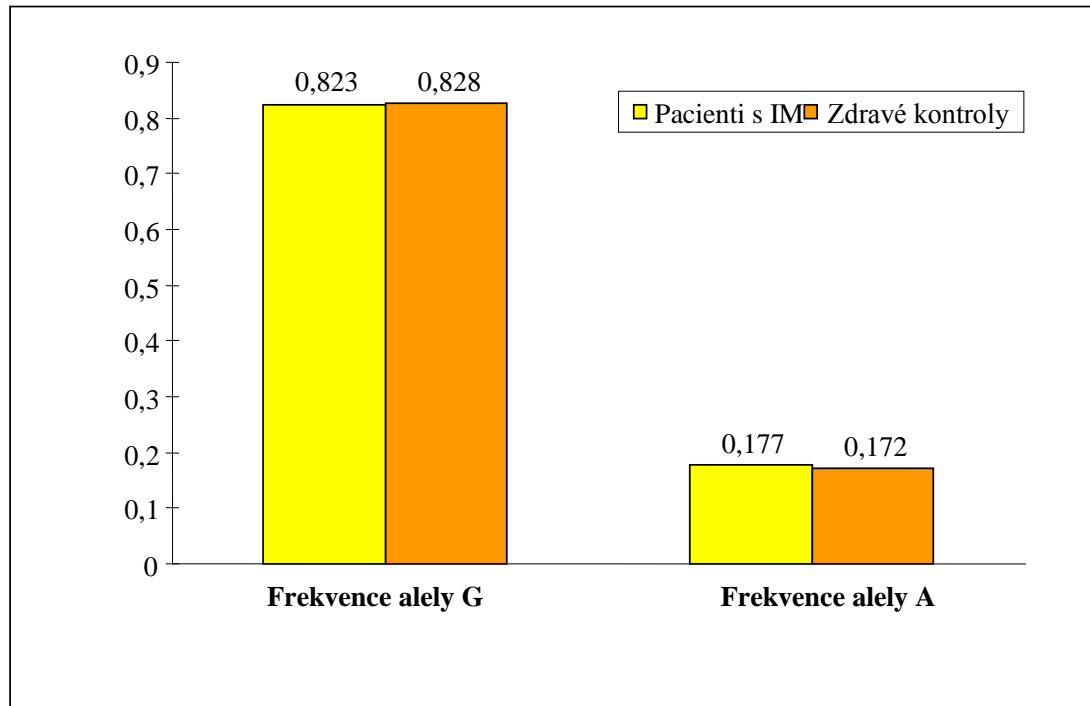
$$p = f(\text{alela A}) = (2 \cdot 9 + 59) / (2 \cdot 217) = \underline{\underline{0,177}}$$

$$p = f(\text{alela G}) = (2 \cdot 149 + 59) / (2 \cdot 217) = \underline{\underline{0,823}}$$

Výpočet alelové frekvence (alely *BDNF* G/A neboli Val66Met) pro kontrolní skupinu:

$$p = f(\text{alela A}) = (2 \cdot 9 + 44) / (2 \cdot 180) = \underline{\underline{0,172}}$$

$$p = f(\text{alela G}) = (2 \cdot 127 + 44) / (2 \cdot 180) = \underline{\underline{0,828}}$$



**Graf 1** Srovnání alelové frekvence polymorfismu *BDNF* Val66Met (G/A) mezi pacienty s IM a kontrolní skupinou.

### Postup při výpočtu fenotypové frekvence

Fenotypová frekvence nebo-li nosičství znamená podíl nosičů dané alely v populaci (bez ohledu na počet této alely v genotypu jedince). Tato frekvence byla v rámci *BDNF* polymorfismu Val66Met vypočtena jako prostý součet všech homozygotů pro danou alelu a všech heterozygotů; součet se poté vydělí počtem všech jedinců studované skupiny (N).

$$f_f = (n_{AA} + n_{Aa}) / N$$

$f_f$  ..... fenotypová frekvence (nosičství)

$n_{AA}$  .... počet homozygotů s danou alelou

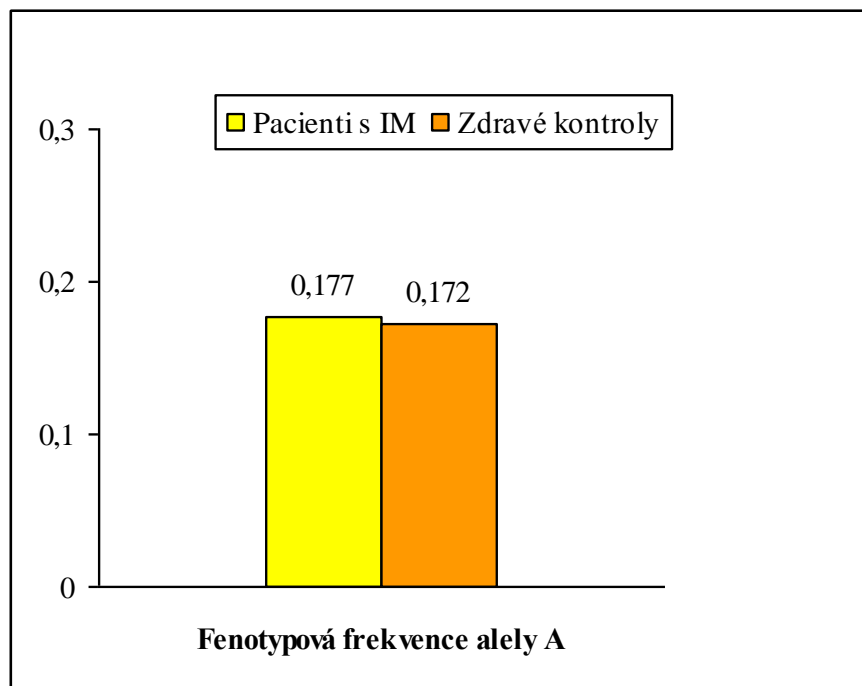
$n_{Aa}$  ..... počet heterozygotů

Výpočet fenotypové frekvence (nosičství) vzácnější alely *BDNF* A (66Met) pro skupinu pacientů s IM:

$$f_f = (9 + 59) / 217 = \underline{\underline{0,313}}$$

Výpočet fenotypové frekvence (nosičství) vzácnější alely *BDNF* A (66Met) pro kontrolní skupinu:

$$f_f = (9 + 44) / 180 = \underline{\underline{0,294}}$$



**Graf 2** Srovnání fenotypové frekvence (nosičství) alely *BDNF* A (66Met) mezi pacienty s IM a kontrolní skupinou.

### Genotypová frekvence

Genotypová frekvence představuje podíl jednotlivých genotypů v populaci. Pro výpočet genotypové frekvence u AA homozygotů platí vzorec:

$$P = f(AA) = \text{počet jedinců s genotypem AA} / \text{celkový počet jedinců N}$$

Pro výpočet genotypové frekvence u GG homozygotů platí vzorec:

$$Q = f(GG) = \text{počet jedinců s genotypem GG} / \text{celkový počet jedinců N}$$

Pro výpočet genotypové frekvence u GA heterozygotů platí vzorec:

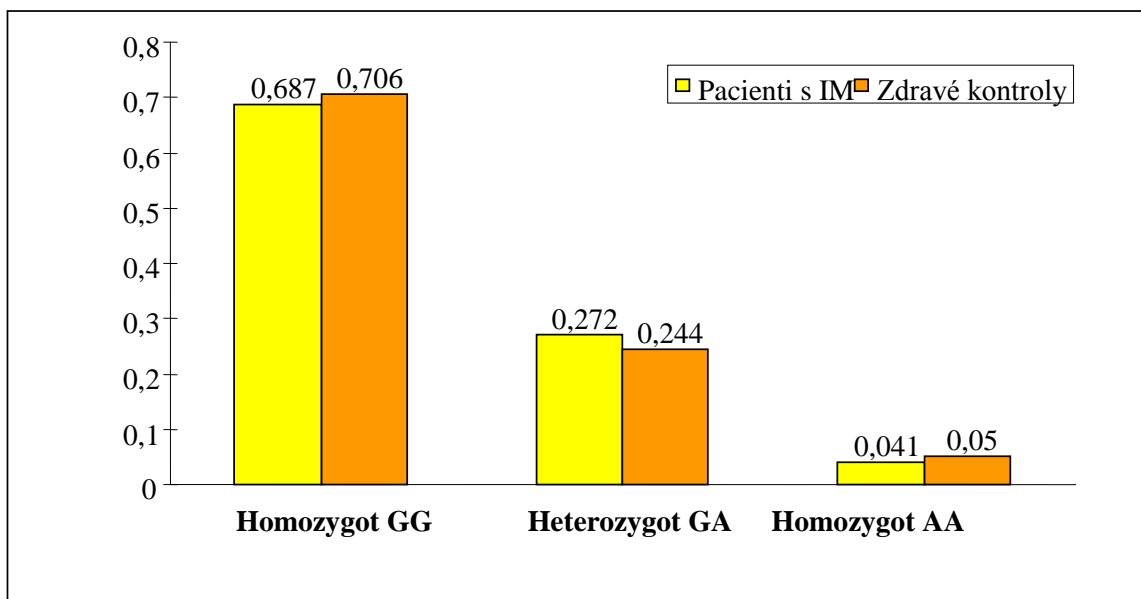
$$H = f(GA) = \text{počet jedinců s genotypem GA} / \text{celkový počet jedinců N}$$

V případě polymorfismu Val66Met genu *BDNF* u pacientů s IM budou výpočty uvedených genotypových frekvencí vypadat následovně:

$$P = f(AA) = 9 / 217 = \underline{0,041}$$

$$Q = f(GG) = 149 / 217 = \underline{0,687}$$

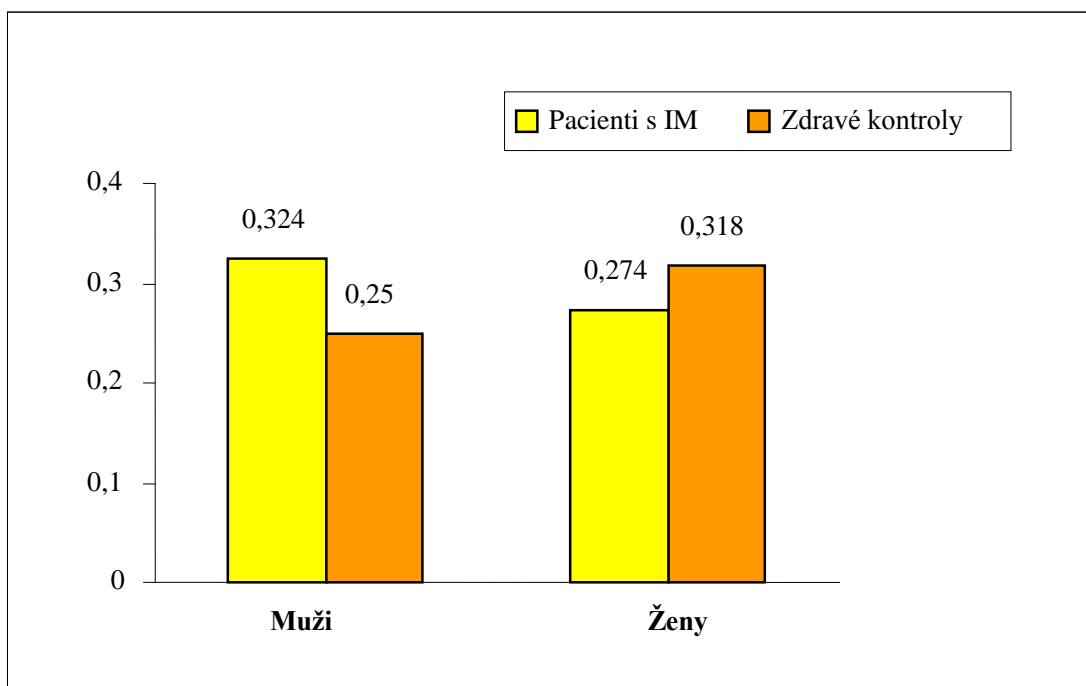
$$H = f(GA) = 59 / 217 = \underline{0,272}$$



