

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Frühbauerová Jitka

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

PRŮBĚH A JEJÍ VYUŽITÍ V DIAGNOSTICE GENETICKÝCH PORUCH

Frühbauerová Jitka

Bakalářská práce

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jitka Frühbauerová**
Osobní číslo: **C18217**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Polymerázová řetězová reakce, průběh a její využití v diagnostice genetických poruch**
Téma práce anglicky: **Polymerase Chain Reaction, Course And Its Use For Diagnosis Of Genetical Disorders**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Seznamte se s literárními údaji o historii objevu polymerázové řetězové reakce (PCR) a o jejím průběhu.
2. Popište teoretické poznatky nezbytné pro realizaci PCR.
3. Popište experimentální provedení PCR, včetně přístrojového vybavení, všech chemických sloučenin a detekci finálních produktů.
4. Popište praktické využití PCR v medicíně, genetice a onkologii se zaměřením na studium genetických poruch u člověka.
5. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy a ze získaných literárních údajů vyvoďte závěry o diagnostických postupech u nemocných s genetickými poruchami.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Martina Špryncová**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem práci s názvem Polymerázová řetězová reakce, průběh a její využití v diagnostice genetických poruch vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mě požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29.06.2022

Frühbauerová Jitka

PODĚKOVÁNÍ

Velice ráda bych poděkovala vedoucímu práce panu prof. Ing. Alexandru Čeganovi, CSc., za odborný dohled, poskytnuté materiály a pomoc při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině za neutuchající podporu během celého studia.

ANOTACE

Ve své bakalářské práci se zabývám popisem geneticky dědičných onemocnění pomocí polymerázové řetězové reakce. V první části popisuji princip a typy polymerázové řetězové reakce, dále se věnuji typům a diagnostice diabetu mellitus a enzymům, jež ovlivňují rozvoj této choroby. V následující části se zabývám popisem a diagnostikou Gilbertova syndromu a enzymům, jež zhoršují průběh tohoto chronického onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

Deficit enzymů, diabetes mellitus, Gilbertův syndrom, polymerázová řetězová reakce

TITLE

Polymerase Chain Reaction's, Course and Use for the Diagnosis of Genetical Disorders

ANNOTATION

In my bachelor's thesis, I deal with the description of genetically inherited diseases using the polymerase chain reaction. In the first part, I describe the principle and types of the polymerase chain reaction, then I focus on the types and diagnosis of diabetes mellitus and the enzymes that influence the development of this disease. In the following part, I pursue the description and diagnosis of Gilbert's syndrome and the enzymes that make the course of this chronic disease worse.

KEYWORDS

Diabetes mellitus, enzyme deficiency, Gilbert syndrome, polymerase chain reaction

Obsah

Obsah.....	7
Úvod.....	13
1 Polymerázová řetězová reakce.....	14
1.1 Princip PCR.....	14
1.2 Real-time PCR.....	17
1.3 Reverzní transkriptázová PCR.....	18
1.4 Nested PCR.....	19
1.5 Multiplexní PCR.....	20
2 Diabetes mellitus.....	21
2.1 Diabetes mellitus 1. typu.....	22
2.2 Diabetes mellitus 2. typu.....	23
2.3 Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY).....	23
2.4 Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA).....	24
2.5 Diagnostika DM.....	24
2.5.1 FPG test.....	25
2.5.2 RPG test.....	25
2.5.3 OGTT.....	26
2.5.4 HbA1c.....	26
2.6 Alfa-1-antitrypsin.....	27
2.6.1 Genetika AAT.....	28
2.6.2 Deficit AAT.....	30
2.6.3 Vliv AAT na diabetes mellitus.....	31
2.7 Thiopurin-S-methyltransferáza.....	32
2.7.1 Genetika TPMT.....	33
2.7.2 Deficit TPMT.....	33

2.7.3	Vliv TPMT na diabetes mellitus	34
3	Gilbertův syndrom	35
3.1	Klinický obraz	35
3.2	Diagnostika	36
3.3	Apolipoprotein B100	37
3.3.1	Genetika Apo B100.....	38
3.3.2	Deficit Apo B100.....	39
3.3.3	Vliv Gilbertova syndromu na Apo B100	39
3.4	Dihydropyrimidindehydrogenáza	40
3.4.1	Genetika DPD	41
3.4.2	Deficit DPD	42
3.4.3	Vliv DPD na Gilbertův syndrom	42
Závěr.....		43
Zdroje		44

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 Schéma polymerázové řetězové reakce (Engstrom–Melnyk, 2015)	16
Obrázek 2 Reverzní transkripce (Marintcheva, 2018)	19
Obrázek 3 Princip funkce primerů, nested PCR (Marmioli, 2007)	19
Obrázek 4 Vznik glykovaného hemoglobinu HbA1c (Sherwani, 2016)	27
Obrázek 5 Genomická organizace genu SERPINA1 (Hazari, 2017)	28
Obrázek 6 3D struktura AAT (Hazari, 2017)	30
Obrázek 7 Pozitivní účinky AAT zpomalující progresi DR (Ortiz, 2014)	32
Obrázek 8 Transport a skladování lipidů (Zhyvotovska, 2019)	38
Obrázek 9 Metabolismus 5–FU (Ciccolini, 2009)	41

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

5-FU	5-fluorouracil
A	adenin
A1AT, AAT	alfa-1 antitrypsin
AATD	deficit alfa-1 antitrypsinu
ADA	Americká diabetologická asociace
AK, AMK	aminokyselina
Apo B100	apolipoprotein B100
Arg	arginin
Asn	asparagin
AS-PCR	alelově specifická PCR
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
DM	diabetes mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPD	dihydropyrimidindehydrogenáza
DR	diabetická retinopatie
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
FDHU	5-fluorodihydrouracil
FPG	plazmatická glukóza nalačno
G	guanin
GDM	gestační diabetes mellitus
Gln	glutamin
HbA	hemoglobin dospělých

HbA1c	glykovaný hemoglobin A1c
HbF	fetální hemoglobin
HLA	Human Leucocyte Antigen
HNF	hepatální nukleární faktor
IEF	izoelektrická fokusace
IFG	zhoršená glukóza nalačno
IGT	porucha glukózové tolerance
ICHS	ischemická choroba srdeční
IPF	inzulínový promotorový faktor
LADA	Latent Autoimmune Diabetes in Adults
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
MMP	matricová metaloproteináza
MODY	Maturity Onset Diabetes of Young
NALFD	non-alkoholové ztučnění jater
NE	neutrofilní elastáza
NF- κ B	nukleární transkripční faktor κ B
OGTT	orální glukózový toleranční test
ORF	otevřené čtecí rámce
PAR	proteázou aktivované receptory
PCR	polymerázová řetězová reakce
PI	inhibitor proteinázy
RCL	reaktivní středová smyčka
RNA	ribonukleová kyselina

RPG	náhodná plazmatická glukóza
RT-PCR	reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce
SAM	s-adenosyl methionin
SERPIN	inhibitor serinových proteáz
SERPINA1	inhibitor serinových proteáz A1
T	thymin
TNF- α	tumor nekrotizující faktor
TPMT	thiopurin methyltransferáza
UDP, UGT	uridin 5'-difosfo-glukuronosyltransferáza
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě

Úvod

Rozvoj sekvenace lidské DNA v posledních desetiletích zaznamenal výrazný rozvoj. Zároveň stále rychleji přibývá lidí s civilizačními a geneticky dědičnými onemocněními jako je diabetes mellitus a Gilbertův syndrom. Využitím polymerázové řetězové reakce lze zrychlit a zpřesnit diagnostiku onemocnění a zároveň snížit výdaje spojené se zdravotní péčí. V současné době je však třeba dívat se více dopředu. Je možné z lidského genomu předurčit rozvoj těchto onemocnění, či jejich komplikovanější průběh?

V první části bakalářské práce jsem se věnovala popisu polymerázové řetězové reakce. Její objev zapříčinil revoluci v biologickém a genetickém výzkumu. Z původní jedné metody se vyvinulo několik typů, které sekvenaci DNA činí rychlejší a přesnější.

V následující části jsem se zaměřila na čtyři enzymy, k jejichž sekvenaci se využívá polymerázové řetězové reakce: konkrétně alfa-1-antitrypsin, thiopurin S-methyltransferázu, apolipoprotein B100 a dihydropyrimidindehydrogenázu. Popsala jsem jejich působení v lidském organismu, lokalizaci v lidském genomu a projevy jejich deficitu v genotypu a fenotypu. S ohledem na jejich vliv v lidském těle jsem se zabývala tím, jak ovlivňují diabetes mellitus a Gilbertův syndrom.

Diabetes mellitus je civilizační onemocnění, které se typicky projevuje hyperglykemií. Dělí se na několik druhů, z nichž většina je geneticky podmíněna. K určení vhodné léčby je důležité tyto typ rozeznávat. Jelikož je diabetes stále častější onemocnění, zaměřila jsem se i na možnosti diagnostiky. Následně jsem se zabývala tím, jak ovlivňují enzymy alfa-1-antitrypsin a thiopurin-S-methyltransferáza toto onemocnění.

Gilbertův syndrom je chronické onemocnění, pro něž je charakteristický zvýšený bilirubin v séru. Bilirubin funguje v lidském těle jako antioxidant, proto mají lidé s Gilbertovým syndromem snížené riziko výskytu kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny. Zaměřila jsem se na popis genetické mutace, jež způsobí Gilbertův syndrom, a jeho diagnostiku. Dále jsem se zabývala vlivem apolipoproteinu B100 a dihydropyrimidindehydrogenázy na tento syndrom.

1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je často vnímaná jako zásadní diagnostická metoda v molekulární biologii, forenzní vědě a potravinářském průmyslu. Její objev umožnil *in vitro* zmnožení neboli amplifikaci specifického fragmentu DNA v jednoduché enzymatické reakci.

Ačkoli byla tato metoda popsána Keppem a spolupracovníky již v roce 1971, teprve v roce 1983 ji byl Kary Mullis schopen uskutečnit. O deset let později za tento objev získal Nobelovu cenu. Od té doby se PCR stále vylepšuje, vznikají nové možnosti, jak reakci provést, a tím roste i její využití v diagnostice.

PCR zapříčinila revoluci v biologickém a genetickém výzkumu díky vlastnosti repetitivnosti, lze tudíž i z malého množství DNA získat velké množství totožných kopií dostačujících pro následnou analýzu. Teoreticky tedy není množství matricové DNA limitujícím faktorem. PCR považujeme za techniku klonování či purifikace.

Dříve se k amplifikaci DNA využívaly bakterie. Tato metoda byla velmi náročná jak časově, tak z hlediska provedení. Proces zahrnoval přenesení DNA do plazmidu, či jiného vektoru bakterie, transformaci kombinované DNA do buňky, následný růst značného množství bakterií a čištění fragmentu DNA z bakterií (*Maheaswari, 2016*).

1.1 Princip PCR

Metoda PCR je založena na repetici tří po sobě jdoucích kroků. Jednotlivé kroky zahrnují denuraci templátu, nasedání primeru a následnou elongaci nového komplementárního řetězce DNA. Charakteristické je střídání teplot, kdy se vzorek nejprve zahřeje, následně ochladí a opět zahřeje. Tento cyklus se opakuje přibližně třicetkrát (*Lorenz, 2012*).

Samotná PCR se sestává ze tří opakujících se kroků a je k ní potřeba několik komponent. Dané komponenty jsou templátová DNA, primery, pufr, volné nukleotidy a enzym DNA polymeráza. Templát představuje DNA o známé sekvenci, který je potřebný amplifikovat. Obsah vzorku DNA je variabilní, ale obvykle je tvořen od 100 do 1000 bp. Jelikož DNA extrahovaná z organismu obsahuje velké množství nukleotidových sekvencí, je nutné odlišit ze všech možných sekvencí, ty, které jsou v oblasti zájmu. K tomu jsou využívány primery, jež jsou komplementární k templátové DNA. Primery jsou jednovláknové oligonukleotidové řetězce složené z 16 až 20 bází. Aplikují se ve dvojici, tvořené dopředným a reverzním primerem. Volné nukleotidy se slučují na základě replikace DNA pomocí enzymu DNA polymerázy za

vzniku produktu PCR. Takto nově syntetizovaná DNA se stává šablonou pro další replikaci, čímž vzniká řetězová reakce a počet nových kopií DNA roste exponenciálně (*Bartlett, 2003*).

Jelikož technika PCR zahrnuje několik kroků s vysokými teplotami, je potřebné, aby DNA polymeráza byla tepelně odolná. DNA polymeráza byla izolována z termofilních bakterií, jako je bakterie *Thermophilus aquaticus*. Odtud vznikl název Taq polymeráza. Tyto polymerázy jsou aktivní i při vyšších teplotách, nežli je potřebné k denaturaci. Díky tomu lze provádět PCR bez nutnosti doplňování enzymu po každém cyklu (*Cline, 1996*).

Používají se ale i jiné termostabilní bakterie. Například se jedná o *Tli* polymerázu izolovanou z *Thermococcus litoralis*. Její nejvyšší polymerační aktivity je dosaženo při 75 až 80 °C. Třetí využívanou polymerázou je *Pfu* polymeráza. Izoluje se z *Pyrococcus furiosus*, která je extrémně tepelně stabilní. Předností těchto polymeráz je vyšší přesnost, jelikož mají schopnost korektury (proof-reading polymerase). Je ovšem nezbytné zdůraznit, že přesnost metody PCR ovlivňuje i optimální zvolení složení pufru, pH, koncentrace Mg^{2+} a koncentrace nukleotidů (*Innis, 1995*).

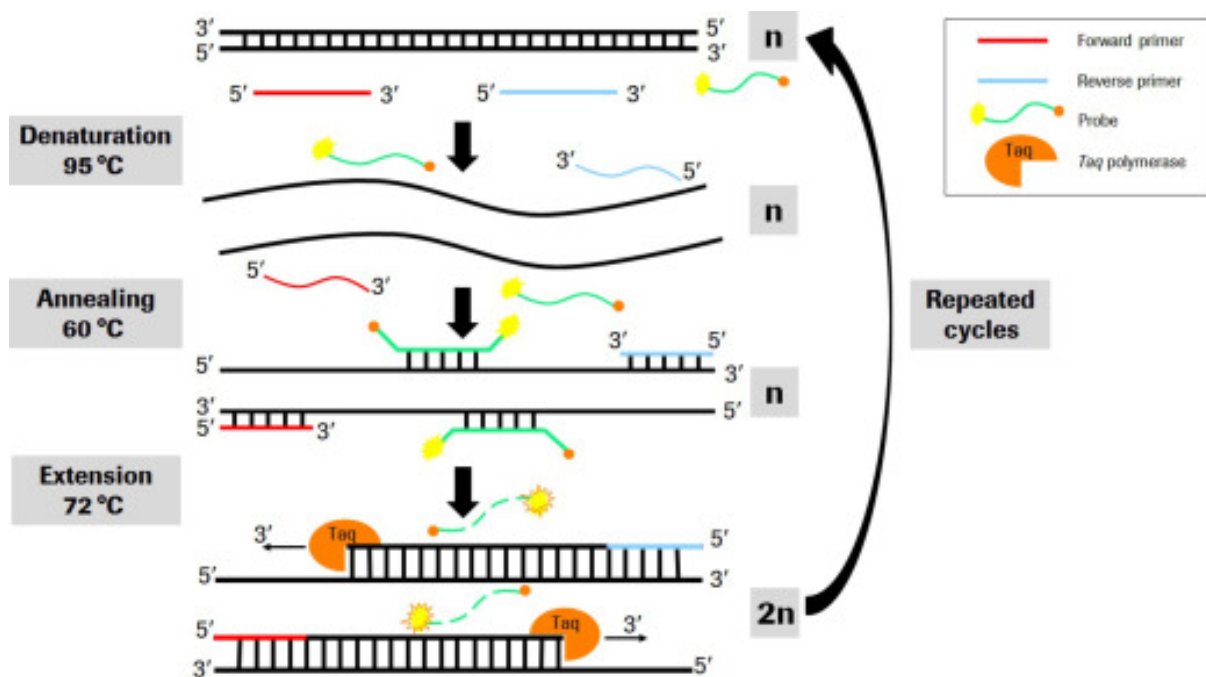
Před samotným provedením PCR je nutné zajistit aseptické prostředí, jelikož vyšetřovaná DNA je velmi citlivá na kontaminaci. Práce laboranta by měla být přesná, rychlá a také aseptická. Po zajištění těchto podmínek se nejprve vyšetřovaný vzorek odstředí, jelikož by mohl být zdrojem aerosolů a kontaminoval by laboratoř (*Park, 2011*). Takto připravený vzorek templátové DNA smícháme s ostatními reagensy, což jsou dva primery, které zahajují syntézu, Taq polymeráza, nukleotidy ve formě deoxynukleosid trifosfátu a pufr, jež zajišťuje optimální podmínky reakce, díky optimální koncentraci iontů a pH. Samotná metoda PCR sestává ze tří na sebe navazujících a opakujících se kroků (*Clark, 2019*).

