UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra antropologie a genetiky člověka

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka

Bc. Gabriela Vacínová

Diabetes mellitus 2. typu a Alzheimerova demence: studium společných patogenetických faktorů

Study of Common Pathogenetic Factors of Alzheimer Disease and Type 2 Diabetes Mellitus.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: RNDr. Markéta Vaňková, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze ……. Podpis……

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce RNDr. Markétě Vaňkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost v průběhu celého zpracování práce. Dále bych chtěla poděkovat všem členům Oddělení molekulární endokrinologie na Endokrinologickém ústavu v Praze za ochotu a čas strávený při zaškolování v laboratoři. Velký dík patří také mé rodině a přátelům za podporu a optimismus, který mi dodávali nejen při vzniku této práce, ale i během celého studia.

Abstrakt

Alzheimerova demence (AD) a diabetes mellitus 2. typu (DM2) jsou onemocnění spojená s vyšším věkem, která mají ve všech industrializovaných zemích stoupající prevalenci. AD je neurodegenerativní onemocnění charakterizované progresivní ztrátou kognitivních funkcí. Jedná se o komplexní onemocnění, na jehož vzniku se podílejí jak faktory genetické, tak faktory vnějšího prostředí. Nejvýznamnějším markerem spojovaným s touto nemocí je riziková alela ε4 v genu pro *APOE*. Z posledních celogenomových asociačních studií vzešlo dalších 10 kandidátních genů, mezi kterými se jako nejvýraznější jeví minoritní alela G polymorfismu rs744373 v genu *BIN1*. AD je spjatá s mnoha metabolickými a imunitními poruchami. Mezi zájmové markery se řadí i nový parametr visfatin, který může působit jako prozánětlivý cytokin. DM2 je chronické onemocnění charakterizované zvýšenou hladinou krevní glukózy, které je zároveň charakterizované neurologickými poruchami. U obou těchto onemocnění se vyskytuje velké množství metabolických poruch. Mezi nejvýznamnější poruchu patří inzulínová rezistence.

Diplomová práce má 2 části – biochemickou a genetickou. Biochemická část práce sleduje hladinu visfatinu u pacientů s AD a zdravých kontrol a sleduje, zda visfatin souvisí s AD. V této části práce bylo vyšetřeno celkem 103 osob (39 pacientů s AD a 64 odpovídajících zdravých kontrol). Vyšetření zahrnovalo klinicko-biochemická vyšetření glukózového a lipidového metabolismu, antropometrické vyšetření ke zjištění základních antropometrických rozměrů a z nich vypočítaných indexů. Biochemické vyšetření pro zjištění hladiny visfatinu bylo provedeno z krevní plazmy v rámci multiplexové analýzy. Výsledky ukázaly zvýšenou hladinu visfatinu u pacientů s AD oproti zdravým kontrolám. Vyšší hladina visfatinu jako prozánětlivého cytokinu pravděpodobně může odrážet chronický zánět popisovaný u AD. Vliv glukózové tolerance na hladinu visfatinu nebyl prokázán.

Genetická část práce sleduje vliv rizikové alely ε4 v genu pro *APOE* a minoritní alely G polymorfismu rs744373 v genu *BIN1* na antropometrické parametry a klinicko-biochemická vyšetření glukózového a lipidového metabolismu. V této části práce bylo vyšetřeno celkem 1386 osob (417 pacientů s DM2, 335 žen s gestačním diabetem a 634 nediabetických jedinců). Vyšetření sledovaného souboru zahrnovala základní antropometrické měření, klinicko-biochemická vyšetření glukózového a lipidového metabolismu včetně glukózového tolerančního testu u nediabetických jedinců a genetickou analýzu zaměřenou na kandidátní geny pro AD (*APOE, BIN1*). Jako materiál pro genetickou analýzu byla použita DNA

izolovaná z periferní krve. Frekvence rizikové alely ε4 v genu pro *APOE* a minoritní alely G polymorfismu rs744373 v genu *BIN1* se mezi jednotlivými skupinami významně neliší. Byl potvrzen vliv rizikové alely ε4 v genu pro *APOE* na lipidový metabolismus. Nositelé této alely měli vyšší hladiny celkového a LDL-cholesterolu. U minoritní alely G polymorfismu rs744373 nebyla souvislost se zkoumanými parametry prokázána.

Diplomová práce přispěla k poznání genetického a biochemického pozadí AD a DM2. V genetické části potvrdila již dříve uváděný vliv rizikové alely ε4 na lipidový metabolismus, v biochemické části odhalila nový rizikový faktor – visfatin – jako pravděpodobného ukazatele chronického zánětu mozku.

Klíčová slova: Alzheimerova demence, diabetes mellitus 2. typu, inzulínová rezistence, visfatin, riziková alela ε4, polymorfismus genu *BIN1*

Abstract

Alzheimer´s disease (AD) and type 2 diabetes mellitus (T2DM) are aging-associated diseases that have rising prevalence in all industrialized countries. AD is a neurodegenerative disease characterized by progressive loss of cognitive functions. It is a complex disease which formation involves both genetic factors and environmental factors. The most important marker associated with this disease is the risk allele ε4 in *APOE* gene. From the latest genome-wide association study emerged another ten candidate genes. As the most significant from those genes appears the minority G allele of rs744373 polymorphism in the gene *BIN1*. AD is connected with many metabolic and immune disorders. To the markers of interest belongs also the new parameter visfatin which can act as a pro-inflammatory cytokine. T2DM is a chronic disease characterized by raised levels of blood glucose, which is also characterized by neurological disorders. In the case of both of these diseases can be found a large number of metabolic disorders. One of the most important disorders is insulin resistance.

This thesis consists of two parts - the biochemical and genetic one. The biochemical part of the thesis studies the visfatin level in patients with AD and healthly control and studies whether visfatin is related to AD. In this part of the thesis has been examined 103 persons in total (39 patients with AD and 64 appropriate healthy controls). The examination included examinations of glucose and lipid metabolism, anthropometric examination to finding the basic anthropometric dimensions and indices calculated from them. Biochemical examination to finding the level of visfatin was performed from blood plasma within the multiplex analysis. Results showed increased levels of visfatin in patients with AD compared with healthy controls. The higher level of visfatin as a pro-inflammatory cytokine can probably reflect the chronic inflammation described in AD. The influence of blood glucose tolerance on the level of visfatin has not been proved.

The genetic part of the thesis studies the influence of the risk ε4 allele in *APOE* gene and minority allele G of polymorphism in the gene *BIN1* on the anthropometric parameters and clinical biochemistry examination of glucose and lipid metabolism. In this part of the thesis were examined 1386 persons in total (417 patients with T2DM, 335 women with gestational diabetes and 634 nondiabetic subjects). Examinations of the studied complex included basic anthropometric measurements, clinical biochemistry examinations of the glucose and lipid metabolism including glucose tolerance test in non-diabetic individuals and genetic analysis focused on candidate genes for AD (*APOE, BIN1*). As a material for genetic analysis has

been used DNA isolated from peripheral blood. The frequency of the risk allele ε4 in gene for *APOE* and minor allele G of polymorphism rs744373 in gene *BIN1* is not significantly different between particular groups. There was confirmed the influence of the risk allele ε4 in gene for *APOE* on lipid metabolism. The holders of this allele had higher level of the overall and LDL-cholesterol. The correlation was not proved in the minor allele G of polymorphism rs744373.

This thesis has contributed to the understanding of the genetic and biochemical background of AD and T2DM. In the genetic part the previously presented influence of the risk ε4 allele on lipid metabolism has confirmed, in the biochemical part a new risk factor – visfatin – was revealed as a likely indicator of chronic inflammation of the brain.

Keywords: Alzheimer's disease, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, visfatin, risk ε4 allele, a polymorphism of the gene *BIN1*

Obsah

1. Úvod 10
2. Cíle práce 12
3. Literární přehled 13
   1.1 Alzheimerova demence 13
      1.1.1 Epidemiologie AD 15
      1.1.2 Diagnostika a symptomy AD 16
      1.1.3 Negenetické rizikové faktory AD 16
      1.1.4 Genetické rizikové faktory AD 18
      1.1.5 Nový biochemický marker – visfatin 21
   1.2 Diabetes mellitus 22
      1.2.1 Epidemiologie DM2 24
      1.2.2 Rizikové faktory diabetu 25
      1.2.3 Diagnostika a symptomy DM2 27
   1.3 Inzulínová rezistence 28
      1.3.1 Epidemiologie inzulínové rezistence 28
      1.3.2 Inzulín, DM2 a AD 29
      1.3.3 Vliv inzulínové rezistence na AD 30
4. Materiál 31
5. Metodika 33
   1.4 Antropometrické měření 33
   1.5 Biochemická vyšetření 34
   1.6 Molekulárně-genetické metody 35
      1.6.1 Detekce alel ε2, ε3 a ε4 v genu pro APOE 36
      1.6.2 Detekce polymorfismu rs744373 v genu *BIN1* 40
   1.7 Statistická analýza 42
      1.7.1 Základní analýza dat 42
      1.7.2 Grafické diagnostiky 43
      1.7.3 Analýza rozptylu (ANOVA) 44
      1.7.4 Frekvenční analýza 44
6. Výsledky 46
   6.1 Biochemická část 46

1.7.5 Základní analýza dat bez transformace 46
1.7.6 Grafické diagnostiky dat bez transformace 47
1.7.7 Základní analýza transformovaných dat 51
1.7.8 Grafické diagnostiky transformovaných dat 52
1.7.9 Neparametrická jednofaktorová analýza rozptylu 56
1.7.10 Vícefaktorová analýza rozptylu 57
1.8 Genetická část 59
1.8.1 Gen pro APOE 59
1.8.2 Gen pro BIN1 61
7. Diskuze 63
8. Závěr 66
9. Literatura 67
10. Internetové zdroje 78
11. Seznam zkratek 79
12. Přílohy 81

1. Úvod

Alzheimerova demence (AD) a diabetes mellitus 2. typu (DM2) jsou onemocnění spojená s vyšším věkem, která mají v evropských a obecně ve všech industrializovaných zemích stále stoupající prevalenci. Bez včasné léčby je provází horší průběh onemocnění a závažnější komplikace.

Alzheimerova demence patří mezi nejčastější příčiny demencí. Postihuje především populaci starší 65 let. Je to onemocnění, které představuje utrpení nejen pro samotného pacienta, ale také pro příbuzné a pečující osoby. Spolu se stoupající prevalencí rostou i náklady na léčbu a sociální služby spojené s průběhem onemocnění.

V České republice bylo v roce 2009 zaznamenáno 123 194 případů AD (www.alzheimer.cz, 12. 3. 2014), v celé Evropě pak bylo zaznamenáno již 7,3 milionů případů (www.alzheimer.cz, 12. 3. 2014).

Diabetes mellitus 2. typu je dalším z častých onemocnění vyššího věku a je charakterizováno vysokou hladinou krevní glukózy, inzulínovou rezistencí a tzv. relativním nedostatkem inzulínu. Neléčený nebo pozdě léčený DM2 vede k celé řadě metabolických komplikací, které invalidizují pacienta a zhoršují kvalitu jeho života. Prevalence DM2 také neustále roste. V České republice bylo v roce 2010 zaznamenáno přes 800 tisíc osob trpících diabetem a naprostá většina z nich byli diabetici 2. typu (www.diabetickaasociace.cz, 20. 2. 2014). DM2 není ale pouze problémem české populace, celosvětově se vyskytuje u 8,3 % populace a je odhadováno, že u dalších 4 % populace nebylo onemocnění ještě diagnostikováno (www.idf.org, 20. 2. 2014).

Asociaci AD a DM2 je v poslední době věnována velká pozornost. Jedním z pojítek obou onemocnění je inzulínová rezistence. Zatímco u DM2 jde o rezistenci periferních tkání k účinku inzulínu, u AD jde o inzulínovou rezistenci samotné nervové tkáně. Pro řadu společných patogenetických rysů bývá někdy AD nazývána „diabetem mozku“ nebo „diabetem 3. typu“ (Stárka, 2009).

Identifikace společných patogenetických faktorů by mohla pomoci k časnější diagnóze, cílenější léčbě, případně ke zmírnění následků onemocnění a vyšší kvalitě života pacientů.

Diplomová práce je rozdělena na dvě části – biochemickou a genetickou. Biochemická část se zabývá novým biochemickým markerem visfatinem a jeho případnou asociací s AD. Plazmatický visfatin je prozánětlivý cytokin, který zvyšuje riziko poškození endoteliálních

buněk díky zánětu a oxidativnímu stresu, nicméně jeho úloha v rozvoji AD není dosud jednoznačně popsána.