**Graf 3** Srovnání genotypových frekvencí polymorfismu *BDNF* Val66Met (G/A) mezi pacienty IM a kontrolní skupinou.

|                | Varianty | Muži          |             | Ženy          |             |
|----------------|----------|---------------|-------------|---------------|-------------|
|                |          | Pacienti s IM | Kontroly    | Pacienti s IM | Kontroly    |
| Počet genotypů | GG       | 125 / 0,676   | 69 / 0,726  | 24 / 0,750    | 58 / 0,682  |
|                | GA       | 54 / 0,292    | 21 / 0,221  | 5 / 0,156     | 23 / 0,271  |
|                | AA       | 6 / 0,032     | 5 / 0,053   | 3 / 0,094     | 4 / 0,047   |
| Počet alel     | G        | 304 / 0,822   | 159 / 0,837 | 53 / 0,828    | 139 / 0,818 |
|                | A        | 66 / 0,178    | 31 / 0,163  | 11 / 0,172    | 31 / 0,182  |
| Počet nosičů   | A        | 60 / 0,324    | 26 / 0,274  | 8 / 0,250     | 27 / 0,318  |

**Tab. 5:** Absolutní a relativní počty (podíl) genotypů, alel a nosičů polymorfismu *BDNF* Val66Met (G/A) u pacientů s manifestací IM a zdravých kontrolních jedinců při odděleném srovnání podle pohlaví. Mezi skupinami nebyly zjištěny statisticky signifikantní rozdíly.



**Graf 4** Porovnání nosičů vzácnější alely *BDNF* A (66Met) u pacientů s infarktem myokardu a kontrolních jedinců zvláště podle pohlaví.

## 5. DISKUZE

Ischemická choroba srdeční (ICHS) patří ke komplexním onemocněním, která jsou ovlivňována jednak vnějšími faktory, ale také genetickou predispozicí. Existuje mnoho studií zabývajících se účastí genetického faktoru na rozvoji ICHS, které byly nedávno obohaceny o nálezy poskytnuté celogenomovými studiemi (GWAS, z angl. genome-wide association studies). (Dandona, Stewart, Roberts, 2010). Přestože GWAS a další studie identifikovaly řadu genových variant asociovaných s ICHS, zůstává genetická složka ICHS stále z větší části nevysvětlena a identifikace dalších genů/genových variant významných při rozvoji ICHS se očekává. (Hamsten, Eriksson, 2008).

Z dřívějších studií existuje řada dokladů, které svědčí pro spojitost mezi růstovým faktorem nervové tkáně *BDNF* a fyziologickými i patofyziologickými procesy v kardiovaskulárním systému. Kromě toho, že byla nalezena souvislost *BDNF* s různými neuropsychiatrickými onemocněními, byla jeho přítomnost a významné funkce objeveny taktéž u kardiovaskulárního systému. Příkladem toho může být studie Ejiri a jeho kolegů (2005), kteří zjistili v přítomnosti *BDNF* zvýšenou koncentraci kyslíkových radikálů a oxidativního stresu, které narušují stabilitu aterosklerotických plátů ve stěně cév. Jak popsali ve své práci, přítomnost *BDNF* byla odhalena také v aterosklerotických cévách. Vědci dále pozorovali působení *BDNF* během poškození a při následných reparačních procesech v kardiovaskulárním systému. Významnou roli *BDNF* při rozvoji srdce odhalil i Donovan a jeho spolupracovníci (2000).

Na tato fakta navazuje práce Jianga et al. (2009). Jedná se vůbec o první studii, která demonstruje spojitost polymorfismu Val66Met genu *BDNF* k ICHS. V této práci autoři zjistili, že frekvence Met/Met homozygotů uvedeného polymorfismu byla u pacientů s nestabilní anginou pectoris výrazně nižší než u pacientů se stabilní anginou pectoris či vyšetřované kontrolní skupiny zdravých jedinců. Závěrem jejich studie byla teze, že genotyp Met/Met má protektivní účinek k rozvoji nestabilní anginy pectoris. Tato studie podnítila zájem o studium variability genu *BDNF* a pokud budou její výsledky ve vztahu k identifikaci rizika pro nestabilní anginu pectoris potvrzeny, mohou být do budoucna velice přínosné. Ve spojení s funkčními studiemi mohou zaměřit pozornost na molekulu *BDNF* jako potenciální molekulární cíl pro vývoj nových preventivních strategií vůči nestabilní angině pectoris.

V návaznosti na uvedené výsledky jsme se v této diplomové práci zajímali o možnou spojitost mezi polymorfismem *BDNF* Val66Met a rozvojem jiné klinické manifestace ICHS, konkrétně infarktu myokardu (IM), v populaci České republiky. Do studie jsme zařadili 217 pacientů s diagnózou infarktu myokardu. Ke srovnání alelových, fenotypových a genotypových frekvencí polymorfismu *BDNF* Val66Met sloužilo 180 vzorků pocházejících od skupiny zdravých kontrolních jedinců. Genotypizace byla u všech jedinců provedena nezávisle dvěma technikami, abychom na minimum omezili riziko genotypizačních chyb, které by mohly ovlivnit výsledky. V souladu s tím odpovídala distribuce genotypů *BDNF* Val66Met ve vyšetřovaných souborech Hardy-Weinbergově rovnováze.

Zjistili jsme, že získané hodnoty alelových frekvencí polymorfismu *BDNF* Val66Met nevykazovaly mezi srovnávanými skupinami pacientů s IM a kontrolních jedinců signifikantní rozdíly. Alelová frekvence pro vzácnější alelu 66Met se u pacientů s IM (17,7 %) téměř rovnala hodnotě ve skupině kontrolních jedinců (17,2 %). Odlišnosti mezi skupinami nebyly zaznamenány ani při srovnání distribuce genotypů Val/Val, Val/Met a Met/Met. Konečně ani nosičství vyšetřovaných alel polymorfismu *BDNF* genu se při srovnávání obou testovaných skupin signifikantně nelišilo (nosičství alely 66Met: IM/kontroly – 31,3 % / 29,4 %).

Na rozdíl od výše zmíněné čínské práce naše studie neposkytuje další důkazy pro uplatnění polymorfismu genu *BDNF* jako rizikového faktoru pro vznik klinických manifestací ICHS. Možná vysvětlení nesouladu mezi výsledky naší studie a práce Jianga a jeho kolegů mohou spočívat v několika oblastech. První a pravděpodobně nejdůležitější je rozdíl ve „fenotypech“, které byly v souvislosti s *BDNF* polymorfismem v obou studiích zkoumány. Přestože jsou IM a nestabilní angina pectoris z hlediska patogenetických mechanismů velmi blízké, jejich genetická složka se může do jisté míry lišit. Dalším možným vysvětlením pro rozdílné výsledky může být výrazný rozdíl v genetickém pozadí mezi čínskou a českou populací. Nejvíce to lze vidět na srovnání frekvence alely *BDNF* 66Met u čínské (49 %) a české (17 %) populace. V případě čínské studie nelze vyloučit ani možnost, že je *BDNF* Val66Met varianta ve vazebné nerovnováze s hypotetickou kauzální variantou pro nestabilní anginu pectoris; tento vztah nemusí být přítomen v české populaci.

Vzhledem k nižšímu počtu případů (pacientů) a kontrolních jedinců ve srovnání s originální čínskou prací, disponovala naše práce nižší statistickou silou k detekci možné asociace variant *BDNF* genu s infarktem myokardu, což může být považováno za určité



omezení. V této souvislosti je ale důležité připomenout nedávnou práci z italské populace, která popsala opačnou (ve srovnání s původní čínskou prací) asociaci *BDNF* 66Met/Met genotypu s vnímavostí ke koronární ateroskleróze u žen. (Bozzini 2009). Závěry této italské práce byly ale založeny na vyšetření dvanácti pacientek se stenózou koronárních tepen, a proto musí být brány s velkou rezervou a vyžadují ověření na větších skupinách. Také v naší studii proběhla subanalýza, kde se hledala možná spojitost mezi Val66Met polymorfismem a infarktem myokardu zvláště u obou pohlaví. Ani zde nebyl objeven výraznější rozdíl mezi srovnávanými skupinami pacientů s IM a kontrolami.

## ZÁVĚR

Podle našich znalostí je tato naše studie vůbec první, která se přímo zaměřila na souvislost mezi polymorfismem Val66Met genu *BDNF* a infarktem myokardu. K tomuto cíli využila genetickou asociační studii na dostatečně velkých skupinách pacientů s infarktem myokardu a zdravých kontrolních jedinců, kteří byli na uvedený polymorfismus genotypizováni dvěma nezávislými metodami. Závěrem lze konstatovat, že souvislost mezi *BDNF* polymorfismem Val66Met a onemocněním infarktem myokardu nebyla prokázána. V české populaci se tedy uvedený polymorfismus pravděpodobně na genetické složce infarktu významněji nepodílí. Výsledky této práce, které lze považovat za významný dílčí příspěvek ve studiu dědičné podmíněnosti ICHS, byly publikovány v časopise s impakt faktorem. Dosavadní nesourodé výsledky z etnicky odlišných populací vyžadují další úsilí v objasnění skutečné role neurotrofinu *BDNF* v patogenezi ischemické choroby srdeční.

