



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

**Klinický význam polymorfismu rs4646994 v  
genu ACE**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Simona Bíchová

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

České Budějovice 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Klinický význam polymorfismu rs4646994 v genu *ACE*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 28.4.2022

.....

Simona Bíchová

### **Poděkování**

Děkuji Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za pomoc, odborné vedení, cenné rady a podněty při vedení mé bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za velkou podporu při celé délce studia.

## Klinický význam polymorfismu rs4646994 v genu *ACE*

### Abstrakt

Předložená bakalářská práce se zabývá, jak je patrné z názvu, jedním konkrétním polymorfismem rs4646994 v genu *ACE* a jeho klinickým významem. Gen *ACE*, složen z 26 exonů, je lokalizován na chromozomu 17q23 a jeho název *ACE* je zkratkou pro angiotenzin konvertující enzym. Tento enzym je schopen štěpit bílkoviny, přičemž je součástí systému renin-angiotenzin, který reguluje krevní tlak a rovnováhu tekutin a solí v organismu. Principem je štěpení bílkoviny zvané angiotenzin I na angiotenzin II. Ten pak způsobuje zúžení (konstrikci) cév, což vede ke zvýšení krevního tlaku. Tento protein také stimuluje produkci hormonu aldosteronu, který spouští vstřebávání solí a vody ledvinami. Zvýšené množství tekutin v těle následně zvyšuje krevní tlak. Kromě toho může angiotenzin II hrát také roli při vývoji ledvin.

Vybraný polymorfismus *ACE* rs4646994 je velmi zajímavý z hlediska různých onemocnění (např. COVID-19, nefropatie u *diabetes mellitus*, syndrom polycystických vaječníků atd.) Významnou roli může hrát také u Alzheimerovy choroby, na kterou je zaměřena praktická část této bakalářské práce. Vyšetření polymorfismu rs4646994 v genu *ACE* bylo v rámci praktické části provedeno ve vybrané skupině 61 seniorských pacientů převážně s diagnózou demence metodou end-point PCR. Získaná data byla následně statisticky zpracována a porovnána s kontrolní skupinou pacientů bez diagnózy demence. Výsledky byly následně porovnány s dostupnými odbornými publikacemi.

### Klíčová slova

gen; polymorfismus; klinický význam; genotyp; populace

## **Clinical significance of the rs4646994 polymorphism in the *ACE* gene**

### **Abstract**

The present bachelor thesis deals, as it is obvious from the title, with one particular polymorphism rs4646994 in the ACE gene and its clinical significance. The ACE gene, consisting of 26 exons, is localized on chromosome 17q23 and its name ACE stands for angiotensin converting enzyme. This enzyme is capable of breaking down proteins and is part of the renin-angiotensin system, which regulates blood pressure and fluid and salt balance in the body. The principle is to split a protein called angiotensin I into angiotensin II. This then causes the blood vessels to narrow (constrict), leading to an increase in blood pressure. This protein also stimulates the production of the hormone aldosterone, which triggers the absorption of salts and water by the kidneys. The increased amount of fluid in the body subsequently increases blood pressure. In addition, angiotensin II may also play a role in kidney development.

The selected ACE rs4646994 polymorphism is of great interest in terms of various diseases (e.g. COVID-19, nephropathy in diabetes mellitus, polycystic ovary syndrome, etc.) It may also play an important role in Alzheimer's disease, which is the focus of the practical part of this bachelor thesis. The investigation of the rs4646994 polymorphism in the ACE gene was carried out in a selected group of 61 patients with a diagnosis of dementia by end-point PCR. The data obtained were then statistically processed and compared with a control group of patients without a diagnosis of dementia. The results were then compared with available scientific publications.

### **Key words**

gene; polymorphism; clinical significance; genotype; population

## Obsah

1	Úvod .....	8
2	Klinický význam polymorfismu rs4646994 v genu <i>ACE</i> .....	9
2.1	Klinický význam .....	9
2.2	Geny .....	9
2.2.1	Umístění genů a genová vazba .....	10
2.2.2	Centrální dogma.....	10
2.2.3	Dědičné znaky.....	11
2.2.4	Genetické poruchy .....	11
2.3	Gen <i>ACE</i> .....	12
2.3.1	Popis.....	12
2.3.2	Funkce.....	13
2.3.3	Výskyt.....	13
2.3.4	Patologie .....	14
2.3.5	Léčba.....	14
2.3.6	Alely.....	15
2.4	Polymorfismy .....	15
2.5	Polymorfismus rs4646994 .....	17
2.6	Klinický význam polymorfismu rs4646994.....	18
2.6.1	Alzheimerova choroba .....	18
2.6.2	Nefropatie u diabetes mellitus .....	20
2.6.3	Primární spontánní intracerebrální krvácení.....	21
2.6.4	Riziko plicního onemocnění .....	22
2.6.5	Syndrom polycystických vaječníků .....	22
2.6.6	Fyzická aktivita u sportovců .....	22

2.6.7	Kardiomyopatie .....	24
2.6.8	COVID-19 .....	25
3	Laboratorní vyšetření polymorfismu rs4646994 v genu <i>ACE</i> .....	27
3.1	Odběr materiálu pro analýzu DNA .....	27
3.2	Izolace DNA.....	27
3.3	Měření koncentrace DNA .....	28
3.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	28
3.5	Gelová elektroforéza .....	30
4	Cíl práce.....	31
5	Praktická část.....	32
5.1	Izolace DNA.....	32
5.1.1	Izolace DNA z bukalního stěru.....	32
5.1.2	Izolace DNA z periferní krve.....	33
5.2	Měření koncentrace DNA .....	34
5.3	Polymerázová řetězová reakce .....	35
5.4	Gelová elektroforéza .....	36
5.5	Vyšetření predispozic pro kardiovaskulární onemocnění .....	37
6	Výsledky.....	42
7	Diskuze .....	44
8	Závěr.....	47
9	Bibliografie.....	48
10	Přílohy .....	62
11	Seznam použitých zkratk.....	70

## 1 Úvod

*ACE* je metalopeptidáza, která se podílí na regulaci krevního tlaku. (Kim et al., 2003; Bernstein et al., 2011). Má dvě katalytické domény, doménu N a doménu C, které mohou štěpit angiotenzin a bradykinin. (Ceconi et al., 2007; Denti et al., 2014; Fernandez et al., 2003) Běžně je exprimován epiteliálními, endoteliálními a neuronálními buňkami. (Turner a Hooper, 2002)

Klasický pohled na funkci *ACE* ji spojuje s dráhou systému renin-angiotenzin (RAS), v němž *ACE* katalyzuje tvorbu vazokonstrikčního oktapeptidu angiotenzinu II z jeho nevaloaktivního prekurzoru angiotenzinu I, stejně jako štěpení a inaktivaci vazodilatačního bradykininu. (Sayed-Tabatabaei et al., 2006)

*ACE* má mnoho polymorfismů, které mají rozdílný klinický význam. Polymorfismus rs4646994 hraje důležitou roli u Alzheimerovy choroby, nefropatií u diabetes mellitus, plicního onemocnění a dalších. Velmi zajímavý je i ve spojitosti se sportovci a jejich sportovním výkonem. Jedná se o inzerčně-deleční polymorfismus.

Pro vyšetření polymorfismu rs4646994 v genu *ACE* byla použita metoda end point PCR a gelová elektroforéza. Celkem bylo hodnoceno z hlediska genotypu 61 pacientů – seniorů s/nebo bez diagnózy demence a 157 pacientů z kontrolní skupiny. Výsledná data byla statisticky zpracována a porovnána s jinými populačními studiemi.



## **2 Klinický význam polymorfismu rs4646994 v genu ACE**

### **2.1 Klinický význam**

V první řadě bych se chtěla věnovat obecným pojmům, které úzce souvisejí s tématem mé bakalářské práce. Klinický význam jakéhokoli faktoru je stanoven na základě předcházející klinické studie. Např. v roce 1747 James Lind provedl systematickou studii na námořnících trpících nedostatkem vitamínu C. V roce pak 1750 John Haytgarth objevil placebo efekt apod. K čemu slouží klinické studie? Klinické studie slouží především pro otestování nových léčiv, kombinací léčiv, lékových forem a generik. Dále pro testování nových léčebných postupů a operací, pro studium vlivu vybraných faktorů na zdraví, pro testování nových diagnostických postupů. Pokud chce farmaceutická společnost vyvinout nové léčivo, musí nejprve stanovit biologickou podstatu jeho funkce, například inhibici klíčového enzymu. Takový enzym nebo receptor je pak cílem pro účinnou látku. Hledání nových cílů je hlavním úkolem akademiků. Např. v oblasti nízkomolekulárních léčiv jsou častými cíli právě enzymy (ACE pro léky na hypertenzi, HMGCoAR pro statiny atd.), receptory (beta-blokátory – beta-adrenergní GPCR, antihistaminika – histaminový GPCR atd.), iontové kanály, transportní proteiny apod. (Lind, 2018; Svobodník et al., 2014)

Mezi tyto enzymy patří i *ACE*. V rámci teoretické části bude vyhodnocen jeho celkový klinický význam, a to na základě informací získaných studiem odborné literatury a dostupných genových databází.

### **2.2 Geny**

Geny jsou specificky uložené jednotky dědičné informace. Z molekulárního hlediska jde o úseky nukleové kyseliny se specifickým pořadím nukleotidů, které podmiňují strukturu a funkci genového produktu. Do této struktury patří i regulační sekvence, jako je promotor nebo terminátor, které jsou rozeznávány enzymy polymerázami a umožňují tak správné a přesné zpracování dědičné informace kódované konkrétním genem. (Vychodilová et al., 2019)

Tzv. mrtvý gen označujeme jako pseudogen, takový gen již není aktivní a jeho informace není realizována – důvodem této inaktivity jsou především nefunkční nebo chybějící regulační sekvence. (Vychodilová et al., 2019)

Geny rozdělujeme podle jejich účinnosti při realizaci dědičného znaku na monogenní a polygenní. Monogenními geny jsou geny velkého účinku. To znamená, že na tvorbě znaku se podílí jen málo genů (často jen jeden) a většinou jde o znak kvalitativní. Tyto geny jsou rozhodující pro monogenní typ dědičnosti. Polygenními geny označujeme geny malého účinku, kdy se na tvorbě znaku podílí více genů a nezanedbatelný je i vliv vnějšího prostředí. Jedná se většinou o kvantitativní znaky zodpovědné za polygenní typ dědičnosti. Dále se geny dělí podle jejich funkce na strukturní, regulační a RNA geny. Strukturní geny kódují strukturu bílkoviny. Regulační geny kódují enzymy regulující expresi strukturních genů a mohou ovlivňovat diferenciaci buněk. (Otová, 2013)

### **2.2.1 Umístění genů a genová vazba**

Geny jsou uloženy ve specifickém a neměnném pořadí na chromosomech lineárně za sebou. Každý gen tak má své unikátní místo na určitém chromosomu a v jeho určité části – přesněji řečeno v genovém lokusu. Geny uloženy na chromozomu 1 jsou spolu v genové vazbě. Mendelův zákon o nezávislé kombinovatelnosti alel různých alelových párů pojednává o tom, že se dva různé geny dědí nezávisle na sobě. Ovšem toto zcela platí pouze o genech uloženy na různých chromosomech. Geny, které jsou uloženy na jednom chromosomu, by se tedy měly dědit společně. Toto tvrzení nemusí být pravdivé díky procesu zvanému crossing-over. Crossing-over je proces vzájemné rekombinace některých genů navzájem mezi párem homologních chromosomů během meiózy. Crossing-over umožňuje vytváření nových kombinací již existujících alel genů lokalizovaných na stejném chromozomu. (Finegold, 2021)

Touto problematikou se začal zabývat Thomas Hunt Morgan, který získal Nobelovu cenu za lékařství a fyziologii v roce 1933. Čím je vzdálenost mezi geny na chromosomu větší, tím je větší i pravděpodobnost rekombinace mezi nimi a síla genové vazby klesá. Ale pokud jsou oba sledované geny na chromosomu velmi blízko sebe, stoupá síla genové vazby a klesá pravděpodobnost rekombinace. Pomocí rekombinačního zlomku při známých výsledcích křížení můžeme vypočítat sílu vazby. (Ziegler, 2011)

### **2.2.2 Centrální dogma**

Základní pohled na přenos a realizaci genetické informace představuje centrální dogma. Základní schéma tohoto dogmatu muselo být několikrát modifikováno, níže je uvedena jednodušší forma zachycující realizaci znaku. (Otová, 2019)

**DNA (Gen) -> transkripce -> mRNA -> translace -> protein -> uplatnění proteinu -> dědičný znak**

V přítomnosti mutace v genu, se syntetizuje pozměněný protein nebo vůbec žádný protein, právě toto má za následek odlišný projev dědičného znaku, tudíž mutace může podmiňovat vznik určitých genetických chorob. (Otová, 2019)

### **2.2.3 Dědičné znaky**

Vlastnosti organismu vzniklé expresí genů označujeme jako dědičné znaky. Fenotypem označujeme jejich soubor v rámci jednoho organismu. Některé mohou být pozorovatelné, některé zjišťujeme pouze za pomoci speciálních vyšetření. Dělíme je z hlediska uplatnění na anatomicko-morfologické, fyziologické a psychologické. Také se dají dělit podle jejich měřitelnosti na kvalitativní a kvantitativní. Kvalitativními znaky myslíme znaky, které jsou neměřitelné a tvoří několik odlišných variant. Například krevní skupiny v ABO systému. (Doškař et al., 2009)

Kvantitativními znaky označujeme znaky měřitelné, které tvoří plynulou řadu variant a můžeme je vyjádřit Gaussovou křivkou. Například výška jedince. (Doškař et al., 2009)

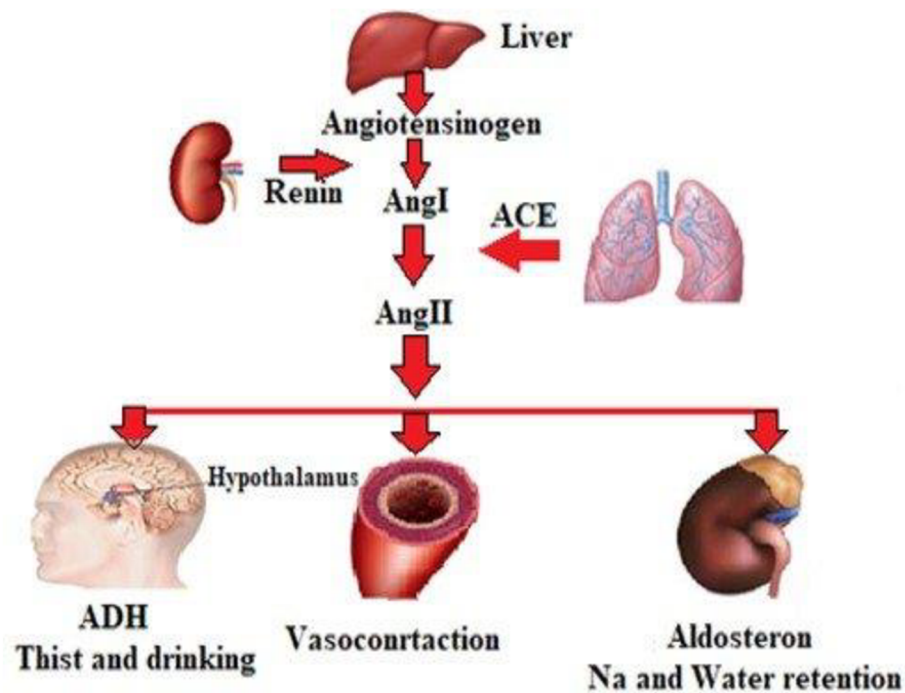
### **2.2.4 Genetické poruchy**

Genetická porucha je způsobena abnormálním genem. Abnormální gen můžeme zdědit nebo může vzniknout spontánně jako výsledek nové mutace. Genové abnormality jsou poměrně běžné. Každý člověk nese v průměru 100–400 abnormálních genů. Odpovídající gen v páru je však většinou normální a zabraňuje škodlivým účinkům abnormálního genu. V běžné populaci je velmi malá šance, že osoba bude mít dvě kopie stejného abnormálního genu. (Finegold, 2021)

## 2.3 Gen ACE

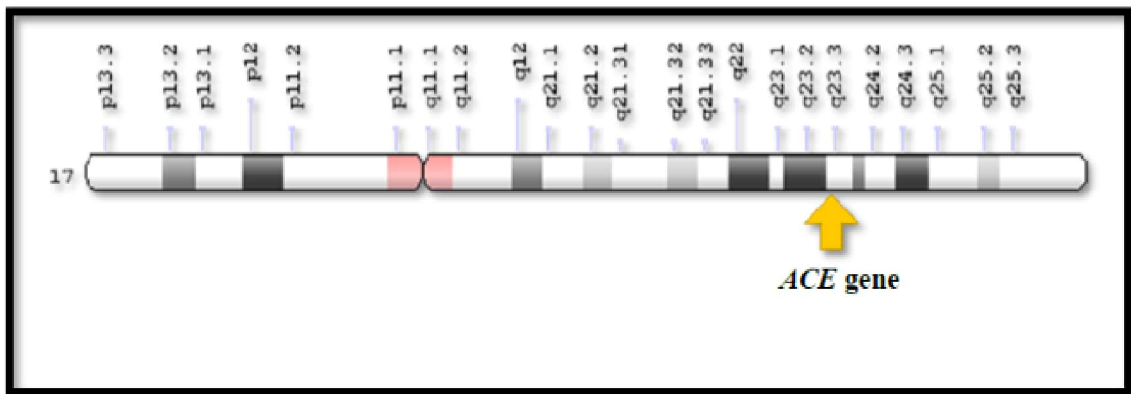
### 2.3.1 Popis

ACE je zkratka pro angiotenzin konvertující enzym. Jedná se o karboxy-terminální dipeptidyl-exopeptidázu obsahující zinek, který hraje důležitou roli v regulaci krevního tlaku jako součást reninangiotenzinového systému angiotenzin II (ATII). (Acharya et al., 2003)