Genetická část práce se zabývá možným vlivem rizikových alel kandidátních genů pro AD na inzulínovou rezistenci. Práce byla zaměřená na rizikovou alelu ε4 genu pro apolipoprotein E (*APOE*) a na minoritní alelu G polymorfismu rs744373 v genu pro bridging integrator-1 (*BIN1*). Gen pro *APOE* je doposud nejvýznamnějším genetickým markerem spojovaným s AD, gen pro bridging integrator-1 je marker vycházející z nejnovějších celogenomových asociačních studií. *BIN1* je po *APOE* považován za druhý nejvýznamnější genetický marker pro AD (Karch et al., 2012).

2. Cíle práce

Biochemická část

Visfatin byl původně popsán jako adipokin, tzn. jako látka aktivně se účastnící energetického metabolismu. Adipokiny jsou látky, které mohou procházet přes hematoencefalickou bariéru a jsou aktivní především v hypotalamu. Ovlivňují pocit sytosti a hladu a odpovídají za nutriční stav organismu včetně příjmu a výdeje energie. Adipokiny také ovlivňují inzulínovou senzitivitu.

V současnosti je však plazmatický visfatin považován spíše za prozánětlivý cytokin. Změny v jeho hladinách pravděpodobně odpovídají za ztrátu neuronů, dysfunkci vaskulárního endotelu v mozku a za zánět zprostředkovaný mikrogliemi.

Lze předpokládat, že funkce visfatinu, ať jako adipokinu nebo cytokinu, má svou roli v rozvoji AD a jeho hladiny budou u pacientů s AD odlišné od zdravých kontrol.

Cíle biochemické části práce jsou následující:

1. Zjistit hladinu visfatinu u pacientů s AD a u zdravých seniorských kontrol.
2. Zjistit, zda se hladina visfatinu liší v závislosti na pohlaví a stupni glukózové tolerance.

Genetická část

Genetická pozadí AD, DM2 i samotné inzulínové rezistence mají polygenní charakter, navíc je pravděpodobné, že se mohou vzájemně prolínat. Genetické pozadí AD ani DM2 ani samotné inzulínové rezistence není dosud zcela známé, a proto jsou stále hledány nové genetické varianty, které by tuto mozaiku doplnily. Pokud je inzulínová rezistence jedním ze společných znaků AD a DM2, pak lze předpokládat, že by rizikové alely v kandidátních genech pro AD mohly mít vliv i na inzulínovou rezistenci.

Cíle genetické části práce jsou následující:

1. Zjistit frekvenci polymorfismů rizikových alel kandidátních genů pro AD (*APOE, BIN1*) u souborů s rizikem inzulínové rezistence (soubor pacientů s DM2 a soubor žen s gestačním diabetem).
2. Zjistit frekvenci polymorfismů rizikových alel kandidátních genů pro AD (*APOE, BIN1*) u nediabetické populace.
3. Zjistit, zda rizikové alely kandidátních genů pro AD (*APOE, BIN1*) asociují s inzulínovou rezistencí a porušenou glukózovou tolerancí.

3. Literární přehled

1.1 Alzheimerova demence

Alzheimerova demence (AD) je heterogenní multifaktoriální onemocnění, na jehož patologii se podílejí faktory genetické i faktory vnějšího prostředí. Jedná se o komplexní neurodegenerativní onemocnění charakterizované patologickým ukládáním β-amyloidních peptidů a neurofibrilárních klubek v mozku. Toto onemocnění je nejčastějším typem demence, které může být s určitostí potvrzeno až po smrti pacienta.

Onemocnění zvané Alzheimerova demence bylo poprvé popsáno roku 1907 německým neuropatologem Aloisem Alzheimerem. Ten popsal výskyt „zvláštních nedobytných tlustých buněk“, které se vyskytují mezi běžnými mozkovými buňkami – tzv. neurofibrilární klubka. Dále popsal formování plaku v superiorní vrstvě mozkové kůry. Ačkoliv byly tyto patologie popsány již dříve, Alois Alzheimer je považován za objevitele klinicko-patologických změn, které doprovázejí průběh onemocnění spojených s demencí (Ramirez-Bermudez, 2012).

Hlavní složku senilních plaků tvoří β-amyloidní peptidy, které jsou patologickým potvrzením přítomnosti AD. Tyto senilní plaky se nejprve objevují v kortikálních oblastech, odkud se s postupem nemoci rozšiřují do ostatních částí mozku (Pimplikar, 2009).

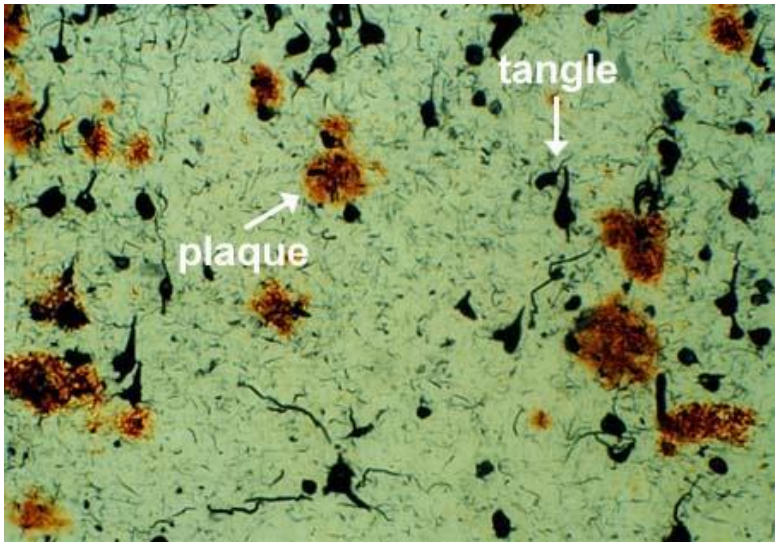
β-amyloidový peptid je složený z 39–42 aminokyselinových řetězců. Forma složená ze 42 aminokyselinových řetězců mnohem více agreguje, bývá spojena s patogenezí AD a tvoří základ pro tzv. amyloidovou hypotézu (Sorrentino et al., 2014). β-amyloid vzniká z β-amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který je za normálních okolností štěpen na krátké rozpustné fragmenty, které mají v CNS svoji vlastní neuroprotektivní roli. U AD je tento prekurzorový protein štěpen na delší fragmenty, které koagulují a polymerují za tvorby β-amyloidu. V okolí vzniklého proteinu dochází k odumírání neuronů a k projevům sterilního zánětu (Hardy and Selkoe, 2002).

Amyloidní hypotéza předpokládá dva možné způsoby hydrolýzy APP – amyloidogenní a non-amyloidogenní způsob. Amyloidogenní hydrolýza je iniciována enzymem β-sekretázou. Tu lze identifikovat pomocí aspartyl proteáz, které štěpí extracelulární oblast APP. Non-amyloidogenní hydrolýza je iniciována enzymem α-sekretázou. Ta štěpí APP pomocí domény β-amyloidu a brání tak vzniku tohoto prekurzorového proteinu (Sorrentino et al., 2014).

Patogenní role β-amyloidu v AD byla již několikrát prokázána. Mutace v *APP* nebo v genech pro preseniliny (*PSEN1, PSEN2*) vedou k nadměrné expresi β-amyloidu a jsou spojeny s familiární formou AD. β-amyloidový peptid má různé cytotoxické účinky: ovlivňuje mitochondriální redoxní aktivitu, která zvyšuje produkci volných radikálů, poškozuje intracelulární vápníkovou homeostázu, indukuje tvorbu selektivních vápníkových kanálů, zvyšuje účinky jiných toxických látek atd. (Sorrentino et al., 2014). Pokud je β-amyloid přítomen v nadměrné míře, může způsobovat kognitivní poruchy typické pro AD. Některé studie ukazují, že na patofyziologické změny, které vedou k AD, nemají vliv amyloidní plaky, ale rozpustné složky β-amyloidu (Morley and Farr, 2014).

AD je také charakterizována ukládáním neurofibrilárních uzlíků (klubek) v postiženém mozku. Tyto uzlíky vznikají díky nadměrné fosforylaci tau proteinu. Nejprve se vyskytují v limbickém systému mozku a s postupem nemoci se šíří do mozkové kůry. Neurony, které obsahují tyto uzlíky, podléhají apoptóze (Pimplikar, 2009).

Strukturní studie společně s objasněním signálních kaskád spojených s neurodegenerací vedou k vytvoření tzv. tau hypotézy založené na konceptu, že nadměrná fosforylace tau proteinu představuje finální krok k patogenezi AD a že tento fenomén předchází rozšířené nervové degeneraci (Maccioni et al., 2010). AD koreluje s rostoucím počtem neurofibrilárních klubek, a tedy i s nadměrnou fosforylací tau proteinu.



Obr. 1 Neurofibrilární klubka a senilní plaky na histologickém řezu mozkovou tkání (http://www.emoryhealthsciblog.com/tag/pathology/)

1.1.1 Epidemiologie AD

Prevalence (počet případů onemocnění v celé zkoumané populaci) AD neustále stoupá, a to hlavně díky stárnutí populace. V roce 2001 dosahovala globální prevalence AD u jedinců ve věku 65 let a více 24 milionů případů a bylo predikováno, že se tento počet každých 20 let zdvojnásobí (Ferri et al., 2005; Reitz et al., 2011). Je tedy odhadováno, že v roce 2040 bude AD trpět více jak 80 milionů pacientů.

Předpokládaný nárůst případů AD je přičítán rostoucímu počtu starších lidí, a to zejména v zemích s nízkými či středními příjmy. Očekává se tedy, že nárůst počtu lidí trpících AD se mezi lety 2001–2040 zvýší o 80–190 % v Evropě, Severní Americe a v Pacifiku, zatímco v Latinské Americe, Indii, Číně, severní Africe a v zemích Blízkého východu prudce stoupne o více jak 300 % (Hampel et al., 2011).

Obecně lze říci, že se AD častěji vyskytuje u žen než u mužů (Thies and Bleiler, 2013; Nahid et al., 2007). Primárně je tento jev vysvětlován tím, že se ženy v průměru dožívají vyššího věku než muži, a proto mají delší časové období, kdy se toto onemocnění může rozvinout. Některé studie však neuvádějí významný rozdíl v prevalenci mezi pohlavími (Gatz et al., 2003; Fitzpatrick et al., 2004). Podle tiskové zprávy Alzheimer Europe z 13. července 2009, která shrnuje výsledky projektu EuroCoDe (European Collaboration on Dementia) financovaného Evropskou komisí a koordinovaného evropskou asociací Alzheimer Europe (Tab.1), jsou počty lidí s demencí vyšší, než se doposud předpokládalo (www.alzheimer.cz, 12. 3. 2014). Podle tohoto výzkumu se v roce 2009 v Evropě vyskytovalo 7,3 milionů pacientů postižených AD .

Tab. 1 Prevalence demence v Evropě podle projektu EuroCoDe (2009)

	muži		**ženy**	
věk	**EuroCoDe**	**EURODEM**	**EuroCoDe**	**EURODEM**
30–59		0,16 %		0,09 %
60–64	0,2 %	1,58 %	0,9 %	0,47 %
65–69	1,8 %	2,17 %	1,4 %	1,10 %
70–74	3,2 %	4,61 %	3,8 %	3,86 %
75–79	7,0 %	5,04 %	7,6 %	6,67 %
80–84	14,5 %	12,12 %	16,4 %	13,5 %
85–89	20,9 %	18,45 %	28,5 %	22,76 %
90–94	29,2 %	32,10 %	44,4 %	32,25 %
95+	32,4 %	31,58 %	48,8 %	36,00 %

Z výše uvedené prevalence je možné odhadnout, že v roce 2009 bylo v České republice 123 194 pacientů trpících AD (www.alzheimer.cz, 12. 3. 2014).

1.1.2 Diagnostika a symptomy AD

Diagnostikovat AD je velmi problematické díky nespecifičnosti biologických markerů doprovázejících toto onemocnění. Jedinou spolehlivou metodou, která potvrzuje tuto diagnózu, je histologické vyšetření mozkové tkáně, které je možné provést pouze *post mortem* nebo pomocí biopsie mozku (Alloul et al., 1998). V praxi jsou pacienti vyšetřováni a diagnostikováni na základě fyzických testů, rodinné anamnézy, systematického stanovení psychického stavu za použití specifických kognitivních a psychologických testů, případně za pomoci magnetické rezonance.

AD má pozvolný nástup následovaný progresivním poklesem kognitivních, behaviorálních a motorických funkcí. Mezi první příznaky AD patří zhoršená schopnost zapamatovat si nové informace. K tomuto symptomu dochází díky odumírání neuronů, které leží v oblasti podílející se na formování krátkodobé paměti (Thies and Bleiler, 2013). Jak dochází k selhávání synapsí a k odumírání neuronů, začnou se objevovat další příznaky spojené s touto chorobou: neschopnost řešit problémy a pracovní úkoly, ztráta schopnosti orientovat se v čase a prostoru, problémy s psaním a výslovností některých slov, změny nálad atd.