## **SEZNAMY**

### **SEZNAM ZKRATEK**

A. – adenin

AP – angina pectoris

BDNF – brain derived neurotrophic factor

BMI – body mass index , index tělesné hmotnosti

C – cytosin

CHD – coronary heart disease

CMP cévní mozková příhoda

dATP – deoxyadenosintrifosfát

dCTP – deoxycytidintrifosfát

dGTP – deoxyguanidintrifosfát

DM – diabetes mellitus

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxyribonukleodtrifosfáty

dsDNA – dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina

dTTP – deoxythimidintrifosfát

ELFO – elektroforéza

EtBr – ethidium bromid

G – guanin

IDL – intermedial density lipoproteins

ICHS – ischemická choroba srdeční

IM – infarkt myokardu

KVO – kardiovaskulární onemocnění

LDL – low density lipoproteins

Met – methionin

MI – myocardial infarction

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

nt3 – neurotrofin-3

nt4/5 – neurotrofin-4/5

NGF – nerve growth factor, nervový růstový hormon

NK – nukleová kyselina

NT – růstové nervové faktory, neurotrofiny

PCR – polymerase chain reaction

PCR – SSP – polymerase chain reaction with sequence specific primers

RT-PCR – real-time polymerase chain reaction

SNP – single nucleotide polymorphism

ssDNA – jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina

TK – krevní tlak

T<sub>m</sub> – melting temperature, teplota tání

Trk – tropomyosin-related kinase, receptor tyrosin kinázy

ÚZIS – Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR

VLDL – very low density lipoproteins

Val – valin

## SEZNAM TABULEK

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tab. 1</b> Rozpis na přípravu „fototypového míchání“ pro různé počty typizací.....  | <b>56</b> |
| <b>Tab. 2</b> Rozpis na přípravu reakční směsi .....   | <b>62</b> |
| <b>Tab. 3</b> Absolutní počty zjištěných genotypů, alel a nosičů polymorfismu BDNF rs6265 G/A (Val66Met) ve skupinách pacientů s IM a kontrolních jedinců.....   | <b>65</b> |
| <b>Tab. 4</b> Srovnání alelové, fenotypové a genotypové frekvence polymorfismu Val66Met genu BDNF u pacientů s IM a kontrolní skupiny.....   | <b>66</b> |
| <b>Tab. 5</b> Absolutní a relativní počty (podíl) genotypů, alel a nosičů polymorfismu BDNF Val66Met (G/A) u pacientů s manifestací IM a zdravých kontrolních jedinců při odděleném srovnání podle pohlaví. .... | <b>69</b> |

## SEZNAM OBRÁZKŮ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Obr. 1</b> Stavba cévy .....  | <b>14</b> |
| <b>Obr. 2</b> Aterogeneze .....  | <b>18</b> |
| <b>Obr. 3</b> Jednonukleotidový polymorfismus .....  | <b>33</b> |
| <b>Obr. 4</b> Lidský 11. chromozom s polymorfismem Val66Met genu BDNF .....                                    | <b>35</b> |
| <b>Obr. 5</b> Rozvržení experimentu .....  | <b>42</b> |
| <b>Obr. 6</b> Zjednodušené schéma protokolu mikroizolace DNA na kolonce .....                                  | <b>46</b> |
| <b>Obr. 7</b> Zjednodušené schéma izolace DNA pomocí vysolovací techniky.....                                  | <b>49</b> |
| <b>Obr. 8</b> Princip metody PCR-SSP. ....   | <b>54</b> |
| <b>Obr. 9</b> Příklad interpretace genotypizace polymorfismu BDNF rs6265 G/A (Val66Met) metodou PCR-SSP.....   | <b>63</b> |
| <b>Obr. 10</b> Genotypizace jednonukleotidového polymorfismu BDNF rs6265 G/A pomocí RT-PCR (TaqMan Assay)..... | <b>64</b> |

## SEZNAM GRAFŮ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Graf 1</b> Srovnání alelové frekvence polymorfismu BDNF Val66Met (G/A) mezi pacienty s IM a kontrolní skupinou.....                         | <b>67</b> |
| <b>Graf 2</b> Srovnání fenotypové frekvence (nosičství) alely <i>BDNF</i> A (66Met) mezi pacienty s IM a kontrolní skupinou.....               | <b>68</b> |
| <b>Graf 3</b> Srovnání genotypových frekvencí polymorfismu <i>BDNF</i> Val66Met (G/A) mezi pacienty IM a kontrolní skupinou.....               | <b>69</b> |
| <b>Graf 4</b> Porovnání nosičů vzácnější alely BDNF A (66Met) u pacientů s infarktem myokardu a kontrolních jedinců zvlášť podle pohlaví. .... | <b>70</b> |

## POUŽITÁ LITERATURA

ASCHERMANN, M.; VESELKA, J. *Trendy soudobé kardiologie*. 1. vyd. Sv.3. Praha : Galén, 2001. 168 s. ISBN 80-7262-087-8.

BOZZINI, S. et al. Coronary artery disease and depression: possible role of brain-derived neurotrophic factor and serotonin transporter gene polymorphisms. *International Journal of Molecular Medicine*, 2009, vol. 24, no. 6, p. 813-818.

CIFKOVÁ, R. et al. Prevalence základních kardiovaskulárních rizikových faktorů v české populaci v letech 2006-2009. Studie Czech post-MONICA. *Cor et Vasa*, 2011, sv. 53, č. 4-5, s. 220-229. ISSN 0010-8650.

DANDONA S, STEWART A. F., ROBERTS R. Genomics in coronary artery disease: past, present and future. *Canadian Journal of Cardiology*, 2010; no. 26, p. 56-59.

DANZIG, V. et al. Pokles fyzické aktivity. In *Ischemická choroba srdeční u diabetiků*. Praha : MAXDORF, 2006a. Kapitola 5.3, s. 89. ISBN 80-7345-079-8.

DANZIG, V. et al. Stoupající výskyt obezity. In *Ischemická choroba srdeční u diabetiků*. Praha : MAXDORF, 2006b. Kapitola 5.1.1, s. 74. ISBN 80-7345-079-8.

DANZIG, V. et al. Rizikové faktory obezity. In *Ischemická choroba srdeční u diabetiků*. Praha : MAXDORF, 2006c. Kapitola 5.1.3, s. 75-77. ISBN 80-7345-079-8.

DANZIG, V. Obezita. In *Ischemická choroba srdeční u diabetiků*. Praha : MAXDORF, 2006a. Kapitola 5.1, s. 73. ISBN 80-7345-079-8.

DANZIG, V. Arytmická forma ICHS. In *Ischemická choroba srdeční u diabetiků*. Praha : MAXDORF, 2006b. Kapitola 10.5, s. 135. ISBN 80-7345-079-8.

HANZLOVÁ, J.; HEMZA, J. *Základy anatomie soustavy dýchací, srdečně cévní, lymfatického systému, kůže a jejich derivátů III*. 1. vyd. Brno : Masarykova univerzita, 2007. 121 s. ISBN 978-80-210-4360-2.

HLINOMAZ, O. Akutní koronární syndromy. In *Ischemická choroba srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing a.s., 2003. Kapitola 3.2, s. 160–202. ISBN 80-247-0500-1.

HOLASOVÁ, Š.; RADILOVÁ, H.; BUNČEK, M. *Praktická cvičení z molekulární genetiky*. 1.vyd. Praha : Univerzita Karlova v Praze, 2006. 47 s. ISBN 80-246-1072-8.

HRADEC, J.; BÝMA, S. *Ischemická choroba srdeční : Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře*. Praha : Společnost všeobecného lékařství ČSL JEP, 2007. 14 s. ISBN 80-86998-14-2.

HUBÁČEK, J.A. Molekulární genetik hyperlipoproteinemií, diagnostické možnosti a eventuální použití v praxi. *Kardioforum*, 2006, roč. 4, č. 4, s. 30–31.

CHALOUPKA, V. Fyzická aktivita. In *Epidemiologie a prevence ischemické choroby srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001. Kapitola 2.2.4, s. 58–71. ISBN 80-247-0085-9.

CHALOUPKA, V. Primární a sekundární prevence. In *Ischemická choroba srdeční*. Praha : Grada Publishing a.s., 2003. Kapitola 5.1, s. 323–333. ISBN 80-247-0500-1.



JIANG, H. et al. *BDNF* Val66Met polymorphism is associated with unstable angina. *Clinica Chimica Acta*. 2009, vol. 400, no. 1-2, p. 3–7.

JOKL, I. *Vývoj kardiovaskulární mortality v ČR po roce 1990 : atestační práce*. Praha : Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, škola veřejného zdravotnictví, 2005. 45 s.

KNOLL, A; VYKOUKALOVÁ, Z. *Molekulární genetika zvířat (Metody detekce polymorfizmů DNA genů)*. 1. vyd. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2002. 168 s. 80–7157-616-6.

KRUSE, N. et al. Differential expression of *BDNF* mRNA splice variants in mouse brain and immune cells. *Journal of Neuroimmunology*, 2007, vol. 182, no. 1-2, p. 13–21.

MANDOVEC, A. *Kardiovaskulární choroby u žen*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, a.s., 2008. 136 s. ISBN 978-80-247-2807-0.

MORENO, P.; BERNARDI, V.; LOPEZ-CUELLAR et al. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation*, 1996, vol. 94, p. 3090–3097.

MUSUNURU, K.; KATHIRESAN, S. Genetics of coronary artery disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2010, vol. 11, p. 91–108.

NUSSBAUM, R. L. et al. *Klinická genetika : Thompon & Thompson*. 6. vyd. Praha : Triton, 2004. 426 s. ISBN 80-7254-475-6.

PÍŤHA, J. et al. Endoteliální dysfunkce a její hodnocení. *Cor et Vasa*, 2001, sv. 43, č. 9, s.452–456. ISSN 0010-8650.

POLEDNE, R. Genetické faktory. In *Epidemiologie a prevence ischemické choroby srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001. Kapitola 2.4.3, s. 146–155. ISBN 80-247-0085-9.

PRŮŠA, R; MACEK, M. ml. Single nukleotide polymorphisms. In *Laboratorní diagnostika*. Praha : Galén : Karolinum, 2007. Kapitola 32.12.2, s. 694. ISBN 978-80-372-3 (Galén), 978-80-246-1423-6 (Karolinum).

QIAamp® DNA mini kit and QIAamp DNA blood mini kit handbook. QIAGEN. 2003. p. 66.

ROHOŇ, P. et al. *Molekulární biologie v hematoonkologii – od základních vyšetřovacích metod ke klinické praxi*. 1. vyd. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. s.127. ISBN 978-80-244-2224-4.

ROSOLOVÁ, H. Obezita. In *Epidemiologie a prevence ischemické choroby srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001a. Kapitola 2.2.5, s. 71–78. ISBN 80-247-0085-9.

ROSOLOVÁ, H. Krevní tlak a arteriální hypertenze. In *Epidemiologie a prevence ischemické choroby srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001b. Kapitola 2.3.1, s. 79–89. ISBN 80-247-0085-9.

SEMRÁD, B. Náhlá srdeční smrt. In *Ischemická choroba srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing a.s., 2003. Kapitola 3.5, s. 225–230. ISBN 80-247-0500-1.