Při prvním kroku dochází k denaturaci dvou řetězců DNA na dva jednoduché řetězce. Aby rozdělení řetězců proběhlo, směs se zahřeje na 94 °C po dobu 15 až 30 sekund. Při této teplotě dochází k rozvolnění vodíkových vazeb, ty drží obě komplementární vlákna spojené. Druhý krok, nazývaný annealing, probíhá za teploty 50 až 58 °C po dobu 15–60 sekund. Je charakteristický nasedáním primerů na specifická místa denaturované DNA. Přímý a reverzní primer nasedají na opačné konce komplementárního cílového vlákna. Posledním třetím krokem je tzv. elongace. Odehrává se za teploty 72 °C, při které je aktivní termostabilní polymeráza. Enzym DNA polymeráza syntetizuje nový komplementární DNA řetězec za využití volných nukleotidů. Dochází tedy k elongaci neboli prodlužování nového řetězce DNA. Obecně

postačuje 1 minuta na vytvoření 1000 bp. Tyto tři kroky se cyklicky opakují přibližně $30 \times$ v přístroji nazývaném termocyklér. Po proběhnutí amplifikační reakce je nezbytné daný amplikon (amplikovaný produkt) detekovat pomocí manuální či automatizované metody. Nejčastěji využívanou metodou je elektroforéza. Při ní dochází k rozdělení fragmentů DNA podle jejich velikosti na agarovém gelu či polyakrylamidovém gelu obarveném etidium bromidem. Produkty se na gelu jeví jako jednotlivé pásy odpovídající sekvenovaným fragmentům DNA o určité velikosti. Při využití ultrafialového světla dochází k fluorescenci (Maheaswari, 2016).

PCR je velmi specifická metoda čili neexistuje univerzální sada podmínek, které by vždy zaručily úspěch. Mezi nejdůležitější parametry optimalizující reakci patří tzv. annealing teplota, která se pohybuje nejčastěji mezi 50 a 68 °C. Dále účinnost tepelného cyklovače, ten zajišťuje omezení počtu cyklů a jejich délky. Důležitým parametrem je i složení pufru. Zde jde především o nastavení optimální koncentrace Mg^{2+} a dalších iontů (Pherson, 2000). Aby se snížilo množství nespecifických vedlejších produktů přidávají se do reakce tzv. aditiva. Nejčastěji se jedná o formamid, dimethylsulfoxid, hovězí sérový albumin či tetramethylamoniumchlorid (Yuce, 2014).

Hlavními výhodami PCR jsou vysoká citlivost a specifčnost, snadnost kvantifikace, rychlost analýzy a reprodukovatelnost.



Obrázek 1 Schéma polymerázové řetězové reakce (Engstrom–Melnyk, 2015)

1.2 Real-time PCR

Specifičnost real-time PCR (PCR v reálném čase) tkví v amplifikaci a detekci DNA v reálném čase. Klasická PCR se naopak spoléhá na detekci a analýzu DNA až na konci tepelného cyklování. Díky této úpravě real-time PCR poskytuje rychlejší a přesnější výsledky. Metoda real-time PCR potřebuje termocyklér vybavený optickým systémem pro zachycení fluorescenčního signálu a počítač se softwarem schopným zaznamenat tato data a provést jejich závěrečnou analýzu. Zachycený signál fluorescence je přímo úměrný množství produktů PCR, které jsou detegovány fluorescenčními barvivy nebo sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami. Hodnoty fluorescence se zaznamenávají během každého cyklu (*Mackay, 2002*).

Existuje velký výběr komerčně dostupných fluorescenčních barviv. Mezi ty nejznámější zahrnujeme ethidiumbromid, SYBER Green I, SYBER Gold, SYTO, BEBO a BOXTO (*Arikawa, 2008*). Nejčastěji používaným je SYBER Green I, asymetrické kyaninové barvivo, které se vyznačuje vysokou afinitou k dsDNA. Po navázání barviva na dsDNA, komplex absorbuje modré světlo (497 nm) a emituje zelené světlo (520 nm). Hlavní nevýhodou SYBER Green barviva je jeho nespecifičnost. Pokud jsou v testu přítomny nespecifické produkty nebo primer-dimery, zvyšuje se množství falešně pozitivních výsledných signálů. Tento problém je možné eliminovat pomocí softwaru schopného analýzy fluorescenční křivky tání. Princip metody je založen na rozdílné teplotě, při které dojde k denuraci specifického a nespecifického produktu. Kratší primer-dimer má nižší teplotu denaturace nežli amplikon plné délky. Porovnáním výsledných křivek umožní rozlišit, o jaký produkt se jedná (*Zipper, 2004*).

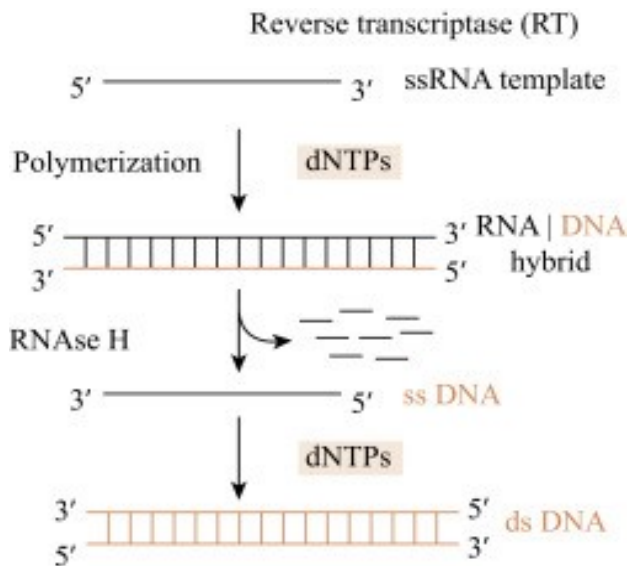
Druhou možností je využití oligonukleotidových sond, jež jsou specifičtější, avšak i nákladnější. Sondy jsou tvořeny oligonukleotidy, na které jsou napojeny malé fluorescenční molekuly, tzv. fluorofory. Nejvíce rozšířené jsou tzv. TaqMan sondy. Jedná se o krátký oligonukleotid, jenž zahrnuje 5' koncový reportérový fluorofor a 3' koncový zhášec. Intaktní sondy neemitují fluorescenci, poněvadž jsou navázané (zhášené). Aby došlo k vytvoření fluorescenčního signálu, nejprve se při 60 °C musí sonda navázat na komplementární řetězec DNA. Při této teplotě současně dochází ke štěpení 5-koncové sondy TaqMan pomocí Taq polymerázy. Tím se uvolní fluorescenční barvivo od zhášecího barviva. Fluorofor bez navázaného zhášeče po excitaci fluoreskuje. Výsledný signál je přímo úměrný množství amplifikovaného specifického produktu. Použití nespecifických fluorescenčních barviv nebo

nákladnějších oligonukleotidových sond záleží na designu reakce určujícím jaká možnost je vhodnější a ekonomičtější (Valones, 2009).

1.3 Reverzní transkriptázová PCR

Reverzní transkriptázová PCR (RT-PCR) je velmi citlivá metoda vhodná k detekci a měření RNA. Důležitou roli zde hraje enzym reverzní transkriptázy, který převádí molekuly RNA na jejich komplementární sekvence DNA, tzv. cDNA (Koolman, 2012). cDNA následně slouží jako templát pro amplifikaci pomocí PCR. RT-PCR je jedno či dvoukroková metoda. Jednokroková metoda kombinuje reakci reverzní transkripce a PCR v jedné zkumavce. Důležité je využití sekvence specifických primerů, které reakci umožní. U dvoukrokové metody se jednotlivé kroky odehrávají v samostatných zkumavkách. V první zkumavce probíhá syntéza cDNA, která se následně přenesse do druhé zkumavky pro PCR. Zde se využívají oligo (dT) či genově specifické primery. Oba postupy mají klady i zápory. Jednokroková metoda je vhodná pro vysoce výkonný screening díky snadnému nastavení reakce. Dvoukroková metoda je ideální pro detekci vícera zpráv z jednoho vzorku RNA (Jajali, 2017).

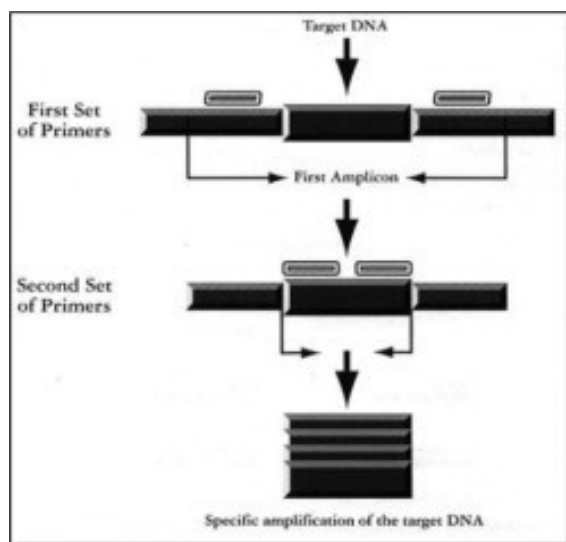
Enzym reverzní transkriptáza, který byl objeven u retrovirů, je schopný vytvořit komplementární řetězec DNA na základě sekvence RNA (Bhagavan, 2015). Enzym obsahuje celkem tři enzymatické aktivity. V prvním kroku RNA-dependentní DNA polymeráza syntetizuje komplementární řetězec DNA k templátu RNA. Následně RNáza H oddělí řetězec RNA z hybridní dvoušroubovice RNA-DNA. V závěru DNA-dependentní DNA polymeráza dokončí syntézu řetězce dvouvláknové DNA (Clark, 2019).



Obrázek 2 Reverzní transkripce (Marintcheva, 2018)

1.4 Nested PCR

Nested PCR (vnořená) využívá dva páry primerů zaměřujících se na jeden lokus. Cílová sekvence DNA prvního páru primerů (vnitřní primery) je vnořená do cílové sekvence druhého páru primerů (vnější primery). Reakce PCR proběhne nejprve standardně za použití „vnějších“ primerů. Posléze proběhne druhá PCR reakce s „vnitřními“ primery, kde jako templát slouží produkty z první reakce. Tento postup zajišťuje zvýšení citlivosti díky opakované dvoukrokové amplifikaci. Zároveň je zvýšena i specifita reakce, jelikož vnitřní primery amplifikují výhradně specifické produkty z první fáze (Picó, 2007).



Obrázek 3 Princip funkce primerů, nested PCR (Marmioli, 2007)

Velkou nevýhodou této metody je vysoké riziko kontaminace. K tomu dochází především při přenosu produktů z prvního kola do druhé zkumavky (*Debnath, 2010*).

1.5 Multiplexní PCR

Multiplexní PCR je metoda, při které jsou v jedné reakční zkumavce zároveň amplifikovány dva a více fragmenty DNA. To je umožněno díky zahrnutí více párů primerů do reakční směsi. Správný výběr primerů je pro multiplexní PCR reakci nezbytný. Páry primerů musí být kompatibilní. Důležitá je podobná teplota nasedání primerů a zároveň by neměly být vzájemně komplementární. Velikosti amplifikačních produktů by měly být dostatečně odlišné, aby byla zajištěna identifikace všech fragmentů na agarózovém gelu či při kapilární elektroforéze. Výhodou metody je vyloučení možnosti falešných pozitiv nebo negativ, proto že jedna sada primerů může fungovat jako vnitřní kontrola (*Markoulatos, 2002*).

Přestože metoda multiplexní PCR snižuje čas i náklady, je mnohem náročnější na vývoj, jelikož je nutné optimalizovat mnoho reakčních podmínek. Reprezentuje však významnou techniku pro vysoce výkonné analýzy, hojně se využívá v analýze potravin, které se testují na přítomnost různých toxických látek v jednom vzorku (*Picó, 2007*), a také při typizaci humánních vzorků ve forezních kitech (*Butler, 2010*).

2 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) je civilizační, metabolické onemocnění, které zahrnuje skupinu heterogenních poruch (Anděl, 2001). Jejich společným znakem je chronická hyperglykémie z důvodu poruchy sekrece inzulínu, účinku inzulínu či obojího. Chronická hyperglykémie vede k dlouhodobému poškození, dysfunkci až selhání mnoha orgánů, zvláště očí, ledvin, nervů, srdce a cév (American diabetes association — ADA, 2004).

Současná klasifikace rozlišuje diabetes 1. typu, který je podmíněn absolutním nedostatkem inzulínu, a diabetes 2. typu, pro nějž je typický relativní nedostatek inzulínu se sníženou účinností na cílové tkáně (Roden, 2016). Můžeme stanovit i méně časté typy DM. Jedná se o gestační diabetes mellitus (GDM), diabetes indukovaný léky nebo chemicky a také diabetes přidružený k onkologickému onemocnění např. pankreatu (Anděl, 2001). V rámci prevence je také důležité odlišit stavy směřující k DM. K jedincům s vyšším rizikem rozvoje DM patří osoby s obezitou, s hypertenzí a s hyperlipidémií (Patel, 2010). Mezi prediabetes se řadí stavy se zhoršenou glukózou nalačno (IFG) a také porucha glukózové tolerance (IGT) (ADA, 2014). Pro oba typy je charakteristický přechodný stav hyperglykémie s vyšší hladinou glukózy, než je norma, ale pod prahem DM. Prediabetes je progresivní asymptomatický stav, objevující se vždy před rozvojem DM. Pokud se prediabetes zachytí včas, je možné rozvoj diabetu zvrátit či aspoň zpomalit. Úprava životního stylu, především snížení tělesné hmotnosti, snižuje riziko rozvoje diabetu o 40 až 70 % u dospělých jedinců. Možností je také využití farmaceutické léčby pomocí metforminu, který snižuje produkci glukózy v játrech, a biguanidu, jenž snižuje inzulínovou rezistenci (Olokoba, 2012). U dětí se však farmakoterapie příliš nedoporučuje, jelikož dlouhodobé důsledky nejsou zcela jasné (Bansal, 2015).

Mezi typické projevy hyperglykémie patří polyurie, polydipsie, rozmazané vidění, špatné hojení ran, brnění, necitlivost, úbytek tělesné hmotnosti, občas s polyfagií. Akutní důsledky nekontrolovaného DM se projevují hyperglykemií s ketoacidózou či neketotickým hyperosmolárním syndromem. Tyto stavy jsou život ohrožující. Naopak pomalu se vyvíjející, chronická hyperglykémie přispívá ke zhoršení růstu a zvyšuje náchylnost k infekcím. Následnými dlouhodobými obtížemi DM jsou retinopatie s případnou ztrátou zraku; nefropatie až úplné selhání ledvin; periferní neuropatie s rizikem vředů na dolních končetinách, rozvojem Charcotových kloubů až amputací. Neuropatie taktéž vede ke gastrointestinálním, genitourinárním a kardiovaskulárním symptomům a k sexuální dysfunkci (ADA, 2014).