V časných stádiích mohou pacienti vykazovat příznaky deprese. V pozdějších stádiích se mohou objevovat behaviorální a psychiatrické problémy, jako jsou neklid, agresivita nebo halucinace (Alloul et al., 1998). S postupem nemoci potřebuje pacient pomoci se základními aktivitami běžného života, jako jsou pomoc při osobní hygieně, oblékání, stravování. V závěrečné fázi ztrácí pacient schopnost komunikovat, poznat svoje blízké, dochází k poklesu motorických funkcí, kdy pacient ztrácí schopnost se samostatně pohybovat a je tedy odkázán na nepřetržitou péči (Thies and Bleiler, 2013).

1.1.3 Negenetické rizikové faktory AD

Mezi negenetické rizikové faktory, které mohou předcházet vzniku AD, patří: cerebrovaskulární onemocnění, vyšší hladiny krevního tlaku, diabetes mellitus 2. typu, nadměrná tělesná hmotnost, poranění mozku, metabolický syndrom a deprese.

Změny, ke kterým dochází během infarktu nebo mrtvice (cerebrovaskulární onemocnění), mohou zvyšovat riziko vzniku následné demence. Pendlebury a Rothwell ve své studii uvádějí, že se u 7,4 % pacientů, kteří prodělali mozkovou mrtvici, následně rozvinula i AD (Pendlebury and Rothwell, 2009). Mrtvice může vést k přímému poškození částí mozku, které ovlivňují paměťové funkce. Může také zvyšovat ukládání β-amyloidu, což vede ke zhoršování kognitivních funkcí. Následná snížená perfuze může vést ke zvýšené expresi cyklin-dependentní kinázy 5 (CDK5), která je asociována s neurotickou apoptózou (Weishaupt et al., 2003).

Uvádí se, že hypertenze může zvyšovat riziko nástupu AD díky snižování cévní celistvosti hematoencefalické bariéry vyúsťující v únik proteinů z cévního řečiště do mozkové tkáně (Kalaria, 2010). Se zvyšujícím se věkem se efekt zvýšeného krevního tlaku, jakožto rizikového faktoru AD, snižuje a může působit obráceně, tj. jako protektivní faktor (Reitz et al., 2011).

Diabetes mellitus 2. typu (DM2) může až dvojnásobně zvyšovat riziko vzniku AD (viz dále). Několik studií hodnotilo vzájemný vztah mezi metabolickým syndromem jako celku a jako rizika pro propuknutí AD nebo pro snížení kognitivních schopností. Některé tyto studie prokázaly pozitivní asociaci mezi přítomností tohoto syndromu a kognitivní dysfunkcí (Raffaitin et al., 2009; Yaffe et al., 2009; Solfrizzi et al., 2011). Dále bylo prokázáno, že metabolický syndrom je také rizikovým faktorem pro neurologická onemocnění, jako jsou mrtvice a deprese, stejně tak jako pro demenci a AD. Je zřejmé, že všechny buněčné a biochemické změny (poškození funkce endoteliálních buněk, abnormality v metabolismu esenciálních mastných kyselin, změny v signalizaci inzulínu a leptinu) pozorované u metabolického syndromu mohou představovat patologické spojení mezi tímto syndromem a různými neurologickými poruchami (Farooqui et al., 2012).

Vztah mezi tělesnou hmotností a jejím vlivem na kognitivní poruchy a na vznik demence je řízen centrální obezitou (Whitmer et al., 2008). Propuknutí AD závisí také na věku, ve kterém je obezita naměřena (Gustafson et al., 2009). Některé studie uvádějí, že příliš nízká, ale i příliš vysoká tělesná hmotnost mohou působit jako rizikové faktory pro vznik demence. Ukazují tedy tzv. *U-shaped* vztah mezi hmotností a kognitivními poruchami. Pomocí meta-analýzy bylo zjištěno, že obezita (podle hodnocení BMI) zvyšuje riziko propuknutí AD o 59 % (Profenno et al., 2010).

K symptomům deprese dochází v 40–50 % případů pacientů s AD. Kontrolní studie prokázala, že riziko výskytu AD se zvyšuje u pacientů trpících depresemi (Jorm, 2001).

Studie Beckera však propojení mezi AD a změnami nálad neprokázala (Becker et al., 2009). Ke zvýšenému riziku propuknutí AD dochází i po traumatech vzniklých při poranění mozku (Reitz et al., 2011).

1.1.4 Genetické rizikové faktory AD

95 % pacientů, kteří trpí touto chorobou, jsou starší 65 let, tzn. mají pozdní nástup demence (*late-onset AD*). U zbylých 5 % pacientů s AD se tato nemoc začne projevovat již mezi 40–50 lety, tzn. mají časný nástup demence *(early-onset AD)*. Obě tyto varianty AD jsou klinicky nerozlišitelné, nicméně pozdější forma AD je závažnější a je asociována s rychlejším tempem progrese nemoci. Každá z těchto forem je asociována s rozdílnými genetickými faktory (Reitz et al., 2011).

Časná forma AD tvoří 1–6 % všech případů AD. Mezi hlavní geny, které se podílejí na časné formě AD, patří: *APP*, *PSEN1* a *PSEN2*.

β-amyloidový prekurzorový protein (APP) se nachází na 21. chromozomu a obsahuje 18 kódujících oblastí. Většina mutací v genu pro *APP* se nachází ve štěpných místech pro γ-sekretázu nebo na transmembránové doméně exonů 16 a 17. Dnes je známo více jak 30 mutací v tomto genu, z toho ~25 je patogenních a ve většině případů vedou k časné formě AD (Vilatela et al., 2012).

Gen *PSEN1* se nachází na 14. chromozomu a obsahuje 12 kódujících oblastí. Mutace v tomto genu jsou nejčastější příčinou vzniku časné formy AD. Dnes je jich známo více jak 180 a tvoří 18–50 % případů této formy nemoci. Pacienti s mutací v tomto genu se projevují zhoršující se demencí a parkinsonismem, avšak existuje jistá fenotypová variabilita (Vilatela et al., 2012).

Gen *PSEN2* obsahuje 12 kódujích oblastí a mutace v tomto genu jsou vzácnými případy u časné formy AD. Klinické projevy této mutace jsou atypické a nelze je jednoznačně definovat (Vilatela et al., 2012).

Genetický profil pozdní formy AD je mnohem komplexnější než profil časné formy, předpokládá se typická polygenní dědičnost, kdy se na rozvoji nemoci podílí větší počet genů menšího účinku. Dosud je jediným prokázaným genem, který působí jako rizikový faktor pozdní formy AD, gen pro apolipoprotein E (*APOE*), resp. alela ε4 tohoto genu (Corder et al., 1993, Vilatela et al., 2012). V roce 1993 bylo zjištěno, že produkt genu *APOE* má tendenci spojovat se s β-amyloidem, a že by tedy mohl ovlivňovat AD. Dále bylo zjištěno, že u pacientů s pozdní formou AD je zvýšená frekvence alely ε4 (Corder et al., 1993).

Gen pro *APOE*

APOE je lipoprotein složený z 229 aminokyselin, leží na 19. chromozomu a obsahuje 4 kódující oblasti. Jeho exprese probíhá v mnoha tkáních, především pak v játrech a mozku (Mahley et al., 2000). V mozku je APOE produkován astrocyty a ve větší míře i mikrogliemi, za určitých podmínek i neurony. Podílí se na transportu lipidů, hraje důležitou roli v metabolismu cholesterolu udržováním jeho plazmatické homeostázy v neuronech (Vilatela et al., 2012). Dále se podílí na správné distribuci lipidů během embryonálního vývoje CNS a účastní se regenerace periferních nervů při jejich poškození.

Každý jedinec nese dvě kopie *APOE* genu (jedna alela pochází od matky a jedna od otce). Jsou známy tři typy alel v genu pro APOE: ε2, ε3 a ε4. Celkem tedy může existovat šest možných genotypů: ε2/ε2, ε2/ε3, ε2/ε4, ε3/ε3, ε3/ε4 a ε4/ε4. Jednotlivé izoformy enzymu, označované E2, E3 a E4, se od sebe liší pouze záměnou cysteinu a argininu na 112. a 158. pozici proteinu (Weisgraber et al., 1981) a vlivem jejich efektu na riziko vzniku AD (Raber et al., 2004). Frekvence jednotlivých alel ve zdravé evropské populaci jsou: 6,7–10,0 % (ε2), 75,3–82,8 % (ε3) a 7,5–15,6 % (ε4) (McKay et al., 2011). Alela ε4 je přítomna u ~50 % případů pozdní formy AD ve srovnání s 20–25 % u kontrolních jedinců. Přítomnost jedné alely ε4 (varianta ε4/x) zvyšuje riziko výskytu této formy 3× a může urychlit nástup AD o 5–10 let, přítomnost obou těchto alel (varianta ε4/ε4) zvyšuje riziko až 12× a může urychlit nástup AD o 10–20 let (Vilatela et al., 2012). Riziko vzniku AD klesá v souladu s genotypy ε4>ε3 >ε2. Alela ε2 může působit jako protektivní faktor vzniku AD (Raber et al., 2004; Suri et al., 2013).

Přítomnost ε4 alely však není postačující podmínka pro rozvoj AD, a proto pouze samotná genetická analýza genu *APOE* nemůže být použita pro diagnostiku tohoto onemocnění.

Studie v současnosti naznačují, že pozdní forma AD je nejen výsledkem kombinací genetických a environmentálních faktorů, ale také epigenetických abnormalit, jako jsou změny v DNA metylaci nebo v modifikaci histonů (Tan et al., 2013). Tyto epigenetické změny se stávají důležitým faktorem v patogenezi AD a jsou důležité pro pochopení multifaktoriality AD.

Kromě genu *APOE* bylo v posledních letech v celogenomových asociačních studiích identifikováno dalších 10 genů spojených s pozdní formou AD: *BIN1, CR1, CLU, PICALM, MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33, EPHA1* a *ABCA7* (Hu et al., 2011; Kamboh et al., 2012).

S AD jsou tyto geny spojovány v souvislosti s imunitní odpovědí (*CLU, CR1, ABCA7, MS4A, CD33 a EPHA1*), metabolismem cholesterolu (*CLU a ABCA7*) a synaptickou funkcí (*PICALM, BIN1, CD33, CD2AP a EPHA1*) (Karch et al., 2012).

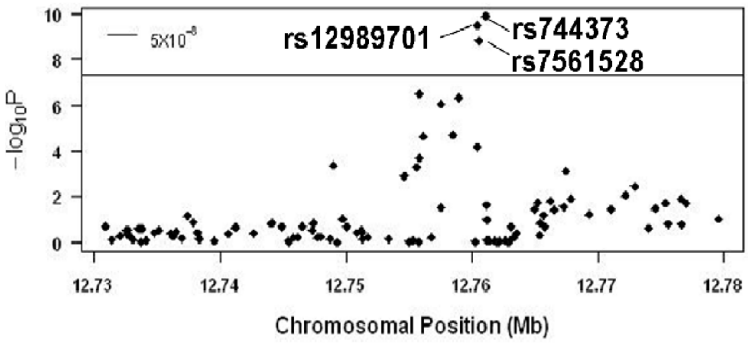
Gen pro *BIN1*

BIN1 (bridging integrator-1) je všudypřítomný nukleoplazmatický protein, který se nachází na chromozomu 2q14. Obsahuje 20 kódujících oblastí, které se mohou vyskytovat v různých izoformách. Jeho exprese probíhá hlavně v kosterním svalstvu a v mozku (Prokic et al., 2014).

BIN1 je klíčovým regulátorem buněčných dějů zahrnujících endocytózu nervových buněk, recyklaci membrány, regulaci cytoskeletu, opravu DNA, progresi buněčného cyklu a buněčnou apoptózu. Polymorfismy tohoto genu jsou spojené s progresí rakoviny, s některými myopatiemi a s pozdní formou AD (Prokic et al., 2014).

BIN1 je po *APOE* druhým nejdůležitějším rizikovým genem pro vznik AD. Produkt tohoto genu interaguje s mikrotubuly tau proteinu a jeho zvýšená exprese může narušit vesikulární synaptický transport nepropuštěním tau proteinu skrz membránu. Tento proces spojuje *BIN1* s patogenezí AD prostřednictvím tau signalizace.