SEMRÁD, B.; KOZÁK, M. Komorová arytmie – maligní arytmie. In *Ischemická choroba srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing a.s., 2003. Kapitola 3.4, s. 216–224. ISBN 80-247-0500-1.

SOŠKA, V. Ateroskleróza. In *Ischemická choroba srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing a.s., 2003. Kapitola 1.1, s. 19–45. ISBN 80-247-0500-1.

SOUČEK, M. Hypertenze a ischemická choroba srdeční. In *Ischemická choroba srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing a.s., 2003. Kapitola 3.7, s. 264–270. ISBN 80-247-0500-1.

ŠIMKOVÁ, R. Epidemiologie diabetu a kardiovaskulárních onemocnění. In *Ischemická choroba srdeční u diabetiků*. Praha : MAXDORF, 2006a. Kapitola 2. s. 26–28. ISBN 80-7345-079-8.

ŠIMKOVÁ, R. Genetické faktory. In *Ischemická choroba srdeční u diabetiků*. Praha : MAXDORF, 2006b. Kapitola 5.5, s. 90 – 91. ISBN 80-7345-079-8.

ŠIMON, J. Nutrice. In *Epidemiologie a prevence ischemické choroby srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001a. Kapitola 2.2.1, s. 43–50. ISBN 80-247-0085-9.

ŠIMON, J. Kouření. In *Epidemiologie a prevence ischemické choroby srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001b. Kapitola 2.2.2, s. 50–54. ISBN 80-247-0085-9.

ŠIMON, J. Alkohol. In *Epidemiologie a prevence ischemické choroby srdeční*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001c. Kapitola 2.2.3, s. 54–58. ISBN 80-247-0085-9.

ŠIMON, J. Psychosociální faktory. In *Epidemiologie a prevence ischemické choroby srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001d. Kapitola 2.4.2, s. 141–146. ISBN 80-247-0085-9.

ŠIMON, J. Koncepce rizika: interakce genetického pozadí a obecných zdrojů chorob. In *Epidemiologie a prevence ischemické choroby srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001e. Kapitola 2.1, s. 39–43. ISBN 80-247-0085-9.

ŠPÁČ, J. Angina pectoris a němá ischemie. In *Ischemická choroba srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing a.s., 2003. Kapitola 3.1, s. 139–159. ISBN 80-247-0500-1.

ŠPAČEK, R. Srdce a kouření. *Cor et Vasa*, 2001, sv. 43, č. 10, s. 505–511. ISSN 0010-8650.

ŠPAČEK, R. Definice infarktu myokardu. In *Infarkt myokardu*. 1. vyd. Praha : Galén, 2003a. Kapitola 1.1, s. 13–14. ISBN 80-7262-197-1.

ŠPAČEK, R. Etiologie, patofyziologie a patologie infarktu myokardu. In *Infarkt myokardu*. 1. vyd. Praha : Galén, 2003b. Kapitola 2., s. 22–38. ISBN 80-7262-197-1.

LIUBA, P.; KARNANI, P.; PESONEN, E. et al. Endothelial dysfunction after repeated Chlamydia pneumoniae infection in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*, 2000, vol. 102, no. 9, p. 1039–1044.

ŠPINAR, J. Ischemická choroba srdeční – definice a dělení. In *Ischemická choroba srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing a.s., 2003. Kapitola 2., s. 46–48. ISBN 80-247-0500-1.

ŠPINAR, J; VÍTOVEC, J. Chronické srdeční selhání. In *Ischemická choroba srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing a.s., 2003. Kapitola 3.6, s. 231–263. ISBN 80-247-0500-1.

ŠPÍŠEK, R. Metody molekulární biologie. In *Výšetřovací metody v imunologii*. 2. vyd. Praha : Grada Publishing a.s., 2011. Kapitola 2.3, s. 84–91. ISBN 978-80-247-3533-7.

ŠTULC, T. Aterogeneze a její patogenetické mechanizmy. *Kardioforum*, 2006, roč. 4, č. 4, s. 14–15.

HANSSON, G.; LIBBY, P.; SCHONBECK, U. et al. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation Research*, 2002, vol. 91, p. 281–291.

VAVERKOVÁ, H. Plazmatické lipidy. In *Epidemiologie a prevence ischemické choroby srdeční*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001. Kapitola 2.3.2 s. 89–108. ISBN 80-247-0085-9.

VESELKA, J. *Ischemická choroba srdeční*. 1. vyd. Brno : Facta Medica, 2009. 43s. ISBN 978-80-904260-4-7.

### **Internetové zdroje**

BERECKI-GISOLF, J. et al. Angina symptoms are associated with mortality in older women with ischemic heart disease. *Circulation*. [online]. November 2009, vol. 120, no. 23, p. 2330-2336. [cit. 2012-02-10]. Dostupný z internetu: <<http://circ.ahajournals.org/cgi/reprint/120/23/2330>>. ISSN 1524-4539.

BIBEL, M.; BARDE, Y.A. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & Development*. [online]. 2000, vol. 14, p. 2919-2937. [cit. 2012-03-3]. Dostupný z internetu: <<http://genesdev.cshlp.org/content/14/23/2919.full.pdf>>.

BINDER, D. K.; SCHARFMAN, H. E. Brain-derived neurotrophic factor. *growth factor*. [online]. September 2004, vol. 22, no. 3, p. 123–131. [cit. 2012-02-7]. Dostupný z internetu: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2504526/>>.

CAPORALI, A.; EMANUELI, C. Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiological Reviews*. [online]. January 2009, vol. 89, no. 1, p. 279–308. [cit. 2012-04-01]. Dostupný z internetu: <<http://physrev.physiology.org/content/89/1/279.full.pdf+html>>.

CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors : a konvergence poin for many signalling pathways. *Nature Reviews Neuroscience*. [online]. April 2003, vol. 4, p. 299–309. [2012-03-08]. Dostupné na internetu: <[http://chrisbarnes.blogharbor.com/\\_attachments/2402192/neurotrphins.pdf](http://chrisbarnes.blogharbor.com/_attachments/2402192/neurotrphins.pdf)>.

CHAO, M.V.; RAJAGOPAL, R.; LEE, F.S. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clinical Science*. [online]. 2006, vol. 110, p. 167–173. [cit. 2012-03-3]. Dostupný z internetu: <<http://www.clinsci.org/cs/110/0167/1100167.pdf>>.

CIFKOVÁ, R. Hypertenze a ischemická choroba srdeční. *Kapitoly z kardiologie*. [online]. 2011, roč. 3, č. 2. [cit. 2011-06-20]. Dostupný z internetu: <<http://www.tribune.cz/tituly/kzk/archiv/429>>.

DONGQING, C. et al. *BDNF*-mediated enhancement of inflammation and injury in the aging heart. *Physiological Genomics*. [online]. February 2006, vol. 24, no. 3, p. 191–197. [cit. 2012-04-02]. Dostupný z internetu: <<http://physiolgenomics.physiology.org/content/24/3/191.full.pdf+html>>.

DONOVAN, M. J. et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development*. [online]. November

2000, vol. 127, no. 21, p. 4531–4540. [cit. 2012-03-25]. Dostupný z internetu: <<http://dev.biologists.org/content/127/21/4531.long>>.

EGAN, M. F. et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*. [online]. January 2003, vol. 112, p. 257–269. [2012-03-14]. Dostupné na internetu: <[http://ac.els-cdn.com/S0092867403000357/1-s2.0-S0092867403000357-main.pdf?\\_tid=c100c2db978e9021d71cdc06a5f9bb1a&acdnat=1344201015\\_6c3ebe528fa89265cc9c2ed5a5dff94c](http://ac.els-cdn.com/S0092867403000357/1-s2.0-S0092867403000357-main.pdf?_tid=c100c2db978e9021d71cdc06a5f9bb1a&acdnat=1344201015_6c3ebe528fa89265cc9c2ed5a5dff94c)>.

EJIRI, J. et al. Possible role of brain-derived neurotrophic factor in the pathogenesis of coronary artery disease. *Circulation*. [online]. October 2005, vol. 112, no. 14, p. 2114–2120. [cit. 2012-04-02]. Dostupný z internetu: <<http://circ.ahajournals.org/content/112/14/2114.full.pdf>>.

*Evropské výběrové šetření o zdraví v České republice EHIS 2008*. Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky. [online]. Praha: ÚZIS ČR, duben 2011.[cit. 2011-06-27]. Dostupný z internetu:< <http://www.uzis.cz> >. ISBN 978-80-7280-916-5.

HALL, D. *A Single Nucleotide Polymorphism is a change of a nucleotide at a single base-pair location on DNA*. [online]. July, 2007. [cit. 2011-08-05]. Dostupný z internetu: <<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Dna-SNP.svg>>.

HAMSTEN, A.; ERIKSSON, P. Identifying the susceptibility genes for coronary artery disease: from hyperbole through doubt to cautious optimism. *Journal of Internal Medicine*. [online]. May 2008, vol. 263, no. 5, p. 538–552. [cit. 2012-07-24]. Dostupný z internetu: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2796.2008.01958.x/pdf>>.

HARIRI, A. R. et al. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *The*

*Journal of Neuroscience*. [online]. July 2003, vol. 23, no 17, p. 6690–6694. [2012-03-14]. Dostupné na internetu: < <http://www.jneurosci.org/content/23/17/6690.full.pdf>>.

HASHIMOTO, K. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders an historical overview and future directions. *Psychiatry and Clinical Neuroscience*. [online]. August 2010, vol. 64, n. 4, p. 341-445. [cit. 2012-06-30]. Dostupný z internetu: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-1819.2010.02113.x/pdf> >.

HO, B-CH et al. Association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and progressive brain volume changes in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*. [online]. December 2007, vol. 164, n. 12, p. 1890-1899. [cit. 2012-07-09]. Dostupný z internetu: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3062255/pdf/nihms-68120.pdf12> >.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L.F. Neurotrophins : Roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience*. [online]. March 2001, vol. 24, p. 677–736. [2012-03-05]. Dostupný z internetu: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2758233/?tool=pubmed>>.

JANOTA, T. Akutní infarkt myokardu u žen. *Kardiologická revue*. [online]. 2006, č. 4. [cit. 2011-07-26]. Dostupný z internetu: < [http://www.kardiologickarevue.cz/pdf/kr\\_06\\_04\\_08.pdf](http://www.kardiologickarevue.cz/pdf/kr_06_04_08.pdf)>.

JEFFREY, R. P. et al. Imaging genetics of brain longevity and mental wellnes : the next frontier? *Radiology*. [online]. 2008, vol. 246, no. 1. [cit. 2012-04-26]. Dostupný z internetu: < <http://radiology.rsna.org/content/246/1/20.full.pdf+html>>.

JIRMANOVÁ, T. *Artérie svalového typu*. [online]. listopad, 2010. [cit. 2011-07-26]. Dostupný z internetu: <<http://www.wikiskripta.eu/index.php/C%C3%A9vy>>.