Obrázek 1: Renin-angiotenzin-aldosteronový systém (Gelen et al., 2021)

ACE je lokalizovaný na chromozomu 17q23. Obsahuje inzerčně(I)/deleční(D) polymorfismus v intronu 16 charakterizovaný přítomností nebo absencí 287 bp dlouhé Alu repetitivní sekvence. Avšak mechanismus účinku inzerčně-delečního polymorfismu není přesně znám. (Martínez-Ríos et al., 2008)



Obrázek 2: Umístění lidského genu ACE na chromozomu 17q23 (Sobhi. Saqer, 2016)

ACE je také označován jako CD143, DCP1. (Metzger et al., 2011)

### 2.3.2 *Funkce*

ACE má dvě hlavní funkce:

- Katalyzuje přeměnu angiotenzinu I na angiotenzin II. Odstraňuje z dekaeptidu angiotensinu I dvě karboxy-terminální aminokyseliny a tvoří oktapeptid AT II, také označován jako prozánětlivý, protože zvyšuje hladinu prozánětlivých cytokinů. Angiotenzin II se podílí na vazokonstrikci neboli stažení cév. (Gribouval et al., 2005)
- ACE je schopen inaktivovat bradykinin, který se považuje za silný vazodilatátor. Bradykinin způsobuje rozšíření cév, což snižuje krevní tlak. Inaktivace bradykininu napomáhá zvyšování krevního tlaku. (Gribouval et al., 2005)

ACE se také podílí při vzniku a rozvoji aterosklerózy, chronického srdečního selhání, cévní mozkové příhody, schizofrenie, demence, Alzheimerovy choroby a dalších akutních nebo chronických zánětlivých onemocnění. (Santos et al., 2017; Okwan-Duodu et al., 2019)

### 2.3.3 *Výskyt v organismu*

ACE je přítomný na endoteliálních buňkách tzn. na buňkách vystylající vnitřek krevních i lymfatických cév v mnoha tkáních (například děloha, placenta, srdce, mozek, ledviny, leukocyty, alveolární makrofágy, periferní monocyty, neurony). (Bernstein et al., 2013)

Harmer et al. (2002) zjistili pomocí kvantitativní RT-PCR expresi *ACE1* ve všech 72 zkoumaných tkáních. Exprese byla zvláště vysoká v ileu, jejunu, duodenu, varleti, plicích, plicních cévách a prostatě. (McKusick, 1989)

#### **2.3.4 Patologie**

Mutace genu *ACE* jsou nejčastější příčinou závažné poruchy ledvin zvané renální tubulární dysgeneze. Toto onemocnění se projevuje abnormálním vývojem ledvin před narozením, neschopností vylučovat moč a výrazně nízkým krevním tlakem. (Cieszczyk et al., 2009)

Patologický polymorfismus rs4646994 má další klinické konsekvence, ovlivňuje hypertrofii levé srdeční komory (D alela), závažnost mikrovaskulárního onemocnění (diabetickou nefropatii) a vývoj Alzheimerovy choroby (degradací amyloidového peptidu), může také ovlivnit etiopatogenezi mnohočetného myelomu. (Zmorzynski, 2019)

Etiopatogeneze znamená soubor příčin a mechanismů, které vedou ke vzniku a rozvoji nemoci. Tady konkrétně vzniku mnohočetného myelomu, což je velmi závažné nádorové onemocnění způsobeno proliferací plazmatických buněk a jejich akumulací v kostní dřeni. (Zmorzynski, 2019)

Polymorfismus rs4646994 může také souviset s opakováním hypertenzního intracerebrálního krvácení (krvácení do mozku), s výskytem psoriázy neboli lupénky, onemocněním ledvin, a dokonce i mrtvice. (Íñiguez et al., 2021)

#### **2.3.5 Léčba**

V souvislosti s jeho funkcemi je inhibice *ACE* hlavním cílem léčby chorob, jako je vysoký krevní tlak, srdeční selhání, diabetická nefropatie a diabetes mellitus II. typu. Inhibice *ACE* (použitím inhibitorů) omezí tvorbu angiotenzinu II což vede ke sníženému vylučování aldosteronu, řízeného angiotenzinem II, z kůry nadledvinek a tím dojde ke snížené reabsorbci vody a sodíku. (Ahmetov II & Robozkin VA, 2009)

Při použití inhibitorů *ACE* a beta-blokátorů u probandů s léčbou srdečního selhání se podle rozsáhlých studií ukázalo zlepšení výsledků. Tyto výsledky vedly k doporučení, aby všichni probandi, kteří mají srdeční selhání doprovázené nízkou ejekční frakcí a kteří

mohou tolerovat inhibitory *ACE* a betablokatory, byli léčeni oběma přípravky. (Van der Horst et al., 2007)

Exner et al. (2001) se zaměřili na skutečnost, že probandi černé pleti se srdečním selháním mají horší prognózu než probandi bílé pleti, a provedli studii srovnávající rasové skupiny. Zjistili, že zatímco léčba enalapilem je u bělošských probandů s funkcí levé komory spojena s významným snížením rizika hospitalizace pro srdeční selhání, u podobných černošských probandů takový účinek nemá. Vysvětlení menší odezvy na inhibitor *ACE* u černošských probandů nebylo jasné. (McKusick, 1989)

Tento gen je obecně nejčastěji testovaným genem vzhledem ke kardiovaskárnímu onemocnění, navíc také hraje roli v plodnosti díky své schopnosti štěpit a uvolňovat membránové proteiny GPI ve spermiích. (Íñiguez et al., 2021)

### **2.3.6 Alely**

Přítomnost alely D je spojována se zvýšenou aktivitou enzymu a vyššími hladinami *ACE* v plazmě. (Rahimi, 2021)

Přítomnost alely I je spojována naopak s nižší sérovou a tkáňovou úrovní aktivity *ACE*. Na základě vědeckých studií bylo prokázáno, že přítomnost alely I v genu *ACE* způsobuje zvýšenou mechanickou účinnost trénovaného svalu tzn. zvýšené množství pomalých svalových vláken, větší odolnost proti únavě, vyšší  $VO_{2max}$  (maximální množství kyslíku, které tělo dokáže využít během fyzické aktivity), celkové zlepšení mechanické svalové účinnosti a také větší sycení kyslíkem periferních tkání v průběhu jakékoliv zátěže. (Hyjánek, 2015)

## **2.4 Polymorfismy**

Genetický polymorfismus je označení pro výskyt téhož znaku ve více tvarech, formách, přičemž tato mnohotvárnost je geneticky podmíněna. (Strachan and Read, 2011)

Jednonukleotidové polymorfismy (z angl. single nucleotide polymorphisms neboli SNP) jsou nejčastěji zastoupenou genetickou změnou v lidském genomu. Každý jednonukleotidový polymorfismus představuje rozdíl v jedné stavební jednotce, tzn. nukleotidu. Z tohoto důvodu se jednonukleotidové polymorfismy nejčastěji označují písmeny symbolizujícími tyto stavební jednotky A – adenin, C – cytosin, G – guanin nebo

T – thymin a také číslem odpovídajícím určité poloze na DNA. Jelikož se vyskytuje jeden SNP na 300 po sobě následujících nukleotidů, znamená to, že v celém lidském genomu se jich nachází přibližně 10 milionů. Většina SNP nemá na lidské zdraví přímý vliv, ale mohou např. pozměnit účinek léku nebo reakci organismu na zátěž chemickými nebo biologickými škodlivinami v životním prostředí. Přítomnost SNP je možné využít při sledování dědičnosti patologického znaku v rodinách s vysokým výskytem závažných chorob, např.: diabetu, kardiovaskulárních či nádorových onemocnění. (MaRu, 2010)

Úspěšné dokončení projektů HUGO (Human Genome Project) v roce 2003 a International HapMap Projekt v roce 2005 přineslo obrovský pokrok v oblasti poznání lidského genomu. V rámci těchto projektů byly vytvořeny genové banky a databáze, které vedly ke zrychlení vývoje různých technologických platforem. (MaRu, 2010)

V současnosti probíhá intenzivní výzkum využívající asociační genomové studie (z angl. Genome-Wide Association Studies) v oblasti genomiky. Tyto studie mapují výskyt SNP v lidském genomu a snaží se najít jejich asociaci s konkrétními onemocněními. Za použití nejnovějších metod jsou sledovány statisíce SNP současně a následně je statisticky ohodnocen jejich výskyt u postižených dobrovolníků a kontrolních zdravých jedinců. Výsledkem je odhalení tzv. kandidátních SNP. Jedná se o SNP, které se vyskytují ve skupině nemocných významně častěji než ve skupině zdravých jedinců a ty jsou pak dále studovány. Po ověření výsledků nezávislými studiemi a zjištění mechanismu působení identifikovaných genů je možné navrhnout panel kandidátních genů pro identifikaci osob, kteří mají zvýšené riziko vzniku onemocnění a zaměřit se u nich na preventivní opatření. (MaRu, 2010)

V databázi Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI) je uvedeno více než 160 polymorfismů genu *ACE*, přičemž většinou se jedná o jednonukleotidové polymorfismy (SNP). (MaRu, 2010)



Tabulka 1: Polymorfismy v genu *ACE*

Polymorfismus	Mutovaná alela	Možné genotypy	Výskyt v populaci (Ensembl, 2022)	Klinický význam	Zdroje
rs4646994 rs1799752 rs4340 rs13447447	I	II DD ID	21% 28% 51%	Alzheimerova choroba, nefropatie u diabetes mellitus syndrom polycystických vaječníků, fyzická aktivita u sportovců, Covid-19, riziko plicního onemocnění, spontánní intracerebrální krvácení	(Hsieh et al., 2020), (Kalita et al., 2011), (Cintra et al., 2018), (Shaikh et al., 2014), (Wang et al., 2015), (Maron et al., 2006), (Qin et al., 2013)
rs12449782	G	GG AA GA	31% 24% 45%	Zvýšené riziko diabetické nefropatie	(Hadjadj et al., 2007)
rs4291	T	TT AA AT	13% 43% 44%	Unipolární deprese, hypertenze s glukózou na lačno	(Baghai et al., 2006; Irvin et al., 2010)
rs4292	T	CC TT CT	9% 34% 57%	Asociace s velkou depresí v thajské populaci	(Angunsri et al., 2009)
rs4293	A	GG AA AG	33% 28% 39%	Vyšší riziko Alzheimerovy choroby	(Alzgene – Genový přehled všech publikovaných studií AD-asociace pro ACE, 2011)
rs4309	C	CC TT CT	38% 23% 39%	Asociace s hypoxií s osteonekrózou hlavice femuru, Alzheimerova choroba	(Hong et al., 2010; Deng et al., 2015)
rs4311	T	TT CC CT	13% 46% 41%	Diabetická nefropatie, riziko recidivy intracerebrálního krvácení u amyloidní angiopatie, genetické rizikové faktory pro hepatopulmonální syndrom u pacientů s pokročilým onemocněním jater	(Hadjadj et al., 2007; Roberts et al., 2010)
rs4343	A	GG AA AG	15% 44% 41%	Diabetická nefropatie, Alzheimerova choroba, ženské reprodukční poruchy	(MyHeritage, 2019)

## 2.5 Polymorfismus rs4646994

Polymorfismus rs4646994 je jedním ze čtyř nejlépe prostudovaných SNP v genu *ACE*. Tento polymorfismus má i jiná označení: rs1799752, rs4340, rs13447447. (Thorn et al., 2010)

Polymorfismus rs4646994 má souvislost s rizikem onemocnění koronárních tepen u probandů s diabetem II. typu, s rizikem primárního intracerebrálního krvácení, s rizikem plicního onemocnění. Také má účinek na hladiny proteinů *ACE2*, vstupního receptoru SARS-CoV-2 v alveolárním plicním epitelu. Dále se spojuje se syndromem polycystických vaječníků, fyzickou aktivitou u sportovců, se srdečním selháním, vysokým krevním tlakem a Alzheimerovou chorobou. (Van Geel, 2001)

## **2.6 Klinický význam polymorfismu rs4646994**

### **2.6.1 Alzheimerova choroba**

Alzheimerova choroba je onemocnění, které postihuje zejména starší jedince. Jedná se o nejrozšířenější typ demence, která se obvykle rozvíjí po 60-65 letech věku. Jedná se o neurodegenerativní onemocnění, u něhož se za hlavní příčinu progresu nemoci považují plaky amyloidu beta. Předpokládá se, že amyloidní plaky tvořící se v mozku, způsobují zánět a v důsledku toho vyvolávají imunologickou reakci, která vede k neurodegeneraci. (Yu et al., 2010)

Uvádí se, že prevalence neurodegenerativních onemocnění s věkem stoupá. Alzheimerova choroba představuje komplexní onemocnění, v jehož patogenezi jsou důležité dědičné faktory, ale i faktory prostředí. Sporadická forma Alzheimerovy choroby představuje více než 90 % všech případů. (Yu et al., 2010)

Na základě studií dvojčat a rodinných studií se dědičnost Alzheimerovy choroby pohybuje v rozmezí od 49 % do 79 %. Přibližně 0,1 % případů Alzheimerovy choroby tvoří tzv. familiární typ s autozomálně dominantní dědičností a s nástupem před 65. rokem věku. (Gatz et al., 2006; Blennow et al., 2006; Wilson et al., 2011)

Tento typ Alzheimerovy choroby (AD) je znám jako časná forma (presenilní) nebo také familiární AD. Většina autozomálně dominantních familiárních forem Alzheimerovy choroby (AD) je způsobena mutacemi v jednom ze tří genů: gen pro amyloidový prekurzor (APP), presenilin 1 a 2. (Waring a Rosenberg, 2008)

V roce 1999 byla poprvé zmíněna možná asociace mezi Alzheimerovou chorobou a polymorfismem I/D v genu *ACE* (Kehoe et al., 1999) Alela D je spojena se zvýšenou hladinou enzymu *ACE*, což souvisí s metabolickým syndromem (Kehoe et al., 2018). Preklinické a klinické studie byly a jsou pro studium v patofyziologii

Alzheimerovy choroby velmi významné. Zvláštní pozornost byla věnována potenciální úloze genu *ACE* při odbourávání amyloidních plaků. (Hsieh et al., 2020)

Gen *ACE* je nyní považován za gen s vysokou náchylností k Alzheimerově chorobě. (Kehoe et al., 1999; Lehmann et al., 2005) Alela I genu *ACE* je spojována nejen se zvýšeným rizikem Alzheimerovy choroby, ale také s jejími behaviorálními a psychologickými příznaky u AD pacientů. (Hsieh et al., 2020)

Podle databáze metaanalýz Alzheimerovy choroby, kandidátních genů uvedených na Alzgene (Bertram et al., 2007) mají *ACE* I/D a příbuzné haplotypy spojené s rizikem AD nižší plazmatické hladiny *ACE* (I/I), zatímco protektivní genotypy mají vyšší plazmatické hladiny *ACE* (D/D) (Meng et al., 2006), přičemž protein ACE má amyloidní plaky degradující vlastnosti. (Wang et al., 2006) Tato zjištění naznačují, že protein ACE může být užitečný v terapii Alzheimerovy choroby (Wang et al., 2006). S ohledem na výše uvedené skutečnosti byla provedena genetická analýza polymorfismu genu *ACE* za účelem zjistit, zda existuje nějaká souvislost mezi variacemi genu *ACE* a Alzheimerovou chorobou v etnické skupině Kašmír. Studie Nissar et al. (2021) zahrnovala 59 klinicky prokázaných pacientů s Alzheimerovou chorobou z celkového počtu 300 osob odeslaných na kliniku paměti v Ústavu duševního zdraví a neurověd v Kašmíru. Výsledky studie Nissar et al. (2021) ukázaly, že v kontrolní skupině byly genotypové frekvence těchto polymorfismů v Hardy-Weinbergově rovnováze (HWE). Případy a kontroly byly upraveny podle věku a etnického původu. V rámci této studie byla provedena analýza pro distribuci genotypů u kontrol a pacientů s AD zaměřená na variantní genotypy a jejich možnou souvislost s náchylností k AD. V případě *ACE* zjistili, že variační I/D genotyp intronu 16 *ACE* byl častější u pacientů s AD než u kontrol. Statistická analýza prokázala, že genotyp I/D intronu 16 *ACE* D> I zvýšil riziko AD čtyřikrát (OR- 4,87, p-0,004, 95% CI-1,89-12,54). (Nissar et al., 2021)

Tabulka 2 ukazuje vztah mezi polymorfismem genu *ACE* a Alzheimerovou chorobou. U případů AD a kontrol byla distribuce alel I 45,8 % vs 29,8 %, zatímco frekvence genotypu I/D byla 44,07 % vs 17,3 %. Při p-hodnotě 0,05 jsou obě hodnoty statisticky významné. (Nissar et al., 2021)

Podobné studie genových polymorfismů v individuální náchylnosti k Alzheimerově chorobě mohou vést k lepšímu pochopení této choroby a k lepším vodítkům pro prevenci a terapii onemocnění, které bylo dosud považováno za nevléčitelné. (Nissar et al., 2021)

Tabulka 2: Vztahy mezi polymorfismem genu *ACE* a Alzheimerovou chorobou (Nissar et al., 2021)

Varianty <i>ACE</i> (I/D)	Kontroly n (%)	Případy n (%)	Hodnota P
DD	32 (61,5%)	19 (32%)	neuvedeno
ID	9 (17%)	26 (44%)	0,004
II	11 (21%)	14 (24%)	0,14
ID + II	20 (38,5%)	40 (68%)	0,002
Alela D	73 (70%)	64 (54%)	neuvedeno
Alela I	31 (30%)	54 (46%)	0,01

### 2.6.2 Nefropatie u diabetes mellitus

Diagnostická jednotka *Diabetes mellitus* (DM) neboli cukrovka může být považována za celosvětovou rostoucí epidemii a představuje velkou socioekonomickou výzvu. Hlavní příčinou smrti v případě onemocnění DM je nefropatie způsobená terminálním onemocněním ledvin (ESRD). (Gheith et al., 2015)

Ve studii Kalita et al. (2011) bylo cílem identifikovat možnou asociaci I/D variant genu *ACE* a M268T (rs699) genu *AGT* systému renin – angiotensin – aldosteron (RAAS). Celkem bylo vyšetřeno 115 probandů s DM, 110 s diabetickou nefropatií a 110 kontrol. Probandům byla nalačno odebrána krev, která byla dále určena pro biochemické a genetické analýzy.