Nová data ukazují, že polymorfismy v genu pro *BIN1* zvyšují riziko vzniku AD nejen tau patologií, ale že se podílí i na regulaci endocytózy, imunity a zánětu, homeostázy vápníku či na apoptóze. Studie ukazují, že jednonukleotidové polymorfismy genu pro *BIN1* se na AD podílí 1,2 %, což je druhý nejvyšší podíl rizikového faktoru ovlivňující AD po genu *APOE* (Tan et al., 2013). Vyšší hladiny exprese tohoto genu jsou asociovány s pozdějším nástupem (*late-onset*) a s rychlejším průběhem AD (Karch et al., 2012). Produkt genu *BIN1* propojuje mikrotubuly cytoskeletu pomocí buněčné membrány tubulárních membránových struktur a může ovlivnit uspořádání hlavní patologické struktury mozku u AD – neurofibrilárních klubek (Meunier et al., 2009). Tento gen je také důležitý pro správné fungování cest vedoucích k buněčnému stárnutí a k apoptóze (Tan et al., 2013). Mezi nejvýznamnější jednonukleotidové polymorfismy v genu pro *BIN1* patří polymorfismus rs744373, který je od kódující oblasti genu *BIN1* vzdálen 30 kb. Minoritní alela G tohoto polymorfismu koreluje s rychlostí poklesu kognitivních funkcí a s mírou progrese AD (Tan et al., 2013).



Obr. 2 Výsledek celogenomových asociačních studií, polymorfismus rs744373 je nejsilněji asociován s AD (Hu et al., 2011)

1.1.5 Nový biochemický marker – visfatin

Visfatin je protein, který je vysoce evolučně konzervován a nachází se u všech organismů od baktérií po člověka. Původně byl visfatin popsán jako adipokin v roce 2005 (Fukuhara et al., 2005) a jeho název vyjadřuje představu o dominantní produkci tohoto hormonu viscerální tukovou tkání. Ukázalo se však, že opravdu poprvé byl tento protein popsán již v roce 1994, ale pod názvem pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF). Byl izolován z lymfocytů periferní krve a pojmenován podle své schopnosti zvyšovat účinky interleukinu-7 a Sertoliho buněčného faktoru na tvorbu β-buněk. (Ognjanovic et al., 2001; Samal et al., 1994). Později bylo zjištěno, že se jedná o ten samý protein. Dnes je visfatin znám také pod názvem nikotinamid fosforybosyltransferáza (NAMPT) (Liu et al., 2012). NAMPT je enzym, který zajišťuje syntézu nikotinamid adeninu dinukleotidu (NAD), je exprimován v mnoha tkáních a orgánech, např. v mozku, játrech, kostní dřeni, kosterním svalu a také v tukové tkáni.

Visfatin se může nacházet ve dvou odlišných formách – jako intracelulární (iNAMPT) nebo jako extracelulární (eNAMPT). Intracelulární visfatin má především funkci enzymu pro syntézu NAD. Význam extracelulárního visfatinu není jednoznačně objasněn (Garten et al., 2009). Nicméně se předpokládá, že extracelulární NAMPT je prozánětlivě působící cytokin. Pravděpodobně může mít i funkci enzymu a syntetizovat NAD, ale díky nedostatku ATP v extracelulárním prostoru je enzymatická aktivita eNAMPT slabá (Liu et al., 2012).

Visfatin bývá často spojován s různými metabolickými onemocněními. Je známá jeho schopnost napodobovat funkci inzulínu, snižuje glukózu v krvi a podporuje účinnost inzulínu. Nicméně není prokázána souvislost s inzulínovou senzitivitou měřenou z lačných hodnot inzulínu a glukózy ani euglykemickým hyperinzulinemickým testem (Al-Suhaimi et al., 2013). Asociace visfatinu s obezitou je spíše kontroverzní. Byly publikovány studie,

které zjistily u obézních jedinců jak vyšší hladiny visfatinu v plazmě (Mercader et al. 2008), tak i snížené hladiny visfatinu (Li et al., 2006). Visfatin má svou úlohu i v imunitních onemocněních, působí jako prozánětlivý cytokin a je např. vysoce exprimován při sepsi (Romacho et al., 2013). Popsána byla také asociace s osteoporózou (Mochen et al., 2010). Hladina visfatinu může souviset i se stresem a vypovídat o odolnosti organismu vůči onemocněním spojených s vyšším věkem (Yang et al., 2006). Přestože stárnutí samo o sobě není nemoc, zvýšené plazmatické hladiny visfatinu mohou znamenat zhoršený zdravotní stav. Jakou souvislost má plazmatický visfatin s neurodegenerativními onemocněními však zatím není jednoznačné.

1.2 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) je závažné chronické onemocnění, které je charakterizováno vysokou hladinou glukózy v krvi – tzv. hyperglykémií. DM se projevuje absolutním nebo relativním nedostatkem inzulínu. Chronická hyperglykémie diabetu je asociována s dlouhodobým poškozením a následným selháním některých orgánů, a to především ledvin, očí, nervů, srdce a cév (American Diabetes Asociation, 2013).

Diabetes mellitus se dělí do dvou základních kategorií – diabetes mellitus 1. typu (DM1), kdy nedochází k tvorbě inzulínu, a diabetes mellitus 2. typu (DM2), kdy k tvorbě inzulínu sice dochází, ale tělo jej nedokáže efektivně využít, což vede k relativnímu nedostatku tohoto hormonu. Další menší podskupinou je gestační diabetes mellitus (GDM) a ostatní specifické formy diabetu.

DM1 zahrnuje okolo 5–10 % případů diabetu. Někdy je také přezdíván jako tzv. dětská forma diabetu. Jedná se o výsledek buněčné autoimunitní destrukce β-buněk pankreatu. U některých pacientů, zvláště u dětí a adolescentů, je poprvé zaznamenán díky ketoacidóze. V pozdějším stádiu zde není žádná nebo pouze malá sekrece inzulínu manifestovaná nízkou nebo nedetekovatelnou hladinou C-peptidu. Autoimunitní rozpad β-buněk má genetické predispozice, ale do jisté míry je závislý i na environmentálních faktorech (American Diabetes Asociation, 2013).

DM2 zahrnuje okolo 90–95 % případů diabetu. Někdy bývá označován jako non-inzulín-dependentní (tedy nezávislý na inzulínu) nebo jako „diabetes dospělých“. Produkce inzulínu bývá u DM2 částečně zachována, ale citlivost tkání vůči jeho působení bývá snížena a dochází k tzv. inzulínové rezistenci a pacienti trpí relativním nedostatkem inzulínu. Tito

pacienti se často během své nemoci obejdou bez inzulínové léčby. To se samozřejmě liší u jednotlivých případů DM2 (American Diabetes Asociation, 2013).

U DM2 nedochází k autoimunitnímu odbourávání β-buněk a pacienti nemají stejné příčiny vzniku tohoto onemocnění jako pacienti s DM1. Pacienti s DM2 často trpí obezitou a ta již sama o sobě způsobuje určitý stupeň inzulínové rezistence. Pacienti, kteří nejsou obézní (byla u nich použita tradiční kritéria pro určení obezity), mohou mít ale zvýšené procento tělesného tuku distribuovaného převážně v břišní oblasti. K rozvoji ketoacidózy dochází spontánně, často v souvislosti se stresem způsobeným jiným onemocněním nebo infekcí. Inzulínovou rezistenci může zmírnit redukce tělesné hmotnosti nebo farmakologická léčba hyperglykémie, ale málokdy dojde k jejímu úplnému odstranění (American Diabetes Asociation, 2013).

Mezi specifické formy diabetu patří genetická porucha β-buněk, genetická porucha inzulínové aktivity, onemocnění exokrinního pankreatu, endokrinopatie, léky vyvolaný diabetes atd. Gestační diabetes mellitus byl definován jako stupeň glukózové intolerance s nástupem nebo prvním projevem během těhotenství. Gestační diabetes mellitus bývá většinou přítomen pouze během těhotenství a po porodu vymizí, u některých pacientek však může přetrvat a postupně přejít v DM2.

Hodnota hyperglykémie u DM2 se může měnit v čase v závislosti na průběhu tohoto onemocnění. Spouštěcí mechanismy diabetu mohou být také přítomny, aniž by hyperglykémii způsobovaly. Na druhou stranu však tyto mechanismy mohou způsobovat zvýšení hladiny glukózy a/nebo zhoršit glukózovou toleranci, aniž by byl diagnostikován diabetes. U některých pacientů s diabetem může být optimální hladiny glukózy v krvi dosaženo redukcí tělesné hmotnosti nebo orálním podáváním látek snižujících hladinu glukózy. Tito pacienti nevyžadují podávání inzulínu. Jiní pacienti, přestože mají zachovanou zbytkovou sekreci inzulínu, vyžadují jeho příjem pro udržení optimální hladiny glukózy. Bez podání inzulínu však dokáží přežít. U pacientů s rozsáhlou destrukcí β-buněk a bez zbytkové sekrece inzulínu je zapotřebí tento hormon dodat, jinak by tito pacienti zemřeli (American Diabetes Asociation, 2013).

1.2.1 Epidemiologie DM2

Podle International Diabetes Federation (IDF) byl v roce 2012 u 8,3 % světové populace diagnostikován diabetes mellitus. Prevalence tohoto onemocnění neustále stoupá a začíná být alarmující (Tab. 2). Předpokládá se, že u dalších 4 % světové populace je diabetes přítomen, ale nebyl ještě diagnostikován.

Také vzrůstající tendence k nadváze a obezitě mezi mladými lidmi je zneklidňující: 27,5 % mužů a 34 % žen ve věku 20–39 let je obézních (Flegal et al., 2010), 11,3 % dětí ve věku 2–19 let je nad 97. percentilem co se týče BMI (Ogden et al., 2008). Většina lidí s nadváhou nebo obezitou trpí také inzulínovou rezistencí. Nepříznivé zdravotní důsledky nadváhy/obezity a inzulínové rezistence jsou dobře zdokumentovány – souvisí s DM2 a kardiovaskulárními nemocemi. Dále mohou tyto důsledky zvyšovat riziko vzniku kognitivních poruch a mohou tedy předcházet i vzniku AD (Profenno et al., 2010).

Tab. 2 Prevalence diabetu ve světě podle IDF (2012)

Oblast	**(Milion)**	**(%)**
Severní Amerika a Karibská oblast	38	10,5
Jižní a Střední Amerika	26	9,2
Afrika	15	4,3
Střední Východ a Severní Afrika	34	10,9
Jihovýchodní Asie	70	8,7
Evropa	55	6,7
Západní Pacifik	132	8

Podle Diabetické asociace České republiky bylo v roce 2010 v České republice přes 800 tisíc osob trpících diabetem (Tab. 3). Od roku 1980 stoupl počet diabetiků 2,5×. Pokud by dále počet diabetiků stoupal tímto tempem, byl by v roce 2035 postižen touto nemocí každý desátý občan České republiky.

Tab. 3 Prevalence diabetu v České republice podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky (2010)

rok	DM2	DM1	sekundární DM	DM celkem
2010	739859	55811	10560	806230
2009	717365	55414	10542	783321
2008	708847	54474	10240	773561
2007	692074	52813	10074	755000
2006	686159	51070	11299	749000
2000	599868	46446	8504	654164
1997	555883	39020	5402	600306
1975	-	-	-	234071

1.2.2 Rizikové faktory diabetu

Na rozvoji diabetu se podílejí různé procesy – od autoimunitní destrukce β-buněk slinivky břišní vedoucí k deficitu inzulínu, až po inzulínovou rezistenci, která spočívá ve snížené odpovědi cílových tkání na inzulín. Nedostatek inzulínové odpovědi často vede k neadekvátní inzulínové sekreci /hyperinzulinémii/. Zhoršená inzulínová sekrece a zvýšená inzulínová rezistence se často vyskytují najednou u jednoho pacienta, a proto není jasné, která z těchto abnormalit je primární příčinou hyperglykémie (American Diabetes Asociation, 2013).

Mezi příznaky, které poukazují na hyperglykémii, patří: polyurie, polydipsie, ztráta tělesné hmotnosti, ale také rozmazané vidění a špatné zaostřování. Dlouhodobé komplikace diabetu zahrnují retinopatii s následnou možností ztráty zraku, nefropatii vedoucí k selhání ledvin, periferní nefropatii s rizikem vzniku tzv. diabetické nohy a autonomní neuropatii způsobující gastrointestinální, urogenitální nebo kardiovaskulární poruchy či sexuální dysfunkce. Pacienti s diabetem mají zvýšený výskyt aterosklerotických kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních onemocnění. U těchto pacientů se také často vyskytuje hypertenze a poruchy lipoproteinového metabolismu (American Diabetes Asociation, 2013).