KIM, S.; MISRA, A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *The Annual Review of Biomedical Engineering*. [online]. 2007, vol. 9, p. 289-320. [cit. 2012-06-28]. Dostupný z internetu:

<<ftp://fileserv.itb.cnr.it/acalabria/PhD/Materiale/DataQuality/Kim%202006%20-%20SNP%20Genotyping%20Technologies%20and%20Biomedical%20Applications.pdf>>.

KRAEMER, R. et al. Decreased neurotrophin TrkB receptor expression reduces lesion size in the apolipoprotein E-null mutant mouse. *Circulation*. [online]. 2005, vol. 112, no. 23, p. 3644-3653. [cit. 2012-07-14]. Dostupný z internetu:

<<http://circ.ahajournals.org/content/112/23/3644.full.pdf+html>>.

KŘIVAN, L. Náhlá srdeční smrt : jak jí předcházet. *Kardiologická revue*. [online]. 2006, č. 1. [cit. 2011-07-25]. Dostupný z internetu:

<[http://www.kardiologickarevue.cz/pdf/kr\\_06\\_01\\_03.pdf](http://www.kardiologickarevue.cz/pdf/kr_06_01_03.pdf)>.

KUBIŠTOVÁ, Z.; MRÁZEK, F.; PETŘEK, M. Polymorphisms of the immune response genes : selected biological, methodical and medical aspects. *Biomedical Papers*. [online]. April 2009, vol. 153, no. 2, p. 93–102. [cit. 2012-07-24]. Dostupný z internetu:

<<http://mefanet.upol.cz/BP/2009/2/93.pdf>>

LESSMANN, V.; GOTTMANN, K.; MALCANGIO, M. Neurotrophin secretion : current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology*. [online]. 2003, vol. 69, p. 341-374. [2012-02-24]. Dostupné z internetu:

<<http://physiologie.uni-mainz.de/physio/luhmann/099.pdf>>.

LU, B. *BDNF* and activity-dependent synaptic modulation. *Learning & Memory*. [online]. 2003, vol. 10, p. 86–98. [cit. 2012-03-3]. Dostupný z internetu:

<<http://learnmem.cshlp.org/content/10/2/86.full.pdf+html>>.

MATARIN, M. et al. Whole genome analyse suggest ischemic stroke and heart disease share an association with polymorphisms on chromosome 9p21. *Stroke*. [online]. June 2008, vol. 39, p. 1586-1589. [cit. 2012-06-28]. Dostupný z internetu:

<<http://stroke.ahajournals.org/content/39/5/1586.full.pdf>>.

MALBERG, J. E. et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. [online]. December 2000, vol. 20, no. 24, p. 9104–9110. [2012-03-16]. Dostupné na internetu:

<<http://www.jneurosci.org/content/20/24/9104.full.pdf>>.

Myocardial infarction redefined – A consensus dokument of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *European Heart Journal*. [online]. September 2000, vol. 21, no. 18, p. 1502–1513. [cit. 2012-07-18]. Dostupný z internetu:

<<http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/21/18/1502.full.pdf+html>>. Podívat, zda se takto cituje

NEVES-PEREIRA, M. et al. The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder : evidence from a family-based association study. *The American Journal of Human Genetics*. [online]. September 2002, vol. 71, no. 3, p. 651–655. [cit. 2012-03-23]. Dostupný z internetu:

<[http://ac.els-cdn.com/S0002929707603462/1-s2.0-S0002929707603462-main.pdf?\\_tid=c65ec7b11d6d7ae0bc8f4a247fdded29e&acdnat=1332519469\\_d7fe1cc7e6cc51d8c93ccc3371805e9a](http://ac.els-cdn.com/S0002929707603462/1-s2.0-S0002929707603462-main.pdf?_tid=c65ec7b11d6d7ae0bc8f4a247fdded29e&acdnat=1332519469_d7fe1cc7e6cc51d8c93ccc3371805e9a)>.

OUWEHAND, W. H. The discovery of genes implicated in myocardial infarction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. [online]. 2009, vol. 7, suppl. 1, p. 305–307. [cit. 2012-07-24]. Dostupný z internetu: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1538-7836.2009.03441.x/pdf>>.

PETRELLA, J. R.; MATTAY, V. S.; DORAISWAMY, P. M. Imaging genetics of brain longevity and mental wellness : the next frontier? *Radiology*. [online]. January 2008, vol. 246, p. 20-32. [cit. 2012-07-02]. Dostupné z internetu: <<http://radiology.rsna.org/content/246/1/20.full.pdf+html>>.

PIDRMAN, V. Deprese u kardiovaskulárního onemocnění. *Kardiologická revue* [online]. 2007, č. 4 [cit. 2011-07-28]. Dostupný z internetu: <[http://www.kardiologickarevue.cz/pdf/kr\\_07\\_04\\_05.pdf](http://www.kardiologickarevue.cz/pdf/kr_07_04_05.pdf)>.

POO, M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Reviews Neuroscience*. [online]. January 2001, vol. 2, no. 1, p. 24–32. [2012-03-19]. Dostupné z internetu: <<http://www.cingulate.ibms.sinica.edu.tw/ftpshare/Protocol/Internet%20Resources/Nature%20Review%20Neuroscience/Subjects/Neuron,%20dendrite,%20synapse,%20plasticity/Neurotrophins%20as%20synaptic%20modulators.pdf>>.

PRUUNSILD, P. et al. Dissecting the human *BDNF* locus : Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics*. [online]. September 2007, vol. 90, no. 3, p. 397–406. [cit. 2012-01-4]. Dostupný z internetu: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2568880/>>.

QIN, L. et al. Genetic variant of *BDNF* (Val66Met) polymorphism attenuates stroke-induced angiogenic responses by enhancing anti-angiogenic mediator CD36 expression. *The Journal of Neuroscience*. [online]. January 2011, vol. 31, no. 2, p. 775–783. [cit. 2012-03-29]. Dostupný z internetu: <<http://www.jneurosci.org/content/31/2/775.full.pdf+html>>.

SASAKI, T. et al. Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in male pediatric patients with depression. *The Open Clinical Chemistry Journal*. [online]. 2011, vol. 4, p. 28–33. [cit. 2012-07-01]. Dostupný z internetu: <<http://benthamscience.com/open/tocchemj/articles/V004/28TOCCHEMJ.pdf>>.

SEN, S. et al. A *BDNF* coding variant is associated with the NEO personality inventory domain neuroticism, a risk factor for depression. *Neuropsychopharmacology*. [online]. February 2003, vol. 28, p. 397–401. [2012-03-14]. Dostupné na internetu: <<http://www.nature.com/npp/journal/v28/n2/pdf/1300053a.pdf>>.

ŠAMÁNEK, M.; URBANOVÁ, Z. Dvě tváře alkoholu – Odvrácená tvář. *Kapitoly z kardiologie pro praktické lékaře*. [online]. 2009, č. 1. [cit. 2012-01-18]. Dostupný z internetu: <<http://www.tribune.cz/clanek/14365-dve-tvare-alkoholu-odvracena-tvar>>.

The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. [online]. 2007, vol. 447, no. 7145, p. 661–678. [cit. 2012-07-24]. Dostupný z internetu: <<http://www.nature.com/nature/journal/v447/n7145/pdf/nature05911.pdf>>.

TYLER, W. J. et al. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learning & Memory*. [online]. September 2002, vol. 9, no. 5, p. 224–237. [cit. 2012-03-17]. Dostupný z internetu: <<http://learnmem.cshlp.org/content/9/5/224.full.pdf+html>>.

VLÁŠKOVÁ, H.; TREŠLOVÁ, H. Izolce DNA. In *Sborník textů : Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice*. [online]. Praha : Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha, 2008. s. 50. [cit. 2012-07-26]. Dostupný z internetu: <[http://www.udmp.cz/elearning/sborniky\\_files/cytogen.pdf](http://www.udmp.cz/elearning/sborniky_files/cytogen.pdf)>.

WIDIMSKÝ, J. jr. et al. Doporučení diagnostických a léčebných postupů u arteriální hypertenze – verze 2007. *Vnitřní lékařství*. [online]. 2011, č. 1. [cit. 2011-06-20]. Dostupný z internetu: <[http://www.vnitrnilekarstvi.cz/pdf/vl\\_08\\_01\\_16.pdf](http://www.vnitrnilekarstvi.cz/pdf/vl_08_01_16.pdf)>.

XU, X. et al. Family-based association study between brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder in UK and Taiwanese

samples. *American Journal of Medical Genetics Part B : Neuropsychiatric Genetics*. [online]. January 2007, vol. 144B, no. 1, p. 1–128. [cit. 2012-03-20]. Dostupný z internetu: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.b.30406/pdf>>.

YAMADA, Y. et al. prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *The New England Journal of Medicine*. [online]. 2002, vol. 347, no. 24. [cit. 2012-01-20]. Dostupný z internetu: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa021445#t=articleTop>>.

YAMADA, Y.; ICHIHARA, S.; NISHIDA, T. *Molecular Genetics of Myocardial Infarction*. [online]. PubMed, 14th August 2008. [cit. 2011-07-20]. Dostupný z internetu: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2518661/pdf/11568\\_2008\\_Article\\_9025.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2518661/pdf/11568_2008_Article_9025.pdf)>.

YE, S. et al. Association of genetic variation on chromosome 9p21 with susceptibility and progression of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. [online]. 2008, vol. 52, no. 5, p. 378-384. [cit. 2012-06-28]. Dostupný z internetu: <<http://content.onlinejacc.org/cgi/reprint/52/5/378.pdf>>.

YOSHIDA, T. et al. Serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) and its precursor pro *BDNF* in healthy subjects. *The Open Clinical Chemistry Journal*. [online]. 2012, vol. 5, p. 7-12. [cit. 2012-06-30]. Dostupný z internetu: <<http://benthamscience.com/open/tocchemj/articles/V005/7TOCCHEMJ.pdf>>.

YU, H. et al. Variant *BDNF* Val66Met polymorphism affects extinction of conditioned aversive memory. *The Journal of Neuroscience*. [online]. April 2009, vol. 29, no. 13, p. 4056–4064. [2012-03-19]. Dostupné na internetu: <<http://www.jneurosci.org/content/29/13/4056.full.pdf+html>>.

ZAJÍČEK, P. Alkoholem indukovaná srdeční selhání. *Kardiologické revue*. [online]. 2004, č. 1. [cit. 2011-07-20]. Dostupný z internetu:

<[http://www.kardiologickarevue.cz/pdf/kr\\_04\\_01\\_07.pdf](http://www.kardiologickarevue.cz/pdf/kr_04_01_07.pdf)>.

*Zdravotnická ročenka České republiky 2009*. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. [online]. Praha: ÚZIS ČR, prosinec 2010. [cit. 2011-06-20]. Dostupný z internetu: <<http://www.uzis.cz>>. ISBN 978-80-7280-909-7.