2.1 Diabetes mellitus 1. typu

Diabetes 1. typu je autoimunitní onemocnění, jež je podmíněno genetickými faktory a vlivem prostředí. Představuje jenom 5–10 % diabetiků a projevuje se již v dětském či dospívajícím věku. Vyznačuje se úplnou ztrátou beta buněk pankreatu a velmi sníženou až nulovou sekrecí inzulínu. Mezi typické příznaky se řadí úbytek hmotnosti, nadměrná únava, žízeň a močení. Inzulín má vliv na metabolismus proteinů i tuků. Dochází tedy k úbytku jak svalové, tak tukové tkáně (*Pippitt, 2016*).

Příčinou vzniku je vrozená odchylka obranyschopnosti organismu. Ta se může projevit, až když dojde ke stimulaci spouštěcího faktoru. Vyvolávacím činitelem mohou být různé infekce (zarděnky, příušnice, angína), chemikálie či stres. Při těchto stavech se vyplavují stresové hormony, jako je např. kortizol. K normalizaci účinků stresových hormonů napomáhá inzulín, tudíž se zvyšují nároky na jeho dostupnost. Pokud je sekrece inzulínu narušena, dochází k manifestaci onemocnění. Typickými projevy jsou hyperglykémie, následná polyurie a dehydratace. Častým průvodním jevem je i ketoacidóza. Při laboratorním vyšetření lze nalézt markery značící imunitní destrukci β -buněk obsahujících autoprotilátky proti inzulínu, autoprotilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové a autoprotilátky proti tyrosinfosfatázám IA-2 a IA-2 p. Při počáteční hyperglykémii je jedna či více těchto protilátek přítomno až u 85–90 % jedinců (*ADA, 2004*).

Při odeznění vyvolávajícího onemocnění se nároky na inzulín sníží. Přesto již dochází k postupné destrukci beta buněk pankreatu. Imunitní systém aktivuje leukocyty, přesněji B a T lymfocyty. B lymfocyty tvoří protilátky namířené proti pankreatické tkáni. T lymfocyty působí cytotoxicky a destrukují beta buňky pankreatu (*Anděl, 2001*). Rychlost celkové destrukce beta buněk je variabilní – u kojenců a dětí probíhá destrukce rychle, v pozdějším věku se proces destrukce zpomaluje (*ADA, 2004*).

Geny předurčující vznik DM jsou umístěné na krátkém raménku 6. chromozomu (*Bělobrádková, 2006*). Na tomto lokusu se nachází oblast hlavního histokompatibilního systému, který obsahuje geny HLA systému. HLA systém slouží ke zprostředkování základních funkčních interakcí mezi buňkami imunitního systému. U diabetu 1. typu imunitní systém vnímá beta buňky pankreatu jako antigeny. Ty jsou schopné vyvolat cytotoxickou reakci, a i následnou tvorbu protilátek proti beta buňkám (*Roden, 2016*).

2.2 Diabetes mellitus 2. typu

Diabetes mellitus 2. typu představuje chronické metabolické onemocnění, které se díky své vysoké prevalenci postupně stává v některých zemích epidemií. Jeho rozvoj je výsledkem působení genetických, enviromentálních a behaviorálních činitelů. DM reprezentuje heterogenní skupinu hyperglykemických syndromů, přičemž většina případů diabetu 2. typu je děděna polygenně. Fenotyp člověka s tímto typem diabetu zahrnuje projevy metabolického syndromu (syndrom X, Reavenův syndrom), do kterého lze zařadit centrální typ obezity, inzulinovou rezistenci, zvýšený cholesterol či arteriální hypertenzi. Vzhledem k nárůstu obezity u dětí a dospívajících není DM 2. typu jen záležitostí jedinců v pozdním věku života. K typickým behaviorálním projevům patří sedavý způsob života, kouření cigaret a častá konzumace alkoholu. Byl zjištěn i mírný pozitivní vzájemný vztah mezi koncentrací enviromentálních toxinů a výskytem DM 2. typu. Tento jev byl popsán při výskytu bisfenolu A v moči: ten je součástí některých plastů. DM může být také přidružené onemocnění, pokud už jedinec trpí např. na akromegalii, Cushingův syndrom, chronickou pankreatitidu, tyreotoxikózu a rakovinu (*Olokoba, 2012*).

Tento typ DM se vyznačuje zhoršenou inzulinovou sekrecí, rezistencí na inzulin a možným selháním pankreatických beta buněk, což vede ke sníženému transportu glukózy do jater a ke svalovým a tukovým buňkám. Následně se zvyšuje odbourávání tuků spolu s hyperglykemií, ta má negativní vliv na kardiovaskulární, neurologickou a renální funkci (*Fujioka, 2007*).

Diabetes mellitus 2. typu je civilizační onemocnění, které postihuje nejčastěji osoby ve čtyřicátém pátém až šedesátém pátém roku života. Riziko rozvoje DM podstatně zvyšuje pozitivní rodinná anamnéza a obezita (*Anděl, 2001*).

2.3 Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY)

Termín MODY zahrnuje monogenetické defekty funkce β -buněk. Jedná se o non–inzulindependentní DM s brzkým začátkem, obvykle do 25. roku života, a autosomálně dominantním typem dědičnosti. Charakteristická je porucha sekrece inzulinu bez snížení účinku inzulinu. Diabetes u mladých lidí s nástupem zralosti (MODY) zahrnuje pět podtypů, jejichž základem jsou genetické predispozice k onemocnění.

MODY 1 je zapříčiněný mutací v genu pro hepatální nukleární faktor 4 α (HNF–4 α). Tento gen je lokalizován na dlouhém raménku 20. chromozomu. HNF–4 α , jakožto nukleární protein, má

vliv na regulaci exprese genů v játrech a pankreatu. Následkem mutace se tvoří protein s omezenou schopností vazby na DNA. Fenotypově pak dochází k postupnému selhávání kontroly glykémie. MODY 2 zahrnuje genetickou poruchu umístěnou na krátkém raménku 7. chromozomu. Což vede k mutaci lokusu pro enzym glukokinázu. Glukokináza ovlivňuje metabolismus glukózy, enzym katalyzující fosforylaci glukózy na glukóza-6-fosfát. Při této mutaci dochází ke snížení vnímavosti enzymu pro β -buňky vůči hyperglykémii, což se projeví snížením inzulínové sekrece. MODY 3 představuje genetickou poruchu lokalizovanou na dlouhém raménku 12. chromozomu a vyvolává mutaci genu pro hepatální nukleární faktor 1 α (HNF-1 α). Tento protein působí jako transkripční faktor a řídí expresi některých genů především v játrech, pankreatu a ledvinách. Následkem toho klesá funkce β -buněk. U pacienta se projeví polyurie, polydipsie a hyperglykémie. Hrozí i vysoké riziko mikrovaskulárních komplikací, např. retinopatie. MODY 4 reprezentuje mutaci genu pro inzulínový promotorový faktor 1 (IPF-1). Tento gen se nachází na dlouhém raménku 13. chromozomu. IPF-1 jakožto transkripční faktor má vliv na raný vývoj pankreatu a expresi genů v β -buňkách, především genů pro inzulín, GLUT 2, amylin a glukokinázu. Přesný mechanismus rozvoje diabetu však není zcela zřejmý. MODY 5 demonstruje mutaci genu pro hepatální nukleární faktor 1 β (HNF-1 β). Gen byl objeven na 17. chromozomu. Tento podtyp DM je vzácností, proto je stále předmětem studia (*Anděl, 2001*).

2.4 Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA)

Latentní autoimunitní diabetes u dospělých (LADA) se projevuje pomalou autoimunitní destrukcí pankreatických buněk a lze ho z počátku léčit bez využití inzulínu. Proto se při prvotní diagnóze jeví jako diabetes 2. typu, ačkoli je více podobný diabetu 1. typu. K přesné diagnóze slouží tři kritéria: dospělý věk pacienta, přítomnost autoprotilátek proti pankreatickým β buňkám a nezávislost na léčbě inzulínem po dobu šesti měsíců od stanovení diagnózy. Typická věková hranice pacientů se pohybuje od 25 do 40 let života (*Fourlanos, 2005*).

2.5 Diagnostika DM

Testy sloužící k diagnostice diabetu jsou jednoduché a široce dostupné, vyšetření probíhá bezbolestně. Přesto má až 25 % nově diagnostikovaných mikrovaskulární onemocnění, což značí, že onemocněním trpěli již 4–7 let předtím, než jim bylo diagnostikováno. Samotné testy se rozdělují do dvou skupin. První hodnotí hladinu glukózy v séru, druhou možností je screening glykovaných proteinů. První skupina zahrnuje testy na plazmatickou glukózu nalačno

(FPG), náhodnou plazmatickou glukózu (RPG) a orální glukózový toleranční test (OGTT). Pokud se zaměřujeme na testy glykovaných proteinů, nejčastěji se určuje glykovaný hemoglobin HbA1c.

Diagnostika diabetes mellitus se provádí při pozitivní rodinné anamnéze, zároveň pokud jsou zřejmé i vnější projevy. U DM 1. typu mluvíme o snížení tělesné hmotnosti, únavě, polyurii, polydipsii. Naopak při diabetu 2. typu evidujeme obezitu, arteriální hypertenzi až známky retinopatie. I zvýšená hladina glukózy nalačno (nad 5,6 mmol/l) je při těchto dvou příležitostech dostatečným kritériem pro diagnostiku, pokud se při vyšetření stanoví hladina plazmatické glukózy nalačno (FPG) vyšší než 7,0 mmol/l, či při orálním glukózovém testu (OGTT) s hodnotou plazmatické glukózy nad 11,1 mmol/l, dvě hodiny po perorálním podání vyšetřovacího roztoku (Cox, 2009).

2.5.1 FPG test

Tento test zaměřený na měření hladiny plazmatické glukózy nalačno je hojně využívaný díky snadnému provedení, nízkým nákladům a malým rizikům. Hladina glukózy je vyšetřena z krve po nejméně osmi–hodinovém lačnění. Zároveň je nezbytné zpracovat krev během dvou hodin, jinak glukóza v krvi klesá a neodráží reálný vzorek pacienta. V současné době je podezření na diabetes při hodnotě glukózy v plazmě vyšší než 126 mg/dl (7,0 mmol/l). Při této hodnotě má však test jen mírnou citlivost. V porovnání s OGTT FPG test rozpoznal jen 55 % diabetických pacientů, při 100% specifitě. Při snížení hladiny FPG na 110 mg/dl (6,1 mmol/l) se sice zvýšila citlivost na 85 %, ale snížila se specifita o 12 %.

FPG test se nedoporučuje ke stanovení prediabetu, jelikož vykazuje časté falešně negativní výsledky. I pokud vyjde FPG test pozitivní pro diabetes je nutná kontrola provedením OGTT či určení proteinu A1C (Cox, 2009).

2.5.2 RPG test

RPG test využívá příležitostné měření glukózy v plazmě. Jeho nepochybnou výhodou je, že jej lze provést kdykoli, jelikož nepožaduje speciální přípravu od pacienta. Nutné je však rychlé zpracování krve jako při testu FPG. Pro stanovení diagnózy musí být hladina glukózy větší než 200 mg/dl (11,1 mmol/l) spolu s vyskytujícími se charakteristickými symptomy. Hodnoty pro prediabetes jsou určeny mezi 140 a 199 mg/dl (7,8–11,0 mmol/l).

RPG test se doporučuje využívat především u symptomatických pacientů jako rychlý a kdykoli dostupný test. V ostatních případech test vykazuje poměrně nízkou citlivost (Cox, 2009).

2.5.3 OGTT

OGTT je nejčastěji využívaná metoda sloužící k diagnostice diabetu. Princip testu funguje na sledování složité reakce odpovědi organismu na podání glukózy a kontrole, zda organismus je po tomto zatížení schopen udržet glykémii.

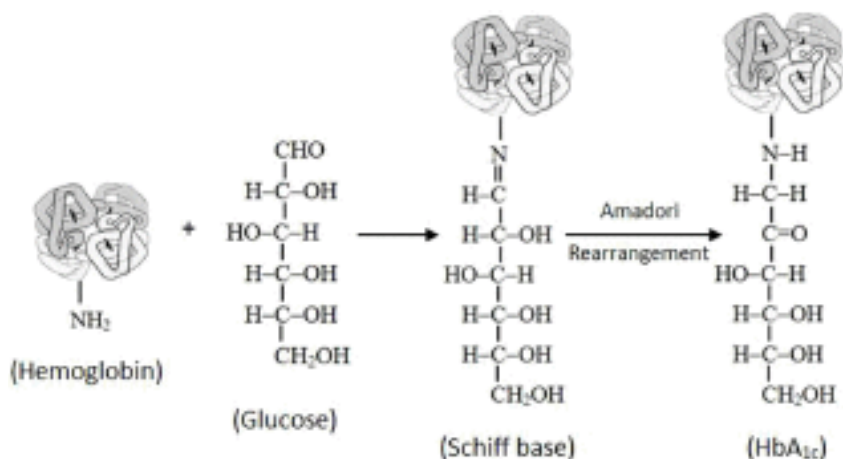
Provedení testu trvá přibližně dvě hodiny. Ráno nalačno se odebere pacientovi žilní krev, ve které se stanoví hladina glukózy. Ta by měla být nižší než 95 mg/dl (5,3 mmol/l). Posléze během pěti až deseti minut vypije pacient roztok, jež obsahuje 100 g glukózy a 250 ml vody. Další odběry žilní krve proběhnou po jedné a dvou hodinách od vypití roztoku. Opět se změří hladina glukózy v krvi. Po první hodině by hodnota neměla přesáhnout 180 mg/dl (10,0 mmol/l) a po druhé hodině 155 mg/dl (8,6 mmol/l). V průběhu testu je důležité, aby vyšetřovaný neměl fyzickou zátěž a vyvaroval se kouření. Pro pozitivní vyhodnocení testu je nutné, aby alespoň dvě hodnoty byly vyšší, než je dané kritérium.

Velkou nevýhodou tohoto testu je špatná reprodukovatelnost, zátěž pro pacienta, který z počátku lační minimálně osm hodin a následně vypije glukózový roztok. Nároky jsou kladeny i na ošetřující personál, jelikož test probíhá minimálně dvě hodiny. V potaz se nebere ani úprava dávky glukózy vzhledem k hmotnosti pacienta. Přesto je OGTT považována za zlatý standard pro diagnostiku diabetu. Hojně se využívá při stanovení gestačního diabetu (ADA, 2004).

2.5.4 HbA1c

Analýza HbA1c poskytuje důležité dlouhodobé údaje, jelikož odráží úhrnnou glykemickou historii za poslední dva až tři měsíce. Díky tomu se stanovení HbA1c používá především ke kontrole chronické hyperglykémie. Souvisí však i s výskytem rizik dlouhodobých komplikací diabetu.

HbA1c je produktem neenzymatické glykace hemoglobinu, který je součástí červených krvinek. Glykace probíhá navázáním glukózy na N-terminální konec β -řetězce, jenž tvoří Schiffovu bázi. Při následné přestavbě báze vznikají produkty amadori, nejznámějším z nichž je HbA1c.