Závěr této studie je velice zajímavý. Mezi diabetickými pacienty s nefropatií a bez nefropatie byly pozorovány rozdíly ve výskytu genotypu D/D v genu *ACE*. Angiotenzinogen a jeho polymorfismus M235T, konkrétně alela T, hraje důležitou roli v rozvoji diabetické nefropatie u IDDM. Souběžný výskyt alely D v genu *ACE* i alely T v genu *AGT* lze považovat za genetický rizikový faktor pro rozvoj nefropatie u diabetu. (Kalita et al., 2011; Rogus et al., 1998)

### 2.6.3 *Primární spontánní intracerebrální krvácení*

Intracerebrální krvácení (ICH) neboli krvácení do mozku se může objevit v důsledku hypertenze, cévních malformací – vrozených vývojových vad, mozkové amyloidové angiopatie (CAA), traumatu a koagulopatie. Nejčastější příčinou primárního spontánního intracerebrálního krvácení (PSICH) u mladých lidí je hypertenze a u starších mozková amyloidová angiopatie. Hypertenze je důležitou příčinou gangliového i cerebelárního krvácení a může být také příčinou lobárního krvácení (krvácení postihující lalok). Arteriální patofyziologie hypertenzní ICH je lipohyalinóza malých hluboko pronikajících mozkových cév a ruptura mikroaneuryzmat. Lipohyalinóza byla vzácněji zaznamenána také v mozku normotenzních pacientů s rekurentním ICH. U starších osob může být lobální krvácení také způsobeno hypertenzí, ačkoliv je přičítáno k mozkové amyloidové angiopatii. (Qin et al., 2013)

S hypertenzí a onemocněním cévní stěny byla spojována celá řada kandidátních genů. Mezi nimi se vyskytl také gen *ACE* a jeho produkt enzym ACE. Tento enzym, omezující rychlost reninového angiotensinového systému, se podílí také na vaskulární remodelaci, což je patofyziologický a fyziologický proces probíhající v rámci dynamiky cévní stěny a při vzniku aterosklerózy. (Pontremoli et al., 2000)

V dostupné lékařské literatuře je nedostatek genetických studií spojovaných s ICH. Je známo, že gen *ACE* a *ADD1* je spojen s hypertenzí, navíc hypertenze je důležitým rizikovým faktorem ICH. (Qin et al., 2013)

Studie Misra et al. (2012) z indické neurologie hodnotila asociaci polymorfismů genu *ACE* a *ADD1* u pacientů s PSICH a jejich možné klinické dopady. V tomto případě D/D genotyp *ACE* a jeho asociace s G/G genotypem *ADD1* zvyšovaly riziko PSICH. Ve studii Qin et al. (2013) provedené na polské populaci, byl prokázán výskyt genotypu *ACE* D/D jako nezávislý rizikový faktor pro PSICH a nikoli pro onemocnění malých cév. Gen *ACE* hraje důležitou roli v endoteliálních funkcích a může se také podílet na rozvoji aterosklerózy. Genotyp D/D je spojován s infarktem myokardu a cévní mozkovou příhodou.

Existuje však mnoho publikací s konfliktními výsledky popisujícími roli genotypu *ACE* D/D jako rizikového faktoru pro spontánní ICH.

Studie Qin et al. (2013) uváděla negativní asociaci polymorfismu *ACE* se spontánním intracerebrálním krvácením. Diagnostikovali ICH na CT. MR angiografie byla provedena u pacientů, kteří byli mladí (<40 let), normotenzní nebo měli lobární ICH. Ostatní příčiny ICH, jako je arteriovenózní malformace, aneuryzma a krvácení z nádoru, jsou proto nepravděpodobné.

#### **2.6.4 Riziko plicního onemocnění**

Mezi nejčastější respirační onemocnění, která celosvětově způsobují velký počet úmrtí patří pneumonie pocházející z virových či bakteriálních infekcí alveolů. Dosud bylo provedeno mnoho výzkumů, zjišťujících etiologické faktory, přičemž zvláštní pozornost byla věnována systému renin-angiotenzin kvůli jeho možnému zapojení do iniciace a progresu pneumonie. (Sethi, 2020)

Ve studii Wang et al. (2015) zjistili, že polymorfismus rs4340 v intronu 16 genu *ACE* potlačuje reflex kašle snížením hladin bradykininu a substance P, čímž se zvyšuje pravděpodobnost rozvoje pneumonie. Existují různé zprávy týkající se korelace genotypů *ACE* rs4340 s rizikem pneumonie.

Celkem bylo analyzováno 10 studií v této kvalitativní metaanalýze, kdy našli velmi silnou souvislost mezi rs4340 jednonukleotidovým polymorfismem a rizikem pneumonie pomocí recesivního modelu (OR 1,33, 95% CI 1,13–1,57). (Wang et al., 2015)

Tato metaanalýza ukazuje, že polymorfismus *ACE* rs4340 může představovat rizikový faktor pro pneumonii. (Wang et al., 2015)

#### **2.6.5 Syndrom polycystických vaječníků (PCOS)**

Studie Cintra et al. (2018) došla k závěru, že mezi ženami s diagnostikovaným PCOS a kontrolní skupinou žen nebyly příliš velké rozdíly pro genotypovou a alelickou frekvenci v genu *ACE*. Ve výsledku je tedy pro ženy s tímto syndromem rizikovějším faktorem anamnéza familiárního PCOS. Ve studované populaci nebyla nalezena žádná souvislost mezi I/D polymorfismem genu *ACE* a PCOS.

#### **2.6.6 Fyzická aktivita u sportovců**

Britská studie Ferec (2018) prokázala následující frekvence genotypů *ACE*: I/I (24%), I/D (50%) a D/D (26%) ve skupině sportovců. Na základě těchto výsledků poté zhodnotili význam jednotlivých genotypů pro sportovní výkon.

Genotyp *ACE I/I* je spojován se zvýšenou účinností deltového svalu u aerobních cvičení. Deltový sval je povrchově uložený kosterní sval, který objímá ramenní kloub. Za aerobní cvičení se považuje jakékoliv cvičení o střední intenzitě prováděné delší čas se zvýšenou tepovou frekvencí. Dále je spojován s vyšší výkonností u posilování, s vyšším počtem opakování a má vytrvalostní profil. U tohoto profilu se nepředpokládá výrazný nárůst svalové hmoty. Na vytrvalostní kapacitu má vliv přítomnost dvou alel, a to alely *I ACE* a alely *-9* u genu *BDRKB2*. V exonu 1 tohoto genu je přítomen polymorfismus *+9/-9*, jehož genetické varianty jsou vyjádřeny absencí (alela *-9*) nebo přítomností (alela *+9*) repetice o délce 9 bp. (Lung et al., 1997; Ferec, 2018)

Genotyp *I/D ACE* je spojován s vyšším srdečním výkonem a vyšším maximálním výkonem, výraznější aerobní reakcí na trénink, lepší odolností vůči únavě, zvýšeným podílem pomalých fázických vláken typu I, vyšší  $VO_{2max}$  a také větší účinností aerobního výkonu. (Ferec, 2018; Winniski et al., 2004)

U genotypu *D/D* můžeme očekávat vyšší nárůst svalové hmoty v průběhu tréninku se zátěží a s lepším výkonem v silových sportech. Vyšší koncentrace *ACE* v krevním oběhu souvisí s izometrickou a kinetickou silou kvadricepsu, a to velmi výrazně. U nositelů tohoto genotypu je velmi důležité sledovat intenzitu zátěže, protože je u nich možná hypertrofie srdeční komory v důsledku fyzického tréninku. Jelikož se u těchto nositelů objevuje při absenci fyzické aktivity vyšší sklon k tvorbě tukových zásob, je důležité hlídat si stravu a upravit ji tak, aby odpovídala vyššímu riziku hypertenze a špatné regulaci glukózy. (Ferec, 2018)

Jiná studie Cieszczyk et al. (2010) provedená na 55 polských veslařích mužského pohlaví zahrnovala i olympijské vítěze a světové šampiony. Tato studie prokázala, že se v této skupině častěji vyskytuje alela *I* ve srovnání s kontrolními subjekty. Williams et al. (2004) zjistili, že nositelé *ACE I/I* a genu pro bradykininový receptor  $B_2$  s alelou *-9* (*BDRKB2-9-9*) mají větší účinnost svalové kontrakce u příčně pruhované svaloviny, přičemž právě tyto genotypy jsou spojovány se špičkovými vytrvalostními sportovci.

Alela *I* má ale také své negativní aspekty. Jedinci s nízkým příjmem vápníku, kteří jsou nositeli genotypu *ACE I/I* či *I/D*, trpí po tréninku hypertenzí, pokud se hodnota  $VO_{2max}$  dostane na 60%. Také u těchto jedinců dochází po fyzické zátěži k vyššímu nárůstu kreatinkinázy než u genotypu *D/D*. Ke zvýšení koncentrace kreatinkinázy obvykle

dochází při poškození buněk, ve kterých je enzym přítomný. V důsledku toho se pak enzym vyplavuje ve vyšší míře do krve. Projevuje se svalovou bolestí nebo slabostí svalů. (Ferec, 2018)

Mezi nositeli alely D se nacházejí sportovci se špičkovými plaveckými výkony na krátkých tratích. Výskyt alely D je spojován s vyšším podílem čisté svalové hmoty a vyšší hmotností těla. (Ferec, 2018)

Autoři studie se domnívají, že genotyp I/I zvyšuje riziko poškození svalů, zatímco genotyp D/D má potenciálně ochranný účinek, což může pramenit z role systému renin-angiotenzin při regulaci svalového zranění v zátěži. (Ferec, 2018)

### **2.6.7 Kardiomyopatie**

Kardiomyopatie patří mezi heterogenní onemocnění myokardu, které vzniká v důsledku jeho patologických změn různé etiologie a projevuje se jako hypertrofie nebo dilatace komor. Mezi kardiomyopatie nepatří dysfunkce myokardu, která je způsobena jinými kardiovaskulárními onemocněními, jedná se např. o chlopenní, hypertenzní, vrozené srdeční vady a ischemickou chorobu srdeční. (Sugrue, 1988)

Kardiomyopatie může nakonec vést k progresivnímu srdečnímu selhání, arytmií, tromboembolií a náhlé smrti a má celkově špatnou prognózu. Kardiomyopatie lze obecně rozdělit na hypertrofickou kardiomyopatii (HCM), dilatační kardiomyopatii (DCM), restriktivní kardiomyopatii (RCM), arytmogenní kardiomyopatii pravé komory (ARVC) a izolovaná non-kompaktní kardiomyopatie (LVNC). Nejčastějšími typy kardiomyopatií jsou hypertrofická kardiomyopatie (HCM) a dilatační kardiomyopatie (DCM). (Maron et al., 2006)

Mnoho předchozích klinických studií uznalo, že kardiomyopatie může mít familiární původ, což naznačuje, že v patogenezi onemocnění mohou hrát zásadní roli genetické faktory. (Michels et al., 1992)

Hypertrofickou kardiomyopatii (HCM) a dilatační kardiomyopatii (DCM) způsobují mutantní kardiomyopatie sarkomerických genů. Mutace v genech pro sarkomerické proteiny mohou způsobit změny v myofilamentech, které určují hypertrofii a dilataci srdce. Nedávné studie prokázaly, že polymorfismy zahrnující geny kódující složky renin-angiotenzinového systému (RAS), jako je *ACE*, jsou spojeny s rizikem vzniku hypertrofie



levé komory (LVH) a mohou tak ovlivňovat klinický fenotyp HCM/DCM. (Lim, 2016; Bleumink et al., 2004; Keren et al., 2008)

Dřívější studie ukázaly, že u pacientů s HCM a DCM je významně zvýšená LVH. (Kaufman et al., 2007; Marian a Roberts, 1995; Van Spaendonck-Zwarts et al., 2013).

*ACE* D/D genotyp může tak být významným genetickým faktorem v patogenezi HCM/DCM. (Perkins et al., 2005; Rai et al., 2008)

V posledních 20 letech vznikly četné studie uvádějící souvislost mezi I/D polymorfismem genu *ACE* (rs4646994) a HCM i DCM. Jejich výsledky jsou však rozporuplné, zejména asociace s DCM, která je v současné době kontroverzní. (Yang et al., 2013)

### **2.6.8 COVID-19**

Koronavirové onemocnění (COVID-19) způsobené závažným akutním respiračním syndromem, se nadále rozšiřuje a ohrožuje lidské zdraví a veřejnou bezpečnost. Je nezbytné identifikovat rizikové faktory, které vedou ke špatné prognóze onemocnění. Predisponující genetické pozadí hostitele by mohlo být jedním z těchto faktorů, které vysvětlují inter individuální variabilitu závažnosti COVID-19. Španělská pilotní studie zjišťovala, zda polymorfismy rs4341 a rs4343 genu *ACE*, klíčového regulátoru systému renin-aldosteron-angiotensinový systém (RAAS), mohou vysvětlit různé výsledky u 128 pacientů s COVID-19 s různým stupněm závažnosti (33 asymptomatických nebo mírně symptomatických jedinců, 66 pacientů hospitalizovaných na všeobecném oddělení a 29 pacientů přijato na JIP). Tato studie zjistila, že alela G rs4341 a G rs4343 byla spojena s těžkým průběhem COVID-19 u hypertoniků, nezávisle na pohlaví. Genotypy s alelou G u obou polymorfismů byly také spojeny s vyšší úmrtností a vyšší závažností COVID-19 u dyslipidemických a diabetických pacientů s DM typu 2. Asociace G alely se závažností onemocnění byla vztažena k věku, pohlaví, BMI a počtu souběžných onemocnění.

Přestože nebyla nalezena přímá souvislost mezi sérovými hladinami *ACE* a závažností COVID-19, byly detekovány vyšší hladiny *ACE* v séru pacientů s genotypem GG rs4341 a G/G rs4343, což by mohlo vysvětlit vyšší náchylnost k rozvoji závažné formy onemocnění u pacientů s tímto genotypem (G/G). Mezi závažné formy onemocnění není zahrnuta hypertenze a dyslipidémie – metabolické onemocnění způsobené zvýšenou koncentrací lipidů. Tato studie naznačuje, že genotypy s alelou G pro rs4341 i rs4343 vytvářejí další rizikový faktor pro nepříznivou prognózu COVID-19. Zmíněné polymorfismy by tedy mohly sloužit jako markery závažnosti COVID-19 u probandů s hypertenzí, dyslipidemií nebo diabetem. Znalost těchto genetických faktorů by mohla přispět k individualizované péči o pacienty infikované SARS-CoV-2 při přijetí do nemocnice. (Íñiguez et al., 2021)

### **3 Laboratorní vyšetření polymorfismu rs4646994 v genu ACE**

#### **3.1 Odběr materiálu pro analýzu DNA**

Pro provedení genetického vyšetření je potřebné odebrat vzorek tkáně od pacienta, ze kterého můžeme následně izolovat DNA. Pro tyto účely lze využít jakýkoliv materiál, který obsahuje buňky s nepoškozeným jádrem. (Kočárek, 2007)

Nejčastěji odebíraným materiálem jsou leukocyty z venózní krve pacienta. Zpravidla se odebírá 5-10 ml krve. Vzorek se odebírá do předem připravených zkumavek s chelatačním činidlem, aby se zabránilo případnému sražení krve. Nejvíce se používá kyselina etylendiaminotetraoctová neboli EDTA. Odebraný vzorek lze transportovat při pokojové teplotě a uchovávat několik dní při teplotě 4°C. Krev je také možné zamrazit při -20°C a izolaci nukleových kyselin provést později. (Kočárek, 2007)

Mezi další významné metody patří stěr epitelálních buněk z ústní sliznice neboli tzv. bukalní stěr. Odběr se provádí vatovým tamponem z vnitřní strany tváře. Výhoda této metody je její neinvazivnost. (Kočárek, 2007)

#### **3.2 Izolace DNA**

Extrakcí z buněčného jádra nebo mitochondrií se získávají čisté molekuly DNA a tomuto procesu se říká izolace DNA. (Beránek, 2016; Kuciel a Urban, 2016) Podle charakteru daného materiálu si volíme, jaký postup bude nejvhodnější. Pokud se jedná o tkáně či buněčné kultury, vzorek se před vlastní izolací musí homogenizovat. V případě volných buněk se homogenizace neprovádí. (Kočárek, 2007)

Prvním krokem u izolace DNA je lýza buněk tzn. že rozrušíme buněčné membrány. K tomuto rozrušení se používá detergent, který je obsažen v lyzačním puftru. Lyzační pufr obsahuje i EDTA, která způsobuje vyvázání Ca<sup>2+</sup> iontů a tím inaktivuje enzymy nukleázy, které se běžně nacházejí v buněčné cytoplazmě a štěpí nukleové kyseliny. Aby mohlo dojít k další genetické analýze, k naštěpení DNA nukleázami nesmí dojít. (Kočárek, 2007)

V dalším kroku dochází k uvolnění DNA do lyzačního pufru, a tak dochází k její precipitaci v polárním prostředí. DNA se poté vysuší a rozpustí ve vodě. Vodný roztok je přepraven pro vlastní analýzu a může být skladován při 4 °C. Při dlouhodobějším skladování při -20°C či -80°C. (Slabý, 2015)

Mezi běžně používané metody patří vysolovací metoda, která využívá působení vysoce koncentrovaných roztoků solí. A další metodou je fenol-chloroformová metoda jejíž princip je založen na denaturačních a inhibičních účincích organických rozpouštědel. Vysolovací metoda je bez použití organických rozpouštědel, což se považuje za výhodu oproti metodě fenol-chloroformové, kde jsou větší zdravotní a bezpečnostní rizika. (Slabý, 2015)