*Zdravotnická ročenka České republiky 2010*. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. [online]. Praha: ÚZIS ČR, prosinec 2010. [cit. 2012-08-01]. Dostupný z internetu: <<http://www.uzis.cz>>. ISBN 978-80-7280-966-0.

## Příloha 1

Výsledky genotypizace pacientů s prodělaným infarktem myokardu (vyznačeno žlutě) se souborem údajů o jejich o pohlaví a věku

| Počet pacientů | Vzorek DNA č. | Pohlaví | Věk | BDNF (G/A) | Počet pacientů | Vzorek DNA č. | Pohlaví | Věk | BDNF (G/A) | Počet pacientů | Vzorek DNA č. | Pohlaví | Věk | BDNF (G/A) |
|----------------|---------------|---------|-----|------------|----------------|---------------|---------|-----|------------|----------------|---------------|---------|-----|------------|
| 1              | 5668          | M       | 51  | GA         | 41             | 6019          | M       | 51  | GG         | 81             | 7614          | Ž       | 54  | GA         |
| 2              | 5679          | M       | 49  | GG         | 42             | 6026          | M       | 49  | GA         | 82             | 7616          | M       | 48  | GG         |
| 3              | 5715          | M       | 51  | GG         | 43             | 6029          | Ž       | 72  | AA         | 83             | 7617          | M       | 46  | GG         |
| 4              | 5716          | M       | 52  | GG         | 44             | 6064          | M       | 49  | GA         | 84             | 7618          | M       | 54  | AA         |
| 5              | 5717          | M       | 52  | GG         | 45             | 6065          | M       | 49  | GG         | 85             | 7619          | M       | 53  | GG         |
| 6              | 5720          | M       | 41  | GG         | 46             | 6085          | M       | 60  | GG         | 86             | 7622          | M       | 57  | GA         |
| 7              | 5724          | M       | 50  | GG         | 47             | 6105          | M       | 50  | GG         | 87             | 7635          | Ž       | 58  | AA         |
| 8              | 5726          | M       | 54  | GG         | 48             | 6110          | M       | 46  | GA         | 88             | 7636          | M       | 54  | GA         |
| 9              | 5727          | M       | 50  | GA         | 49             | 6151          | M       | 50  | GG         | 89             | 7637          | Ž       | 56  | GG         |
| 10             | 5729          | M       | 51  | GG         | 50             | 6152          | M       | 46  | GA         | 90             | 7639          | M       | 53  | GG         |
| 11             | 5730          | M       | 41  | GG         | 51             | 6170          | M       | 47  | GG         | 91             | 7658          | M       | 56  | GG         |
| 12             | 5731          | M       | 25  | GG         | 52             | 6216          | M       | 53  | GG         | 92             | 7682          | Ž       | 47  | GG         |
| 13             | 5741          | M       | 68  | GG         | 53             | 6217          | M       | 47  | GG         | 93             | 7697          | M       | 65  | GG         |
| 14             | 5742          | M       | 79  | GA         | 54             | 6223          | M       | 51  | GG         | 94             | 7750          | M       | 50  | GA         |
| 15             | 5769          | M       | 40  | GG         | 55             | 6236          | M       | 61  | GG         | 95             | 7751          | M       | 60  | GG         |
| 16             | 5807          | M       | 59  | GG         | 56             | 6262          | M       | 72  | GG         | 96             | 7752          | M       | 62  | GG         |
| 17             | 5813          | M       | 49  | GG         | 57             | 6278          | M       | 77  | GA         | 97             | 7753          | M       | 52  | GG         |
| 18             | 5847          | M       | 45  | GA         | 58             | 6294          | Ž       | 53  | GA         | 98             | 7754          | M       | 62  | GG         |
| 19             | 5848          | Ž       | 55  | GG         | 59             | 6295          | M       | 61  | GG         | 99             | 7755          | M       | 59  | GA         |
| 20             | 5849          | M       | 60  | GA         | 60             | 6304          | M       | 50  | GA         | 100            | 7776          | M       | 53  | GG         |
| 21             | 5857          | M       | 51  | GG         | 61             | 6318          | M       | 39  | GA         | 101            | 7777          | M       | 57  | GG         |
| 22             | 5864          | Ž       | 54  | GG         | 62             | 6323          | Ž       | 68  | GG         | 102            | 7781          | M       | 58  | GA         |
| 23             | 5865          | M       | 56  | GA         | 63             | 6324          | M       | 63  | GA         | 103            | 7790          | Ž       | 60  | GG         |
| 24             | 5875          | M       | 58  | GA         | 64             | 6329          | M       | 54  | GA         | 104            | 7791          | M       | 58  | GG         |
| 25             | 5897          | Ž       | 52  | GG         | 65             | 6455          | M       | 58  | GA         | 105            | 7792          | M       | 46  | GA         |
| 26             | 5901          | Ž       | 62  | GG         | 66             | 6456          | M       | 37  | GG         | 106            | 7793          | M       | 47  | GG         |
| 27             | 5902          | M       | 61  | GG         | 67             | 6470          | Ž       | 68  | GG         | 107            | 7794          | M       | 51  | GG         |
| 28             | 5915          | M       | 66  | GG         | 68             | 6504          | M       | 69  | GG         | 108            | 7801          | M       | 56  | GA         |
| 29             | 5916          | M       | 53  | GA         | 69             | 6505          | M       | 69  | GA         | 109            | 7809          | M       | 47  | GG         |
| 30             | 5917          | M       | 72  | GA         | 70             | 7377          | M       | 66  | GG         | 110            | 7812          | Ž       | 40  | GG         |
| 31             | 5920          | Ž       | 73  | GG         | 71             | 7386          | Ž       | 50  | GG         | 111            | 7813          | M       | 54  | GG         |
| 32             | 5921          | M       | 63  | GG         | 72             | 7434          | M       | 57  | GA         | 112            | 7838          | M       | 60  | GG         |
| 33             | 5922          | M       | 52  | GG         | 73             | 7458          | M       | 75  | GG         | 113            | 7872          | M       | 58  | GG         |
| 34             | 5927          | Ž       | 53  | GG         | 74             | 7471          | M       | 53  | AA         | 114            | 7874          | M       | 57  | GG         |
| 35             | 5930          | M       | 49  | GA         | 75             | 7474          | Ž       | 56  | GG         | 115            | 7875          | M       | 50  | GG         |
| 36             | 5985          | M       | 63  | GG         | 76             | 7475          | Ž       | 50  | GG         | 116            | 7994          | M       | 49  | GG         |
| 37             | 5986          | M       | 53  | GG         | 77             | 7503          | M       | 55  | GA         | 117            | 8191          | M       | 66  | GG         |
| 38             | 5994          | M       | 55  | GG         | 78             | 7514          | M       | 53  | GA         | 118            | 8192          | M       | 53  | GA         |
| 39             | 6017          | M       | 54  | AA         | 79             | 7521          | M       | 33  | GG         | 119            | 8197          | M       | 67  | GA         |
| 40             | 6018          | M       | 55  | GG         | 80             | 7556          | M       | 42  | GG         | 120            | 8198          | M       | 51  | GG         |

| Počet pacientů | Vzorek DNA č. | Pohlaví | Věk | BDNF (G/A) |
|----------------|---------------|---------|-----|------------|
| 121            | 8199          | M       | 55  | GA         |
| 122            | 8207          | M       | 50  | GG         |
| 123            | 8208          | M       | 46  | GG         |
| 124            | 8212          | M       | 56  | GG         |
| 125            | 8215          | M       | 60  | GA         |
| 126            | 8216          | M       | 46  | GA         |
| 127            | 8223          | M       | 55  | GA         |
| 128            | 8224          | M       | 43  | GG         |
| 129            | 8226          | M       | 53  | GG         |
| 130            | 8227          | M       | 53  | GG         |
| 131            | 8228          | M       | 54  | GG         |
| 132            | 8232          | Ž       | 46  | AA         |
| 133            | 8233          | Ž       | 53  | GG         |
| 134            | 8240          | M       | 44  | GG         |
| 135            | 8255          | M       | 51  | GA         |
| 136            | 8256          | Ž       | 60  | GG         |
| 137            | 8257          | M       | 49  | GG         |
| 138            | 8259          | M       | 59  | GG         |
| 139            | 8361          | M       | 48  | GG         |
| 140            | 8373          | M       | 60  | GG         |
| 141            | 8374          | M       | 52  | GG         |
| 142            | 8375          | M       | 60  | GG         |
| 143            | 8396          | M       | 54  | GG         |
| 144            | 8431          | M       | 47  | GG         |
| 145            | 8437          | M       | 58  | GG         |
| 146            | 8444          | M       | 53  | GG         |
| 147            | 8559          | M       | 51  | GG         |
| 148            | 8583          | M       | 46  | GG         |
| 149            | 8584          | Ž       | 52  | GG         |
| 150            | 8586          | M       | 54  | GG         |
| 151            | 8587          | M       | 46  | GG         |
| 152            | 8591          | M       | 65  | GG         |
| 153            | 8608          | M       | 54  | GG         |

| Počet pacientů | Vzorek DNA č. | Pohlaví | Věk | BDNF (G/A) |
|----------------|---------------|---------|-----|------------|
| 154            | 8615          | M       | 54  | GA         |
| 155            | 8627          | M       | 52  | GA         |
| 156            | 8654          | M       | 58  | GG         |
| 157            | 8663          | M       | 75  | GA         |
| 158            | 8664          | M       | 31  | GA         |
| 159            | 8702          | Ž       | 56  | GG         |
| 160            | 8726          | M       | 56  | GG         |
| 161            | 8733          | Ž       | 50  | GG         |
| 162            | 8742          | M       | 55  | GG         |
| 163            | 8772          | M       | 73  | GA         |
| 164            | 8773          | M       | 55  | GG         |
| 165            | 8774          | M       | 47  | GG         |
| 166            | 8775          | M       | 61  | GG         |
| 167            | 8784          | M       | 63  | GG         |
| 168            | 8789          | Ž       | 52  | GG         |
| 169            | 8790          | M       | 48  | GG         |
| 170            | 8798          | M       | 50  | GG         |
| 171            | 8799          | M       | 55  | GA         |
| 172            | 8801          | M       | 59  | GG         |
| 173            | 8804          | M       | 73  | GA         |
| 174            | 8836          | M       | 61  | GA         |
| 175            | 8852          | M       | 55  | GG         |
| 176            | 8856          | M       | 62  | GG         |
| 177            | 8863          | M       | 60  | GA         |
| 178            | 8922          | M       | 47  | GG         |
| 179            | 8958          | Ž       | 55  | GG         |
| 180            | 8959          | M       | 52  | GG         |
| 181            | 8962          | M       | 56  | AA         |
| 182            | 9017          | M       | 48  | GG         |
| 183            | 9018          | M       | 42  | GA         |
| 184            | 9054          | Ž       | 60  | GA         |
| 185            | 9055          | M       | 50  | AA         |
| 186            | 9080          | M       | 65  | GG         |