Riziko rozvoje DM2 se zvyšuje s věkem, obezitou a nedostatkem fyzické aktivity. Obezita je primárním rizikovým faktorem pro vznik diabetu. 80 % pacientů s DM2 je obézních (Bergman et al., 2014). Obezitu je těžké vyléčit pouze změnou životního stylu (dietou nebo cvičením). Efektivním způsobem léčby jsou bariatrické operace, které jsou ale velmi rizikové, a ne všichni pacienti je mohou podstoupit (Ribaric et al., 2014).

Častěji se DM2 vyskytuje u žen, které prodělaly gestační diabetes mellitus a u pacientů, kteří mají hypertenzi nebo dyslipidémii. Frekvence výskytu této nemoci je závislá na

jednotlivých etnických skupinách. Často je DM2 asociován s genetickými predispozicemi (American Diabetes Asociation, 2013).

Mezi další rizikové faktory, které mohou ovlivnit vznik a rozvoj DM2, patří deprese. Existují důkazy, že deprese a DM2 jsou spolu silně asociovány. Které poškození ovlivňuje které, ale zatím není dosud objasněno. K depresi může dojít v důsledku DM2, ale je také možné, že deprese může působit jako rizikový faktor pro vznik diabetu (Knol el tl., 2006). Podle Cukiermana et al. zvyšuje DM2 riziko vzniku kognitivních poruch o 1,2–1,5 % a riziko vzniku demence zvyšuje o 1,6 % (Cukierman et al., 2005). Deprese by mohla usnadnit nástup DM2 díky poruchám příjmu potravy, lékům, které zapříčiňují zvýšení tělesné hmotnosti nebo díky aktivaci hormonálních drah souvisejících se stresem a prozánětlivými cytokiny, které narušují glukózový metabolismus (Rotella and Mannucci, 2013). Na druhou stranu omezení stravy nebo fyzické a společenské aktivity, která může s DM2 souviset, mohou vyvolat stavy deprese (Nouwen et al., 2010).

Podle meta-analýzy z roku 2001 je prevalence deprese 2× častější u pacientů s DM2 než u zdravé populace (Anderson et al, 2001). I další studie potvrdily, že pacienti s DM2 mají vyšší riziko výskytu depresí (Golden et al., 2008; O´Connor et al., 2009). Deprese v asociaci s diabetem může vést k postižení důležitých životních funkcí, k mikro- a makrovaskulárním komplikacím (Egede, 2004) a samozřejmě zvyšuje náklady na zdravotní péči (Finkelstein et al., 2003).

Některé studie však vyšší riziko vzniku demence u pacientů s DM2 nepotvrzují (Brown et al., 2006). Pouze poukazují na to, že příznaky spojené s dlouhotrvajícími makrovaskulárními komplikacemi, jako jsou infarkt, mrtvice nebo periferní žilní onemocnění, mohou vyústit k depresím, a to i u pacientů s DM2. Vliv deprese na DM2 je podle těchto studií tedy nepřímý.

Vliv DM2 na zdravotní stav zahrnuje dlouhotrvající komplikace jako kardiovaskulární onemocnění, mrtvici, periferní vaskulární onemocnění, retinopatii, nefropatii či neuropatii (Serván, 2013). Jedinci trpící DM2 mají zvýšené riziko rozvoje kognitivních poruch zahrnujících i AD (Moreira et al., 2013).

Existují důkazy o genetické predispozici DM2 díky studiím zaměřeným na dvojčata a familiární výskyt tohoto onemocnění (Poulen et al., 1999). Pomocí celogenomových asociačních studií bylo odhaleno několik rizikových lokusů, jejichž varianty však mají minoritní efekt na vznik DM2 (Greenawalt et al., 2012).

1.2.3 Diagnostika a symptomy DM2

Diabetes je diagnostikován v případě, že hladina lačné glukózy překročí 7,8 mmol/l nebo když ve 120. min orálního glukózového tolerančního testu překročí hladina glukózy 11 mmol/l (Ravona-Springer and Schnaider-Beeri, 2011). Orální glukózový toleranční test (OGTT) je pomocná vyšetřovací metoda pro diagnostiku DM2, gestačního diabetu a porušené glukózové tolerance. Na počátku testu se orálně podá přesně odměřené množství glukózy (75 g), následně se ze vzorků krve v předem daných časových intervalech zjišťuje, jak se organismus s touto zátěží vyrovnává a jak rychle dokáže toto množství cukru zpracovat (při diabetu je tato schopnost omezena).

Mezi hlavní symptomy, které poukazují na možný rozvoj DM2, patří porušená glukózová tolerance (PGT). Ta je diagnostikována v případě, kdy se hladina lačné glukózy pohybuje v rozmezí 5,6–7,8 mmol/l nebo když se ve 120. min OGTT pohybuje v rozmezí 7,8–11 mmol/l (Ravona-Springer and Schnaider-Beeri, 2011). Takovéhoto „prediabetika“ je třeba pravidelně sledovat, aby se případné propuknutí diabetu včas odhalilo. Studie Perreaulta et al. nedávno ukázala, že lidé s porušenou glukózovou tolerancí, kteří se léčbou vrátí zpět k normální glukózové toleranci, mají významně nižší riziko získat DM2 (Perreault et al., 2012).

Některé studie uvádějí, že zvýšená hladina glukózy v krvi může narušit přirozený obranný antioxidační mechanismus (Obrosova et al., 2001). Výskyt DM2 a s ním spojených komplikací může být spojen se zvýšenou hladinou oxidačního stresu, který vyplývá z výše zmíněné hyperglykémie (Binici et al., 2013). Existuje stále více důkazů spojujících DM2 s těžkou peroxidací lipidů a oxidačním poškozením DNA a proteinů (Pan et al., 2008). Zvýšená hladina oxidativních proteinů je často spojována s některými nemocemi – s DM2, AD nebo rakovinou (Binici et al., 2013). Oxidativní stres vede ke zvýšené produkci volných kyslíkových radikálů. Kyslíkové radikály jsou vysoce reaktivní sloučeniny s krátkým poločasem rozpadu. Naproti tomu lipidy, proteiny, sacharidy a DNA po reakci s kyslíkovými radikály mají delší poločas rozpadu a jsou snadněji detekovatelné biochemickými metodami (Kesavulu et al., 2001).

DM2 dlouho nemusí být diagnostikován, protože hyperglykémie se vyvíjí postupně a v raných stádiích není tak často závažná, aby byla detekována jako příznak DM2.

1.3 Inzulínová rezistence

Inzulínová rezistence (IR) bývá definována jako stav, kdy je zapotřebí větší než běžné množství inzulínu k tomu, aby došlo k biologické odpovědi na daný podnět (Serván, 2013). Inzulín působí prostřednictvím membránového buněčného receptoru – proteinu složeného ze dvou α- a dvou β-podjednotek. α -podjednotky se nacházejí v extracelulárním prostředí a předávají inzulínový signál intracelulárním β-podjednotkám, přičemž dojde ke zvýšení tyrosin-kinázové aktivity. Poté dochází k fosforylaci endogenních proteinových substrátů a k následné aktivaci kaskády intracelulárních signálů, které v poslední fázi vyvolají migraci glukózových transportérů (Glut-4) z intracelulárního prostředí na povrch buňky. Díky tomu dochází k usnadnění vstupu glukózy do buňky. Inzulínová rezistence je způsobena porušenou funkčností některého z kroků v tomto procesu. Cílové tkáně následně indukují kompenzaci formou hyperinzulinémie (zvýšení hladiny inzulínu), aby došlo k udržení normálního stavu glykémie. Za pár let se ale touto kompenzací slinivka vyčerpá a hladina glukózy v krvi se začne zvyšovat. Jakmile k tomu dojde, hyperglykémie začne mít toxické účinky na buněčné ostrůvky a bylo prokázáno, že dojde k narušení kinázové funkce inzulínového receptoru (Serván, 2013). Inzulínová rezistence může být také definována jako neadekvátní odpověď cílové tkáně (svalů, jater a tukové tkáně) na účinky cirkulujícího inzulínu.

1.3.1 Epidemiologie inzulínové rezistence

Jedním z nejsilnějších determinantů pro vznik inzulínové rezistence u pacientů s metabolickým syndromem nebo s DM2 je množství viscerálního tuku. Ten se nejčastěji tvoří díky přebytku volných mastných kyselin (Luchsinger et al., 2009). Bylo prokázáno, že tyto kyseliny mohou působit jako inhibitory inzulín degradujícího enzymu, přispívají k dalšímu snížení degradace β-amyloidu, a tedy k nárůstu jeho ukládání (Bravata et al., 2004).

Důležitým pojítkem mezi viscerálním tukem a AD je zánět. Adipokin TNFα, který je nadměrně exprimován v tukové tkáni jedinců s inzulínovou rezistencí, je kromě inzulínové rezistence také spojen i s lipotoxicitou a selháním β-buněk. Neutralizace TNFα zvyšuje inzulínovou senzitivitu a snižuje hladiny volných mastných kyselin (Piers et al., 2002). Zvýšená hladina TNFα se nachází v mozku a v mozkomíšním moku pacientů s AD a také u jedinců s mírnou kognitivní poruchou a inhibuje transport β-amyloidu z mozku do periferie (López et al., 2008).

Dnešní studie ukazují, že starší lidé s DM2, a tedy i s inzulínovou rezistencí, mají vyšší riziko vzniku kognitivních dysfunkcí a demence zahrnující i AD (Moreira et al., 2013).

1.3.2 Inzulín, DM2 a AD

Inzulín je hormon snadno transportovatelný do CNS přes krevní mozkovou bariéru díky přenašečům. Inzulín a hyperinzulinémie podporuje sekreci amyloidového prekurzorového proteinu (APP) a následnou formaci β-amyloidu. Další vliv inzulínu na β-amyloid je zprostředkován inzulín degradujícím enzymem (IDE). IDE byl identifikován jako enzym zodpovědný nejen za degradaci inzulínu, ale také za degradaci β-amyloidu. U pacientů s inzulínovou rezistencí může hyperinzulinémie vést ke snížení degradace β-amyloidu prostřednictvím IDE, a to zvýšením jeho ukládání v nervových buňkách. Kromě toho má APP na β-amyloid nežádoucí neurodegenerativní účinky, protože může působit jako neurotoxin a může nepříznivě ovlivnit inzulínovou signalizaci (Moreira et al., 2013). Inzulín dále reguluje fosforylaci tau proteinu, která je základem vzniku neurofibriálních uzlíků v mozku pacientů s AD.

Během stárnutí dochází k poruchám hormonální homeostáze včetně homeostáze inzulínu. Ke zhoršení glukoregulačních mechanismů, které jsou charakterizovány poruchou glukózové tolerance a zvýšením inzulínové rezistence, dochází často u starších lidí a prevalence DM2 se tedy zvyšuje s věkem. Asi 40–50 % starších lidí mají PGT nebo DM2 a je odhadováno, že necelá polovina případů DM2 není diagnostikována. Zvyšující se množství těchto případů podporuje spojitost mezi neurodegenerativním onemocněním jako je AD a hormonální dysfunkcí. Ačkoli se zdá, že hormonální změny nemusejí být spouštěcí reakcí pro vznik AD, mohou zvyšovat riziko vzniku této nemoci stejně tak jako mohou zhoršit hraničních příznaky a urychlit tak progresi AD (Gasparini et al., 2002).

Vyšší koncentrace inzulínu v plazmě a nižší koncentrace inzulínu v cerebrospinální kapalině, které poukazují na inzulínovou rezistenci, byly detekovány u pacientů s AD ve srovnání se zdravou populací (Frölich et al., 1998). Bylo také zjištěno, že u pacientů s lehkou formou AD indukovaná hyperglykémie zvyšuje lačnou hladinu inzulínu v plazmě a zlepšuje kognitivní funkce, ale u pacientů s těžkou formou AD nezvyšuje koncentraci inzulínu a nezlepšuje kognitivní funkce (Craft et al., 2000). Zvýšené riziko AD u pacientů s DM2 indikují, že abnormální inzulínová homeostáza může usnadnit nástup demence (Gasparini et al., 2002).

1.3.3 Vliv inzulínové rezistence na AD

Inzulínová rezistence je dalším mechanismem přispívajícím k tvorbě neuropatologií a ke kognitivním poruchám. Mozek byl koncipován jako k inzulínu necitlivý orgán. Nicméně bylo detekováno, že se v určitých jeho oblastech (čichová oblast, cerebrální kortex, hippocampus, hypothalamus, amygdala, mediální temporální kortex) nacházejí inzulínové receptory, a to ve vysoké koncentraci (Ravona-Springer and Schnaider-Beeri, 2011). Vysoká koncentrace inzulínových receptorů v mediálním temporálním kortexu a v hippocampu je v souladu s jeho vlivem na kognitivní funkci a paměť. Bylo prokázáno, že inzulín hraje roli v procesech souvisejících se stárnutím (Craft and Watson, 2004), některé z nich jsou asociovány se stárnutím mozku a s neurodegenerací (Kenyon, 2010). Ačkoli neurony mají mechanismy pro přísun glukózy nezávislé na inzulínu, v některých částech mozku, konkrétně v hippocampu a hypothalamu, má inzulín vliv na vychytávání glukózy (Schulingkamp et al., 2000). Bylo zjištěno, že inzulín má také vliv na hladinu neurotransmiterů podílejících se na učení a paměti. Kromě toho tzv. downregulující efektory a mediátory inzulínových signalizačních drah hrají roli ve snížení tau fosforylace a ve vývoji neurofibrilárních uzlíků (Lesort and Johnson, 2000). Všechny výše zmíněné faktory přispívají k chronickému zánětlivému stavu.