V současnosti se nejvíce používají komerční kity využívající adhezivní schopnosti molekul DNA k pevným částicím silikátu v roztoku solí, zajišťující vhodné pH a iontové síly. (Slabý, 2015)

### **3.3 Měření koncentrace DNA**

Po izolaci DNA následuje změření její koncentrace a čistoty izolátu nukleových kyselin. Jako nejjednodušší metoda se používá měření absorbance v ultrafialové oblasti. Nukleové kyseliny absorbují maximum záření při vlnové délce 260 nm a míra absorbance při této vlnové délce odpovídá koncentraci DNA v měřeném vzorku. (Barbas et al., 2007)

Tato metoda se dá také využít pro stanovení míry kontaminace izolátu DNA proteiny, které mají absorpční maximum při vlnové délce 280 nm. Míra znečištění vzorku se zjistí stanovením poměru obou absorbancí (poměr  $A_{260}/A_{280}$ ). V ideálním případě by se měla hodnota poměru pohybovat v rozmezí 1,8-2,0. Nižší hodnoty než 1,75 poukazují na vysoké znečištění vzorku. (Barbas et al., 2007)

V laboratorní praxi se běžně používají 2 metody, a to metoda spektrofotometrická a metoda fluorimetrická. (Barbas et al., 2007)

V současnosti nejmodernější přístroje umožňují nanášet velmi malé množství vzorku přímo do místa k vyústění optického vlákna analyzátoru. Díky povrchovému napětí se vzorek dokáže udržet na správném místě i v průběhu analýzy. (Barbas et al., 2007)

### **3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Polymerázová řetězová reakce (z anglického Polymerase Chain Reaction) je metoda, která se používá k amplifikaci vybraného úseku DNA. Amplifikovaný úsek DNA je ohraničen fragmenty DNA o 20-25 nukleotidech, které na základě komplementarity bází specificky přisedají k vybraným úsekům DNA a vymezují tak rozsah amplifikace, jsou to tzv. primery. Od těchto primerů probíhá syntéza DNA. (Bartůňková a Paulík, 2005)

Samotná syntéza probíhá díky termostabilní DNA polymeráze, která je izolovaná nejčastěji z bakterie *Thermus aquaticus*, zkráceně *Taq* polymeráza. Tento enzym je velmi termostabilní, proto si uchovává svou aktivitu i přes opakované působení teploty blízké teplotě varu při probíhající reakci. Při reakci je využíváno cyklických změn teplot, které umožňují denaturaci DNA, přisedání primerů a samotnou syntézu DNA. (Tellier et al., 2003)

Princip metody PCR je podobný jako při syntéze DNA během replikace DNA v buňce. DNA polymeráza přisedá k templátovému úseku DNA. Podle templátového úseku DNA polymeráza syntetizuje druhý komplementární řetězec. DNA polymeráza začíná syntézu od primeru, který je navázán na templátový, jednořetězový úsek. Syntéza probíhá od místa navázaného primeru, přičemž vzniká z jednořetězové dvouřetězová molekula DNA. Následně proběhne denaturace (rozpojení) dvouřetězové molekuly na dvě jednořetězové molekuly, které jsou v dalším kole syntézy DNA polymerázou opět doplněny na dvouřetězové. Tyto kroky se při PCR cyklicky opakují. (Kuciel a Urban, 2016) Úplný popis průběhu PCR je uveden v následujícím odstavci.

Tato metoda se využívá pro amplifikaci konkrétní sekvence DNA ve vzorku.

PCR reakce má tři fáze: denaturace, annealing a extenze. Při denaturaci se dvouvláknová DNA po dobu 20-30 sekund zahřívá na teplotu 94-98 °C. Dochází k rozrušení vodíkových můstků ve dvouvláknové molekule DNA, a tedy k rozvolnění dvoušroubovice. Vznikají tak dvě jednovláknové molekuly DNA. Annealing neboli nasednutí primerů probíhá při teplotě 50-65 °C. Primery nasedají na specifická místa DNA. Při syntéze DNA teplota závisí na použité DNA polymeráze, např. *Taq* polymeráza má optimum aktivity při 72-80 °C. V tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru od 5' konce ke 3' konci vzniká vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA. (Kuciel a Urban, 2016)

Tyto 3 kroky se cyklicky opakují a pro dostatečnou amplifikaci původní molekuly DNA obvykle stačí 30 cyklů. PCR probíhá v tzv. termocycleru. Termocycler je schopen během několika sekund zvýšit či snížit teplotu o několik desítek stupňů Celsia. (Kuciel a Urban, 2016)

### 3.5 *Gelová elektroforéza*

Gelová elektroforéza patří mezi nejpoužívanější separační techniky sloužící k analýze nukleových kyselin a proteinů (Bártová, 2011).

Princip metody je založen na pohybu záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě. Pomocí gelové elektroforézy lze separovat molekuly DNA na základě rozdílných rychlostí pohybu molekul DNA v gelu, které jsou nepřímo úměrné velikosti molekul DNA (Bártová, 2011).

Elektroforéza se provádí na vhodném nosiči, nejčastěji na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Gel je tvořen složitou sítí polymerních molekul s póry, kterou se molekuly DNA pohybují různě rychle v závislosti na jejich velikosti (Bártová, 2011).

Agarózový gel se připravuje rozpuštěním agarózy v příslušném pufru, povařením vzniklého roztoku, který je přenesen do elektroforetické formy s hřebeny, ve které ztuhne. Výsledkem je řada jamek na jedné straně gelu, které následně slouží ke vkládání vzorků DNA (Kuciel a Urban, 2016)

Pro odhad velikosti DNA fragmentů se do jedné jamky (nejčastěji do první jamky) gelu nanáší tzv. velikostní marker o definované velikosti jednotlivých fragmentů (např. 100bp ladder, 50bp ladder). (Bártová, 2011)

Pro vizualizaci fragmentů DNA se při gelové elektroforéze využívá fluorescenčního barvení agarózových gelů a jejich následného zviditelnění UV světlem. (Kuciel a Urban, 2016)

## 4 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je:

- Vypracování odborné rešerše na zadané téma.
- Praktické zvládnutí základních laboratorních metod v genetické laboratoři: izolace DNA, měření koncentrace DNA, příprava PCR reakce a gelová elektroforéza, metoda reverzní hybridizace na stripu. Analýza získaných výsledků.
- Optimalizace metody PCR pro vyšetření genotypů I/D polymorfismu rs4646994 v genu ACE.
- Zjištění výskytu jednotlivých genotypů I/D polymorfismu rs4646994 v genu ACE v různých skupinách pacientů. Zpracování vlastních i převzatých dat a jejich porovnání s daty, které uvádí jiné zdroje.

## 5 Praktická část

Praktická část mé bakalářské práce probíhala pod vedením Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích. V rámci praktické části bylo nutné izolovat DNA z bukalního stěru nebo z periferní krve, provést amplifikaci vybraného úseku genu pomocí PCR a vizualizovat PCR produkt pomocí gelové elektroforézy, analyzovat získaná data. Veškerá práce probíhala pod odborným dohledem.

V laboratoři jsem pro mou práci využila následující přístroje: stolní minicentrifuga/vortex, sada pipet, laminární box, elektroforetický systém, mikrovlnná trouba, chladnička pro laboratorní použití, iluminátor pro pozorování elektroforézy UV světlem, detekční systém pro focení gelu, teplotní cycler, termostat, chlazená centrifuga.

V praktické části jsem analyzovala 61 pacientů. Kontrolní skupinu tvořil soubor 157 jedinců dříve vyšetřených v genetické laboratoři GENLABS. Primárními vzorky pro izolaci DNA byly vzorky periferní krve nebo bukalní stěry.

### 5.1 *Izolace DNA*

Izolace DNA se provádí před každou molekulárně biologickou metodou. DNA je izolována nejčastěji z bukalního stěru nebo periferní krve pacienta. Odběr periferní krve provádí proškolení pracovník ve zdravotnickém zařízení. Bukální stěr si provádí pacient většinou sám dle přesně daných pokynů, které obdrží spolu s odběrovou sadou pro provedení bukalního stěru. V obálce také najde žádanky pro uvedení identifikačních údajů, štítek s adresou a štítky na popsání odběrové zkumavky. Pro správné provedení bukalního stěru je nutné dodržet následující pokyny: nejméně 60 minut před odběrem nejíst, odběrovým tamponem řádně otírat sliznice obou tváří po dobu 3 minut a maximálně do 48 hodin doručit vzorek do laboratoře pro další zpracování.

#### 5.1.1 *Izolace DNA z bukalního stěru*

Pro izolaci DNA z bukalního stěru jsem použila komerční kit GeneAll ExGene™ Clinic SV mini. Použité reagenty: proteináza K, BL pufr, BW pufr, TW pufr AE pufr, 100% ethanol.

Z mrazicího boxu jsem vyndala proteinázu K a nechala ji rozmrazit při pokojové teplotě. Nechala jsem si nahřát suchou lázeň na 56 °C a pro každý vzorek jsem si popsala 1,5 ml mikrozukmavku.



Ke vzorku jsem napipetovala 25  $\mu$ l proteinázy K (20mg/ml) a 300  $\mu$ l BL pufru. Vzorek s BL pufrém jsem důkladně promíchala pomocí vortexu, krátce stočila a nechala inkubovat 10 minut při 56 °C. Poté jsem zkumavku krátce stočila pro odstranění kapek z vnitřní strany víčka zkumavky a přidala 300  $\mu$ l 100% etanolu. V dalším kroku jsem provedla vortex v pulzech a krátké stočení. Všechnu směs jsem postupně nanesla na kolonku a zcentrifugovala 1 minutu při 8000 rpm. Nahradila jsem sběrnou zkumavku novou sběrnou zkumavkou a přidala 600  $\mu$ l BW pufru po 1 minutě centrifugace při 8000 rpm. Poté jsem opět nahradila sběrnou zkumavku čistou zkumavkou. Přidala jsem 700  $\mu$ l TW pufru a opět jsem stočila jako v předchozím kroku. Po stočení jsem odstranila supernatant ze sběrné zkumavky a kolonku jsem vrátila zpět do té samé sběrné zkumavky. Poté jsem provedla tzv. centrifugaci na sucho – při nejvyšších otáčkách 1 minutu, aby došlo k odstranění zbytkového promývacího pufru. Kolonku jsem umístila do nové popsané 1,5 ml mikrozukavky s víčkem, přidala jsem 50  $\mu$ l AE pufru přidává se přesně do středu filtru kolonky, aby se udělala kapka. Následně jsem dala inkubovat na 1-5 minut při 56 °C a zcentrifugovala při nejvyšších otáčkách po dobu 1 minuty. Dále jsem napipetovala získaný objem z předchozí centrifugace znovu na kolonku a opět jsem provedla centrifugaci ve stejné zkumavce při nejvyšších otáčkách po dobu 1 minuty.

### ***5.1.2 Izolace DNA z periferní krve***

Pro izolaci DNA z periferní krve jsem použila komerční kit GeneAll ExGene™ Clinic SV mini. Použité reagenty: proteináza K, BL pufr, BW pufr, TW pufr AE pufr, 100% ethanol.

Z mrazicího boxu jsem vyndala proteinázu K a nechala ji rozmrazit při pokojové teplotě. Nechala jsem nahřát suchou lázeň na 56 °C a pro každý vzorek jsem si popsala 1,5 ml mikrozukavku. Do čisté a popsané 1,5 ml mikrozukavky jsem si napipetovala 20  $\mu$ l proteinázy K (20mg/ml) a přidala 200  $\mu$ l vzorku. Do zkumavky se vzorkem a PK jsem přidala 200  $\mu$ l BL pufru. Vzorek s BL pufrém jsem důkladně promíchala pomocí vortexu a nechala inkubovat 10 minut při 56 °C. Poté jsem nechala krátce stočit pro odstranění kapek z vnitřní strany víčka zkumavky a přidala 200  $\mu$ l 100% etanolu. V dalším kroku jsem provedla vortexování v pulzech a krátké stočení. Všechnu směs jsem postupně nanesla na kolonku a zcentrifugovala 1 minutu při 8000 rpm. Nahradila jsem sběrnou zkumavku novou sběrnou zkumavkou a přidala 600  $\mu$ l BW pufru.

Po proběhnutí 1 minuty centrifugace při 8000 rpm jsem tento krok provedla ještě jednou pro odstranění nečistot ze vzorku. Po proběhnutí 1 minuty centrifugace jsem opět nahradila sběrnou zkumavku čistou zkumavkou. Přidala jsem 700 µl TW pufru a opět jsem stočila jako v předchozím kroku. Po stočení jsem odstranila supernatant ze sběrné zkumavky a kolonku jsem vrátila zpět do té samé sběrné zkumavky. Poté jsem provedla tzv. centrifugaci na sucho – při nejvyšších otáčkách 1 minutu, aby došlo k odstranění zbytkového promývacího pufru. Kolonku jsem umístila do nové popsané 1,5 ml mikrozukavky s víčkem, přidala jsem 50 µl AE pufru přesně do středu filtru kolonky, aby se udělala kapka. Následně jsem dala inkubovat 1-5 minut při 56 °C a zcentrifugovala při nejvyšších otáčkách po dobu 1 minuty. Poté jsem opět přidala 50 µl AE pufru na kolonku a inkubovala 1-5 minut při 56 °C. Jako poslední krok jsem provedla centrifugaci při nejvyšších otáčkách po dobu 1 minuty, všechny otevřená víčka mi směřovala po směru točení centrifugy.

## **5.2 Měření koncentrace DNA**

Měření koncentrace DNA jsem provedla u všech vzorků ihned po izolaci. K měření koncentrace DNA jsem použila AccuGreen™ Broad Range dsDNA Quantitation Solution a přístroj Qubit 2.0 Fluorometer. Součástí této sady jsou 0,5 ml PCR mikrozukavky a příslušné reagentie. Reagentie: AccuGreen™ Broad Range dsDNA Quantitation Solution (skladován ve tmě), AccuGreen™ Standard 1 AccuGreen™ Standard 2.

Před vlastním měřením koncentrace jsem nechala všechny reagentie vytemperovat na laboratorní teplotu. Mezitím jsem si připravila mikrozukavky pro každý vzorek a oba standardy a řádně je popsala.

Dále jsem do připravených mikrozukavek pro vzorky napipetovala 198 µl připraveného pracovního roztoku a 2 µl izolátu DNA tak, aby byl výsledný objem 200 µl. Nakonec jsem mikrozukavky zvortexovala a krátce centrifugovala na stolní minicentrifuze a nechala inkubovat po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Následně jsem provedla vlastní měření na fluorometru Qubit 2.0. Měření jsem prováděla po 1 vzorku a výslednou koncentraci jsem nechala pomocí funkce na přístroji přepočítat na 2 µl měřeného izolátu DNA.

### 5.3 Polymerázová řetězová reakce

Pro metodu PCR jsem použila komerční kit 2xPCRBIO Taq Mix Red dle doporučení výrobce BioSystems. Použité PCR primery a PCR profil byly převzaty z odborné práce Nissar et al. (2021). Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Sekvence použitých primerů (Nissar et al., 2021)

Primer	Sekvence
Forward	5' CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT3'
Reverse	5' GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT3'

Připravila jsem si 1 PCR zkumavku pro každý vzorek a řádně ji popsala, aby nedošlo k záměně vzorků. Připravila jsem si roztok primerů na výslednou koncentraci 20 pmol/μl a to smícháním 80 μl H<sub>2</sub>O a 20 μl primeru.

Dále jsem si připravila 1 větší zkumavku pro namíchání PCR mixu. PCR mix pro jednu reakci obsahoval 8,25 μl vody, 12,5 μl 2x PCRBIO Taq Mix Red, 1,25 μl 100% DMSO, 0,5 μl primer reverse (20 pmol), 0,5 μl primer forward (20 pmol). PCR mix jsem zvortexovala a stočila. K takto namíchanému PCR mixu jsem přidala 2 μl DNA. Veškerá příprava probíhala v laminárním boxu, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků. Řádně popsané a namíchané vzorky jsem vložila do termocycleru (Fast Gene® Gelfie LED Box G1 02) kde jsem spustila následující program (viz tabulka č.4).

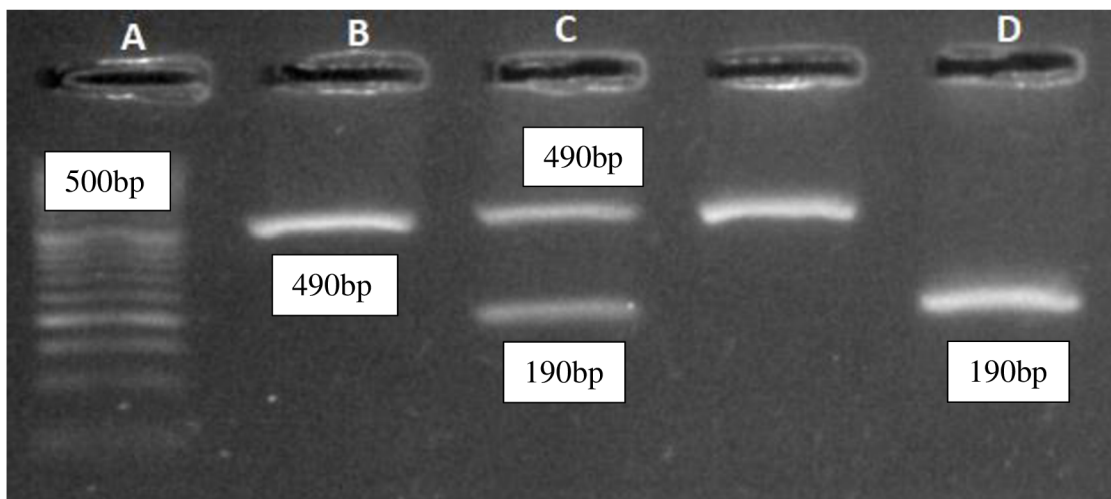
Tabulka 4: Průběh PCR programu

PCR PROTOKOL		ACE	
Počáteční denaturace	1 cyklus	5 min	95 °C
Denaturace	30 cyklů	30 s	95 °C
Anealing		30 s	63 °C
Extenze		59 s	72 °C
Terminální Extenze	1 cyklus	9 min	72 °C
Chlazení	∞		4 °C

Po ukončení PCR programu jsem provedla kontrolu PCR produktů pomocí gelové elektroforézy na 3% gelu.