| Počet pacientů | Vzorek DNA č. | Pohlaví | Věk | BDNF (G/A) |
|----------------|---------------|---------|-----|------------|
| 187            | 9084          | M       | 51  | GG         |
| 188            | 9192          | Ž       | 45  | GG         |
| 189            | 9198          | M       | 43  | GG         |
| 190            | 9237          | M       | 62  | GG         |
| 191            | 9852          | M       | 46  | GA         |
| 192            | 9858          | Ž       | 52  | GA         |
| 193            | 9868          | M       | 34  | GG         |
| 194            | 9882          | Ž       | 49  | GA         |
| 195            | 9888          | M       | 51  | GG         |
| 196            | 9889          | M       | 39  | GG         |
| 197            | 9902          | M       | 50  | GG         |
| 198            | 9905          | M       | 50  | GG         |
| 199            | 9944          | M       | 45  | GA         |
| 200            | 12636         | M       | 41  | GG         |
| 201            | 12921         | M       | 52  | GG         |
| 202            | 12931         | M       | 49  | GA         |
| 203            | 12932         | M       | 51  | GA         |
| 204            | 12933         | M       | 63  | GG         |
| 205            | 12953         | M       | 47  | AA         |
| 206            | 12968         | M       | 49  | GG         |
| 207            | 12979         | M       | 55  | GG         |
| 208            | 12980         | M       | 45  | GG         |
| 209            | 13067         | Ž       | 56  | GG         |
| 210            | 13165         | M       | 43  | GG         |
| 211            | 13254         | M       | 38  | GG         |
| 212            | 13262         | M       | 44  | GA         |
| 213            | 13285         | M       | 39  | GG         |
| 214            | 13508         | M       | 55  | GA         |
| 215            | 13509         | M       | 38  | GG         |
| 216            | 13510         | M       | 49  | GG         |
| 217            | 13524         | M       | 50  | GG         |



## Příloha 2

Výsledky genotypizace zdravých jedinců (vyznačeno oranžově) se souborem údajů o jejich pohlaví a věku

| Počet pacientů | Vzorek DNA č. | Pohlaví | Věk | BDNF (G/A) |
|----------------|---------------|---------|-----|------------|
| 1              | 1090          | M       | 32  | GA         |
| 2              | 1800          | M       | 40  | GG         |
| 3              | 1811          | M       | 34  | GG         |
| 4              | 1812          | M       | 26  | GG         |
| 5              | 1816          | Ž       | 46  | AA         |
| 6              | 1819          | Ž       | 22  | GG         |
| 7              | 1820          | M       | 23  | GA         |
| 8              | 1821          | M       | 30  | GG         |
| 9              | 1822          | M       | 39  | GG         |
| 10             | 1828          | M       | 34  | GA         |
| 11             | 1950          | M       | 32  | GA         |
| 12             | 1951          | M       | 33  | GA         |
| 13             | 1952          | M       | 25  | GG         |
| 14             | 1956          | M       | 49  | GG         |
| 15             | 1957          | M       | 39  | GG         |
| 16             | 1958          | M       | 36  | GG         |
| 17             | 1959          | Ž       | 45  | GA         |
| 18             | 1960          | M       | 46  | GG         |
| 19             | 1961          | Ž       | 41  | GG         |
| 20             | 1966          | Ž       | 25  | GG         |
| 21             | 1969          | Ž       | 27  | GG         |
| 22             | 1976          | Ž       | 28  | GG         |
| 23             | 9467          | Ž       | 32  | GG         |
| 24             | 9469          | M       | 47  | GG         |
| 25             | 9958          | M       | 64  | GA         |
| 26             | 9959          | Ž       | 38  | GG         |
| 27             | 9978          | M       | 52  | GG         |
| 28             | 10040         | M       | 50  | GG         |
| 29             | 10060         | Ž       | 40  | GA         |
| 30             | 10103         | Ž       | 22  | GA         |
| 31             | 10105         | M       | 25  | GG         |
| 32             | 10116         | Ž       | 28  | GG         |
| 33             | 10118         | Ž       | 22  | GA         |

| Počet pacientů | Vzorek DNA č. | Pohlaví | Věk | BDNF (G/A) |
|----------------|---------------|---------|-----|------------|
| 34             | 10119         | M       | 28  | GG         |
| 35             | 10145         | M       | 58  | GA         |
| 36             | 10146         | Ž       | 53  | GG         |
| 37             | 10156         | M       | 32  | GG         |
| 38             | 10166         | M       | 28  | GG         |
| 39             | 10183         | M       | 21  | GG         |
| 40             | 10184         | Ž       | 25  | GG         |
| 41             | 10203         | Ž       | 27  | GG         |
| 42             | 10205         | Ž       | 41  | GA         |
| 43             | 10207         | M       | 45  | GG         |
| 44             | 10217         | Ž       | 20  | GA         |
| 45             | 10218         | M       | 23  | GG         |
| 46             | 10248         | M       | 33  | GG         |
| 47             | 10249         | Ž       | 28  | GG         |
| 48             | 10251         | Ž       | 29  | GG         |
| 49             | 10253         | Ž       | 24  | GG         |
| 50             | 10260         | M       | 24  | GG         |
| 51             | 10287         | M       | 30  | GA         |
| 52             | 10298         | Ž       | 32  | GA         |
| 53             | 10330         | M       | 24  | GA         |
| 54             | 10332         | M       | 28  | GG         |
| 55             | 10354         | Ž       | 37  | GG         |
| 56             | 10367         | Ž       | 25  | AA         |
| 57             | 10370         | M       | 21  | GG         |
| 58             | 10397         | M       | 33  | GG         |
| 59             | 10421         | Ž       | 25  | GG         |
| 60             | 10423         | M       | 28  | GG         |
| 61             | 10451         | Ž       | 24  | GG         |
| 62             | 10509         | Ž       | 19  | GA         |
| 63             | 10591         | M       | 48  | GG         |
| 64             | 10592         | Ž       | 30  | GA         |
| 65             | 10606         | M       | 32  | GG         |
| 66             | 10616         | M       | 28  | GG         |
| 67             | 10617         | M       | 32  | GG         |
| 68             | 10624         | M       | 53  | GG         |

| Počet pacientů | Vzorek DNA č. | Pohlaví | Věk | BDNF (G/A) |
|----------------|---------------|---------|-----|------------|
| 69             | 10625         | Ž       | 37  | GG         |
| 70             | 10627         | Ž       | 32  | AA         |
| 71             | 10630         | Ž       | 19  | GG         |
| 72             | 10729         | M       | 27  | AA         |
| 73             | 10847         | Ž       | 34  | GA         |
| 74             | 10959         | Ž       | 26  | GG         |
| 75             | 11042         | Ž       | 27  | GG         |
| 76             | 11165         | Ž       | 27  | GG         |
| 77             | 11232         | M       | 22  | GA         |
| 78             | 11233         | Ž       | 22  | GG         |
| 79             | 11255         | Ž       | 25  | GG         |
| 80             | 11272         | M       | 42  | GG         |
| 81             | 11273         | M       | 36  | GG         |
| 82             | 11363         | Ž       | 24  | GA         |
| 83             | 11374         | Ž       | 23  | GG         |
| 84             | 11376         | M       | 20  | GG         |
| 85             | 11586         | Ž       | 21  | GG         |
| 86             | 11601         | M       | 38  | GG         |
| 87             | 11680         | Ž       | 23  | GG         |
| 88             | 11740         | M       | 24  | GG         |
| 89             | 11754         | M       | 27  | GG         |
| 90             | 11791         | M       | 25  | GG         |
| 91             | 12004         | M       | 31  | GG         |
| 92             | 12052         | M       | 55  | GG         |
| 93             | 12065         | M       | 21  | GG         |
| 94             | 12072         | M       | 41  | GG         |
| 95             | 12073         | Ž       | 24  | GG         |
| 96             | 12078         | M       | 33  | GG         |
| 97             | 12079         | Ž       | 18  | GG         |
| 98             | 12083         | Ž       | 31  | GG         |
| 99             | 12091         | Ž       | 40  | GA         |
| 100            | 12095         | Ž       | 28  | GG         |
| 101            | 12440         | Ž       | 21  | GG         |
| 102            | 12441         | M       | 21  | GA         |
| 103            | 12513         | M       | 20  | GG         |

| Počet pacientů | Vzorek DNA č. | Pohlaví | Věk | BDNF (G/A) |
|----------------|---------------|---------|-----|------------|
| 104            | 12749         | Ž       | 27  | GG         |
| 105            | 12750         | M       | 32  | GG         |
| 106            | 12765         | Ž       | 22  | GG         |
| 107            | 12778         | M       | 25  | GG         |
| 108            | 12782         | M       | 36  | GG         |
| 109            | 12791         | Ž       | 33  | GG         |
| 110            | 12884         | M       | 30  | GG         |
| 111            | 12892         | Ž       | 24  | GG         |
| 112            | 12992         | M       | 25  | GA         |
| 113            | 12993         | Ž       | 38  | GG         |
| 114            | 13001         | M       | 52  | GG         |
| 115            | 13014         | M       | 24  | GG         |
| 116            | 13028         | M       | 30  | GG         |
| 117            | 13029         | Ž       | 33  | GG         |
| 118            | 13031         | M       | 29  | AA         |
| 119            | 13032         | Ž       | 27  | GG         |
| 120            | 13047         | Ž       | 27  | GG         |
| 121            | 13049         | M       | 28  | GG         |
| 122            | 13107         | Ž       | 24  | GG         |
| 123            | 13167         | M       | 41  | GA         |
| 124            | 13187         | Ž       | 28  | GG         |
| 125            | 13213         | M       | 41  | GG         |
| 126            | 13214         | Ž       | 39  | GG         |
| 127            | 13243         | M       | 45  | GA         |
| 128            | 13244         | Ž       | 32  | GG         |
| 129            | 13480         | Ž       | 23  | GA         |
| 130            | 13482         | M       | 30  | GA         |
| 131            | 13530         | M       | 25  | GG         |
| 132            | 13531         | Ž       | 23  | GA         |
| 133            | 13545         | M       | 56  | AA         |
| 134            | 13556         | Ž       | 21  | GG         |
| 135            | 13558         | M       | 26  | GG         |
| 136            | 13606         | Ž       | 34  | GG         |
| 137            | 13608         | Ž       | 40  | GG         |
| 138            | 13629         | Ž       | 31  | GA         |
| 139            | 13631         | M       | 31  | GG         |
| 140            | 13656         | M       | 44  | GA         |
| 141            | 13657         | M       | 20  | GG         |
| 142            | 13659         | M       | 25  | GG         |
| 143            | 13679         | Ž       | 27  | GA         |
| 144            | 13752         | M       | 26  | GG         |