Obrázek 4 Vznik glykovaného hemoglobinu HbA1c (Sherwani, 2016)

Při tvorbě glykovaného hemoglobinu v prvním kroku reaguje v reverzibilní reakci hemoglobin s krevní glukózou za vzniku aldiminu. Následně se aldimin nevratně přeměňuje na stabilní ketoamin. Normální hemoglobin dospělých se dělí do frakcí HbA, HbA₂ a HbF. Frakce HbA je zastoupena z 97 %. Z toho je asi 6 % tvořeno HbA₁, který se také dělí do frakcí HbA_{1a1}, HbA₂, HbA_{1b} a HbA_{1c}. Nejhojnější je frakce HbA_{1c}, jež tvoří asi 5 % z celkového HbA (Sherwani, 2016).

Samotný test je velmi nenáročný a lze ho provést kdykoli. Nevyžaduje žádnou přípravu od pacienta, k vyšetření stačí jen zkumavka krve. Další výhodou je vysoká předanalytická stabilita glykovaného hemoglobinu. Hodnoty HbA_{1c}, které ukazují pro diabetes jsou vyšší než 48 mmol/l (> 6,5 %). Ovšem bez jednoznačné hyperglykémie je nutné test pro potvrzení opakovat či využít jiného testu. Prediabetes značí hodnoty mezi 39 a 46 mmol/l (5,7–6,4 %) (Florkowski, 2013).

2.6 Alfa-1-antitrypsin

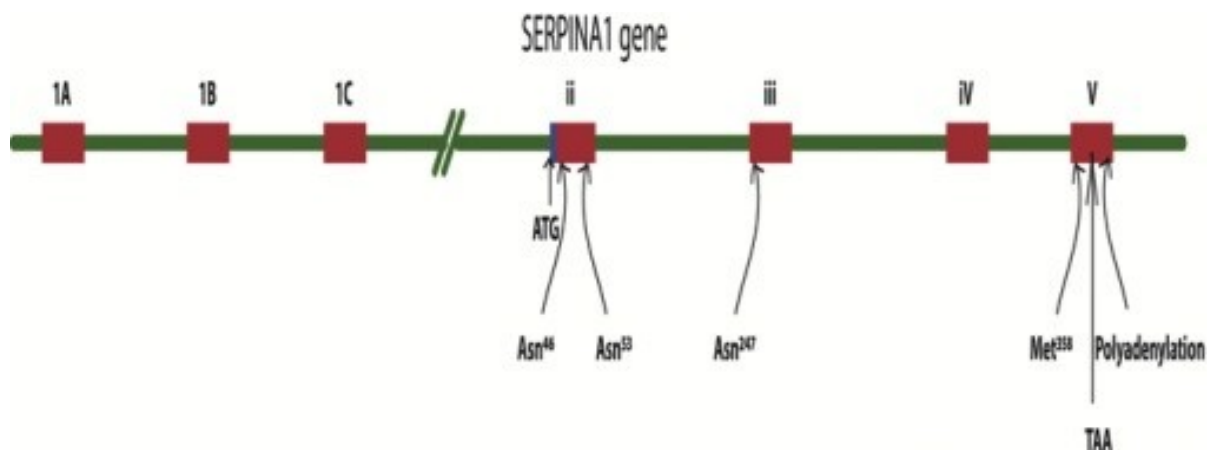
Alfa-1-antitrypsin (A1AT či AAT) patří do skupiny sekrečních glykoproteinů akutní fáze. Je to hlavní inhibitor serinových proteáz (SERPIN). Pomocí vytvoření komplexu s aktivním místem serinových proteáz blokuje jejich enzymatickou aktivitu. AAT je složen z jednoho polypeptidového řetězce o 394 aminokyselinových zbytcích spolu se sacharidovými postranními řetězci. Molekulová hmotnost zralého proteinu je 51 kDa. Přestože je většina plazmatického AAT tvořena buňkami jaterního parenchymu, díky své malé velikosti prostupuje do všech tělesných tekutin. Plazmatická hladina tohoto glykoproteinu je určena geneticky

alelami, které jsou popsány ve více fenotypech, z nichž některé souvisí se snížením hladiny AAT (Hashemi, 2007).

Primární funkcí AAT je inhibice proteáz SERPIN, především těch souvisejících s trypsinem. Dále inhibuje proteázy odvozené z degranulujících neutrofilů, počínaje neutrofilní elastázou (NE), proteinázou 3 a katepsinem G. Antiproteázová aktivita AAT byla popsána i u dalších serinových proteáz souvisejících s koagulací, trávicími enzymy a urokinázou. AAT funguje také i jako protein akutní fáze, díky jedinečným protizánětlivým účinkům. Jeho plazmatická hladina se zvyšuje troj až pětinasobně při zánětu či infekci, což odpovídá hodnotám 80–250 mg/dl. Naopak při jeho nedostatku je zvýšené riziko rozvoje plicního emfyzému vedoucí k chronické obstrukční plicní nemoci. Deficit alfa-1 antitrypsinu (AATD) vede také k chronickým jaterním onemocněním, hepatitidě, cirhóze a rakovině (Bergin, 2012).

2.6.1 Genetika AAT

Gen kódující AAT, přezdívaný SERPINA1 (SERine Proteinase INhibitor A1), je umístěn v lokusu PI (inhibitor proteinázy) na q raménku 14. chromozomu (14q31–32.3). Má 12,2 kb a je složený ze sedmi exonů, z nichž čtyři jsou kódující (II, III, IV, V) a tři nekódující (IA, IB, IC), a šesti intronů. Exon II obsahuje start kodon a signální peptid. Stop kodon a reaktivní centrální smyčku najdeme v exonu V. Exon II a III obsahuje sacharid navázaný na asparaginyly (Asn46, Asn83 a Asn247) (Hazari, 2017).

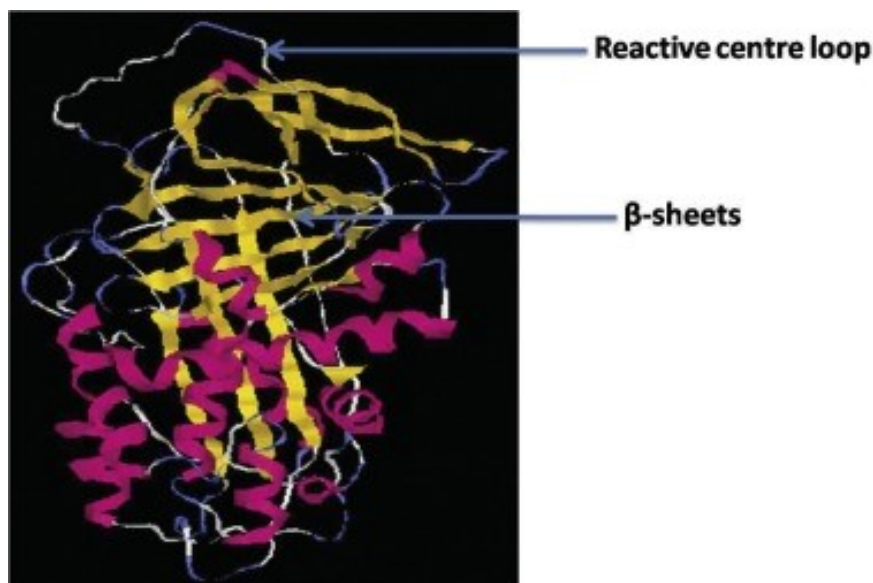


Obrázek 5 Genomická organizace genu SERPINA1 (Hazari, 2017)

Gen SERPINA1 je vysoce pleomorfní. Hladinu AAT v séru lze určit nefelometrií. Následně se jednotlivé varianty (fenotypizace) stanoví pomocí izoelektrické fokusace (IEF). Přestože že je IEF časově náročná metoda, představuje zlatý standard pro určení AATD. Rozdělení pomocí

IEF je založeno na rozdílné rychlosti migrace, která je dána proměnlivostí náboje, v důsledku změn AMK. IEF byly popsány čtyři formy alel F, M, S a Z. Nejčastěji se vyskytují alely PI*M, PI*S a PI*Z. Názvosloví je odvozeno od rychlosti migrace proteinu ve škrobovém gelu při elektroforéze; M se pohybuje střední rychlostí, S pomalu a nejpomaleji Z. Alela M je nejběžnější ve zdravé populaci a určuje normální plazmatickou hladinu AAT (>104 mg/dl). Označuje se jako divoký typ a projevuje se jak normální hladinou AAT v séru, tak i funkční aktivitou inhibovat NE. Alela PI*Z je nejčastější formou spojovanou s klinickým onemocněním. Forma Z je následkem tranzice, přechodu G (guaninu) na A (adenin), v exonu 5, což vede k náhradě kyseliny glutamové za lysin. Forma S je výsledkem transverze A na T (thymin) v exonu 3, což se projeví výměnou kyseliny glutamové za valin. Nejzávažnější klinický fenotyp způsobí homozygotní genotyp Z, jelikož až 85 % celkového proteinu PI*Z se hromadí v endoplazmatickém retikulu jaterních buněk (*Bartels, 2009*). K rozlišení těchto dvou nejčastějších deficitních alel se využívá real time PCR (*Veith, 2019*). Hlavní výhodou real time PCR je nižší časová náročnost než u IEF. Zároveň se tato metoda využívá k sceneingu heterozygotních přenašečů, které nelze detekovat pomocí snížené hladiny AAT (*Greulich, 2016*).

Primární molekula AAT je tvořena z 418 aminokyselin (AK, AMK), z nichž prvních 24 AMK, označených jako signální peptid, je při úpravě molekuly odstraněno. Výsledný zralý polypeptidový řetězec je tvořený 394 AMK, jenž je post-translačně upraven glykosylací připojením N-asparaginylu vázajícího postranní řetězec, který je tvořen N-acetylglukosaminem, galaktózou, manózou a kyselinou sialovou. Terciální struktura globulárního proteinu AAT je složena z devíti α helixů, tří β skládaných listů a reaktivní centrální smyčky (*Bartels, 2009*).



Obrázek 6 3D struktura AAT (Hazari, 2017)

Typickým znakem všech SERPINů je podobnost s cílovými proteázami. SERPINy se váží nevratným „jednorázovým“ či „sebevražedným“ inhibičním mechanismem. Důležitou oblastí je reaktivní středová smyčka (RCL), která díky aminokyselinové sekvenci rozpozná danou proteázu. Po navázání vznikne Michaelis komplex, který vede ke „stresové“ konformaci AAT. Tím je vyvoláno štěpení mezi Met³⁵⁸ (methionin) a Ser³⁵⁹ (serin), díky němuž je dokončeno připojení proteázy. Konečným krokem je zvýšení tepelné stability AAT konformační změnou. Tato změna zajistí vytvoření dalšího vlákna pomocí vložení RCL do středu β-listu A (Hazari, 2017).

2.6.2 Deficit AAT

Deficit AAT je dědičné onemocnění, které se vyznačuje snížením hladiny AAT v séru o 25-85 % oproti normální hladině u zdravých jedinců. Deficit AAT může být jak kvantitativní, tak kvalitativní. K identifikaci dysfunkční alely se využívá feno či genotypizace (Popławska, 2013). Nejčastější deficitní varianta je způsobená alelou Z. Varianta Z je následek bodové mutace, při níž dochází k substituci GAG za AAG. V důsledku špatného skládání proteinů se vytvoří narušená struktura. Dochází k rozšíření β-listu A, čímž se naruší vztah s RCL. Při navazování další molekuly přes β-list A na RCL vzniká řetězec smyčkových polymerů. Následnou agregací se tvoří inkluzní tělíska, jež jsou zadržována v hepatocytech. Hromadící se polymery AAT jsou pro buňky jater cytotoxické a způsobují různá onemocnění od novorozenecké žloutenky po cirhózu a karcinom u dospělých jedinců. Homozygot PI*ZZ

vylučuje pouze 10–15 % kvalitního AAT. Heterozygot PI*MZ oproti tomu vylučuje až 50 % normální hladiny AAT. Druhá varianta je dána alelou S. Mutace způsobí substituci GAA na GTA. Alela PI*S nezpůsobí velké strukturální změny v β -listu A, ale projeví se pomalejší tvorbou polymerů oproti alele PI*Z. Díky tomu nedochází k významnému hromadění polymerů v hepatocytech. Homozygot PI*SS má 52 % normální sérové hladiny AAT. Heterozygot PI*MS má až 75 % normální sérové hladiny AAT. Výrazný pokles normální sérové hladiny AAT nastává u heterozygota s kombinací PI*SZ a to na 32 % (Hazari, 2017).

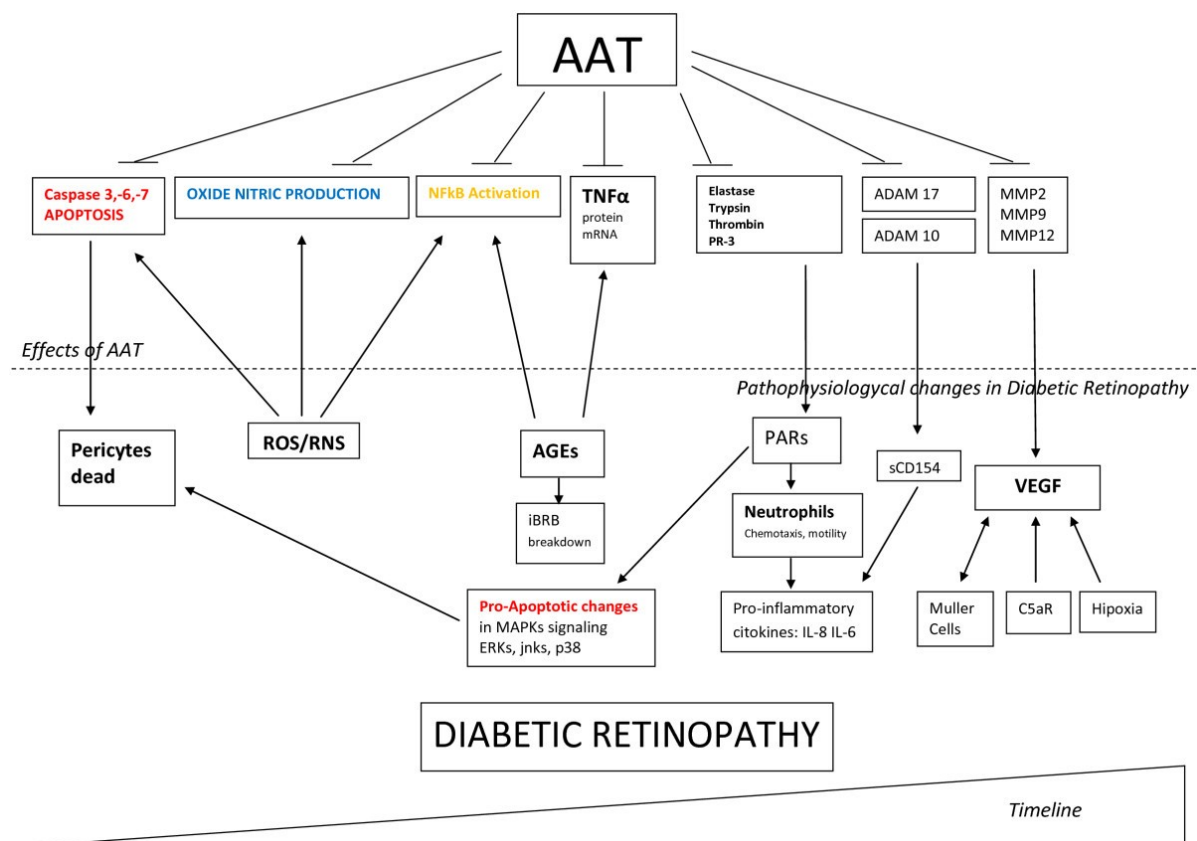
Nedostatek AAT je autozomálně-kodominantní genetická porucha, vyskytující se nejčastěji u bělochů evropského původu. AATD se projevuje jak nedostatkem cirkulujícího AAT v krevním oběhu, tak onemocněním jater či emfyzémem. Primární úlohou tohoto proteinu je ochrana buněk před silným enzymem NE, následně i proti jiným serinovým proteázám. Enzym NE je produkován bílými krvinkami a uplatňuje se v boji proti infekci. AAT dohlíží, aby nedošlo k poškození i zdravých buněk. Při deficitu AAT není NE kontrolována a její aktivita ničí drobné vzduchové vaky v plicích, což vede až k emfyzému. Onemocnění jater je způsobeno hromaděním abnormálního proteinu AAT (Hazari, 2017).