4. Materiál

Biochemická část

Vyšetření kontrolního souboru probíhá v Endokrinologickém ústavu v Praze už od roku 2012. Od roku 2012 probíhá také vyšetřování pacientů s AD ve spolupráci s Thomayerovou nemocnicí v Krči. Do diplomové práce byli zařazeni kontrolní jedinci a pacienti s AD vyšetření od ledna 2012 do prosince 2013. V této době bylo vyšetřeno celkem **103** jedinců (Tab. 4). Pacienti i kontroly podstoupili neuropsychologické vyšetření a magnetickou rezonanci hlavy k potvrzení (pacienti s AD) nebo k vyloučení neurologické diagnózy (kontroly).

Tab. 4 Sledované soubory

celkový počet vyšetřených osob	**103**
kontrolní soubor	64
muži/ženy	23/41
porušená glukózová tolerance/normální glukózová tolerance	24/40
pacienti s AD	39
muži/ženy	15/24
porušená glukózová tolerance/normální glukózová tolerance	6/33

Protokol vyšetření zahrnoval klinicko-biochemická vyšetření glukózového a lipidového metabolismu, antropometrické vyšetření ke zjištění základních antropometrických rozměrů a z nich vypočítaných indexů. Antropometrické charakteristiky souborů uvádí tabulka 5 (viz Příloha), biochemické charakteristiky uvádí tabulka 6 (viz Příloha).

Pacienti i zdravé kontroly byli před zařazením do studie podrobně seznámeni s jejím průběhem a svůj souhlas se zařazením do této studie potvrdili podpisem informovaného souhlasu schváleného Etickou komisí Endokrinologického ústavu v Praze.

Genetická část

Sběr materiálu probíhá v Endokrinologickém ústavu v Praze už od roku 1999. Pro různé studie byli vybíráni a vyšetřováni pacienti s DM2, jejich příbuzní a potomci, ženy s gestačním diabetem v anamnéze a zdravé kontroly bez rodinné anamnézy diabetu 2. typu. Do diplomové práce bylo zařazeno celkem **1386** jedinců (Tab. 7).

Tab. 7 Sledované soubory

celkový počet vyšetřených osob	**1386**
pacienti s DM2	417
muži/ženy	159/258
pozitivní rodinná anamnéza DM2 alespoň u jednoho z rodičů (%)	17
léčba diabetu dietou/PAD/inzulínem (%)	4/80/16
ženy s gestačním diabetem v anamnéze	335
pozitivní rodinná anamnéza DM2 alespoň u jednoho z rodičů (%)	28
porušená glukózová tolerance/normální glukózová tolerance	36/299
nediabetičtí jedinci	634
muži/ženy	220/414
pozitivní rodinná anamnéza DM2 alespoň u jednoho z rodičů (%)	13
porušená glukózová tolerance/normální glukózová tolerance	43/591

Vyšetření sledovaného souboru zahrnovala základní antropometrické měření, klinicko-biochemická vyšetření glukózového a lipidového metabolismu včetně glukózového tolerančního testu u nediabetických jedinců a genetickou analýzu zaměřenou na kandidátní geny pro AD. Antropometrické charakteristiky souborů uvádí tabulka 8 (viz příloha) a biochemické charakteristiky uvádí tabulka 9 (viz Příloha). Vzhledem k rozsáhlému časovému období, kdy byl sběr dat prováděn, nejsou kompletní vyšetření přítomna u všech pacientů.

Pacienti i zdravé kontroly byli před zařazením do studie podrobně seznámeni s jejím průběhem a svůj souhlas se zařazením do této studie potvrdili podpisem informovaného souhlasu schváleného Etickou komisí Endokrinologického ústavu.

5. Metodika

1.4 Antropometrické měření

Pro antropometrické vyšetření byl použit standardizovaný systém technik antropometrie s přesně definovanými antropometrickými body. Bylo provedeno základní měření a byly zhodnoceny následující parametry:

Tělesná hmotnost

tělesná hmotnost byla měřena na digitální váze s přesností na 0,1 kg

proband stojí na váze rovnoměrně na obou nohách, paže jsou volně spuštěné podél těla

Tělesná výška

tělesná výška byla měřena pomocí stadiometru s přesností na 1 mm

proband stojí zády ke stěně, hlava je orientována v tzv. frankfurtské horizontále, ruce jsou volně svěšeny podél těla, paty jsou u sebe, záda, hýždě a paty se dotýkají stěny

Obvodové parametry

obvodové parametry byly měřeny pásovou mírou s přesností na 1 mm

obvod pasu: obvod měřený horizontálně v polovině vzdálenosti mezi spodním okrajem dolního žebra a hřebenem kosti kyčelní (*crista iliaca*)

obvod břicha: obvod měřený horizontálně v úrovni pupku (*omphalion*)

obvod gluteální: obvod měřený horizontálně v úrovni největšího vyklenutí hýždí

Kožní řasy

kožní řasy byly měřeny kaliperem typu Best s přesností na 1 mm

kožní řasa suprailiakální: měřena šikmo nad hřebenem kosti kyčelní (*crista iliaca*)

kožní řasa nad bicepsem: měřena ve svislé poloze ve středu kosti pažní nad dvojhlavým svalem pažním (*m. biceps brachii*)

kožní řasa nad tricepsem: měřena ve svislé poloze ve středu kosti pažní nad trojhlavým svalem pažním (*m. triceps brachii*)

kožní řasa subskapulární: měřena šikmo těsně pod dolním úhlem lopatky

∑4 řas: kožní řasa suprailiakální, nad bicepsem, nad tricepsem a subskapulární

Pro hodnocení tělesného složení byly vypočítány následující indexy:

BMI = hmotnost v kg/tělesná výška v m^2

WHR = obvod pasu v cm/obvod boků v cm

BAI = (obvod boků v cm)/((tělesná výška v m)^{1,5}) – 18) (Bergman et al., 2011)

1.5 Biochemická vyšetření

Biochemická vyšetření byla stanovena ze vzorků periferní krve odebraných po nočním lačnění. Specifikace základních biochemických metod stanovených na Oddělení klinické biochemie Endokrinologického ústavu je uvedena v následujícím přehledu:

- **Triacylglyceroly:** enzymatický kolorimetrický test (Roche, Cobas 6000, Roche Diagnostics, Mannheim); opakovatelnost CV 0,9 %, mezilehlá přesnost CV 2,0 %
- **Celkový cholesterol:** enzymatický kolorimetrický test (Roche, Cobas 6000, Roche Diagnostics, Mannheim); opakovatelnost CV 1,1 %, mezilehlá přesnost CV 1,6 %
- **HDL-cholesterol:** homogenní enzymatický kolorimetrický test (Roche, Cobas 6000, Roche Diagnostics, Mannheim); opakovatelnost CV 1 %, mezilehlá přesnost CV 1,5 %
- **LDL-cholesterol:** celkový cholesterol – (triacylglyceroly/2,2) – HDL-cholesterol
- **Glykémie:** enzymatická referenční metoda s hexokinázou (Roche, Cobas 6000, Roche Diagnostics, Mannheim); opakovatelnost CV 1,0 %, mezilehlá přesnost CV 1,3 %
- **C-peptid:** ECLIA(Roche, Cobas 6000, Roche Diagnostics, Mannheim); opakovatelnost CV 3,2 %, mezilehlá přesnost CV 4,7 %
- **Inzulín:** ECLIA (Roche, Cobas 6000, Roche Diagnostics, Mannheim); opakovatelnost CV 3,7 %, mezilehlá přesnost CV 4,6 %

Pro hodnocení inzulínové rezistence, resp. senzitivity, byly vypočítány dva indexy:

1) index inzulínové rezistence HOMAR (homeostasis model assessment-estimated insulin resistance) = inzulín (nalačno) × glykémie (nalačno) / 22,5 (Matthews et al., 1985)

2) Matsuda index vypočítaný z hodnot glykémie a inzulínu po zátěži 75 g glukózy (pouze u jedinců, kteří podstoupili vyšetření orálním glukózovým tolerančním testem) = $10^4/\sqrt{}$ (průměr inzulínu × průměr glykémie × glykémie nalačno × inzulín nalačno) (Matsuda and DeFronzo, 1999)

Biochemické vyšetření visfatinu bylo provedeno v rámci multiplexové analýzy kitem Bio-Plex ProHuman Diabetes 10-Plex Assay na přístroji BIO-RAD (BIO-RAD Laboratories, Hercules CA). Tento kit umožňuje, kromě visfatinu, stanovit za použití minimálního objemu biologického materiálu (plazmy) dalších 9 parametrů (C-peptid, ghrelin, GIP, GL P-1, glukagon, inzulín, leptin, PAI-1, resistin). Metoda funguje na principu klasické sandwichové ELISA metody, při které dochází k navázání protilátek na různě

barevné polystyrenové kuličky s magnetickým jádrem – každý odstín odpovídá jednomu analytu.

Postup stanovení plazmatických hladin visfatinu:

1. Příprava vzorků na ledu: rozmražení, zvortexování, stočení.
2. Zapnutí a kalibrace přístroje BIO-RAD.
3. Příprava standardů: rozpuštění standardů v 500 µl ředícího pufru (Standard diluent) a inkubace 30 min na ledu.
4. Příprava ředící destičky na 10-plex: 25 µl plazmy (3× naředěné) + 50 µl ředícího pufru (Sample diluent).
5. Příprava 10-plexu: navlhčení destičky, zvortexování a smíchání polystyrenových kuliček s magnetickým jádrem s 5,6 ml pufru (Assay buffer), nanesení 50 µl do každé jamky, promytí.
6. Naředění standardů do ředících řad.
7. Nanesení 50 µl standardů, kontrol a vzorků (3× naředěných), přelepení ochrannou fólií, 2 h inkubace na míchačce.
8. Promytí destičky a příprava protilátek, smíchání 2,9 ml ředícího pufru (Detection antibody diluent) a 144 µl detekční protilátky.
9. Zvortexování protilátek, nanesení 25 µl protilátek, přelepení ochrannou fólií, 30 min inkubace na míchačce při laboratorní teplotě.
10. Promytí destičky, smíchání 6 ml pufru (Assays buffer) + 60 µl Streptavidinu-PE, zvortexování a nanesení 50 µl mixu, přelepení ochrannou fólií, 15 min inkubace na míchačce.
11. Promytí destičky, přidání 125 µl pufru (Assays buffer), přelepení ochrannou fólií, krátké zvortexování, vložení destičky do měřícího přístroje, spuštění analýzy.

1.6 Molekulárně-genetické metody

Izolace DNA

Deoxyribonukleotidová kyselina (DNA) pro molekulárně-genetické analýzy byla izolována z leukocytů periferní krve na automatickém přístroji QuickGene 610L (FujiFilm Life Science) kitem QuickGene DNA whole blood kit L (KURABO Industries, Osaka). Principem metody je, že po lýze buněk se uvolněná DNA v přítomnosti chaotropních solí a etanolu zachytí na silikátové membráně kolonky. Kolonka se následně opakovaně promývá

vhodným pufrem, čímž se odstraní zbytky proteinů a další nežádoucí příměsi. Již čistá DNA se v posledním kroku z membrány uvolní elučním pufrem. Po změření koncentrace a ověření čistoty na spektofotometru NanoPhotometer P330 (poměr absorbancí DNA 260 nm/proteiny 280 nm) byly roztoky DNA naředěny na pracovní koncentraci 10 ng/µl. DNA je uchovávána pod kódem v DNA bance při -20°C.

1.6.1 Detekce alel ε2, ε3 a ε4 v genu pro APOE

Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězcová reakce (PCR = Polymerase Chain Reaction) je metodou molekulární biologie, která se používá k namnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA *in vitro*. Kopie úseku DNA jsou syntetizovány podle templátu (jednořetězcová DNA) za pomoci enzymu DNA-polymerázy. Tato reakce probíhá na principu komplementarity bází. Vysokou teplotou dochází k denaturaci dvouřetězcové DNA a získaná jednořetězcová vlákna slouží jako templát. Dále je zapotřebí dvou *primerů* (chemicky syntetizovaných krátkých oligonukleotidů), které se připojují ke komplementárním úsekům řetězců DNA. Pomocí těchto primerů je vymezen úsek DNA, který se bude amplifikovat.