| Počet pacientů | Vzorek DNA č. | Pohlaví | Věk | BDNF (G/A) |
|----------------|---------------|---------|-----|------------|
| 145            | 13753         | Ž       | 21  | GA         |
| 146            | 13858         | Ž       | 26  | GA         |
| 147            | 13860         | M       | 27  | GG         |
| 148            | 13922         | M       | 29  | GG         |
| 149            | 13942         | Ž       | 31  | GG         |
| 150            | 13962         | M       | 41  | GG         |
| 151            | 13975         | Ž       | 34  | GA         |
| 152            | 14018         | Ž       | 28  | GA         |
| 153            | 14020         | M       | 21  | GA         |
| 154            | 14085         | Ž       | 46  | GG         |
| 155            | 14101         | M       | 28  | GG         |
| 156            | 14135         | Ž       | 27  | GG         |
| 157            | 14146         | M       | 21  | GG         |
| 158            | 14159         | Ž       | 23  | GA         |
| 159            | 14161         | Ž       | 42  | GG         |
| 160            | 14163         | Ž       | 27  | GG         |
| 161            | 14182         | Ž       | 18  | GG         |
| 162            | 14184         | M       | 19  | GA         |
| 163            | 14214         | M       | 27  | GG         |
| 164            | 14217         | M       | 32  | AA         |
| 165            | 14242         | M       | 38  | GG         |
| 166            | 14255         | Ž       | 37  | AA         |
| 167            | 14291         | M       | 40  | AA         |
| 168            | 14328         | Ž       | 31  | GG         |
| 169            | 14340         | M       | 34  | GA         |
| 170            | 14341         | M       | 28  | GA         |
| 171            | 14380         | M       | 31  | GG         |
| 172            | 14387         | Ž       | 28  | GG         |
| 173            | 14431         | M       | 27  | GA         |
| 174            | 14434         | M       | 40  | GG         |
| 175            | 14445         | Ž       | 24  | GG         |
| 176            | 14447         | Ž       | 32  | GG         |
| 177            | 14456         | Ž       | 30  | GA         |
| 178            | 14458         | Ž       | 32  | GG         |
| 179            | 14573         | Ž       | 38  | GA         |
| 180            | 14584         | M       | 37  | GG         |

### **Příloha 3**

Protokol pro zpracování vzorků pacientů s infarktem myokardu a kontrolních jedinců

#### **BDNF rs 6265 G (A)**

Protokol:

Primerový mix (100 µl):

|          |      |       |       |     |     |
|----------|------|-------|-------|-----|-----|
|          | Tris | P1054 | P1056 | P33 | P34 |
| BDNF (G) | 88,6 | 5     | 5     | 0,7 | 0,7 |
|          | Tris | P1055 | P1056 | P33 | P34 |
| BDNF (A) | 88,6 | 5     | 5     | 0,7 | 0,7 |

Do zkumavek 5 µl příslušného mixu, pak 0,2 µl DNA, pak 0,8 µl fototypového míchání.

Program fototyp, elfo normání, foto.

|      |      |      |      |      |      |
|------|------|------|------|------|------|
| 1090 | 1800 | 1811 | 1812 | 1816 | 1819 |
|      |      |      |      |      |      |

## Příloha 4

### Publikace uveřejněná v časopise s impakt faktorem „Cytokine“

Cytokine 53 (2011) 13–14



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/issn/10434666](http://www.elsevier.com/locate/issn/10434666)



#### Letter

##### The *BDNF* Val66Met polymorphism is not associated with myocardial infarction in Czech patients

Dear Editor,

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has been implicated in the pathogenesis of coronary artery disease (CAD) [1]. *BDNF* Val66Met polymorphism has recently been associated with particular manifestation of CAD (unstable angina) in Chinese population [2]. To further explore role of this polymorphism in CAD we have investigated its association with myocardial infarction (MI) in the Czech Caucasian population.

The frequencies of *BDNF* Val66Met (rs6265) variants were determined in the group of 217 MI patients [age, median (range): 53(25–79); males/females: 185/32] diagnosed according to the international consensus criteria [3] and compared to those in healthy control group [ $N = 180$ ; 29(18–64); 95/85]. The genotype and allele frequencies of the *BDNF* Val66Met polymorphism in the MI patients (66Met allele frequency: 17.7%) nearly equalled those observed in healthy control subjects (17.2%,  $p > 0.05$ , Table 1). Both investigated groups also did not differ in carriage rates of *BDNF* 66Val/Met alleles. Similarly, no association of this *BDNF* variant with MI was observed in the subanalysis according to the gender (data not shown).

In addition to its principal role in neural system, *BDNF* has also been implicated in the vascular development, repair of vascular injury and CAD pathogenesis [1,4,5]. The gene variants affecting *BDNF* expression and/or structure may, therefore, be considered as plausible candidates in CAD genetics [6,7]. The report which motivated the present study described the association of less common *BDNF* 66Met allele with protection from unstable angina in Chinese population [2]; the authors suggested that this SNP may affect local expression of *BDNF* in inflamed arterial wall and interfere with the plaque rupture.

Our study could not provide further evidence that *BDNF* gene variability contributes to the genetic component of CAD. However, there are several reasons why the present work could not be strictly considered as a replication of the original Chinese study [2]: (1) Different phenotypes: the genetic component of various CAD manifestations (MI and unstable angina) may partially differ. (2) The Czech (Caucasian) and Chinese (Asian) populations differ significantly in their genetic background; this is particularly apparent in the frequency of investigated *BDNF* 66Met allele in Chinese controls (49%) by comparison with Czech controls (17%). Furthermore, the differences in haplotype structure between both ethnicities may mask causal variants within the *BDNF* gene or nearby. (3) Though our study involved well characterised group of MI patients, it disposed of lower statistical power to detect potential association of *BDNF* gene variant with CAD in comparison with the original report [2]. In the context of group size, there was a report of an inverse association (as compared with Chinese data [2]) between

Table 1

Distribution of *BDNF* SNP rs6265 G/A (Val66Met) genotypes and alleles in the groups of Czech patients with myocardial infarction (MI) and of healthy control subjects (controls).

| <i>BDNF</i> rs6265 G/A (Val66Met) | Czech population    |                           |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------------|
|                                   | MI<br>( $N = 217$ ) | Controls<br>( $N = 180$ ) |
| Genotypes <sup>a</sup>            | GG                  | 149 (0.687)               |
|                                   | GA                  | 59 (0.272)                |
|                                   | AA                  | 9 (0.041)                 |
| Alleles <sup>a</sup>              | G                   | 357 (0.823)               |
|                                   | A                   | 77 (0.177)                |
| Carriers <sup>a</sup>             | G                   | 68 (0.313)                |
|                                   | A                   | 53 (0.294)                |

The data are given as absolute numbers with proportion in parentheses.

The *BDNF* rs6265 G/A (Val66Met) SNP was genotyped by "TaqMan" SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Assay ID C\_11592758\_10) according to the manufacturer's instructions. The distribution of *BDNF* Val66Met genotypes conformed to Hardy-Weinberg equilibrium in both investigated groups (MI/controls,  $p > 0.05$ ).

<sup>a</sup>  $p > 0.05$  for all comparisons (genotypes, alleles, carriage) between the MI patients and controls.

*BDNF* 66Met/Met genotype and coronary atherosclerosis in Italian females [8], based only on 12 patients with coronary artery stenosis – this size definitely does not allow to draw any valid conclusions.

In summary, the *BDNF* Val66Met polymorphism is not associated with myocardial infarction in Czech population. We could not, therefore, provide further positive data which would add up to the observation from Chinese population [2] suggesting that *BDNF* Met/Met genotype is a genetic modifier in CAD.

#### Acknowledgments

This study was supported by the institutional grant of the Palacky University (IGA UP Project No. LF\_2010\_008, Czech Republic) and, in part, by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (Projects MSM6198959205 and ME-856). The data were presented in part at the European Atherosclerosis Society Congress, Hamburg, June 20–23, 2010.

#### References

- [1] Ejiri J, Inoue N, Kobayashi S, Shiraki R, Otsui K, Honjo T, et al. Possible role of brain-derived neurotrophic factor in the pathogenesis of coronary artery disease. *Circulation* 2005;112:2114–20.
- [2] Jiang H, Wang R, Liu Y, Zhang Y, Chen ZY. *BDNF* Val66Met polymorphism is associated with unstable angina. *Clin Chim Acta* 2009;400:3–7.
- [3] Myocardial infarction redefined a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2000;21:1502–13.
- [4] Kermani P, Hempstead B. Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17:140–3.
- [5] Lorgis L, Amoureux S, de Maistre E, Sicard P, Bejot Y, Zeller M, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor and platelet activation evaluated by soluble

- P-selectin and soluble CD-40-ligand in patients with acute myocardial infarction. *Fundam Clin Pharmacol* 2010;24:525–30.
- [6] Dandona S, Stewart AF, Roberts R. Genomics in coronary artery disease: past, present and future. *Can J Cardiol* 2010;26:56–9.
- [7] Hamsten A, Eriksson P. Identifying the susceptibility genes for coronary artery disease: from hyperbole through doubt to cautious optimism. *J Intern Med* 2008;263:538–52.
- [8] Bozzini S, Gambelli P, Boiocchi C, Schirizzi S, Falcone R, Buzzi P. Coronary artery disease and depression: possible role of brain-derived neurotrophic factor and serotonin transporter gene polymorphisms. *Int J Mol Med* 2009;24:813–8.

A. Stahelova  
*Laboratory of Immunogenomics and Proteomics,  
Department of Immunology, Medical Faculty of Palacky University and  
Faculty Hospital, Olomouc, Czech Republic*

J. Petrakova  
*Laboratory of Immunogenomics and Proteomics,  
Department of Immunology, Medical Faculty of Palacky University and  
Faculty Hospital, Olomouc, Czech Republic  
Department of Internal Medicine I, Medical Faculty of Palacky University  
and Faculty Hospital, Olomouc, Czech Republic*

N. Motakova  
*Laboratory of Immunogenomics and Proteomics,  
Department of Immunology, Medical Faculty of Palacky University and  
Faculty Hospital, Olomouc, Czech Republic*

M. Taborsky  
*Department of Internal Medicine I, Medical Faculty of Palacky University  
and Faculty Hospital, Olomouc, Czech Republic*

F. Mrazek  
*Laboratory of Immunogenomics and Proteomics,  
Department of Immunology, Medical Faculty of Palacky University and  
Faculty Hospital, Olomouc, Czech Republic*

M. Petrek\*  
*Laboratory of Immunogenomics and Proteomics, Department of  
Immunology, Medical Faculty of Palacky University, I.P. Pavlova str. 6,  
CZ-775 20 Olomouc, Czech Republic.*

\*Tel.: +420 58 563 2770; fax: + 420 58 541 5116.  
*Div. of Clinical Biochemistry and Immunogenetics, Faculty Hospital,  
Olomouc, Czech Republic  
Institute of Molecular and Translational Medicine, Medical Faculty of  
Palacky University and Faculty Hospital, Olomouc, Czech Republic  
E-mail address: martin.petrek@fnol.cz*