2.6.3 Vliv AAT na diabetes mellitus

Účinku AAT, jakožto silného protizánětlivého činidla, lze využít v terapii diabetes. Při rozvoji diabetu dochází postupně k destrukci β buněk pankreatu. Zároveň při snížené hladině AAT (<1,0 mg/ml) se zvyšuje riziko rozvoje DM 2. typu. Naopak zvýšená hladina AAT snižuje edém a infiltraci leukocytů do pankreatických buněk, také zabraňuje rozvoji hyperglykémie. Mechanismus, kterým jsou chráněny buňky pankreatu a jež zvyšuje sekreci inzulínu, funguje na zvýšení produkovaného inzulínu způsobem závislým na glukóze. AAT také zesílil účinky glukagonu a chrání buňky před apoptózou, jež je indukovaná TNF- α (tumor nekrotizující faktor) (Bergin, 2012).

Terapie pomocí AAT má velký potenciál při diabetické retinopatii (DR). DR patří mezi nejdůležitější příčiny slepoty u pracující populace. Postihuje až 34 % diabetických pacientů. Mechanismus onemocnění zahrnuje postupné zánětlivé a degenerativní změny buněk, což negativně ovlivňuje retinální mikrocirkulaci. To vede k hypoxii a následné angiogenezi. Nové cévy rostou v sítnici a ve sklivci, ovšem kvůli jejich křehkým stěnám je vyšší riziko krvácení. Posledním stádiem vedoucím ke slepotě je rozvoj vitreoretinální fibrózy, která podporuje odchlípení sítnice. Léčba DR využívá ochranných účinků AAT, díky jeho četným aktivitám a

protizánětlivým vlastnostem. AAT působí jako inhibitor prozánětlivých molekul, např. NF- κ B (nukleární transkripční faktor κ B) a TNF- α . Díky inhibici serinových proteáz, aktivující PAR (proteázou aktivované receptory), se snižují proangiogenní a zánětlivé procesy. Mezi další pozitivní efekty AAT patří schopnost inhibovat účinky MMP (matricová metaloproteináza). MMP spolu s hyperglykemií oslabuje stěny cév, jelikož narušuje tvorbu elastinu.



Obrázek 7 Pozitivní účinky AAT zpomalující progresi DR (Ortiz, 2014)

Díky všem těmto vlastnostem je AAT schopno oddálit progresi onemocnění DR. Při časně terapii AAT ho lze využít k prevenci či zpomalení rozvoje DR (Ortiz, 2014).

2.7 Thiopurin-S-methyltransferáza

Thiopurin methyltransferáza (TPMT) je cytoplazmatická transmethyláza, jejíž funkcí je přenos methylové skupiny S-adenosyl methioninu (SAM) na atom síry thiopurinů. TPMT se prezentuje na řadě tkání, především na játrech, ledvinách a střevech (Li, 2021). Tento

cytosolový enzym je důležitý při terapii imunosupresivy a chemoterapeutiky, jelikož metabolizuje thiopurinové léky S–methylací. Léky jako azathiopurin, 6–merkaptopurin a 6–thioguanin se využívají k léčbě autoimunitních onemocnění či u pacientů s transplantací. Thiopurinové léky působí cytotoxicky, imunosupresivně a myelosupresivně. TPMT metabolizuje tyto léky na neaktivní, netoxické látky. Díky tomu se vyznačuje ochrannými vlastnostmi před škodlivými vedlejšími efekty a toxickými účinky thiopurinových léků. Bezpečnost využití thiopurinových léčiv závisí na genetické variantě TPMT (Katara, 2016).

2.7.1 Genetika TPMT

Enzym TPMT se dědí autozomálně kodominantně a je kódován genem TPMT, který je umístěn na 6. chromozomu (6p22.3). Skládá se z 10 exonů a 9 intronů o celkové délce 34 kb. TPMT má několik geneticky kódovaných polymorfismů, jež mají vliv na metabolismus léčiv (Wang, 2010). Většina populace má vysokou aktivitu TPMT, jelikož zdělili divoký typ homozygotně, u 11 % populace je zaznamenána snížená aktivita TPMT v důsledku heterozygotnosti. Jen u 0,3 % populace lze pozorovat nízkou až žádnou enzymatickou aktivitu, jelikož obě zděděné alely jsou nefunkční. Nejběžnější variantní alela je TPMT*3A, kódována na exonech 7 a 10. Způsobuje až o 400krát nižší hladinu proteinu a nulovou aktivitu enzymu TPMT, je typická u bělošské populace. U obyvatelů Afriky a jihovýchodní Asie se objevuje typ TPMT*3C, jež je umístěn na exonu 10. Projevuje se také snížením hladiny proteinu, avšak jen 1,4násobně oproti normální koncentraci. Méně častou, ale nejdříve objevenou variantou alely je TPMT*2, jež je lokalizována na exonu 5. Tato mutace snižuje aktivitu enzymu 100násobně. Všechny tyto mutace jsou založeny na substituci aminokyselin a reprezentují více než 95 % dědičných deficitů (Li, 2021). K rozlišení těchto tří typických polymorfismů TPMT se využívá alelově specifická PCR (AS–PCR). Detekce specifických sekvencí DNA probíhá pomocí specifických primerů a restrikčních enzymů. AS–PCR je levná metoda vhodná především pro klinickou diagnostiku (Chowdhury, 2007).

2.7.2 Deficit TPMT

Deficit enzymu TPMT může být i život ohrožující stav, pokud je jedinec s tímto deficitem zároveň léčen thiopurinovými léky. Obecně se testování na nedostatek enzymu doporučuje před zahájením léčby, či při objevení prvních komplikací. U heterozygotů, kteří mají sníženou aktivitu TPMT, se doporučuje zahájit léčbu nižšími dávkami, než je standardní. Homozygotům, kteří mají nízkou až žádnou aktivitu enzymu, by se dávky léků měly drasticky snížit, ideálně je

nutné zvolit alternativní látky pro léčbu, pokud to stav pacienta dovoluje. Při špatně zvolené dávce léčiva jsou pacienti vystaveni riziku rozvoje závažných nežádoucích reakcí na léky (Katara, 2016). Může se rozvinout hematopoetická toxicita (Wang, 2010), neutropenie až život ohrožující suprese kostní dřeně (Groop, 2014).

2.7.3 Vliv TPMT na diabetes mellitus

TPMT je důležitý cytosolický methylační enzym. I přes rozsáhlé výzkumy je však jeho fyziologická funkce nejasná (Azami, 2014). Ani rozsáhlým studiem současných dostupných zdrojů se mi nepodařilo najít spojitost TPMT s diabetem mellitus.

3 Gilbertův syndrom

Gilbertův syndrom reprezentuje benigní autozomálně recesivní poruchu jater. Poprvé byl popsán Augustinem Gilbertem a Pierem Lereboulletem v roce 1901. Jedná se o nejčastější dědičný metabolický defekt jater, vyskytující se u 4–16 % populace (*Chandrasekar, 2022*). Projevuje se mírně zvýšenou hladinou nekonjugovaného bilirubinu, obvykle do 6 mg/dl. Mezi zevní projevy patří zežloutnutí kůže a očního bělma v důsledku ukládání nadbytku bilirubinu ve tkáních. Je zapříčiněn genetickou mutací genu pro bilirubin UDP–glukuronosyltransferázu (UGT1A1), což způsobí snížení aktivity enzymu UGT1A1 přibližně na 30 % a poškodí glukuronidaci, což vede k nekonjugované hyperbilirubinémii (*Aiso, 2017*). Gen UGT1A1, ovlivňující stejnojmenný enzym, je umístěn na chromozomu 2q37.1. U zdravých osob je v promotoru genu obsaženo šest thymin–adeninových repetitiv – A(TA)₆TAA. Naopak u jedinců s Gilbertovým syndromem dochází k elongaci či delecii TA sekvencí v promotorové oblasti nebo ke strukturálním změnám v kódující oblasti genu UGT1A1 (*Radlovic, 2014*). Enzym UGT1A1 pomáhá navázat nekonjugovaný bilirubin na kyselinu glukuronovou za vzniku konjugovaného bilirubinu. Konjugovaný bilirubin je rozpustný ve vodě, tudíž jde snadno vyloučit močí (*Chandrasekar, 2022*).

Za zmínku také stojí spojení diabetu mellitus s Gilbertovým syndromem. Gilbertův syndrom se častěji vyskytuje u pacientů s diabetem I. typu. Jelikož se při diabetu vyskytuje také nealkoholové ztučnění jater (NAFLD) a s ním sekundárně hyperbilirubinémie, může být diagnostika Gilbertova syndromu zanedbána (*King, 2019*).

3.1 Klinický obraz

Ačkoli je Gilbertův syndrom dědičné onemocnění, prezentuje se jako benigní porucha, která se projevuje mírným zvýšením hladiny nekonjugovaného bilirubinu. Klinické projevy obvykle nastávají během rané adolescence a až čtyřikrát častěji u mužů. Vyšší prevalence u mužů je nejspíše důsledkem vyšší koncentrace pohlavních steroidů a vyšší produkce bilirubinu (*Chandrasekar, 2022*). Dalším možným vysvětlením je také vyšší počet erytrocytů a množství svalové hmoty. Nynější studie nicméně ukazují, že se Gilbertův syndrom může prokázat už u novorozenců a mladších kojenců. Gilbertův syndrom se projevuje, pokud doprovází onemocnění, jako jsou např. vrozená hypertrofická stenóza pyroly, atřezie tenkého střeva a hypogalaktie (*Radlovic, 2014*).

Pacienti jsou obvykle asymptomaticí s výjimkou mírné žloutenky. Epizody žloutenky a nekonjugované hyperbilirubinémie mohou být vyvolané různými spouštěči, např. půstem, fyzickou námahou, menstruací, požitím alkoholu, horečnatými onemocněními a hemolytickými reakcemi. Hyperbilirubinémie může být vyvolána i při nízkém denním energetickém příjmu (400 kcal) či při normokalorické dietě bez suplementace lipidů (*Chandrasekar, 2022*).

Hladiny nekonjugovaného bilirubinu se v čase mění. Bilirubin se typicky pohybuje v rozmezí 30–90 $\mu\text{mol/l}$ (*Radlovic, 2014*). Mohou být však zaznamenány i normální hodnoty bilirubinu (do 5 $\mu\text{mol/l}$). Charakteristické jsou normální hladiny krevních testů mimo bilirubin, slezina ani játra nejsou zvětšeny, moč ani stolice nejsou atypicky zbarveny. Hemolýza se neprojevuje. Pacienti s Gilbertovým syndromem však mají zvýšené riziko vzniku žlučových kamenů. Také dochází ke snížení oxidace plazmy a ovlivnění metabolismu léčiv u kterých je potřebná glukuronidace (*Fretzayas, 2012*). Toxicky se projevuje lék irinotekan, aktivní metabolit SN – 38 způsobuje průjem a myelosupresi. Glukuronidaci vyžadují také léky acetaminofen, estradiol benzoát, rifampicin a tolbutamid. Gilbertův syndrom u dospělého jedince je komplikace pouze tehdy, když doprovází talasémii, sférocytózu, cystickou fibrózu či při požití irinotekanu (*Kuntz, 2009*).

Gilbertův syndrom nejspíše také ovlivňuje rozvoj žloutenky z mateřského mléka a žloutenky při kojení. Tento jev se projevuje od prvního či druhého týdne života a přirozeně mizí po čtyřech měsících života kojence (*Maruo, 2000*). Po nahrazení mateřského mléka umělou výživou se koncentrace bilirubinu přirozeně sníží. Naopak při opětovném nasazení mateřského mléka hladina bilirubinu opět vzroste. Mateřské mléko obsahuje 5 β -pregnan-3 α ,20 β -diol, jenž tlumí glukuronidační aktivitu bilirubinu. Pokud jsou kojenci s homozygotní mutací UGT1A1*6 krmeni mateřským mlékem, může se u nich projevit nekonjugovaná hyperbilirubinémie (*Maruo, 2014*).

3.2 Diagnostika

Jelikož Gilbertův syndrom není příliš časté onemocnění, obvykle trvá, než se definitivně stanoví tato diagnóza. Je mnoho onemocnění jater, proto je ze začátku důležité vyvrátit ostatní akutní a vážnější možnosti. Dříve se k průkazu Gilbertova syndromu využíval test zahrnující hladovění či snížení kalorického příjmu pod 400 kcal po dobu 24 hodin. To vedlo ke zvýšení nekonjugovaného bilirubinu v séru až dvojnásobně. Další možností bylo intravenózní podání kyseliny nikotinové, což vedlo k významnému nárůstu nekonjugovaného bilirubinu. Tyto testy

však nejsou specifické a zvýšení hladin bilirubinu může být způsobeno jinými onemocněními (*Keren, 2007*).

V současné době se využívá k diagnostice rifampicinový test. Perorálně pacient užije 600–900 mg rifampicinu. Hladina nekonjugovaného bilirubinu se zvýší během 2 až 4 hodin v důsledku snížené aktivity enzymu UDP–glukuronyltransferázy, která napomáhá ke vzniku konjugovaného bilirubinu tím, že katalyzuje navázání nekonjugovaného bilirubinu na kyselinu glukuronovou. Nejspolehlivější možností je diagnostika pomocí molekulárně genetických testů. Využívá se metoda PCR, která při sekvenaci DNA dokáže najít odchylky v genu UGT1A1. Nejčastější genotyp Gilbertova syndromu je homozygotní polymorfismus A(TA)₇TAA v promotoru UGT1A1 genu (*Fretzayas, 2012*).