#### 5.4 Gelová elektroforéza

Nejprve jsem si připravila pracovní roztok 1x TBE. Do skleněné lahve o objemu 0,5 l jsem odměřila 50 ml 10x TBE pufru a přidala jsem 450 ml destilované vody. Dále jsem si připravila 3% gel. Do plastové kádinky jsem vložila 3 agarózové tablety a k nim jsem přidala 50 ml 1x TBE pufru. Tablety jsem nechala rozpustit a poté jsem směs nechala krátce povařit v mikrovlnné troubě. Při této práci jsem musela směs v mikrovlnné troubě hlídat, jelikož dochází k pění a vzlínání směsi. Po provaření vznikl průhledný gelový roztok. Tento roztok jsem nechala krátce zchladnout a po zchladnutí jsem přidala barvu na gel značky Eli DNA. Celý objem jsem nalila do připravené elektroforetické podložky, ve které jsem měla připravené hřebeny. Po nalití roztoku, jsem opatrně špachtličkou odstranila zbylé vzduchové bubliny. Takto připravený gel jsem vložila do chladničky a nechala 15 minut ztuhnout. Po ztuhnutí gelu jsem odstranila hřebeny a vložila do elektroforetické vany, která obsahovala 1x TBE pufr. Hladina TBE pufru byla 3 mm nad gelem. Do první jamky jsem napipetovala 5  $\mu$ l hmotnostního markeru 50 bp DNA Ladder H3 RTU pro určení velikosti PCR produktů. Do dalších jamek jsem napipetovala 20  $\mu$ l PCR produktů. Spustila jsem elektroforézu na 10 minut při 135V. Po spuštění jsem její průběh mohla sledovat pomocí iluminátoru (Mupid<sup>TM</sup> LED Illuminator). Po skončení elektroforézy jsem gel přenesla na detekční systém (FastGene<sup>®</sup> GelPic LED Box), pomocí něhož jsem gel vyfotila na paměťovou kartu a foto gelu přenesla do počítače pro další možné zpracování výsledků. Po vyfocení gelu jsem ověřila výsledek velikosti PCR produktů.



Obrázek 3: Výsledky gelové elektroforézy, analýza genu *ACE* zobrazené pomocí detekčního systému FastGene<sup>®</sup> GelPic LED Box, (A – hmotnostní marker 50 bp DNA Ladder H3 RTU pro určení velikosti PCR produktů, B – homozygotní genotyp I/I 490bp, C – heterozygotní genotyp I/D 190 bp a 490 bp, D – homozygotní genotyp D/D 190bp)

### 5.5 Vyšetření predispozic pro kardiovaskulární onemocnění pomocí metody reverzní hybridizace na stripu

V rámci vyšetření predispozic pro kardiovaskulární onemocnění se vyšetřuje více genů současně, jejich přehled je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5: Přehled genů vyšetřovaných pro predispozice kardiovaskulárního onemocnění

<b>Gen</b>	<b>Mutace</b>
<i>F5</i>	1691 G>A (Leiden) His1299Arg (HR2 haplotyp)
<i>F2</i>	20210 G>A
<i>MTHFR</i>	677 C>T 1298 A>C
<i>F13A1</i>	Val34Leu
<i>Serpine 1</i>	4G/5G
<i>ECPR</i>	4600 A>G 4678 G>C
<i>Enos</i>	-786 T>C 894 G>T (Glu298Asp)
<i>LTA</i>	804 C>A (Thr26Asn)
<i>ACE</i>	I/D (Inzerce/delece)
<i>ITGB3</i>	1a/b (Leu33Pro)
<i>FGB</i>	-445 G>A
<i>ApoB</i>	Arg3500Gln
<i>ApoE</i>	Cys112Arg Arg158Cys

Pro toto vyšetření jsem použila komerční CE IVD kit CVD StripAssay (ViennaLab). Vyšetření predispozic pro kardiovaskulární onemocnění je rozděleno do 3 kroků:

1) Izolace DNA probíhala stejným způsobem jako u předchozího vyšetření a je popsána v kapitole 5.1.

## 2) Multiplex PCR amplifikace s biotinylovanými primery

PCR reakci jsem připravovala na ledu. Všechny PCR reagenty i DNA templát byly chlazené. Připravila jsem si čerstvý pracovní roztok (0,2 U/μl) Taq polymerázy v Taq Dulution Buffer. Připravila jsem si dvě PCR zkumavky pro každý vzorek. Jednu pro mix A a druhou pro mix B. Složení PCR mixu obsahovalo 15 μl Amplification Mix A nebo Amplification Mix B, 5 μl diluted Dream Taq polymerázy (tzn. 0,2 μl Taq DNA polymerázy + 4,8 μl Taq Dilution Buffer) pro 1 reakci, 5 μl DNA templátu. Zavřela jsem zkumavky. Nechala jsem předežhřát cycler na 94 °C a po zahřátí jsem vložila zkumavky do cycleru a spustila PCR program uvedený v tabulce 6.

Tabulka 6: PCR profil

PCR PROTOKOL		CVD	
Počáteční denaturace	1 cyklus	2 min	94 °C
Denaturace	35 cyklů	15 s	94 °C
Anealing		30 s	58 °C
Extenze		30 s	72 °C
Terminální Extenze	1 cyklus	3 min	72 °C
Chlazení	∞		4 °C

Po provedení PCR jsem zkontrolovala PCR produkty na 4% agarózovém gelu. Metodický postup pro gelovou elektroforézu je uveden v kapitole 5.4.

### Velikosti PCR jednotlivých produktů získané amplifikací pomocí multiplex PCR:

Amplifikační mix A: 134 pb, 156 pb, 173 pb, 202 pb, 223 pb, 254 pb, 297 pb a 324 pb.

Amplifikační mix B: 225 bp, 248 bp, 283 bp, 346 bp.

3) Reverzní hybridizace na stripu – hybridizace amplifikovaného PCR produktu k testovacím stripům s navázanými oligonukleotidovými próbami imobilizovanými paralelně za sebou jako array.

#### a) Reverzní hybridizace

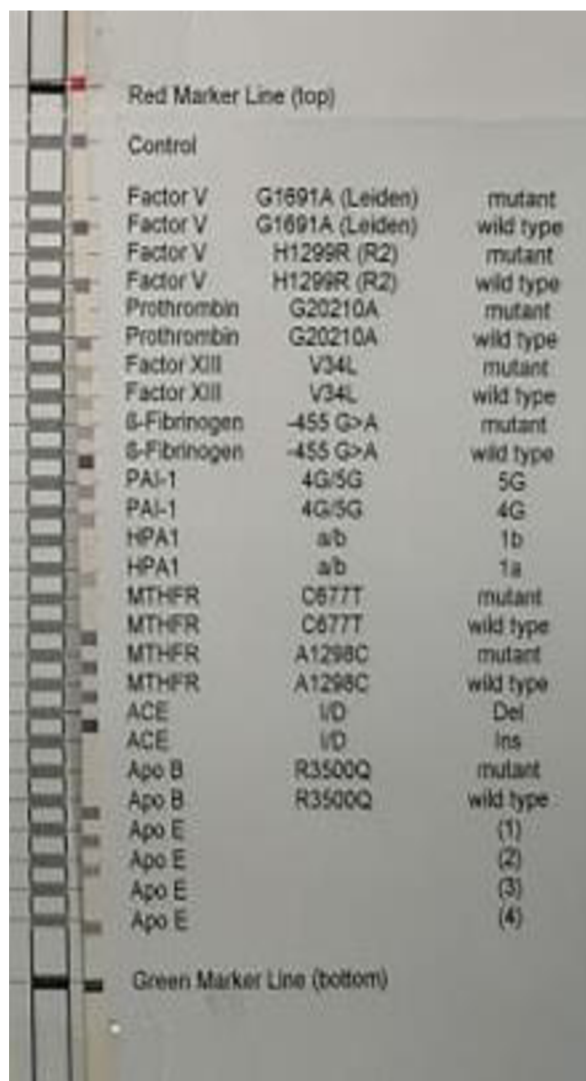
Zkontrolovala jsem hladinu vodní lázně, aby dosahovala minimálně do poloviny výšky hybridizačního korýtka. Zahřála jsem vodní lázeň v předstihu na 45 °C a po zahřátí teplotu zkontrolovala kalibrovaným teploměrem. Dále jsem dala do vodní lázně předehřát Hybridization Buffer a Wash Solution A na 45 °C ve vodní lázni. Pufry jsem vložila ještě do studené lázně a nechala jsem je předehřát společně s lázní na 45 °C. Zkontrolovala jsem, zda jsou rozpuštěny všechny precipitáty. Do každého žlábků jsem napipetovala 20 µl DNAT. Přímo do modré kapky jsem napipetovala 10 µl PCR produktu Mix A a 10 µl PCR produktu Mix B, opatrně jsem promíchala pipetou. Inkubovala jsem 5 minut při RT. Ke každému vzorku jsem přidala 1 ml Hybridization Buffer (předehřátý na 45 °C), mírně jsem zatřepala vaničkou a modrá barva zmizela. Vložila jsem testovací stripy značenou stranou vzhůru tak, aby byly zcela ponořeny. Inkubovala jsem 30 minut v třepané vodní lázni při teplotě 45 °C při cca 50 rpm. Odsála jsem roztok ze žlábků a ihned jsem začala promývat, jelikož stripy nesmí vyschnout.

#### b) Promývání

Ke každému stripu jsem přidala 1 ml Wash Solution A, který byl opět předehřátý na 45 °C. Stripy jsem krátce opláchla cca 10 sekund a odsála pufr. Znovu jsem přidala 1 ml Wash Solution a nechala inkubovat 15 minut ve třepané vodní lázni při teplotě 45 °C při cca 50 rpm. Tento krok jsem opakovala ještě jednou. Odsála jsem roztok, znovu přidala 1 ml Wash Solution a nechala inkubovat 15 minut ve třepané vodní lázni při teplotě 45 °C při cca 50 rpm. Odsála jsem roztok a ihned jsem pokračovala s barevnou reakcí, aby nedošlo k vysušení stripů.

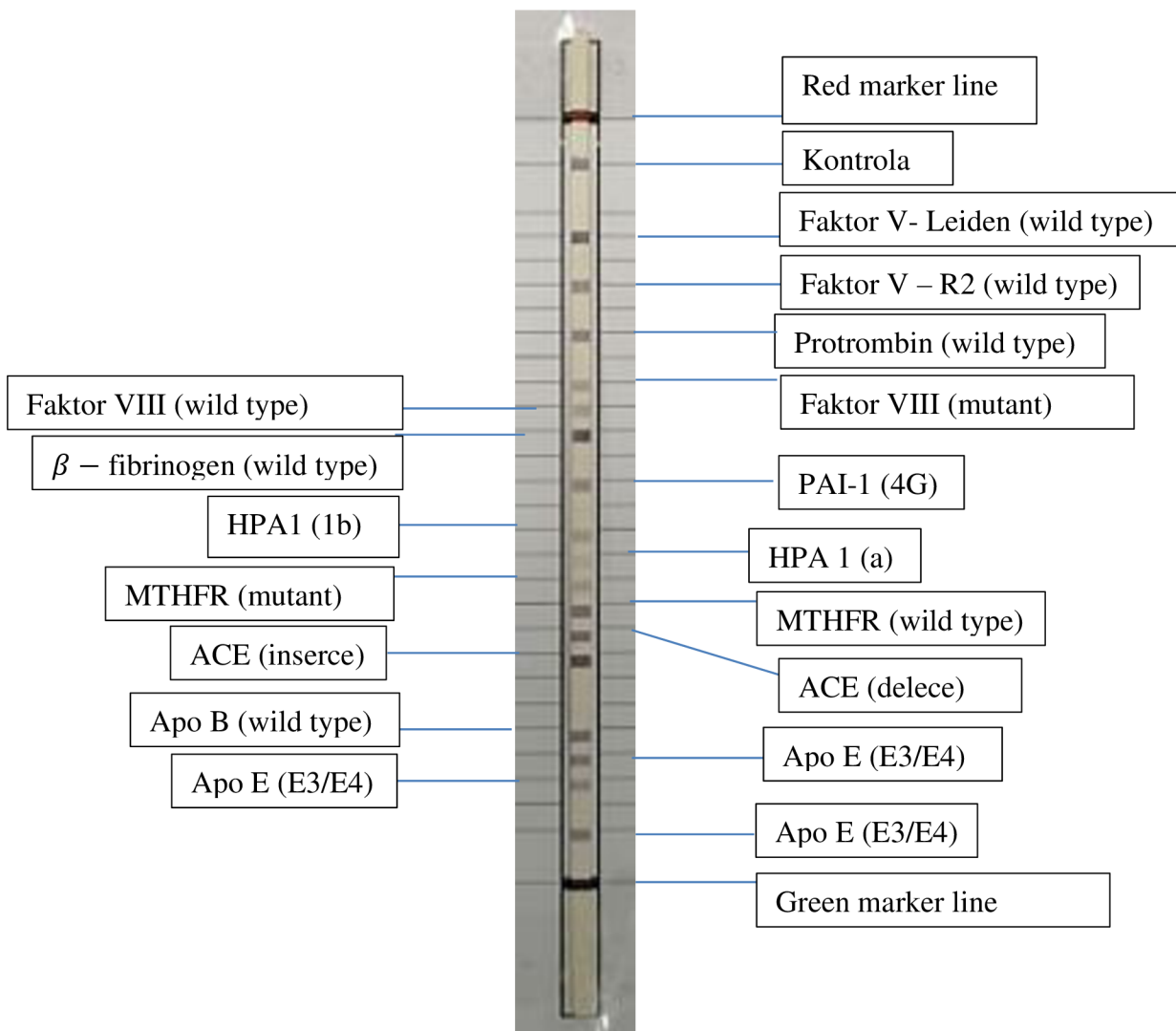
#### c) Barevná reakce (probíhá při RT)

Ke každému stripu jsem přidala 1 ml Conjugate solution. Inkubovala jsem stripy 15 minut při RT za stálého třepání při cca 50 rpm. Odsála jsem roztok a přidala 1 ml Wash Solution B. Stripy jsem krátce propláchla a odsála pufr. Přidala jsem znovu 1 ml Wash Solution B, inkubovala jsem stripy 15 minut při RT ve tmě za stálého třepání při cca 50 rpm. Odsála jsem pufr a přidala 1 ml Color Developer. Inkubovala jsem stripy 15 minut při RT ve tmě za stálého třepání při cca 50 rpm. Pozitivní reakce se obarvila fialově. Několikrát jsem opláchla stripy destilovanou vodou a nechala je ve tmě vyschnout na buničině.



Obrázek 4: Šablona, pomocí které lze odečíst získané výsledky, je součástí formuláře přiloženého ke kitu.





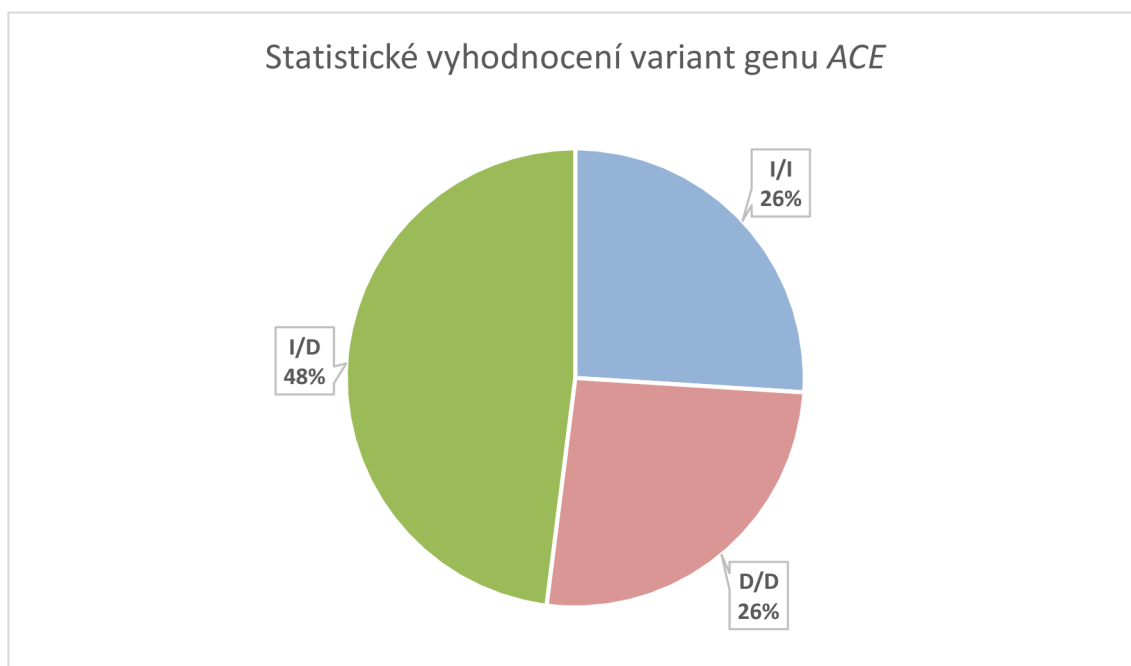
Obrázek 5: Příklad výsledné hybridizace, foto stripu.

## 6 Výsledky

Metodou end-point PCR jsem vyšetřila celkem 61 vzorků. V tabulce 7 a grafu 1 jsou uvedeny výsledky pacientů s AD či jinou demencí. V tabulce 8 a grafu 2 jsou uvedeny výsledky pacientů z kontrolní skupiny. Jako kontrolní skupinu pro srovnání a porovnání genotypů v genu *ACE* jsem použila výsledky vyšetření 156 jedinců, u kterých nebyla diagnostikována AD, demence ani jiné psychiatrické onemocnění a kteří byli vyšetřeni v laboratoři GENLABS od roku 2013 dosud zejména pro predispozice ke kardiovaskulárním onemocněním. V přílohách 1-4 bakalářské práce jsou uvedeny tabulky s konkrétními výsledky analýz a diagnózami vyšetřených pacientů.