PCR probíhá formou cyklů, které se 20–40× opakují. Každý cyklus má tři fáze: denaturační, anelační a extenzní neboli elongační. Denaturační fáze probíhá při 95°C a dochází v ní k oddělení řetězců DNA. V anelační fázi nasedají primery na oba volné řetězce DNA na předem určených místech. Anelační teplota závisí na sekvenci primerů, bývá v rozmezí 50–72°C. Reakci je nutné optimalizovat na konkrétní primery. V elongační fázi, která probíhá při 72°C, začne polymeráza připojovat komplementární nukleotidy na základě sekvence matriční DNA. Podél jednořetězcové DNA tedy vzniká druhé komplementární vlákno a vytváří se tak dvoušroubovice. Stejný proces probíhá současně i na templátovém vláknu.

Amplifikace *APOE* lokusu

V PCR reakci *APOE* lokusu byly použity následující primery:

primer 1: 26mer: 5´- GCA CGG CTG TCC AAG GAG CTG CAG GC – 3´

primer 2: 22mer: 5´- GGC GCT CGC GGA TGG CGC TGA G – 3´

Výsledný PCR produkt měl délku 271 bp.

Postup amplifikace *APOE* lokusu:

1. Označení mikrozkumavek a uložení na ledu.
2. Zhotovení Master mixu (výsledné koncentrace: 10% DMSO, 1mM $MgCl_2$, 160µM dNTPs, 0,1µM primery)

pro jeden vzorek: 8,494 µl sterilní H_2O; 2,2 µl DMSO (100%); 0,88 µl 25mM $MgCl_2$; 2,2 µl 10xPCR Buffer; 1,76 µl 2,0mM dNTPs; 2,2 µl 1µM primer 1; 2,2 µl 1µM primer 2; 0,066 µl Taq (5U/µl), zvortexování a stočení.

3. Přidání 20 µl Master mixu + 2 µl zvortexované a stočené DNA do označených mikrozkumavek.

4. Stočení mikrozkumavek, vložení do termocycleru, spuštění analýzy (počáteční denaturace: 95°C 10 min; 35 cyklů: 95°C 35 s, 62°C 40 s, 72°C 1 min; závěrečná elongace: 72°C 10 min).

Elektroforéza

Gelová elektroforéza patří k nejpoužívanějším separačním technikám sloužícím k analýze nukleových kyselin a proteinů. Principem této metody je pohyb záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě. Pomocí gelové elektroforézy lze oddělovat molekuly DNA na základě odlišných rychlostí pohybu těchto molekul v gelu, které jsou nepřímo úměrné velikosti molekuly DNA.

Nejčastěji se gelová elektroforéza provádí na agarózovém gelu, který je tvořen sítí polymerních molekul s póry. Touto sítí se molekuly DNA pohybují různou rychlostí – malé molekuly se pohybují rychleji, a proto doputují v gelu dále než velké molekuly, které v gelu díky své velikosti putují pomaleji. Agarózový gel složený z agarózy a pufru, který je také obsažen v elektroforetické vaně jako elektrolyt, se připravuje v různé hustotě. Do gelu se nanášejí vzorky a velikostní marker důležitý pro odhad velikosti pozorovaných DNA fragmentů. Do agarózového gelu se přidává interkalační fluorescenční barvivo, které se váže na DNA a později ji vizualizuje pod UV zářením.

Postup přípravy a spuštění elektroforézy:

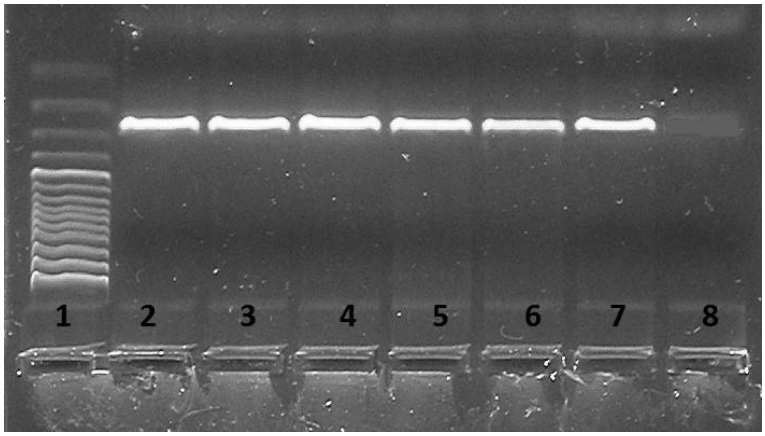
1. Odvážení agarózy (0,75 g pro 1,5% agarózu (TopBio, ČR), 2 g pro 4% MethaPhor agarózu (Cambrex, USA)) a přidání 50 ml 0,5% TBE pufru ph 8,45-8,55.

2. Zahřátí směsi na 100 °C, vychladnutí na 60 °C, přidání 1,25 µl interkalačního fluorescenčního barviva GelRed (Biotium, USA), přelití do nalévací vaničky, tuhnutí.

3. Přendání agarózového gelu do elektroforetické vany.
4. Nanesení 3 µl DNA markeru (0,5 µl barviva – součást kitu DNA markeru – 0,5 µl DNA markeru a 2 µl 0,5% TBE pufru) a 7 µl směsi vzorku a barvičky (5 µl každého vzorku a jedné negativní kontroly + 2 µl nanášecí barvičky DextranBlue) do jamek na gelu.
5. Spuštění elektroforézy

a) 1,5% agaróza (po PCR): 90 V, 30 min
b) 4% agaróza (po RFLP): 80 V, 1,5 h.

6. Ukončení elektroforézy, přenesení gelu na UV transiluminátor, fotodokumentace.



Obr. 3 Kontrolní elektroforéza po PCR. Pozice 1 velikostní DNA marker, pozice 2–7 jednotlivé vzorky, pozice 8 negativní kontrola

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism) a jeho analýza je metoda, která funguje na principu enzymatického štěpení molekul DNA ve specifickém štěpném (restrikčním) místě. Probíhá díky enzymu restrikční endonukleáza. Restrikční endonukleázy jsou sekvenčně specifické bakteriální enzymy, které chrání bakterii před vniknutím cizorodé DNA. Cizí dvouvláknová DNA je restriktázou rozštěpena, vlastní DNA je proti působení enzymu chráněna. Každý typ restrikční endonukleázy štěpí cílovou DNA v různých místech v závislosti na sekvenci DNA. Názvy restrikčních endonukleáz jsou odvozovány od jména bakterie, ze které byly získány.

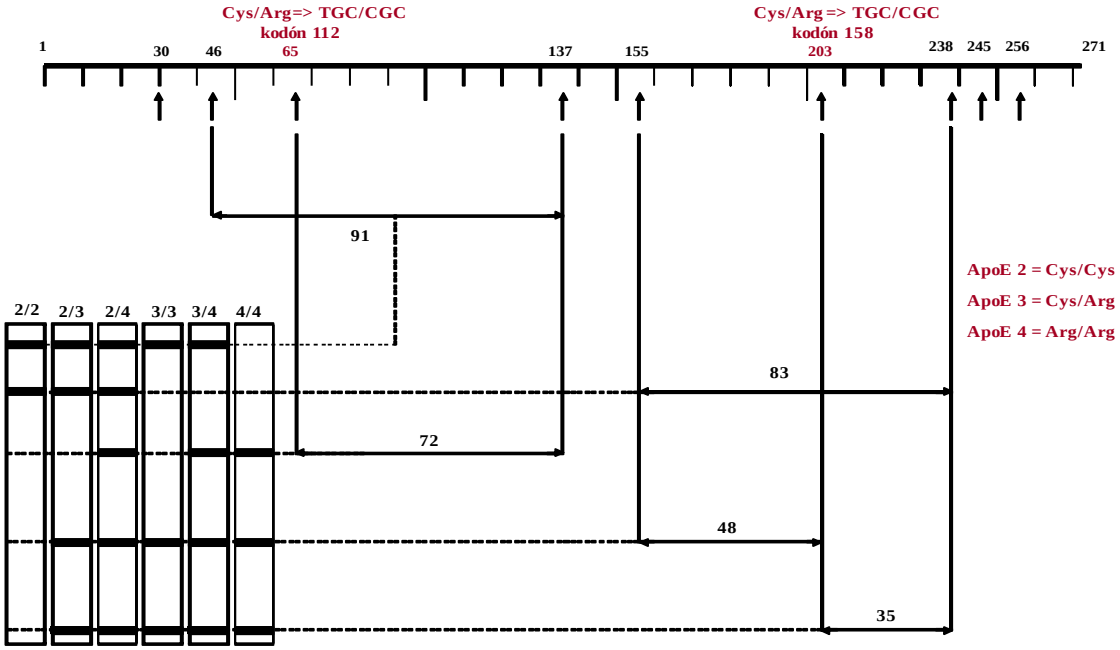
Detekce polymorfismu délky restrikčních fragmentů v genu pro *APOE* restrikční analýzou

Štěpení lokusu v genu pro *APOE* zajišťuje restrikční endonukleáza **Hha I** z bakterie *Haemophilus haemolyticus*, která má čtyřnukleotidovou rozpoznávací sekvenci **G C G │ C** a teplotní optimum při 37°C. **C │ G C G**

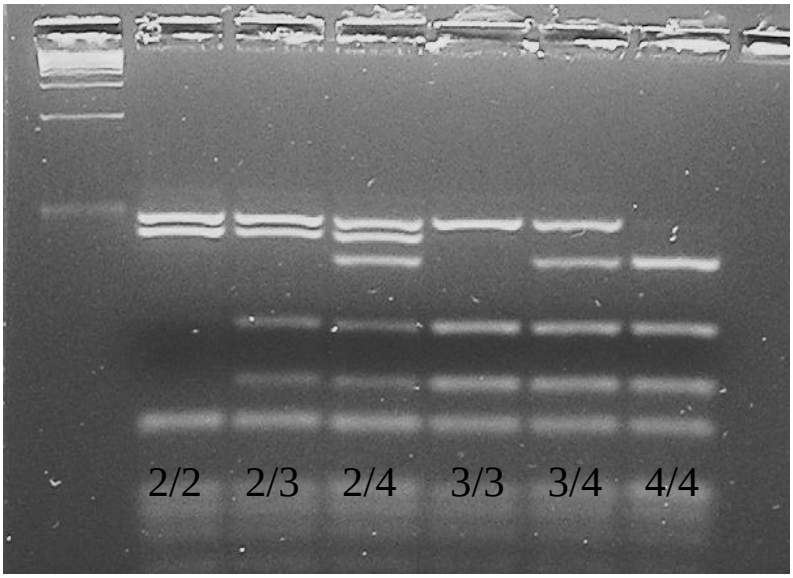
Postup RFLP *APOE* lokusu:

1. Zhotovení Restrikčního mixu (uvedeno pro jeden vzorek): 7,8 µl sterilní H_2O; 2 µl 10× Buffer TangoY+; 0,2 µl HhaI (8U/µl), zvortexování, stočení.
2. Smíchání 10 µl Restrikčního mixu + 10 µl PCR produktu.
3. Stočení a vložení do termostatu (37°C, min. 12 h).
4. Příprava 4% agarózového gelu a elektroforéza.
5. Ukončení elektroforézy, vizualizace gelu na UV transiluminátoru, fotodokumentace.
6. Odečtení jednotlivých polymorfismů.

Po rozdělení vzniklých fragmentů pomocí gelové elektroforézy lze na základě jejich velikosti odečíst jednotlivé varianty zkoumaného genu, tzv. polymorfismy. Vznik jednotlivých variant v lokusu pro *APOE* popisuje následující obrázek:



Obr. 4 Schéma odečtu alel pro gen *APOE*. Štěpná místa se pro endonukleázu HhaI nacházejí na pozicích: 30, 46, 65, 137, 155, 203, 238, 245 a 256. Ke změnám způsobeným bodovou mutací dochází v kodónu 112 a 158. Pokud ke změně nedojde, dojde ke štípání v pozicích 46 a 137 (vzniká fragment dlouhý 91 bp) a v pozicích 155 a 238 (vzniká fragment dlouhý 83 bp). Alela ε2 má v obou klíčových kodónech cystein a její fragmenty jsou dlouhé 91 a 83 bp (ani v jednom z těchto kodónů nedochází ke štípání). Alela ε3 má ve 112 kodónu cystein, ale ve 158 kodónu arginin, ve kterém dochází ke štípání a fragment o délce 83 párů bazí se rozpadá na dva menší o délkách 48 a 35 bp. Alela ε4 má štěpná místa v obou kodónech (v obou má arginin) a vzniklé fragmenty mají velikost 72 a 19 bp (tento kratší fragment pro nás není důležitý) a 48 a 35 bp. U jednotlivých kombinací alel se kombinují i vzniklé fragmenty. Ty lze pak podle tohoto obrázku odečíst a určit jednotlivý genotyp v genu pro *APOE*.