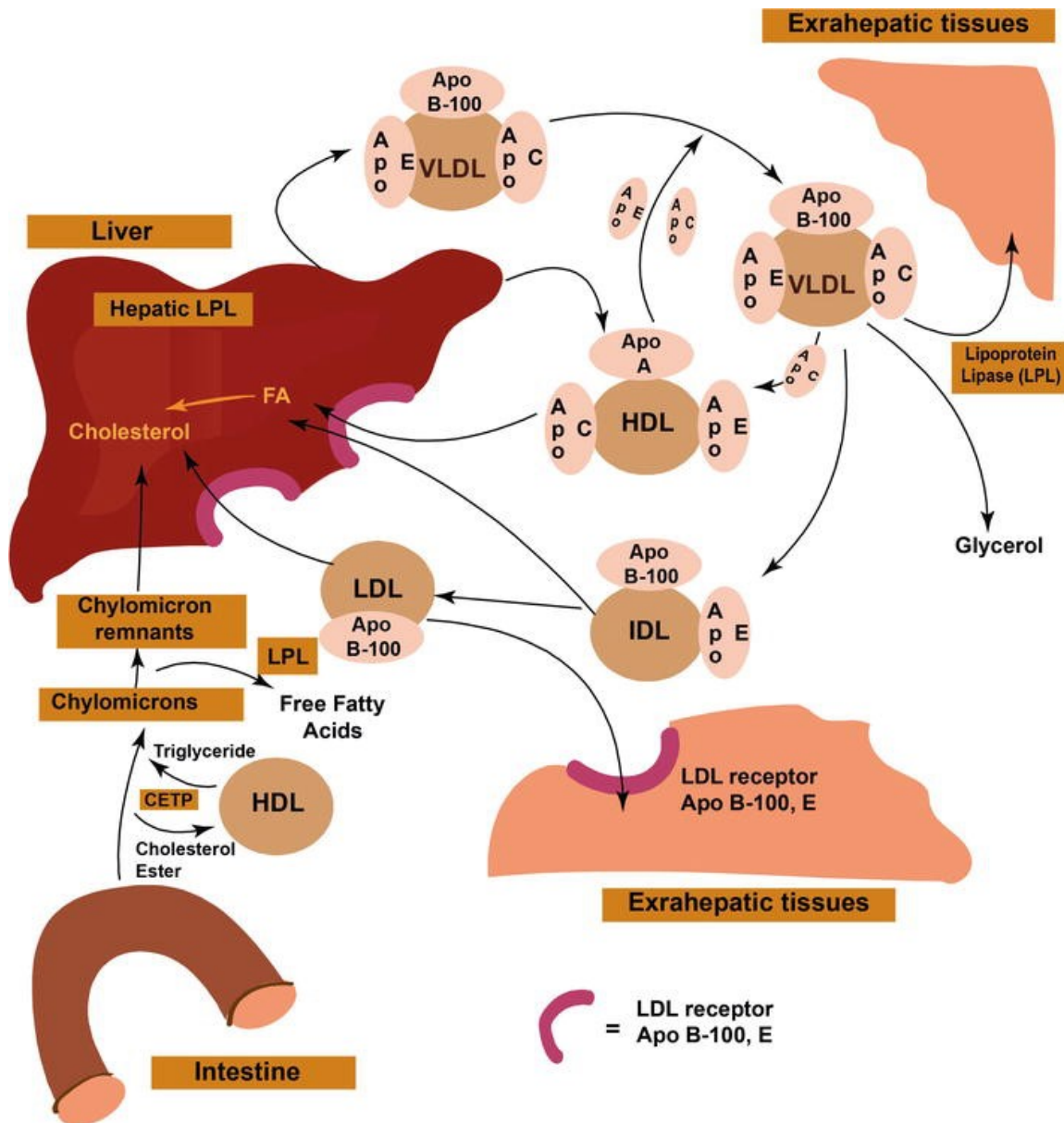
Gilbertův syndrom je benigní onemocnění s výbornou prognózou, které nevyžaduje léčbu. Obecně je doporučeno vyvarovat se potenciálním spouštěčům. Při těžkém výskytu subikteru lze podávat 50–150 mg fenobarbitonu na noc (*Radlovic, 2014*).

V současné době jsou pozorovány i určité „výhody“ Gilbertova syndromu. Bilirubin působí jako antioxidant, což má pozitivní vliv na nižší výskyt ischemické choroby srdeční. Studie také poukazují na snížení výskytu Hodgkinova lymfomu a celkově nižší mortalitu spojenou s rakovinou oproti běžné populaci (*Chandrasekar, 2022*).

3.3 Apolipoprotein B100

Apolipoprotein B100 (Apo B100) je glykoprotein, jenž se zásadně podílí na metabolismu lipoproteinů, především na odstraňování lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) z krve. Apo B100 je největší známý jednoduchý polypeptidový řetězec, složený z 4563 aminokyselinových zbytků a přibližně 5 % sacharidů (*Murray, 2002*). Jeho celková molekulová hmotnost dosahuje 515 kDa. Apo B100 je syntetizován v játrech na ribozomech drsného endoplazmatického retikula, k navázání na lipoproteiny dochází v hladkém endoplazmatickém retikulu. Primární funkcí lipoproteinů je distribuce cholesterolu. Apo B100 se nejprve váže na lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL). Po uvolnění VLDL z jater dochází v plazmě k postupné úpravě za vzniku LDL. Apo B100 se podílí na sestavení a udržení struktury lipoproteinu, tudíž každá jedna částice LDL má svůj Apo B100, jež tvoří 25 % z celkové hmotnosti molekuly (*Orekhov, 2014*). Poněvadž je apoprotein amfipatická částice, zůstává navázána po celou dobu metabolismu LDL, až nakonec zprostředkuje vazbu LDL na LDL receptor. LDL receptory jsou umístěné opět v játrech, kde dochází k rozkladu LDL. Při vyšší koncentraci LDL v krevním

řečišti dochází k navázání na receptory umístěné v arteriálních stěnách, kde se postupně hromadí (Kriško, 2007).



Obrázek 8 Transport a skladování lipidů (Zhyvotovska, 2019)

3.3.1 Genetika Apo B100

Gen pro Apo B100 je umístěn na druhém chromozomu (2p24.1). Celková délka genu je asi 43 kb, skládá se z 29 exonů a 28 intronů (Žák, 2011). Apo B100 má jakožto největší polypeptidový řetězec i několik specifík v genetické struktuře. Rozdělení intronů v genu je vysoce asymetrické. Díky tomu vznikly dva exony s neobvykle dlouhými otevřenými čtecími rámci (ORF). Exon 26, o celkové délce 7572 bp, má nejdelší známý ORF pro kterýkoli savčí

gen (*Blackhart, 1986*). Určení sekundární struktury Apo B100 není zcela jednoznačné. Sekundární struktura je ovlivňována změnou teploty, iontovou silou či složením lipidů (*Khattari, 2017*). Při využití infračervené spektroskopie měla být struktura složena z 24 % α -helixů, 23 % β -listů, 24 % β -řetězců, 6 % β -závitů a 24 % neuspořádaného složení. Naopak při využití cirkulárního dichroismu bylo popsáno 40 % α -helixů, 20 % β -listů a 40 % nahodilého svinutí (*Kriško, 2007*).

3.3.2 Deficit Apo B100

Deficit Apo B100 narušuje vazbu LDL na LDL receptor, což vede k hypercholesterolémii. Následkem je zvýšené riziko rozvoje předčasné aterosklerózy a ischemické choroby srdeční (ICHS). Familiární defektní Apo B100 se dědí autozomálně dominantně (*Robles-Osorio, 2003*). Byly popsány tři mutace zapříčínující plazmatickou akumulaci LDL. Všechny jsou lokalizované na exonu 26. Nejběžnější mutace se týká změny CGC na CAG pro AMK 3500, což se projeví substitucí argininu (Arg) na glutamin (Gln). Lipoproteiny s touto mutací mají až o 90 % sníženou afinitu k LDL receptoru. Tato mutace vede ke zvýšení cholesterolu v krevním řečišti, a proto převládá u jedinců s hypercholesterolémií. Druhá významná mutace se nachází v pozici 3531 a je zapříčiněná změnou Arg na cystein. Jedná se o mírnější mutaci, jelikož snižuje afinitu k LDL receptoru jen o 30 %. Statisticky převládá u pacientů s ICHS. Poslední mutace je umístěna v pozici 3500 a jedná se o záměnu Arg za tryptofan (*Ludwig, 1997*). K rozlišení těchto tří mutací Apo B100 se využívá PCR, jež dokáže rozlišit substituce jednotlivých nukleotidů (*Welty, 2001*).

Rozvoj hypercholesterolémie je zapříčiněn buď mutacemi na Apo B100, nebo mutacemi na LDL receptoru. Mutace lokalizované na LDL receptoru jsou mnohem častější a je jich popsáno více než 1 600 typů. Na Apo B100 se nachází mnohem méně mutací, jelikož většina z nich je lokalizována v oblasti p.3527 nazývané jako mutační „hotspot“. Mutace Apo B100 jsou nejčastěji popisovány u obyvatel střední Evropy a především Švýcarska. Náboženská skupina Amishů je považována za zakladatele mutace Arg3500Gln, jelikož až 12 % disponuje touto mutací a následnou hypercholesterolémií (*Andersen, 2016*).

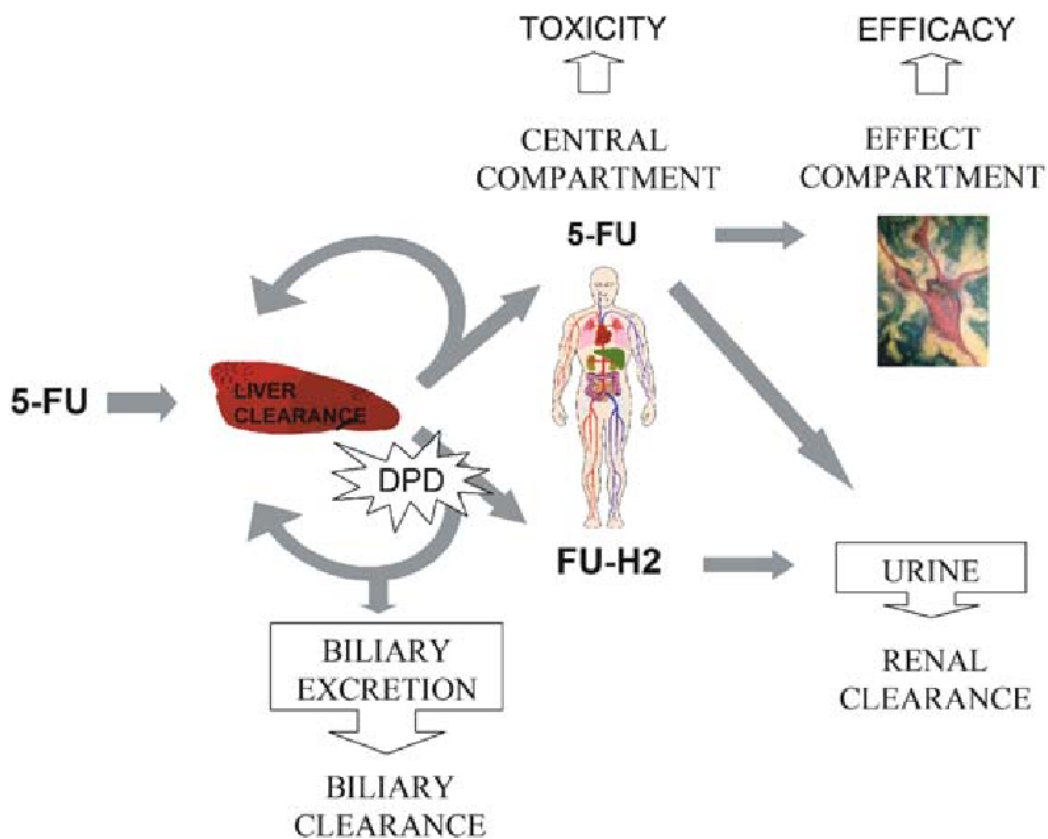
3.3.3 Vliv Gilbertova syndromu na Apo B100

Gilbertův syndrom se projevuje zvýšeným nekonjugovaným bilirubinem v plazmě. Bilirubin je významný antioxidant a působí pozitivně proti nadměrnému oxidačnímu stresu. Oxidační stres ve fyziologických hodnotách je nezbytný pro řízení životních procesů. Naopak při nadměrné

oxidační zátěži dochází k poškozování biomolekul (*Sies, 2017*). Pokud oxidační stres působí chronicky na LDL molekuly, mění jejich biologickou funkci a následkem toho zvyšuje riziko rozvoje aterosklerózy. Pokud jedinec trpí mutací Apo B100, zvyšuje se množství LDL molekul v plazmě, jelikož LDL molekuly mají sníženou schopnost se vázat na LDL receptory. Pokud jsou zároveň vystaveny oxidačnímu stresu, vznikají oxidované lipoproteiny, jež vyvolávají mnoho proaterogenních procesů, které vedou k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění (*Peluso, 2012*). V těle se přirozeně vyskytují antioxidanty, aby chránily buňky před negativním působením oxidačního stresu a volnými radikály. Ovšem jedinci s Gilbertovým syndromem mají díky vyšší hladině bilirubinu větší ochranu než normální jedinci. Nekonjugovaný bilirubin společně s α -tokoferolem přímo inhibuje oxidaci LDL molekul, čímž snižuje rozvoj aterosklerózy (*Wagner, 2021*). Bilirubin tak působí proti deficitnímu Apo B100. Jedinci s Gilbertovým syndromem mají nižší výskyt ICHS, případně se u nich vyskytuje v lehčí formě (*Vitek, 2002*).

3.4 Dihydropyrimidindehydogenáza

Dihydropyrimidindehydogenáza (DPD) je enzym pyrimidinových bází obsahující dusík. DPD se podílí na katabolismu přirozeně se vyskytujícího thyminu a uracilu jakožto počáteční a rychlost určující enzym (*Kuilenburg, 2016*). Díky tomu je znám také jako dihydrothymindehydogenáza či uracilreduktáza. Enzym DPD hraje důležitou roli při léčbě onkologických onemocnění, jelikož až z 80 % metabolizuje protinádorový lék 5-fluorouracil (5-FU) (*Sharma, 2019*). 5-FU má velký rozsah účinku, jelikož působí jako uracilový analog, čímž inhibuje syntézu DNA a RNA. Tento lék je aktivován mnoha enzymy uvnitř buňky a následně je degradován DPD. Uvádí se však, že pouze jen 1–3 % podaného léčiva je metabolizováno na cytotoxické metabolity a více než 80 % je pomocí DPD rychle degradováno. Enzym DPD působí v játrech, kde 5-FU přemění na 5-fluorodihydrouracil (FDHU). Následně je FDHU metabolizován na 5-fluoro- β -alanin, který je jakožto konečný metabolit vyloučen močí. Pokud se u pacienta vyskytuje snížená aktivita enzymu DPD, prodlužuje se tím poločas léčiva a zvyšuje se riziko závažné toxicity (*Amstutz, 2010*). Nežádoucí účinky postihují 10–20 % pacientů, mezi ty nejčastější patří průjem, mukozitida, hematologická toxicita a neurotoxicita. V některých případech může dojít k rozvoji těžké až život ohrožující toxicity 5-FU, což vede k přerušení či odložení chemoterapie a nižší míře vyléčení. Včasné stanovení snížené aktivity enzymu DPD může zvýšit terapeutický index (*Ciccolini, 2010*).



Obrázek 9 Metabolismus 5-FU (Ciccolini, 2009)

3.4.1 Genetika DPD

Enzym DPD je kódován genem DPYD, jenž je lokalizován na chromozomu 1 (1p22). DPYD je gen o celkové molekulové hmotnosti 843 kb, skládající se z 23 exonů a přibližně 43 kb zabírají introny. DPYD postihují časté mutace a polymorfismus, jež snižují aktivitu enzymu DPD a tím zvyšují toxicitu pro organismus při nedostatečném odbourávání 5-FU (Offer, 2014). Deficit DPD se dědí autozomálně recesivně. Uvádí se tři mutace, jež způsobují nejzávažnější deficit DPD a následnou toxicitu. První mutace označovaná jako rs 3918290 (DPYD*2A) je lokalizovaná v místě sestřihu intronu 14. Tato bodová mutace způsobí přeskočení exonu 14. DPYD*2A je nejčastější mutace, která zároveň způsobuje nejnižší aktivitu enzymu DPD. Druhá varianta rs 55886062 či také DPYD*13 je lokalizována na exonu 13 v kodonu 560. Vede k výměně isoleucinu za serin. V populaci se nevyskytuje často, avšak také způsobuje sníženou aktivitu enzymu DPD. Poslední významnou mutací je rs 67376798, jež se nachází na exonu 22 v kodonu 949. Projeví se záměnou kyseliny asparagové za valin. Tato mutace se nachází na místě AMK, jež je u savců velmi konzervativní. Tento výjimečný typ také vede ke snížení aktivity enzymu DPD, jelikož narušuje transport elektronů (Amstutz, 2011). K identifikaci

těchto mutací se využívá RT-PCR. RT-PCR dokáže rozlišit jednotlivé mutace, které způsobují sníženou aktivitu enzymu DPD (*Johnson, 200*).