Tabulka 7: Statistické vyhodnocení variant genu *ACE* u pacientů s AD či jinou demencí

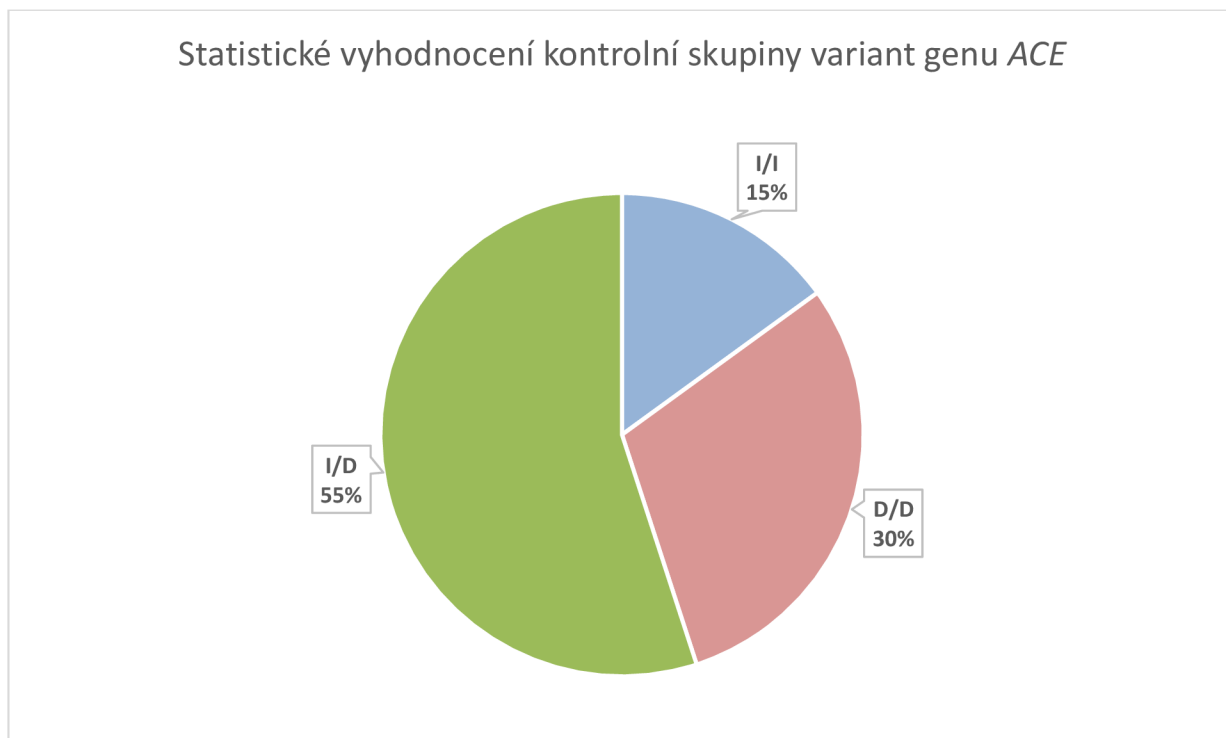
VARIANTY <i>ACE</i> (I/D)	POČET	PROCENTA
I/I	15	26%
D/D	15	26%
I/D	27	48%



Graf 1: Statistické vyhodnocení variant genu *ACE* u pacientů s AD či jinou demencí

Tabulka 8: Statistické vyhodnocení kontrolní skupiny variant genu ACE u pacientů bez demence

VARIANTY ACE (I/D)	POČET	PROCENTA
I/I	23	15%
D/D	47	30%
I/D	85	55%



Graf 2: Statistické vyhodnocení kontrolní skupiny variant genu ACE v kontrolní skupině.

## 7 Diskuze

Byla provedena řada studií s cílem zjistit případnou asociaci polymorfismu v genu *ACE* s onemocněními, jako je infarkt myokardu, hypertenze, Covid-19, nefropatie u *diabetes mellitus*, riziko plicního onemocnění, syndrom polycystických vaječníků, Alzheimerovy choroby a dalších.

Nejzajímavější částí této bakalářské práce je ovšem souvislost genu *ACE* rs4646994 s Alzheimerovou chorobou, na kterou je zaměřena i praktická část práce. Bylo vyšetřeno celkem 62 pacientů z Alzheimer a Senior centra, přičemž se jeden ze vzorků nepodařilo vyšetřit. Kontrolní skupinu tvořilo 157 pacientů, kteří byli v laboratoři vyšetřováni již dříve metodou reverzní hybridizace na stripu a nebylo u nich doloženo žádné onemocnění podobné demenci či Alzheimerově chorobě. Zda se u nich onemocnění prokázalo později nedokážeme doložit. Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění, u něhož jsou hlavní příčinou progresu nemoci plaky amyloidu beta vyskytující se v mozku. Tyto amyloidní plaky způsobí zánět a v důsledku toho vyvolávají imunologickou reakci, která vede k neurodegeneraci. Uvádí se, že výskyt neurodegenerativních onemocnění s věkem stoupá, což můžeme potvrdit. Již z výsledků vyplývá, že u vyšetřovaných pacientů s průměrným věkem 79 let vyšlo, že Alzheimerovou chorobou trpí 21 jedinců, jinou demencí 31 a bez demence je pouze 9 jedinců. Průměrný věk u seniorů bez demence byl 60 let, tedy podstatně nižší než u pacientů s demencí. Pravděpodobnost dědičnosti tohoto onemocnění se pohybuje mezi 49-79%. (Gatz et al., 2006; Wilson et al., 2011) V roce 1999 byla poprvé zmíněna souvislost mezi Alzheimerovou chorobou a polymorfismem I/D v intronu 16 genu *ACE*. (Kehoe et al., 1999) Na základě této studie bylo potvrzeno, že tento gen má vysokou náchylnost k AD. Mé výsledky ukazují, že genotyp I/I a genotyp D/D u pacientů s AD či jinou demencí byl shodný, jednalo se v obou případech o 26%, genotyp I/D se vyskytoval ve 48% případů. Kontrolní skupina vykazovala rozdílné zastoupení jednotlivých genotypů: I/I v 15%, D/D ve 30% a I/D v 55%. Získaná data ukazují, že genotyp I/I se ve větší míře vyskytoval u pacientů s demencí či AD, tudíž alela I může být považována za patologickou a je oprávněně spojována s AD. Vzhledem k nízkému průměrnému věku pacientů (48 let) v kontrolní skupině mohou mít jedinci I/I zvýšenou náchylnost k onemocnění typu demence ve stáří.

Pro porovnání výsledků genotypových frekvencí zjištěných v české populaci jsem použila studii Nissar et al. (2021), ve které bylo hodnoceno zastoupení jednotlivých

genotypů v kašmírské populaci. Výsledky genotypů získané na základě této studie prokázaly výskyt genotypu I/I u 24%, genotypu D/D u 32% a genotypu I/D u 44% pacientů s AD. V kontrolní skupině zdravých jedinců byl nejčastěji zastoupen genotyp D/D (61,5%), dále I/I (21%) a nejméně zastoupený byl genotyp I/D (17%). Libanonská populace (Saab et al., 2007) je v případě heterozygotního genotypu více podobná české, ačkoli se v ní objevuje významně vyšší procento genotypů I/I (37% versus 18%). Výsledky naší i kašmírské studie jsou velmi rozdílné zejména z hlediska zastoupení genotypu D/D v obou populacích, což může být vysvětleno odlišným původem testovaných jedinců. Shoda byla nalezena u pacientů s AD, kteří v obou případech vykazovali nejčastěji genotyp I/D. Zastoupení jednotlivých genotypů ACE I/D v neselektované české populaci ve srovnání s neselektovanou kašmírskou a libanonskou populací je uvedeno v tabulce 9.

Tabulka 9: Zastoupení genotypů ACE v české, kašmírské a libanonské populaci (Nissar et al., 2021; Saab et al., 2007)

	Česká populace (218 jedinců) vlastní výsledky	Kašmírská populace (352 jedinců)	Libanonská populace (570 jedinců)
I/I	18%	23%	37%
I/D	53%	35%	42%
D/D	29%	51%	21%

Dalším zajímavým, a především aktuálně řešeným tématem je COVID-19. Jelikož je u každého onemocnění nezbytné identifikovat rizikové faktory, které vedou ke špatné prognóze onemocnění, zaměřila jsem se i u tohoto onemocnění k možné asociaci s genem ACE. Bylo zjištěno, že alela G u obou polymorfismů rs4311 a rs4343 byla spojena s těžkým COVID-19 u hypertoniků a také s vyšší úmrtností u dyslipidemických a diabetických pacientů 2. typu. COVID -19 sice není spojován s rs4646994, ale vzhledem k nedávné situaci po celém světě, stojí za zmínku, že polymorfismy ACE rs4341, rs4343 by tedy mohly být rizikovými markery pro závažnost COVID-19 u probandů s hypertenzí, dyslipidemií či diabetem.

Je velice zajímavé, že gen ACE je spojován s fyzickou aktivitou u sportovců. Pro některé vrcholové sportovce by vyšetření genu ACE mohlo být zajímavým předpokladem pro jejich sportovní rozvoj. Můžeme říci, že po prokázání alel ACE u sportovce by bylo možné se zaměřit na určitý druh sportu, který u něj bude dle genetických výsledků nejvíce efektivní. Například genotyp I/I má vytrvalostní profil, což znamená, že sportovci s tímto

genotypem mají lepší předpoklady u aerobních cvičení s výkonností u posilování, vhodné jsou pro ně i vytrvalostní běhy na dlouhé vzdálenosti. Dále vykazují lepší odolnost vůči únavě a také vyšší  $VO_{2max}$ . U genotypu D/D lze očekávat vyšší nárůst svalové hmoty v průběhu silového tréninku se zátěží. U tohoto genotypu je tedy lepší silový trénink, crossfit nebo kulturistika. U nositelů tohoto genotypu je důležité sledovat intenzitu zátěže, protože mají větší sklony k hypertrofii srdeční komory v důsledku fyzického tréninku. Z tohoto důvodu mívají větší přestávky mezi jednotlivými tréninky či klidový režim a dochází u nich k tvorbě vyšších tukových zásob. Alela I ovšem nemá jen pozitivní účinky, ale také své negativní aspekty. Alela I zvyšuje riziko poškozených svalů. Jedinci s genotypem I/I či I/D, kteří mají nízký příjem vápníku mají větší komplikace s hypertenzí v momentě, kdy jejich  $VO_{2max}$  dosáhne 60%.

Závěrem lze říci, že genetické testování genu *ACE* může mít významný přínos nejen pro klinickou diagnostiku zaměřenou na prevenci kardiovaskulárních onemocnění, virových infekcí nebo psychiatrických onemocnění, ale také například pro sportovní medicínu a doporučení vhodných tréninkových opatření.

## 8 Závěr

V mé bakalářské práci jsem se zabývala nejprve obecnými genetickými pojmy, dále teoretickým popisem struktury a funkce genu *ACE*, jeho možnými genovými polymorfismy včetně populačního výskytu a také jeho klinickým významem.

V genu *ACE* bylo dosud popsáno mnoho různých polymorfismů, avšak já jsem se zabývala jedním z klinicky nejvíce významných, kterým byl rs4646994. Mým cílem bylo stanovení frekvence genotypů tohoto polymorfismu ve vybraných skupinách pacientů a kontrolní skupině a odvození možného predispozičního významu pro vznik demence.

Polymorfismus *ACE I/D* byl detekován metodou end-point PCR nebo metodou reverzní hybridizace na stripu, kterým předcházela izolace DNA z bukalního stěru anebo periferní krve u 61 seniorských pacientů a 157 pacientů z kontrolní skupiny.

Heterozygotní genotyp *ACE I/D* se vyskytoval v obou testovaných skupinách nejčastěji a to v 48% (seniorští pacienti) a 55% (kontrolní skupina). Druhým nejvíce zastoupeným genotypem byl v kontrolní skupině genotyp *DD* (30%). Tento genotyp se vyskytoval u 26% jedinců ze skupiny seniorských pacientů s demencí, kde byl stejně zastoupen (26%) také genotyp *I/I*.

## 9 Bibliografie

1. ACHARYA, K.R., STURROCK, E.D., RIORDAN, J.F., EHLERS, M.R.W., 2003. Ace revisited: A new target for structure-based drug design. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2(11), 891-902. DOI: 10.1038/nrd1227. ISSN 1474-1776. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nrd1227>
2. ALZGENE-GENOVÝ PŘEHLED VŠECH PUBLIKOVANÝCH STUDIÍ AD-ASOCIACE PRO ACE, 2011. [online]. Alzforum. Copyright © 1996–2013 Biomedical Research Forum, LLC. Všechna práva vyhrazena [cit. 2022-4-15]. Dostupné z: <http://www.alzgene.org/geneoverview.asp?geneid=125>
3. ANGUNSRI, R., SRITHARATHIKHUN, T., SUTTIRAT, S., TENCOMNAO, T., 2009. Association of angiotensin-converting enzyme gene promoter single nucleotide polymorphisms and haplotype with major depression in a northeastern Thai population. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 10(3), 179-184. DOI: 10.1177/1470320309344151. ISSN 1470-3203. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1470320309344151>
4. BAGHAI, T.C. et al., 2006. Polymorphisms in the angiotensin-converting enzyme gene are associated with unipolar depression, ACE activity and hypercortisolism. *Molecular Psychiatry*. 11(11), 1003-1015. DOI: 10.1038/sj.mp.4001884. ISSN 1359-4184. Dostupné také z: <https://www.nature.com/articles/4001884>
5. BÁRTOVÁ, E., 2011. Gelová elektroforéza. [online]. Molekulární biologie. Brno: VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat [cit. 2022-4-23]. Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-gelova\\_elektroforeza&lang=cz&fbclid=IwAR12tFa\\_q1OjI2vQWZXRyMS-VSC6jUXRvS2lozfwVSPW95t9l6Zfo-dYyA0](https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz&fbclid=IwAR12tFa_q1OjI2vQWZXRyMS-VSC6jUXRvS2lozfwVSPW95t9l6Zfo-dYyA0)
6. BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., 2005. Vyšetřovací metody v imunologii. Praha: Grada. ISBN 80-247-0691-1.
7. BERNSTEIN, K.E. et al., 2011. Different in vivo functions of the two catalytic domains of angiotensin-converting enzyme (ACE). *Current Opinion in*



*Pharmacology*. 11(2), 105-111. DOI: 10.1016/j.coph.2010.11.001. ISSN 14714892. Dostupné také z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489210001748>

8. BERNSTEIN, K.E. et al., 2013. A Modern Understanding of the Traditional and Nontraditional Biological Functions of Angiotensin-Converting Enzyme. *Pharmacological Reviews*. 65(1), 1-46. DOI: 10.1124/pr.112.006809.

ISSN 0031-6997. Dostupné také z:

<http://pharmrev.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/pr.112.006809>

9. BERTRAM, L., MCQUEEN, M.B., MULLIN, K., BLACKER, D., TANZI, R.E., 2007. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nature Genetics*. 39(1), 17-23. DOI: 10.1038/ng1934.

ISSN 1061-4036. Dostupné také z:

<http://www.nature.com/articles/ng1934>

10. BLENNOW, K., DE LEON, M.J., ZETTERBERG, H., 2006. Alzheimer's disease. *The Lancet*. 368(9533), 387-403. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69113-7.

ISSN 01406736. Dostupné také z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673606691137>

11. BLEUMINK, G.S. et al., 2004. Genetic polymorphisms and heart failure. *Genetics in Medicine*. 6(6), 465-474. DOI: 10.1097/01.GIM.0000144061.70494.95. ISSN 10983600. Dostupné také z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098360021038727>

12. CECONI, C. et al., 2007. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors have different selectivity for bradykinin binding sites of human somatic ACE. *European Journal of Pharmacology*. 577(1-3), 1-6. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.07.061.

ISSN 00142999. Dostupné také z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299907008540>

13. CINTRA, M.T.R. et al., 2018. Polycystic ovarian syndrome: rs1799752 polymorphism of ACE gene. *Revista da Associação Médica Brasileira* [online]. 64(11), 1017-1022 [cit. 2022-3-30]. DOI: 10.1590/1806-9282.64.11.1017. ISSN 1806-9282.

Dostupné z:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302018001101017&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302018001101017&lng=en&tlng=en)

14. DENG, J. et al., 2015. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and Alzheimer's disease. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 35(9), 1325-1330.

15. DENTI, P. et al., 2014. Pharmacokinetic evaluation of lisinopril-tryptophan, a novel C-domain ACE inhibitor. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 56, 113-119. DOI: 10.1016/j.ejps.2014.01.012. ISSN 09280987. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098714000566>

16. DOŠKAŘ, J. et al., 2009. Masarykova univerzita. Brno: Masarykova univerzita, 894 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

17. FEREC, A., 2018. ACE. In: *Genetika pro trenéry*. 1. Praha 7: Grada Publishing, s. 73-78. ISBN 978-80-247-5553-3.

18. FERNANDEZ, J.H., HAYASHI, M.A.F., CAMARGO, A.C.M., NESHICH, G., 2003. Structural basis of the lisinopril-binding specificity in N- and C-domains of human somatic ACE. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 308(2), 219-226. DOI: 10.1016/S0006-291X(03)01363-9. ISSN 0006291X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X03013639>

19. GATZ, M. et al., 2006. Role of Genes and Environments for Explaining Alzheimer Disease. *Archives of General Psychiatry*. 63(2), 168-174. DOI: 10.1001/archpsyc.63.2.168. ISSN 0003-990X. Dostupné také z: <http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archpsyc.63.2.168>

20. GELEN, V., KÜKÜRT, A., ŞENGÜL, E., 2021. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Various Disease Processes: An Overview. *Renin-Angiotensin Aldosterone System*. IntechOpen, 2021-11-24. DOI: 10.5772/intechopen.97354. ISBN 978-1-83968-286-5. Dostupné také z: <https://www.intechopen.com/books/renin-angiotensin-aldosterone-system/role->

of-the-renin-angiotensin-aldosterone-system-in-various-disease-processes-an-overview

21. GHEITH, O., FAROUK, N., NAMPOORY, N., HALIM, M.A., AL-OTAIBI, T., 2015. Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors. *J Nephropharmacol.* 2016(5(1), 49–56. DOI: , 3 , 4 Narayanan Nampoory, 2 , 4 Medhat A Halim, 2 and Torki Al-Otaibi 2.