3.4.2 Deficit DPD

Deficit DPD je reprezentován vrozenou vadou v metabolismu uracilu, thyminu a léku 5-FU, jež se většinou projevuje sníženou hladinou enzymu DPD. Deficit DPD má bohatou fenotypovou variabilitu. V některých případech se symptomy vůbec neprojeví, u jiných jedinců dochází k intelektuálnímu postižení až motorické retardaci a křečím. U pediatrických pacientů je deficit DPD spojen s thyminuracilurií, u onkologických pacientů léčených 5-FU se objevuje zvýšené riziko toxicity (*Wei, 1996*). Lék 5-FU se využívá při léčbě rakoviny prsu, plic, tlustého střeva, konečníku. V těle inhibuje syntézu DNA a RNA, zároveň zvyšuje srážení krve a působí proti leukocytům. Tím zvyšuje riziko rozvoje infekce. 5-FU se vyznačuje úzkým terapeutickým indexem. Mezi typické komplikace patří horečka, nauzea, průjem, zánět úst, kůže, nízký počet erytrocytů, ztráta vlasů. Až u 10–26 % pacientů se rozvine těžká, život ohrožující mukozitida, myelotoxicita nebo cerebelární toxicita. Ta je většinou způsobena deficitním enzymem DPD. Život ohrožující stavy se projeví u homozygotů s mutací DPYD*2A, poněvadž mají úplný deficit enzymu DPD. U heterozygotů stejné mutace je 50% aktivita enzymu (*Sharma, 2019*). Jelikož má 3–5 % populace částečný deficit DPD, doporučuje se před zahájením léčby provést genotypizaci enzymu DPD, zvláště na výše uvedené mutace (*Toffoli, 2015*).

3.4.3 Vliv DPD na Gilbertův syndrom

Gilbertův syndrom se projevuje zvýšeným množstvím nekonjugovaného bilirubinu v plazmě. Jedná se o benigní onemocnění, které však může mít vliv na farmakokinetické vlastnosti některých léků. Léky používané při onkologických onemocněních jsou citlivé na změny metabolismu jater. 5-FU je metabolizován v játrech pomocí enzymu DPD. Pokud dojde k nasycení enzymu DPD, lék využije glukuronidaci, která je ovšem u Gilbertova syndromu snižena (*Ha, 2017*). Některé zdroje doporučují extrémní opatrnost v užívání léku 5-FU, pokud je hodnota bilirubinu vyšší než 5mg/dl (*Aparo, 2012*). Literatura, která kombinuje Gilbertův syndrom, deficit DPD a léčbu pomocí 5-FU, však není v dostupných zdrojích.

Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo prozkoumat vliv enzymů alfa-1-antitrypsinu a thiopurin-S-methyltransferázy na diabetes mellitus a vliv apolipoproteinu B 100 a dihydropyrimidindehydrogenázy na Gilbertův syndrom.

V úvodní části jsem se věnovala polymerázové řetězové reakci, jež je založena na sekvenaci lidské DNA. V současné době se polymerázová řetězová reakce využívá k časně diagnostice geneticky dědičných chorob.

V následujících částech jsem již zaměřila na diabetes mellitus a Gilbertův syndrom a enzymy, které mají vliv na jejich průběh.

Enzym AAT funguje v těle jako protizánětlivé činidlo. Jelikož při onemocnění diabetes mellitus dochází k poškození β pankreatických buněk, lze využít protizánětlivých účinků AAT. Zvýšená hladina AAT pozitivně ovlivňuje glykémii v séru a chrání pankreatické buňky. Dalším přínosem při terapii pomocí AAT je zpomalení rozvoje diabetické retinopatie, jelikož enzym AAT působí proti negativním vlivům prozánětlivých molekul. Naopak při nedostatku enzymu AAT má jedinec vyšší riziko rozvoje DM 2. typu. Druhým zkoumaným enzymem v souvislosti s DM byl thiopurin-S-methyltransferáza. TPMT působí v těle jako methylační enzym. Jeho deficit může mít život ohrožující následky, pokud je člověk léčen thiopurinovými léky. Souvislost s diabetem se mi však pro nedostatek dostupných zdrojů nepodařilo prokázat.

Apo B100 je důležitý přenašeč lipoproteinů o nízké hustotě. Při jeho nedostatku se zvyšuje rozvoj aterosklerózy. Naopak zvýšený bilirubin u Gilbertova syndromu působí jako antioxidant. Díky tomu bilirubin dokáže vyrovnat negativní vliv, pokud je Apo B100 deficitní. Enzym DPD se podílí na katabolismu pyrimidinových bází. Jeho nedostatek může mít vážné fenotypové projevy. Deficit DPD také negativně ovlivňuje léčbu rakoviny pomocí 5-FU. Spojení s Gilbertovým syndromem a deficitním enzymem DPD se mi však nepodařilo prokázat, jelikož kombinace těchto onemocnění je velmi vzácná.

Zdroje

AISO, Mitsuhiro, Minami YAGI, Atsushi TANAKA, et al. Gilbert Syndrome with Concomitant Hereditary Spherocytosis Presenting with Moderate Unconjugated Hyperbilirubinemia. *Internal Medicine* [online]. 2017, **56**(6), s. 661–664 [cit. 2022-05-06]. ISSN 0918-2918. Dostupné z: doi:10.2169/internalmedicine.56.7362

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* [online]. 2004, **27**(suppl_1), s. 5–10 [cit. 2022-05-05]. ISSN 0149-5992. Dostupné z: doi:10.2337/diacare.27.2007.S5

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* [online]. 2014, **37**(Supplement_1), s. 81–90 [cit. 2022-05-12]. ISSN 0149-5992. Dostupné z: doi:10.2337/dc14-S081

AMSTUTZ, Ursula, Tanja K FROEHLICH a Carlo R LARGIADÈR. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. *Pharmacogenomics* [online]. 2011, **12**(9), s. 1321–1336 [cit. 2022-06-10]. ISSN 1462-2416. Dostupné z: doi:10.2217/pgs.11.72

ANDĚL, Michal. *Diabetes mellitus a další poruchy metabolismu*. Praha: Galén, c2001. ISBN 80-7262-047-9. [04.07.2022, s. 3, 17, 38–40, 66, 67]

ANDERSEN, Lars H., André R. MISEREZ, Zahid AHMAD a Rolf L. ANDERSEN. Familial defective apolipoprotein B-100: A review. *Journal of Clinical Lipidology* [online]. 2016, **10**(6), s. 1297–1302 [cit. 2022-06-09]. ISSN 1933–2874. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jacl.2016.09.009

APARO, Santiago a Sanjay GOEL. Evolvement of the treatment paradigm for metastatic colon cancer. From chemotherapy to targeted therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [online]. 2012, **83**(1), s. 47-58 [cit. 2022-06-11]. ISSN 1040–8428. Dostupné z: doi: 10.1016/j.critrevonc.2011.08.006

ARIKAWA, Emi, Yanyang SUN, Jie WANG, Qiong ZHOU, Baitang NING, Stacey L DIAL, Lei GUO a Jingping YANG. Cross-platform comparison of SYBR® Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC Genomics* [online].

2008, **9**(1) [cit. 2022-04-27]. ISSN 1471–2164. Dostupné z: doi: 10.1186/1471-2164-9-328

AZIMI, F; JAFARIYAN, M; KHATAMI, S. *Assessment of Thiopurine–based drugs according to Thiopurine S-methyltransferase genotype in patients with Acute Lymphoblastic Leukemia* [online]. 2014 [cit. 06.07.2022]. Dostupný na WWW: ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3980020

BANSAL, Nidhi. Prediabetes diagnosis and treatment: A review. *World Journal of Diabetes* [online]. 2015, **6**(2) [cit. 2022-05-12]. ISSN 1948-9358. Dostupné z: doi: 10.4239/wjd.v6.i2.296

BARTELS, Claudine L.; MARCHETTI, Angela L.; HIGHSMITH, W. Edward, TSONGALIS, Gregory J. *Real time PCR detection of the PI*Z and PI*S mutations associated with alpha-1 antitrypsin deficiency* [online]. 2009 [cit. 05.29.2022]. ISSN PMC2780033. Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2780033/>

BARTLETT, John M. S. a David STIRLING. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. BARTLETT, John M.S. a David STIRLING. *PCR Protocols* [online]. New Jersey: Humana Press, 2003, s. 3–6 [cit. 04.20.2022]. ISBN 1-59259-384-4. Dostupné z: doi: 10.1385/1-59259-384-4:3

BĚLOBRÁDKOVÁ, Jana a Ludmila BRÁZDOVÁ. *Diabetes mellitus*. V Brně: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2006. [cit. 04.07.2022, s. 14–15]. ISBN 80-7013-446-1.

BERGIN, David A., Killian HURLEY, Noel G. MCELVANEY a Emer P. REEVES. Alpha-1 Antitrypsin: A Potent Anti-Inflammatory and Potential Novel Therapeutic Agent. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* [online]. 2012, **60**(2), 81-97 [cit. 05.29.2022]. ISSN 0004 –069X. Dostupné z: doi: 10.1007/s00005-012-0162-5

BHAGAVAN, N.V. a Chung-Eun HA. DNA Replication, Repair, and Mutagenesis. *Essentials of Medical Biochemistry* [online]. Elsevier, 2015, s. 401–417 [cit. 04-28-2022]. ISBN 9780124166875. Dostupné z: doi: 10.1016/B978-0-12-416687-5.00022-1

BLACKHART, B D, E M LUDWIG, V R PIEROTTI, et al. Structure of the human apolipoprotein B gene. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1986, **261**(33), s. 15364–

15367 [cit. 06-09-2022]. ISSN 0021–9258. Dostupné z: doi: 10.1016/S0021-9258(18)66718-3

BUTLER, John M. *Fundamentals of forencis DNA typing*. Maryland, USA: National Institute of Standards and Technology, 2010, s. 138–140 [cit. 04-29-2022] ISBN 978–0–12–374999–4

CICCOLINI, Joseph, Cédric MERCIER a Gérard MILANO. Dihydropyrimidine Dehydrogenase (Dpyd) Gene Polymorphism: Portrait of a Serial Killer. INNOCENTI, Federico, ed. *Genomics and Pharmacogenomics in Anticancer Drug Development and Clinical Response* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2009, 2008, s. 249–265 [cit. 06-11-2022]. ISBN 978-1-58829-646-7. Dostupné z: doi: 10.1007/978-1-60327-088-5_14

CICCOLINI, Joseph, Eva GROSS, Laetitia DAHAN, Bruno LACARELLE a Cédric MERCIER. Routine Dihydropyrimidine Dehydrogenase Testing for Anticipating 5-Fluorouracil–Related Severe Toxicities: Hype or Hope?. *Clinical Colorectal Cancer* [online]. 2010, **9**(4), s. 224–228 [cit. 06-10-2022]. ISSN 1533–0028. Dostupné z: doi: 10.3816/CCC.2010.n.033

CLARK, David P., Nanette J. PAZDERNIK a Michelle R. MCGEHEE. Polymerase Chain Reaction. *Molecular Biology* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 168–198 [cit. 04-27-2022]. ISBN 9780128132883. Dostupné z: doi: 10.1016/B978-0-12-813288-3.00006-9

CLINE, J. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* [online]. **24**(18), s. 3546–3551 [cit. 04-23-2022]. ISSN 1362–4962. Dostupné z: doi: 10.1093/nar/24.18.3546

COX, Mary E. a David EDELMAN. Tests for Screening and Diagnosis of Type 2 Diabetes. *Clinical Diabetes* [online]. 2009, **27**(4), s. 132-138 [cit. 05-13-2022]. ISSN 0891-8929. Dostupné z: doi: 10.2337/diaclin.27.4.132

DEBNATH, M.; PRADAS, G.b.k.s.; BISEN, P.s. *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*. New York: Springer, 2010, s. 139 [cit. 04-28-2022]. ISBN 978–90–481–3260–7

ENGSTROM-MELNYK, Julia, Pedro L. RODRIGUEZ, Olivier PERAUD a Raymond C. HEIN. Clinical Applications of Quantitative Real-Time PCR in Virology. *Current and Emerging Technologies for the Diagnosis of Microbial Infections* [online]. Elsevier, 2015,

2015, s. 161–197 [cit. 05-19-2022]. *Methods in Microbiology*. ISBN 9780128032978. Dostupné z: doi: 10.1016/bs.mim.2015.04.005

FLORKOWSKI, Chris. *HbA1c as a Diagnostic Test for Diabetes Mellitus – Reviewing the Evidence* [online]. 2013 [cit. 05-18-2022]. Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3799221/>

FOURLANOS, S., F. DOTTA, C. J. GREENBAUM, J. P. PALMER, O. ROLANDSSON, P. G. COLMAN a L. C. HARRISON. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) should be less latent. *Diabetologia* [online]. 2005, **48**(11), s. 2206–2212 [cit. 06-12-2022]. ISSN 0012-186X. Dostupné z: doi: 10.1007/s00125-005-1960-7

FRETZAYAS, Andrew, Maria MOUSTAKI, Olga LIAPI a Themistocles KARPATIOS. Eponym. *European Journal of Pediatrics* [online]. 2012, **171**(1), s. 11–15 [cit. 05-07-2022]. ISSN 0340-6199. Dostupné z: doi: 10.1007/s00431-011-1641-0

FUJIOKA, Ken. Pathophysiology of Type 2 Diabetes and the Role of Incretin Hormones and Beta-Cell Dysfunction. *Journal of the American Academy of Physician Assistants* [online]. 2007, **20**(12), s. 3-8 [cit. 05-13-2022]. ISSN 1547-1896. Dostupné z: doi: 10.1097/01720610-200712000-00001

GREULICH, Timm a Claus F. VOGELMEIER. Alpha-1-antitrypsin deficiency: increasing awareness and improving diagnosis. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* [online]. 2016, **10**(1), s. 72-84 [cit. 2022-07-06]. ISSN 1753-4666. Dostupné z: doi: 10.1177/1753465815602162

GROOP, Leif, Petter STORM a Anders ROSENGREN. Can genetics improve precision of therapy in diabetes?. *Trends in Endocrinology & Metabolism* [online]. 2014, **25**(9), s. 440–443 [cit. 06-07-2022]. ISSN 1043–2760. Dostupné z: doi: 10.1016/j.tem.2014.06.005

HA, Vincent H., Jennifer JUPP a Roger Y. TSANG. Oncology Drug Dosing in Gilbert Syndrome Associated with UGT1A1: A Summary of the Literature. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* [online]. 2017, **37**(8), s. 956–972 [cit. 06-11-2022]. ISSN 0277–0008. Dostupné z: doi: 10.1002/phar.1946

HASHEMI, Mohammad, Mohammad NADERI, Homaira RASHIDI a Saeid GHAVAMI. Impaired activity of serum alpha–1–antitrypsin in diabetes mellitus. *Diabetes Research and*

Clinical Practice [online]. 2007, **75**(2), s. 246–248 [cit. 05-29-2022]. ISSN 0168–8227. Dostupné z: doi: 10.1016/j.diabres.2006.06.020

HAZARI, Younis Mohammad, Arif BASHIR, Mudasir HABIB, et al. Alpha–1–antitrypsin deficiency: Genetic variations, clinical manifestations and therapeutic interventions. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. 2017, **773**, s. 14–25 [cit. 05-29-2022]. ISSN 1383–5742. Dostupné z: doi: 10.1016/j.mrrev.2017.03.001

CHANDRASEKAR Thoguluva V, Faust TW, Syndrom Johna S. Gilberta. [Aktualizováno 14. února 2022]. In: StatPearls [internet]. Ostrov pokladů (FL): StatPearls Publishing; leden 2022. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470200/>

CHOWDHURY, Jeeshan, Govind V. KAGIALA, Sudeep PUSHPAKOM, et al. Microfluidic Platform for Single Nucleotide Polymorphism Genotyping of the Thiopurine S-Methyltransferase Gene to Evaluate Risk for Adverse Drug Events. *The Journal of Molecular Diagnostics* [online]. 2007, **9**(4), s. 521-529 [cit. 2022-07-06]. ISSN 15251578. Dostupné z: doi: 10.2353/jmoldx.2007.070014

INNIS, Michael A., David H. GELFAND a John J. SNINSKY. *PCR strategies*. San Diego: Academic Press, 1995, s. 44–45 [cit. 23.04.2022]. ISBN 0-12-372183-0.

JAJALI, M.; ZABOROWSKA, J.; JAJALI, M. *Basic science methods for clinical researchers*. United Kingdom: Elsevier, 2017, ISBN 10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1 s. 8–9 [cit. 04-28-2022]

JOHNSON, Martin R., Kangsheng WANG, Jeffrey B. SMITH, Martin J. HESLIN a Robert B. DIASIO. Quantitation of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Expression by Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* [online]. 2000, **278**(2), s. 175-184 [cit. 2022-07-06]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi: 10.1006/abio.1999.4461

KATARA, Pramod a Himani KUNTAL. TPMT Polymorphism: When Shield Becomes Weakness. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* [online]. 2016, **8**(2), s. 150–155 [cit. 06-04-2022]. ISSN 1913-2751. Dostupné z: doi: 10.1007/s12539-015-0111-1

KEREN G, MAZALIS A. Gilbert syndrome presenting in a young boy, confirmed by the rifampin test. *Isr Med Assoc J*. 2007, **9**(8), s. 626–627

KHATTARI, Ziad. A correlation between secondary structure and rheological properties of low-density lipoproteins at air/water interfaces. *Journal of Biological Physics* [online]. 2017, **43**(3), s. 381–395 [cit. 06-09-2022]. ISSN 0092-0606. Dostupné z: doi: 10.1007/s10867-017-9458-3

KING, D a MJ ARMSTRONG. Overview of Gilbert's syndrome. *Drug and Therapeutics Bulletin* [online]. 2019, **57**(2), s. 27–31 [cit. 05-08-2022]. ISSN 0012-6543. Dostupné z: doi: 10.1136/dtb.2018.000028

KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Ilustroval Jürgen WIRTH, přeložil Vladimír BENDA, přeložil Martin VEJRAŽKA. Praha: Grada Publishing, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0, s. 260–262 [cit. 05.27.2022].

KRIŠKO, Anita a Catherine ETCHEBEST. Theoretical model of human apolipoprotein B100 tertiary structure. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* [online]. 2007, **66**(2), 342-358 [cit. 2022-06-08]. ISSN 08873585. Dostupné z: doi:10.1002/prot.21229

KUILENBURG, André B.P. van, Judith MEIJER, Michael W.T. TANCK, et al. Phenotypic and clinical implications of variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease* [online]. 2016, **1862**(4), s. 754–762 [cit. 06-10-2022]. ISSN 09254439. Dostupné z: doi: 10.1016/j.bbadis.2016.01.009

KUNTZ, Erwin; KUNTZ, Hans Dieter. *Hepatology textbook and atlas*. Germany: Springer Science & Business Media, 2009, s. 229–230. ISBN 978-3-540-76838-8.

LI, Jiaojiao, Chunxiao SUN, Wenwen CAI, Jing LI, Barry P. ROSEN a Jian CHEN. Insights into S-adenosyl-l-methionine (SAM)-dependent methyltransferase related diseases and genetic polymorphisms. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. 2021, **788** [cit. 06-04-2022]. ISSN 1383–5742. Dostupné z: doi: 10.1016/j.mrrev.2021.108396

LORENZ, Todd C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (63) [cit. 04-20-2022]. ISSN 1940–087X. Dostupné z: doi: 10.3791/3998

- LUDWIG, E H, P N HOPKINS, A ALLEN, et al. Association of genetic variations in apolipoprotein B with hypercholesterolemia, coronary artery disease, and receptor binding of low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research* [online]. 1997, **38**(7), s. 1361–1373 [cit. 06-09-2022]. ISSN 0022–2275. Dostupné z: doi: 10.1016/S0022-2275(20)37419-8
- MACKAY, I. M. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* [online]. **30**(6), s. 1292–1305 [cit. 04-27-2022]. ISSN 1362–4962. Dostupné z: doi: 10.1093/nar/30.6.1292
- MAHEASWARI, Rajendran, Jaishree Tukaram KSHIRSAGAR a Nallasivam LAVANYA. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *Journal of Indian Society of Periodontology* [online]. 2016 [cit. 04-20-2022]. ISSN 0972–124X. Dostupné z: doi: 10.4103/0972–124X.176391
- MARINTCHEVA, Boriana. Viral Tools for In Vitro Manipulations of Nucleic Acids. *Harnessing the Power of Viruses* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 27–67 [cit. 05-19-2022]. ISBN 9780128105146. Dostupné z: doi: 10.1016/B978-0-12-810514-6.00002-7
- MARKOULATOS, P., N. SIAFAKAS a M. MONCANY. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. 2002, **16**(1), s. 47–51 [cit. 04-29-2022]. ISSN 0887-8013. Dostupné z: doi:10.1002/jcla.2058
- MARMIROLI, Nelson a Elena MAESTRI. Polymerase chain reaction (PCR). *Food Toxicants Analysis* [online]. Elsevier, 2007, 2007, s. 147–187 [cit. 05-19-2022]. ISBN 9780444528438. Dostupné z: doi: 10.1016/B978-044452843-8/50007-9
- MARUO, Yoshihiro, Kashiro NISHIZAWA, Hiroshi SATO, Hiroko SAWA a Morimi SHIMADA. Prolonged Unconjugated Hyperbilirubinemia Associated With Breast Milk and Mutations of the Bilirubin Uridine Diphosphate – Glucuronosyltransferase Gene. *Pediatrics* [online]. 2000, **106**(5), e59–e59 [cit. 05-07-2022]. ISSN 1098-4275. Dostupné z: doi: 10.1542/peds.106.5.e59
- MARUO, Yoshihiro, Yoriko MORIOKA, Hiroshi FUJITO, et al. Bilirubin Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferase Variation Is a Genetic Basis of Breast Milk Jaundice. *The Journal of Pediatrics* [online]. 2014, **165**(1), s. 36–41 [cit. 05-07-2022]. ISSN 0022–3476. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jpeds.2014.01.060

MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H & H 3. Jinočany: H & H, 2002. Lange medical book, s. 264–286 [cit. 08.06.2022]. ISBN 80-7319-013-3.

OFFER, Steven M., Croix C. FOSSUM, Natalie J. WEGNER, Alexander J. STUFLESSER, Gabriel L. BUTTERFIELD a Robert B. DIASIO. Comparative Functional Analysis of DPYD Variants of Potential Clinical Relevance to Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity. *Cancer Research* [online]. 2014, **74**(9), s. 2545–2554 [cit. 06-11-2022]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2482

OLOKOBA, Abdulfatai B., Olusegun A. OBATERU a Lateefat B. OLOKOBA. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Medical Journal* [online]. 2012, **27**(4), s. 269–273 [cit. 05-13-2022]. ISSN 1999768X. Dostupné z: doi: 10.5001/omj.2012.68

OREKHOV, Alexander, Yuri BOBRY SHEV, Igor SOBENIN, Alexandra MELNICHENKO a Dimitry CHISTI AKOV. Modified Low Density Lipoprotein and Lipoprotein-Containing Circulating Immune Complexes as Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Atherosclerosis and Type 1 Diabetes Macrovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, **15**(7), s. 12807–12841 [cit. 06-09-2022]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi: 10.3390/ijms150712807

ORTIZ, Gustavo, Juan P SALICA, Eduardo H CHULUYAN a Juan E GALLO. Diabetic retinopathy: could the alpha-1 antitrypsin be a therapeutic option?. *Biological Research* [online]. 2014, **47**(1) [cit. 06-04-2022]. ISSN 0717-6287. Dostupné z: doi: 10.1186/0717-6287-47-58

PARK, Daniel J., ed. *PCR Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. Methods in Molecular Biology, s. 3–15 [cit. 05-27-2022]. ISBN 978-1-60761-943-7. Dostupné z: doi: 10.1007/978-1-60761-944-4

PATEL, Parita; MACEROLLO, Allison. *Diabetes Mellitus: Diagnosis and Screening* [online]. 2010 [cit. 05-12-2022]. Dostupný na: <https://www.aafp.org/afp/2010/0401/p863.html>

PELUSO, Iliaria, Giuseppa MORABITO, Lourdes URBAN, Francesca IOANNONE a Mauro SERAFI. Oxidative Stress in Atherosclerosis Development: The Central Role of LDL and Oxidative Burst. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug*

Targets [online]. 2012, **12**(4), s. 351–360 [cit. 06-09-2022]. ISSN 1871–5303. Dostupné z: doi: 10.2174/187153012803832602

PERSON, M. C.; MØLLER, S. G. *PCR*. United States of America: BIOS Scientific Publishers, 2000, s. 71 [cit. 04-22-2022] ISBN 1–85996–017–0.

PICÓ, Yolanda. *Food toxicants analysis: techniques, strategies and developments*. Amsterdam: Elsevier, 2007, s. 149–151 [cit. 04-28-2022] ISBN 978–0–444–52843–8.

PIPPITT, Karly; LI, Marlana. *Diabetes Mellitus: Screening and Diagnosis* [online]. 2016 [cit. 05-13-2022]. Dostupné z:

<https://www.aafp.org/afp/2016/0115/p103.html#afp20160115p103-c1>

POPLAWSKA, Beata; JANCIAUSKIENE, Sabina; CHOROSTOWSKA-WYNIMKO, Joanna. *Genetické varianty alfa-1 antitrypsinu: klasifikace a klinické důsledky* [online]. 2013 [cit. 05-30-2022]. Dostupné z:

https://journals.viamedica.pl/advances_in_respiratory_medicine/article/view/27530

RADLOVIC, Nedeljko. Hereditary hyperbilirubinemias. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo* [online]. 2014, **142**(3–4), s. 257–260 [cit. 05-06-2022]. ISSN 0370-8179. Dostupné z: doi: 10.2298/SARH1404257R

ROBLES-OSORIO, Ludivina, Ma.Luisa ORDOÑEZ, Carlos A AGUILAR-SALINAS, Moisés AURÓN-GÓMEZ, Ma.Teresa TUSIÉ-LUNA, Francisco J GÓMEZ-PÉREZ a Juan A RULL-RODRIGO. Familial Hypercholesterolemia Due to Ligand-Defective Apolipoprotein B100. *Archives of Medical Research* [online]. 2003, **34**(1), s. 70–75 [cit. 06-09-2022]. ISSN 0188–4409. Dostupné z: doi: 10.1016/S0188-4409(02)00452-6

RODEN, Michael. Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation und Diagnose. *Wiener klinische Wochenschrift* [online]. 2016, **128**(S2), s. 37–40 [cit. 04-07-2022]. ISSN 0043-5325. Dostupné z: doi: 10.1007/s00508-015-0931-3

SHARMA, Vinay, Sonu Kumar GUPTA a Malkhey VERMA. Dihydropyrimidine dehydrogenase in the metabolism of the anticancer drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2019, **84**(6), s. 1157–1166 [cit. 06-10-2022]. ISSN 0344-5704. Dostupné z: doi:10.1007/s00280-019-03936-w

SHERWANI, Shariq I., Haseeb A. KHAN, Aishah EKHZAIMY, Afshan MASOOD a Meena K. SAKHARKAR. Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. *Biomarker Insights* [online]. 2016, **11** [cit. 05-18-2022]. ISSN 1177-2719. Dostupné z: doi: 10.4137/BMI.S38440

SIES, Helmut, Carsten BERNDT a Dean P. JONES. Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2017, **86**(1), s. 715–748 [cit. 06-09-2022]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037

TOFFOLI, Giuseppe, Luciana GIODINI, Angela BUONADONNA, et al. Clinical validity of a DPYD – based pharmacogenetic test to predict severe toxicity to fluoropyrimidines. *International Journal of Cancer* [online]. 2015, **137**(12), s. 2971–2980 [cit. 06-11-2022]. ISSN 0020–7136. Dostupné z: doi: 10.1002/ijc.29654

VALONES, Marcela Agne Alves, Rafael Lima GUIMARÃES, Lucas André Cavalcanti BRANDÃO, Paulo Roberto Eleutério de SOUZA, Alessandra de Albuquerque Tavares CARVALHO a Sergio CROVELA. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2009, **40**(1), s. 1–11 [cit. 04-27-2022]. ISSN 1517-8382. Dostupné z: doi: 10.1590/S1517-83822009000100001

VEITH, Martina, Andreas KLEMMER, Iker ANTON, et al. Diagnosing Alpha-1 – Antitrypsin Deficiency Using A PCR/Luminescence-Based Technology; *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* [online]. 2019, **14**, s. 2535–2542 [cit. 06-04-2022]. ISSN 1178-2005. Dostupné z: doi: 10.2147/COPD.S224221

VÍTEK, Libor, Milan JIRSA, Marie BRODANOVÁ, Milan KALÁB, Zdeněk MAREČEK, Vilém DANZIG, Ladislav NOVOTNÝ a Petr KOTAL. Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis* [online]. 2002, **160**(2), s. 449–456 [cit. 06-09-2022]. ISSN 0021–9150. Dostupné z: doi: 10.1016/S0021-9150(01)00601-3

WAGNER, Karl-Heinz, Nazlisadat SEYED KHOEI, Claudia HANA, Daniel DOBERER, Rodrig MARCULESCU, Andrew BULMER, Marlies HÖRMANN-WALLNER a Christine MÖLZER. Oxidative Stress and Related Biomarkers in Gilbert's Syndrome: A

Secondary Analysis of Two Case-Control Studies. *Antioxidants* [online]. 2021, **10**(9) [cit. 06-09-202]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi: 10.3390/antiox10091474

WANG, Liewei, Linda PELLEYMOUNTER, Richard WEINSHILBOUM, Julie A. JOHNSON, Joan M. HEBERT, Russ B. ALTMAN a Teri E. KLEIN. Very important pharmacogene summary: thiopurine S-methyltransferase. *Pharmacogenetics and Genomics* [online]. 2010, **20**(6), s. 401–405 [cit. 06-05-2022]. ISSN 1744-6872. Dostupné z: doi: 10.1097/FPC.0b013e3283352860

WEI, X, H L MCLEOD, J MCMURROUGH, F J GONZALEZ a P FERNANDEZ-SALGUERO. Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1996, **98**(3), s. 610–615 [cit. 06-11-2022]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi: 10.1172/JCI118830

WELTY, Francine K., Kristin A. GUIDA a Jennifer J. ANDERSEN. Donor Splice-Site Mutation (210+1G_C) in the ApoB Gene Causes a Very Low Level of ApoB-100 and LDL Cholesterol. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2001, **21**(11), 1864-1865 [cit. 2022-07-06]. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi: 10.1161/atvb.21.11.1864

YUCE, Meral, Hasan KURT, Venkata R. S. S. MOKKAPATI a Hikmet BUDAK. Employment of nanomaterials in polymerase chain reaction: insight into the impacts and putative operating mechanisms of nano-additives in PCR. *RSC Adv* [online]. 2014, **4**(69), s. 36800–36814 [cit. 04-27-2022]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi: 10.1039/C4RA06144F

ZHYVOTOVSKA, Angelina, Denis YUSUPOV a Samy I. MCFARLANE. Introductory Chapter: Overview of Lipoprotein Metabolism. I. MCFARLANE, Samy, ed. *Dyslipidemia* [online]. IntechOpen, 2019, [cit. 06-09-2022]. ISBN 978-1-83968-003-8. Dostupné z: doi: 10.5772/intechopen.85094

ZIPPER, H. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* [online]. 2004, **32**(12), e103-e103 [cit. 2022-04-27]. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi: 10.1093/nar/gnh101

ŽÁK, Aleš a kol. *Ateroskleróza*. Praha, Česká republika: Grada Publishing a.s., 2011, s. 39–47. ISBN 9788024775623.