22. GRIBOUVAL, O. et al., 2005. Mutations in genes in the renin-angiotensin system are associated with autosomal recessive renal tubular dysgenesis. *Nature Genetics.* 37(9), 964-968. DOI: 10.1038/ng1623. ISSN 1061-4036. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/ng1623>

23. HADJADJ, S. et al., 2007. Asociace mezi polymorfismy genu pro angiotenzin konvertující enzym a diabetickou nefropatií: případová kontrola, haplotyp a rodinná studie ve třech evropských populacích: Case-Control, Haplotype a Family-Based Study v Tři evropské populace. *Journal of the American Society of Nephrology* . 18(4), 1284-1291. DOI: 10.1681/ASN.2006101102. ISSN 1046-6673. Dostupné také z: <https://jasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2006101102>

24. HADJADJ, S. et al., 2007. Association between Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphisms and Diabetic Nephropathy: Case-Control, Haplotype, and Family-Based Study in Three European Populations. *Journal of the American Society of Nephrology.* 18(4), 1284-1291. DOI: 10.1681/ASN.2006101102. ISSN 1046-6673. Dostupné také z: <https://jasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2006101102>

25. HONG, J.M. et al., 2010. Genetic association of angiogenesis- and hypoxia-related gene polymorphisms with osteonecrosis of the femoral head. *Experimental and Molecular Medicine.* 42(5), 376-385. DOI: 10.3858/emm.2010.42.5.039. ISSN 1226-3613. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.3858/emm.2010.42.5.039>

26. HSIEH, S.-W., LIU, M.-W., HUANG, L.-C., WU, M.-N., YANG, Y.-H., 2020. The Impact of Angiotensin-Converting Enzyme Gene on Behavioral and

Psychological Symptoms of Dementia in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*. 16(14), 1269-1275. DOI: 10.2174/1567205017666200103114550. ISSN 15672050. Dostupné také z: <http://www.eurekaselect.com/178056/article>

27. HU, J., IGARASHI, A., KAMATA, M., NAKAGAWA, H., 2001. Angiotensin-converting Enzyme Degrades Alzheimer Amyloid  $\beta$ -Peptide ( $A\beta$ ); Retards  $A\beta$  Aggregation, Deposition, Fibril Formation; and Inhibits Cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*. 276(51), 47863-47868. DOI: 10.1074/jbc.M104068200. ISSN 00219258. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819402937>

28. HYJÁNEK, J., 2015. Možnosti genetického testování sportovní výkonnosti u dospělých sportovců. *Medicína pro praxi*. Olomouc, (12), 39-41.

29. ÍÑIGUEZ, M. et al., 2021. ACE Gene Variants Rise the Risk of Severe COVID-19 in Patients With Hypertension, Dyslipidemia or Diabetes: A Spanish Pilot Study. *Frontiers in Endocrinology* [online]. 12 [cit. 2022-3-30]. DOI: 10.3389/fendo.2021.688071. ISSN 1664-2392. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.688071/full>

30. ÍÑIGUEZ, M. et al., 2021. ACE Gene Variants Rise the Risk of Severe COVID-19 in Patients With Hypertension, Dyslipidemia or Diabetes: A Spanish Pilot Study. *Frontiers in Endocrinology*. 12. DOI: 10.3389/fendo.2021.688071. ISSN 1664-2392. Dostupné také z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.688071/full>)

31. IRVIN, M.R. et al., 2010. Pharmacogenetic association of hypertension candidate genes with fasting glucose in the GenHAT Study. *Journal of Hypertension*. 28(10), 2076-2083. DOI: 10.1097/HJH.0b013e32833c7a4d. ISSN 0263-6352. Dostupné také z: <https://journals.lww.com/00004872-201010000-00016>

32. KALITA, J., MISRA, U.K., BINDU, I.S., KUMAR, B., MITTAL, B., 2011. Angiotensin-converting enzyme (rs4646994) and  $\alpha$  ADDUCIN (rs4961) gene polymorphisms' study in primary spontaneous intracerebral

- hemorrhage. *Neurology India* [online]. 59(1), 41-46 [cit. 2022-3-30]. DOI: 10.4103/0028-3886.76856. ISSN 0028-3886. Dostupné z: <http://www.neurologyindia.com/text.asp?2011/59/1/41/76856>
33. KAUFMAN, B.D. et al., 2007. *Human Genetics*. 122(5). DOI: 10.1007/s00439-007-0429-9. ISSN 0340-6717. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-007-0429-9>
34. KEHOE, P.G. et al., 1999. Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. *Nature Genetics*. 21(1), 71-72. DOI: 10.1038/5009. ISSN 1061-4036. Dostupné také z: [http://www.nature.com/articles/ng0199\\_71](http://www.nature.com/articles/ng0199_71)
35. KEHOE, P.G. et al., 1999. Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. *Nature Genetics*. 21(1), 71-72. DOI: 10.1038/5009. ISSN 1061-4036. Dostupné také z: [http://www.nature.com/articles/ng0199\\_71](http://www.nature.com/articles/ng0199_71)
36. KEHOE, P.G., PERRY, G., AVILA, J., TABATON, M., ZHU, X., 2018. The Coming of Age of the Angiotensin Hypothesis in Alzheimer's Disease: Progress Toward Disease Prevention and Treatment?. *Journal of Alzheimer's Disease*. 62(3), 1443-1466. DOI: 10.3233/JAD-171119. ISSN 13872877.
37. KEREN, A., SYRRIS, P., MCKENNA, W.J., 2008. Erratum: Hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. 5(11), 747-747. DOI: 10.1038/ncpcardio1349. ISSN 1743-4297. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/ncpcardio1349>
38. KIM, H.M., SHIN, D.R., YOO, O.J., LEE, H., LEE, J.-O., 2003. Crystal structure of *Drosophila* angiotensin I-converting enzyme bound to captopril and lisinopril 1. *FEBS Letters*. 538(1-3), 65-70. DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00128-5. ISSN 00145793. Dostupné také z: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793\(03\)00128-5](http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793(03)00128-5)
39. KOČÁREK, E., 2007. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.

40. KUCIEL, J., URBAN, T., 2016. Principy genetiky. Brno: Mendelova univerzita v Brně. 200 s. ISBN 978-80-7509-385-1.
41. LEHMANN, D.J. et al., 2005. Large Meta-Analysis Establishes the ACE Insertion-Deletion Polymorphism as a Marker of Alzheimer's Disease. *American Journal of Epidemiology*. 162(4), 162,305-317. DOI: 10.1093/aje/kwi202. ISSN 1476-6256. Dostupné také z: <http://academic.oup.com/aje/article/162/4/305/105019/Large-MetaAnalysis-Establishes-the-ACE>
42. LIM, G.B., 2016. Tension between hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Nature Reviews Cardiology*. 13(7), 380-381. DOI: 10.1038/nrcardio.2016.80. ISSN 1759-5002. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nrcardio.2016.80>
43. LIND, J., 2018. A Treatise on the Scurvy. in Three Parts. ... by James Lind, ... the Second Edition Corrected, with Additions and Improvements. 2nd ed. London: Gale Ecco, Print Editions, 496 s. ISBN 978-1379469803.
44. Lung, Ch., Chan, E. K. L., Zuraw, B. L. (1997) Analysis of an exon 1 polymorphism of the B2 bradykinin receptor gene and its transcript in normal subjects and patients with C1 inhibitor deficiency. – *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 99: 134-46.
45. MARIAN, A.J., ROBERTS, R., 1995. Recent Advances in the Molecular Genetics of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation*. 92(5), 1336-1347. DOI: 10.1161/01.CIR.92.5.1336. ISSN 0009-7322. Dostupné také z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.92.5.1336>
46. MARON, B.J. et al., 2006. Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies. *Circulation*. 113(14), 1807-1816. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174287. ISSN 0009-7322. Dostupné také z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174287>
47. MARTÍNEZ-RÍOS, M.A. et al., 2008. No association found between the insertion/deletion of a 287-bp alu repeat sequence within intron 16 of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE) gene in Mexican patients and binary

restenosis after coronary stenting. *Clinica Chimica Acta*. 397(1-2), 65-67. DOI: 10.1016/j.cca.2008.07.019. ISSN 00098981. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898108003732>

48. MENG, Y. et al., 2006. Association of Polymorphisms in the Angiotensin-Converting Enzyme Gene with Alzheimer Disease in an Israeli Arab Community. *The American Journal of Human Genetics*. 78(5), 871-877. DOI: 10.1086/503687. ISSN 00029297. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707638208>

49. METZGER, R., FRANKE, F.E., BOHLE, R.M., ALHENC-GELAS, F., DANILOV, S.M., 2011. Heterogeneous distribution of angiotensin I-converting enzyme (CD143) in the human and rat vascular systems: Vessel, organ and species specificity. *Microvascular Research*. 81(2), 206-215. DOI: 10.1016/j.mvr.2010.12.003. ISSN 00262862. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026286210002402>

50. MICHELS, V.V. et al., 1992. The Frequency of Familial Dilated Cardiomyopathy in a Series of Patients with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*. 326(2), 77-82. DOI: 10.1056/NEJM199201093260201. ISSN 0028-4793. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199201093260201>

51. MISRA, U.K. et al., 2012. Do ACE (rs4646994) and  $\alpha$ ADDUCIN (rs4961) gene polymorphisms predict the recurrence of hypertensive intracerebral hemorrhage?. *Neurological Sciences*. 33(5), 1071-1077. DOI: 10.1007/s10072-011-0903-y. ISSN 1590-1874. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10072-011-0903-y>

52. NISSAR, K. et al., 2021. Association of Angiotensin-Converting Enzyme gene polymorphism and Alzheimer's risk in Kashmiri population. *Gene Reports*. 25(25), 1- 4. DOI: 10.1016/j.genrep.2021.101309. ISSN 24520144. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452014421002946>

53. OKWAN-DUODU, D. et al., 2019. Overexpression of myeloid angiotensin-converting enzyme (ACE) reduces atherosclerosis. *Biochemical and*

Biophysical Research Communications. 520(3), 573-579. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.10.078. ISSN 0006291X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X19319710>

54. OTOVÁ, B., KOHOUTOVÁ, M., PANCZAK, A., 2013. Lékařská biologie a genetika. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1594-3.

55. OTOVÁ, B., KOHOUTOVÁ, M., PANCZAK, A., 2019. Lékařská biologie a genetika. 2., nezměněné vydání. Praha: Karolinum. ISBN 978-802-4628-356

56. PERKINS, M.J. et al., 2005. Gene-specific modifying effects of pro-LVH polymorphisms involving the renin–angiotensin–aldosterone system among 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *European Heart Journal*. 26(22), 2457-2462. DOI: 10.1093/eurheartj/ehi438. ISSN 1522-9645. Dostupné také z: <http://academic.oup.com/eurheartj/article/26/22/2457/507698/Genespecific-modifying-effects-of-proLVH>

57. Polymorfismy ACE [online], 2022. Ensembl [cit. 2022-4-23]. Dostupné z: [https://www.ensembl.org/Multi/Search/Results?q=polymorfismy%20ACE;site=ensembl\\_all](https://www.ensembl.org/Multi/Search/Results?q=polymorfismy%20ACE;site=ensembl_all)

58. PONTREMOLI, R. et al., 2000. Genetic polymorphism of the renin-angiotensin system and organ damage in essential hypertension. *Kidney International*. 57(2). DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00876.x. ISSN 00852538. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815467729>

59. QIN, H., ZHANG, L., XU, G., PAN, X., 2013. Association of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism (rs4646994) with the risk of primary intracerebral hemorrhage. *Neurological Research* [online]. 35(6), 545-552 [cit. 2022-3-30]. DOI: 10.1179/1743132813Y.0000000184. ISSN 0161-6412. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/1743132813Y.0000000184>



60. RAHIMI, Z., 2012. ACE insertion/deletion (I/D) polymorphism and diabetic nephropathy. *Journal of Nephropathology*. 1(3), 143-151. DOI: 10.5812/nephropathol.8109. ISSN 2251-8363. Dostupné také z: [http://nephropathol.com/Abstract/JNP\\_20130220170522](http://nephropathol.com/Abstract/JNP_20130220170522)
61. RAI, T.S. et al., 2008. ACE I/D polymorphism in Indian patients with hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 311(1-2), 67-72. DOI: 10.1007/s11010-007-9695-z. ISSN 0300-8177. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11010-007-9695-z>
62. ROBERTS, K.E. et al., 2010. Genetic risk factors for hepatopulmonary syndrome in patients with advanced liver disease. *Gastroenterology*. 139(1), 130-139. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.03.044. ISSN 00165085. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508510004634>
63. ROGUS, J.J. et al., 1998. Diabetic Nephropathy Is Associated With AGT Polymorphism T235. *Hypertension*. 31(2), 627-631. DOI: 10.1161/01.HYP.31.2.627. ISSN 0194-911X. Dostupné také z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.HYP.31.2.627>
64. Rs4343 [online], 2019. MyHeritage [cit. 2022-4-15]. Dostupné z: <https://www.snpedia.com/index.php/Rs4343>
65. SAAB, Y. B., GARD, P. R., OVERALL, A. D. J., 2007. The geographic distribution of the ACE II genotype: a novel finding. *Genetical Research*. 89(4), 259-267. DOI: 10.1017/S0016672307009019. ISSN 0016-6723. Dostupné také z: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0016672307009019/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0016672307009019/type/journal_article)
66. SANTOS, C.Y. et al., 2017. Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. *Alzheimers Dement*. 7(1), 69-87. DOI: 10.1016/j.dadm.2017.01.005. ISSN 2352-8729. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.dadm.2017.01.005>

67. SAYED-TABATABAEI, F.A., OOSTRA, B.A., ISAACS, A., VAN DUIJN, C.M., WITTEMAN, J.C.M., 2006. ACE Polymorphisms. *Circulation Research*. 98(9), 1123-1133. DOI: 10.1161/01.RES.0000223145.74217.e7. ISSN 0009-7330. Dostupné také z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.0000223145.74217.e7>
68. SETHI, S., 2020. Overview of Pneumonia [online]. University at Buffalo: MD [cit. 2022-4-26]. Dostupné z: <https://www.msmanuals.com/home/lung-and-airway-disorders/pneumonia/overview-of-pneumonia>
69. SHAIKH, R., SHAHID, S.M., MANSOOR, Q., ISMAIL, M., AZHAR, A., 2014. Genetic variants of ACE (Insertion/Deletion) and AGT (M268T) genes in patients with diabetes and nephropathy. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* [online]. 15(2), 124-130 [cit. 2022-3-30]. DOI: 10.1177/1470320313512390. ISSN 1470-3203. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1470320313512390>
70. SLABÝ, O., 2015. *Molekulární medicína*. Praha: Galén. 598 s. ISBN 978-80-7492-121-6.
71. SOBHI. SAQER, L.'a, 2016. Association Between Angiotensin Converting Enzyme Gene Insertion\Deletion Polymorphism and Coronary Heart Disease in Gaza Strip. *International Journal of Biomedical Materials Research*. 4(3), 18-26. DOI: 10.11648/j.ijbmr.20160403.12. ISSN 2330-7560.
72. STRACHAN, T., READ, A., 2011. *Human molecular genetics*. 4. New York. ISBN 978-0815341499.
73. SUGRUE, D., 1988. Dilated cardiomyopathy. *Current Opinion in Cardiology*. Lippincott-Raven Publishers, 3(3), 385-390.
74. SVOBODNÍK, A., DEMLOVÁ, R., PECEN, L., 2014. *Klinické studie v praxi*. Brno: Facta Medica. ISBN 978-80-904731-8-8.
75. TELLIER, R., BUKH, J., EMERSON, S.U., PURCELL, R.H., 2003. Long PCR Amplification of Large Fragments of Viral Genomes: A Technical Overview. *PCR Protocols*. New Jersey: Humana Press, 226, 167-172. DOI:

10.1385/1-59259-384-4:167. ISBN 1-59259-384-4. Dostupné také z:  
<http://link.springer.com/10.1385/1-59259-384-4:167>

76. THORN, C.F., KLEIN, T.E., ALTMAN, R.B., 2010. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for angiotensin-converting enzyme. *Pharmacogenetics and Genomics*. 20(2), 143-146. DOI: 10.1097/FPC.0b013e3283339bf3. ISSN 1744-6872. Dostupné také z: <https://journals.lww.com/01213011-201002000-00011>

77. TURNER, A.J., HOOPER, N.M., 2002. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*. 23(4), 177-183. DOI: 10.1016/S0165-6147(00)01994-5. ISSN 01656147. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614700019945>

78. VAN DER HORST, I.C.C., VOORS, A.A., VAN VELDHUISEN, D.J., 2007. Treatment of heart failure with ACE inhibitors and beta-blockers. *Clinical Research in Cardiology*. 96(4), 193–195. DOI: 10.1007/s00392-007-0487-y. ISSN 1861-0684. Dostupné také z: <https://link.springer.com/10.1007/s00392-007-0487-y>

79. VAN GEEL, P.P., 2001. Increased risk for ischaemic events is related to combined RAS polymorphism. *Heart* [online]. 85(4), 458-462 [cit. 2022-3-30]. DOI: 10.1136/heart.85.4.458. ISSN 00070769. Dostupné z: <https://heart.bmj.com/lookup/doi/10.1136/heart.85.4.458>

80. VAN SPAENDONCK-ZWARTS, K.Y. et al., 2013. Genetic analysis in 418 index patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: overview of 10 years' experience. *European Journal of Heart Failure*. 15(6), 628-636. DOI: 10.1093/eurjhf/hft013. ISSN 13889842. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1093/eurjhf/hft013>

81. VYCHODILOVÁ, L. et al., 2019. *Klinická genetika*. Brno: VFU Brno, 163 s. ISBN 978-80-7305-825-8.

82. WANG, D.-S., DICKSON, D.W., MALTER, J.S., 2006. B – Amyloid Degradation and Alzheimer's Disease. *Journal of Biomedicine and*

Biotechnology. 2006(3), 1-12. DOI: 10.1155/JBB/2006/58406. ISSN 1110-7243.  
Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2006/058406/abs/>

83. WANG, H. et al., 2015. Genetic Association Between CD143 rs4340 Polymorphism and Pneumonia risk. *Medicine* [online]. 94(30) [cit. 2022-3-30]. DOI: 10.1097/MD.0000000000000883. ISSN 0025-7974. Dostupné z: <https://journals.lww.com/00005792-201507050-00001>

84. WARING, S.C., ROSENBERG, R.N., 2008. Genome-Wide Association Studies in Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*. 65(3), 329-334. DOI: 10.1001/archneur.65.3.329. ISSN 0003-9942. Dostupné také z: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneur.65.3.329>

85. WILSON, R.S. et al., 2011. Heritability of Different Forms of Memory in the Late Onset Alzheimer's Disease Family Study. *Journal of Alzheimer's Disease*. 23(2), 249-255. DOI: 10.3233/JAD-2010-101515. ISSN 18758908.

86. WINNICKI, M. et al., 2004. Physical activity and angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in mild hypertensives. *American Journal of Medical Genetics*. 125A(1). DOI: 10.1002/ajmg.a.20434. ISSN 0148-7299. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.a.20434>

87. YANG, J. et al., 2013. Impact of Angiotensin I Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphisms on Dilated Cardiomyopathy and Hypertrophic Cardiomyopathy Risk. *PLoS ONE*. 8(5), -. DOI: 10.1371/journal.pone.0063309. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0063309>

88. YU, C.-E. et al., 2010. The N141I Mutation in PSEN2. *Archives of Neurology*. 67(5), 631- 633. DOI: 10.1001/archneurol.2010.87. ISSN 0003-9942. Dostupné také z: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneurol.2010.87>

89. ZIEGLER, A., R. KOENIG, I., 2011. A statistical approach to genetic epidemiology. 2nd ed. Weinheim: Wiley-Blackwell. ISBN 978-3527323890.

90. ZMORZYNSKI, S., 2019. ACE Insertion/Deletion Polymorphism (rs4646994) Is Associated With the Increased Risk of Multiple Myeloma. *Frontiers in oncology*. 2019(9), 9-44. DOI: 10.3389/fonc.2019.00044.

## 10 Přílohy

Příloha 1: Přehled pacientů s demencí.

Pořadí	Pacient	Výsledek ACE (I/D)	Věk	Pohlaví	Diagnóza	V jakém věku byla stanovena diagnóza?
1	S1	I/D	73	Ž	Vaskulární demence	70-79
2	S2	I/D	97	Ž	Demence s Lewyho tělísky	70-79
3	S3	I/D	74	M	Vaskulární demence	70-79
4	S4	I/D	74	Ž	Vaskulární demence	70-79
5	S5	D/D	89	Ž	Vaskulární demence	70-79
6	S6	D/D	92	Ž	Alzheimerova choroba, nespecifikovaná demence	50-59
7	S7	D/D	89	Ž	Alzheimerova choroba, nespecifikovaná demence, Parkinsonova choroba, Sekundární demence, demence s Lewyho tělísky	60-69
8	S8	I/I	71	M	Alzheimerova choroba, nespecifikovaná demence, Vaskulární demence	60-69
9	S9	I/I	87	Ž	Alzheimerova choroba, nespecifikovaná demence	50-59
10	S10	I/D	71	M	Vaskulární demence	70-79
11	S11	I/I	76	Ž	Vaskulární demence	70-79
12	S12	I/D	76	Ž	Vaskulární demence	70-79
13	S13	I/D	90	Ž	Vaskulární demence	více než 79
14	S14	I/I	84	M	Vaskulární demence	70-79
15	S15	I/D	74	M	Demence s Lewyho tělísky	60-69
16	S16	D/D	87	Ž	Vaskulární demence	60-69
17	S17	I/D	69	Ž	Vaskulární demence	70-79
18	S18	I/I	76	Ž	Vaskulární demence	70-79
19	S19	D/D	86	Ž	Vaskulární demence	60-69
20	S20	D/D	87	Ž	Bez diagnózy demence	--
21	S21	I/D	94	M	Bez diagnózy demence	--
22	S22	I/D	78	M	Bez diagnózy demence	--
23	S23	I/I	81	Ž	Bez diagnózy demence	--
24	S24	I/D	67	Ž	Bez diagnózy demence	--
25	A1	I/D	75	Ž	Alzheimerova choroba	60-69
26	A2	I/D	92	Ž	Alzheimerova choroba	70-79
27	A3	I/D	80	Ž	Smíšená kortikální a subkortikální demence	70-79
28	A4	I/D	87	M	Vaskulární demence	70-79
29	A5	I/D	92	Ž	Nespecifická demence	70-79
30	A6	I/D	88	Ž	Alzheimerova choroba	60-69
31	A7	I/I	84	Ž	Alzheimerova choroba	60-69

32	A8	I/D	81	Ž	Alzheimerova choroba	70-79
33	A9	I/D	63	Ž	Neurodegenerativní demence	50-59
34	A10	D/D	85	Ž	Alzheimerova choroba	60-69
35	A11	I/I	88	Ž	Alzheimerova choroba	více než 79
36	A12	D/D	71	M	Smíšená demence	60-69
37	A13	D/D	76	Ž	Nespecifikovaná demence	70-79
38	A14	D/D	83	Ž	Nespecifikovaná demence	70-79
39	A15	I/D	78	M	Nespecifikovaná demence	60-69
40	A16	I/D	91	Ž	Vaskulární demence	více než 79
41	A17	D/D	85	Ž	Alzheimerova choroba	70-79
42	A18	I/I	88	Ž	Nespecifikovaná demence	70-79
43	A19	I/D	70	Ž	Alzheimerova choroba, úzkostná porucha	60-69
44	A20	I/D	95	M	Nespecifikovaná demence	více než 79
45	A21	I/I	80	Ž	Alzheimerova choroba	70-79
46	A22	I/D	88	Ž	Alzheimerova choroba	více než 79
47	A23	I/I	71	Ž	Parkinsonova choroba, nespecifikovaná demence	60-69
48	A24	D/D	76	Ž	Nespecifikovaná demence	60-69
49	A25	I/I	85	M	Nespecifikovaná demence	70-79
50	A26	I/D	72	M	Alzheimerova choroba	60-69
51	A27	I/I	77	Ž	Alzheimerova choroba	60-69
52	A28	D/D	67	M	Neurodegenerativní demence	50-59
53	A29	D/D	82	M	Alzheimerova choroba	60-69
54	A30	I/I	84	Ž	Alzheimerova choroba	více než 79
55	A31	D/D	83	Ž	Alzheimerova choroba	70-79
56	A32	I/I	95	Ž	Nespecifikovaná demence	70-79
57	A33	I/D	79	Ž	Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba	70-79
58	642/20	I/D	51	Ž	Bez diagnózy demence	-
59	1008/21	D/D	65	M	Bez diagnózy demence	-
60	702/21	I/I	57	Ž	Bez diagnózy demence	-
61	966/21	I/D	43	Ž	Bez diagnózy demence	-

**Příloha 2: Přehled pacientů v kontrolní skupině.**

LIČ	DATUM	POHLAVÍ	VĚK	ACE I/D
18/14	23.5.2014	Ž	55	I/I
44/14	5.11.2014	Ž	47	I/D
45/14	5.11.2014	M	34	I/D
3/15	22.3.2016	Ž	23	I/I
7/15	22.3.2016	M	53	I/I
8/15	22.3.2016	Ž	50	I/D
9/15	22.3.2016	M	15	I/D
26/15	14.8.2015	Ž	73	I/D
52/15	15.12.2015	Ž	56	I/I
2/16	13.1.2016	M	44	I/D
5/16	13.1.2016	Ž	59	D/D
6/16	13.1.2016	M	64	D/D
22/16	3.5.2016	Ž	57	I/D
26/16	11.5.2016	Ž	29	I/D
29/16	31.5.2016	M	30	I/D
28/16	2.6.2016	Ž	57	I/D
31/16	30.6.2016	Ž	51	D/D
37/16	20.7.2016	Ž	17	I/I
48/16	16.8.2016	M	51	I/D
96/16	16.12.2016	M	34	I/D
101/16	3.1.2017	Ž	49	D/D
2/17	20.1.2017	Ž	54	I/D
31/17	27.2.2017	Ž	44	I/D
32/17	30.6.2017	Ž	77	I/I
36/17	3.3.2017	Ž	45	I/I
37/17	30.5.2017	M	35	D/D
42/17	23.3.2017	M	57	D/D
43/17	23.3.2017	Ž	57	D/D
63/17	23.3.2017	Ž	49	I/D
64/17	23.3.2017	M	52	I/D
65/17	23.3.2017	M	45	I/D
66/17	29.3.2017	Ž	41	I/D
67/17	29.3.2017	M	32	I/D
68/17	13.6.2017	M	55	I/I
70/17	29.3.2017	Ž	45	I/I
72/17	29.3.2017	Ž	63	I/D
73/17	29.3.2017	Ž	55	I/D
74/17	29.3.2017	Ž	58	I/D
75/17	29.3.2017	Ž	39	I/D



76/17	29.3.2017	Ž	54	I/D
77/17	29.3.2017	Ž	69	I/D
78/17	25.5.2017	M	57	D/D
79/17	6.4.2017	M	29	I/D
80/17	6.4.2017	Ž	41	I/D
81/17	30.5.2017	Ž	64	I/D
82/17	15.5.2017	Ž	49	I/D
83/17	6.4.2017	M	42	D/D
84/17	6.4.2017	M	77	I/D
85/17	6.4.2017	M	63	I/D
86/17	6.4.2017	Ž	44	I/D
87/17	11.4.2017	Ž	35	I/D
88/17	11.4.2017	M	30	D/D
89/17	15.5.2017	Ž	56	D/D
90/17	11.4.2017	M	28	D/D
91/17	11.4.2017	Ž	49	D/D
92/17	30.5.2017	Ž	14	I/D
93/17	11.4.2017	Ž	55	D/D
94/17	12.4.2017	Ž	51	I/D
95/17	12.4.2017	M	69	D/D
96/17	15.5.2017	Ž	51	I/D
97/17	12.4.2017	Ž	64	D/D
98/17	13.6.2017	M	68	I/D
99/17	12.4.2017	Ž	52	I/D
100/17	12.4.2017	M	50	I/D
101/17	30.5.2017	Ž	45	I/D
102/17	13.6.2017	Ž	42	I/I
103/17	30.5.2017	Ž	53	I/D
104/17	30.5.2017	Ž	52	I/I
107/17	23.3.2017	Ž	29	D/D
108/17	20.3.2017	M	62	-
109/17	15.5.2017	Ž	61	D/D
110/17	21.3.2017	Ž	29	I/D
111/17	16.5.2017	Ž	61	D/D
114/17	30.5.2017	Ž	11	D/D
115/17	16.5.2017	M	22	I/I
117/17	16.5.2017	Ž	49	I/I
118/17	16.5.2017	M	12	I/I
119/17	16.5.2017	M	50	I/D
120/17	16.5.2017	M	47	I/D
121/17	16.5.2017	Ž	59	D/D
122/17	13.6.2017	M	18	I/D

123/17	30.5.2017	M	57	I/I
124/17	16.5.2017	Ž	64	D/D
125/17	25.5.2017	Ž	73	I/D
127/17	13.6.2017	M	72	I/D
133/17	7.6.2017	Ž	9	I/D
134/17	7.6.2017	Ž	39	D/D
135/17	7.6.2017	M	61	I/I
151/17	20.6.2017	Ž	5	I/D
152/17	27.6.2017	Ž	48	I/D
153/17	20.6.2017	Ž	5	I/D
159/17	7.6.2017	M	41	D/D
160/17	7.6.2017	Ž	50	D/D
161/17	7.6.2017	Ž	61	I/D
162/17	13.6.2017	M	41	I/D
168/17	27.6.2017	M	35	I/D
169/17	20.6.2017	M	34	I/D
175/17	20.6.2017	Ž	43	D/D
176/17	27.6.2017	Ž	71	D/D
199/17	15.8.2017	M	46	I/D
201/17	22.8.2017	Ž	34	D/D
212/17	24.8.2017	Ž	56	I/D
213/17	24.8.2017	M	58	I/D
215/17	24.8.2017	M	40	I/I
216/17	24.8.2017	Ž	43	I/D
221/17	2.11.2017	M	30	D/D
222/17	23.11.2017	M	60	I/I
223/17	2.11.2017	Ž	35	I/D
224/17	2.11.2017	Ž	54	I/D
225/17	23.11.2017	M	54	I/D
226/17	23.11.2017	Ž	63	I/I
227/17	11.1.2017	M	42	I/D
228/17	2.11.2017	Ž	67	I/D
229/17	9.11.2017	M	70	D/D
230/17	2.11.2017	Ž	63	D/D
233/17	9.11.2017	M	50	D/D
235/17	2.11.2017	Ž	56	I/D
236/17	9.11.2017	Ž	55	I/D
237/17	9.11.2017	Ž	56	I/D
238/17	9.11.2017	Ž	62	I/D
239/17	9.11.2017	Ž	50	I/D
243/17	23.11.2017	Ž	24	I/D
244/17	23.11.2017	Ž	68	D/D

245/17	23.11.2017	Ž	27	I/D
8/18	6.2.2018	Ž	46	D/D
14/18	27.2.2018	Ž	42	D/D
70/18	12.9.2018	Ž	61	I/D
71/18	12.9.2018	M	56	I/I
77/18	1.11.2018	Ž	61	I/D
99/18	20.12.2018	Ž	58	I/I
5/19	29.1.2019	Ž	38	I/D
25/19	14.8.2019	Ž	34	D/D
49/19	7.4.2019	Ž	47	D/D
56/19	26.6.2019	M	32	I/D
68/19	14.8.2019	M	65	D/D
169/19	20.11.2019	Ž	57	I/D
31/20	7.4.2020	M	44	I/D
98/20	3.6.2020	M	62	D/D
175/20	9.7.2020	M	55	D/D
218/20	9.7.2020	Ž	55	I/D
332/20	7.8.2020	M	10	D/D
468/20	24.9.2020	M	42	I/D
603/20	18.11.2020	M	7	I/D
625/20	4.12.2020	Ž	36	D/D
642/20	8.12.2020	Ž	49	I/D
648/20	4.12.2020	Ž	42	I/D
658/20	21.12.2020	M	55	I/D
686/20	21.12.2020	M	12	D/D
7/21	13.1.2021	Ž	70	I/I
33/21	20.1.2021	M	6	D/D
367/21	25.4.2021	Ž	56	I/D
381/21	13.5.2021	Ž	48	D/D
499/21	10.6.2021	Ž	50	I/D
702/21	30.6.2021	Ž	56	I/I
939/21	1.10.2021	M	10	D/D
966/21	20.9.2021	Ž	42	I/D
1008/21	11.10.2021	M	64	D/D

Příloha 3: Podrobnější statistické vyhodnocení pacientů s demencí

<b>Průměrný věk pacientů</b>	
79	
<b>Ženy/muži</b>	
M	16
Ž	45
<b>STATISTIKA ACE I/D</b>	
I/I	16
I/D	29
D/D	16
<b>STATISTIKA ONEMOCNĚNÍ</b>	
Alzheimerova choroba	21
Jiná demence	31
Bez demence	9
<b>ACE I/D ŽENY</b>	
I/I	13
D/D	12
I/D	20
<b>ACE I/D MUŽI</b>	
I/I	3
D/D	4
I/D	9

Příloha 4: Podrobnější statistické vyhodnocení pacientů bez demence

<b>Průměrný věk pacientů</b>	
48	
<b>Ženy/muži</b>	
M	60
Ž	97
<b>STATISTIKA ACE I/D</b>	
I/I	23
I/D	86
D/D	47
<b>ACE I/D ŽENY</b>	
I/I	14
D/D	27
I/D	55
<b>ACE I/D MUŽI</b>	
I/I	9
D/D	20
I/D	30

## 11 Seznam použitých zkratek

A – adenin

ACE – angiotenzin konvertující enzym

ACE2 – angiotenzin konvertující enzym 2

AD – Alzheimerova choroba

ADDI – adducin

AGT – angiotenzin

ATII – Angiotenzin II

ATP – adenosintrifosfát

BMI – body mass index

C – cytosin

CAA – mozková amyloidová angiopatie

CI – interval spolehlivosti

COVID-19 – Koronavirové onemocnění

CT – počítačová tomografie

DD – delece/delece

DM – diabetes mellitus

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

ESRD – end-stage renal disease – skutečné onemocnění v konečném stádiu

G – guanin

GPI – Genuine Progress Indicator

HUGO – Human Genom Project

I/D – inzerce/delece

IDDM – inzulin-dependentní diabetes mellitus

ICH – ischemická choroba

II – inzerce/inzerce

JIP – jednotka intenzivní péče

MR – magnetická rezonance

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

OR – poměr šancí

PCOS – syndrom polycystických vaječníků

PCR – polymerázová řetězová reakce

PSICH – Primárního spontánní intracerebrální krvácení

RAAS – renin-angiotenzin-aldosteronový systém

RNA – ribonukleová kyselina

rpm – otáčky za minutu

RT – pokojová teplota

RT-PCR – real time polymerase chain reaction

T – thymin

UFTM – Universidade Federal do Triangulo Mineiro

VO<sub>2max</sub> – maximální objem kyslíku v plicích

Zn – zinek