Obr. 5 Výsledná elektroforéza. Zleva – velikostní DNA marker, dále pak alely v jednotlivých genotypech (ε2/ε2; ε2/ε3; ε2/ε4; ε3/ε3; ε3/ε4; ε4/ε4)

1.6.2 Detekce polymorfismu rs744373 v genu *BIN1*

RealTime PCR

RealTime PCR je metoda vycházející z klasické PCR. Tato metoda zaznamenává růst PCR produktu v reálném čase. RealTime PCR probíhá ve speciálních termocyklerech, které kromě střídání teplot potřebných pro PCR ozařují vzorky excitačním zářením.

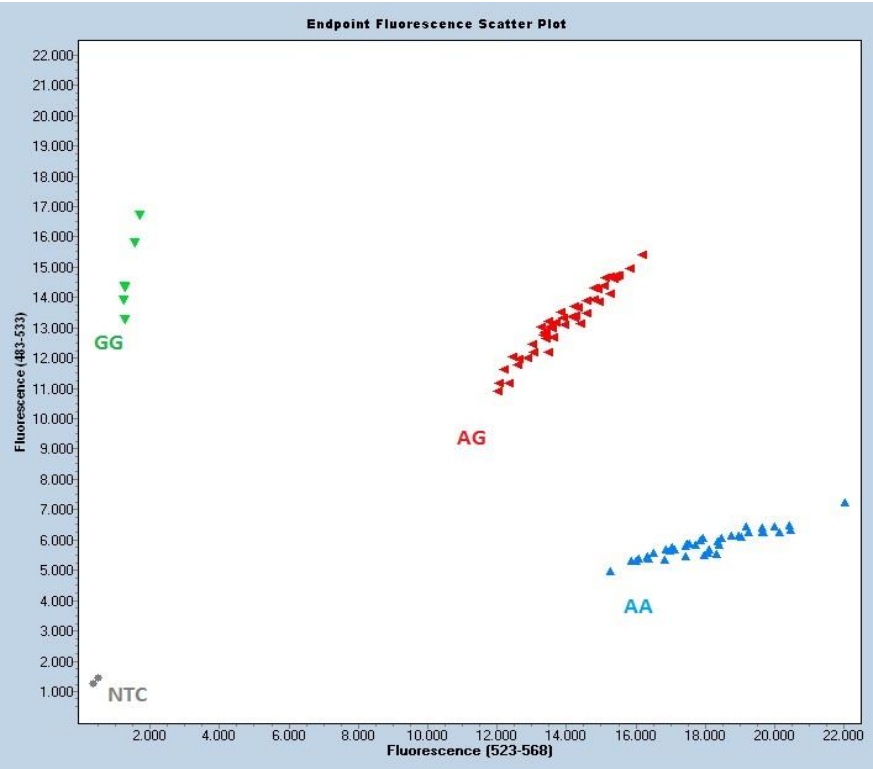
Endpoint genotypizace využívá dvě specifické TaqMan sondy pro obě alely polymorfismu a specifické primery. TaqMan sonda je na jednom konci označena fluorescenční barvou tzv. reportérem, na druhém konci je označena tzv. zhášečem fluorochromu. V této stavu nedochází k uvolňování fluorescence. Při syntéze komplementárních vláken dochází k hydrolyzaci TaqMan sondy DNA polymerázou. Dojde k uvolnění fluorescenční látky a k nárůstu fluorescence, která je detekována a zaznamenávána v reálném čase. Při hodnocení výsledků Edpoint genotypizace se vychází ze záverečné míry fluorescence.

Detekce polymorfismu rs744373 v genu *BIN1* metodou RealTime PCR

Detekce polymorfismu rs744373 v genu *BIN1* byla provedena Endpoint genotypizací s využitím TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems) obsahující specifické sondy a primery na přístroji Ligh Cycler 480 (Roche, USA).

Postup RealTime-PCR polymorfismu rs744373:

1. Příprava 96-jamkové destičky: přidání 1 µl vzorku (naředěného na pracovní koncentraci) do každé jamky, vysušení, zamražení.
2. Příprava Master mixu: 10 µl TagMan sondy, 290 µl sterilní H_2O a 200 µl TagMan Genotyping Master Mixu (Applied Biosystems, USA)
3. Stočení destičky, přidání 5 µl Master mixu do každé jamky, přelepení speciální fólií pro RealTime PCR, stočení a vložení do termocycleru.
4. Spuštění analýzy, amplifikace probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace při 95 °C 10 min a poté 50 cyklů 92 °C 15 s, 60 °C 1 min.



Obr. 6 Výstup analýzy RT-PCR. Zeleně homozygoti v alele G, červeně heterozygoti, modře homozygoti v alele A

1.7 Statistická analýza

Před vlastní statistickou analýzou byla data podrobena základní analýze dat, která měla za úkol ověřit předpoklady pro výběr vhodné statistické metody. Základní analýza dat zahrnuje předběžnou analýzu a diagnostiku dat, testuje předpoklady (vlastnosti dat), jejichž splnění je nutné k použít dalších metod. K základním předpokladům o datech patří normalita, nezávislost a homogenita, tedy nepřítomnost vybočujících měření, odlehlých dat a hrubých chyb. Pro základní analýzu byl použit program QC Expert 3.1.

K základní charakteristice dat patří i grafické diagnostiky, a to především pro svoji názornost. Pro grafické diagnostiky byl použit program QC Expert 3.1.

Pro statistické hodnocení byla použita analýza rozptylu (ANOVA). Je to statistická metoda založená na hodnocení vztahů mezi rozptyly porovnávaných souborů. Tato metoda předpokládá normální rozdělení dat, má však i svoji neparametrickou variantu. Parametrická ANOVA byla počítána v programu NCSS 2004, vícefaktorová ANOVA v programu Statgraphics Centurion verze XV.

Pro porovnání frekvencí alel studovaných genů byl použit Chi-square test v programu NCSS 2004.

1.7.1 Základní analýza dat

Hodnoceny byly následující testy a hodnotící kritéria:

- **Znaménkový test –** test testuje náhodnost ve střídání hodnot vyšších a nižších než je průměr. Je-li toto střídání příliš pravidelné a vyskytují-li se nepravděpodobně dlouhé sekvence po sobě jdoucích dat nad nebo pod průměrem, jsou data podezřelá a jsou označena jako závislá.
- **Momentový test normality –** je založený na shodě šikmosti a špičatosti s normálním rozdělením. Ve výstupu se opakují hodnoty klasických parametrů. Momentový test normality je slovním závěrem testu na zadané hladině významnosti.
- **D´Agostinův test normality –** zdokonalený test podle D´Agostina posuzuje výběrové momenty dat. Obecně je tento test podstatně citlivější než předchozí jednoduchý momentový test.
- **Kolmogorov-Smyrnovův test normality –** je založený na rozdílu teoretické a výběrové distribuční funkce korigovaný pro neznámé (odhadované) μ a σ. Posuzuje se detailní rozdílnost distribuční funkce dat pro případ, že by nenormální rozdělení dat mělo

náhodou podobné momenty jako normální rozdělení a nenormalita by tedy nebyla detekována v předchozích testech.

- **Kritický kvantil chi2(22):** jedná se o kritickou hodnotu maximálního rozdílu distribučních funkcí D z rozdělení *chi^2* (v=22).
- **Testové kritérium D:** maximální rozdíl mezi distribučními funkcemi
- **p-hodnota:** je-li menší než zadaná hladina významnosti, normalita je zamítnuta
- **Vybočující body:** robustní test na přítomnost vybočujících měření založený na kvantilovém odhadu vnitřních mezí dat
- **Homogenita:** slovní závěr testu, nejsou-li v datech vybočující měření, je předpoklad homogenity přijat

1.7.2 Grafické diagnostiky

Hodnoceny byly následující grafické diagnostiky:

- **Q-Q graf –** slouží k diagnostice normality a odlehlých měření. Pro normální data bez odlehlých měření má tvar přímky, pro normální data s odlehlými měřeními má tvar přímky s koncovými body ležícími mimo tuto přímku. U tohoto grafu je možné posoudit, zda je nelinearita způsobena jen několika body nebo všemi daty.
- **Diagramy rozptýlení –** zobrazují všechna data ve skutečném měřítku na ose X. Popis osy Y nemá význam. Aby nedošlo ke splývání shodných nebo blízkých dat, jsou ve spodní polovině grafu zobrazena táž data, ale náhodně rozmítnutá na ose Y.
- **Odhad hustoty –** graf porovnává hustotu pravděpodobnosti normálního rozdělení (zelená čára) s hustotu naměřených dat (červená čára). V případě normality a většího množství dat jsou si obě křivky blízké.
- **Krabicový graf –** tento graf je standardní diagnostický graf. Větší obdélník ohraničuje 50 % dat, horní okraj zeleného obdélníku odpovídá 75 % a spodní okraj odpovídá 25 % kvantilu, střed bílého pruhu v zeleném obdélníku odpovídá mediánu, šířka pruhu odpovídá intervalu spolehlivosti mediánu, dva černé proužky jsou tzv. vnitřní hradby. Data mimo vnitřní hradby jsou označena červeným proužkem a lze je považovat za vybočující měření.
- **P-P graf –** graf porovnává data s normálním (modrá křivka), Laplaceovým (červená křivka) a rovnoměrným rozdělením (zelená křivka). Křivka ležící nejblíže černé přímce odpovídá experimentálním datům. Graf slouží pro rozlišení symetrických rozdělení podle špičatosti.

- **Graf rozptýlení s kvantily –** zobrazuje empirické kvantily dat proložené kvantilovou funkcí normálního rozdělení. Vzájemná poloha obdélníků odpovídá symetrii, respektive asymetrii rozdělení. Vodorovná příčka uprostřed nejmenšího obdélníku označuje medián, svislá úsečka na příčce odpovídá intervalu spolehlivosti mediánu.
- **Kruhový graf –** graf slouží ke komplexnímu vizuálnímu posouzení normality na základě kombinace šikmosti a špičatosti. Zelená elipsa je optimální tvar pro normální rozdělení, černá „elipsa" představuje experimentální data. V případě normálních dat se obě křivky téměř kryjí.

1.7.3 Analýza rozptylu (ANOVA)

ANOVA je statistická metoda založená na hodnocení vztahů mezi rozptyly porovnávaných souborů. Je to progresivní metoda umožňující zjistit, zda mezi dvěma proměnnými existují významné rozdíly. Tato metoda předpokládá normální rozdělení dat a tzv. homoskedasticitu (identické rozptyly) – parametrická ANOVA. Pokud data nejsou normálně rozdělena, existuje neparametrická varianta původní analýzy rozptylu – neparametrická ANOVA.

Na základě základní analýzy dat a grafických diagnostik byla pro statistickou analýzu vybrána robustní neparametrická analýza rozptylu – Kruskal-Wallisův test. První tři testy testující normalitu totiž zamítly nulovou hypotézu o normalitě, ale modifikovaný Levenův test na homoskedasticitu nezamítl nulovou hypotézu o shodě rozptylů, proto se pro ANOVU použil tento neparametrický test.

Kruskal-Wallisův test je tedy neparametrickou verzí jednofaktorové ANOVY, která se využívá v případě, kdy předpoklad normality není platný. Jedná se o robustní test, který nepředpokládá normální rozdělení dat.

1.7.4 Frekvenční analýza

Hardy-Weinbergova rovnováha

Podíl jednotlivých alel se v panmiktické (jedinci se v populaci rozmnožují náhodně) a dostatečně velké populaci nemění.

Pro výpočet minoritní alely G byl použit následující vzorec: $p + q = 1$ (tj. 100 %), celkové genotypové složení populace lze vyjádřit pomocí vzorce: $p^2 + 2pg + q^2 = 1$.

Pro výpočet rizikové alely ε4 byl použit následující vzorec: $p + q + n = 1$ (tj. 100 %), celkové genotypové složení populace lze vyjádřit pomocí vzorce: $p^2 + q^2 + n^2 + 2pg + 2pn + 2qn = 1$.

Polymorfismy rizikové alely ε4 a minoritní alely G byly spočítány pomocí Chí-kvadrátu v programu NCSS 2004 podle daného vzorce:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{n} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

, kde O_i je pozorovaná frekvence a E_i je očekávaná (teoretická) frekvence alely.

6. Výsledky

6.1 Biochemická část

1.7.5 Základní analýza dat bez transformace

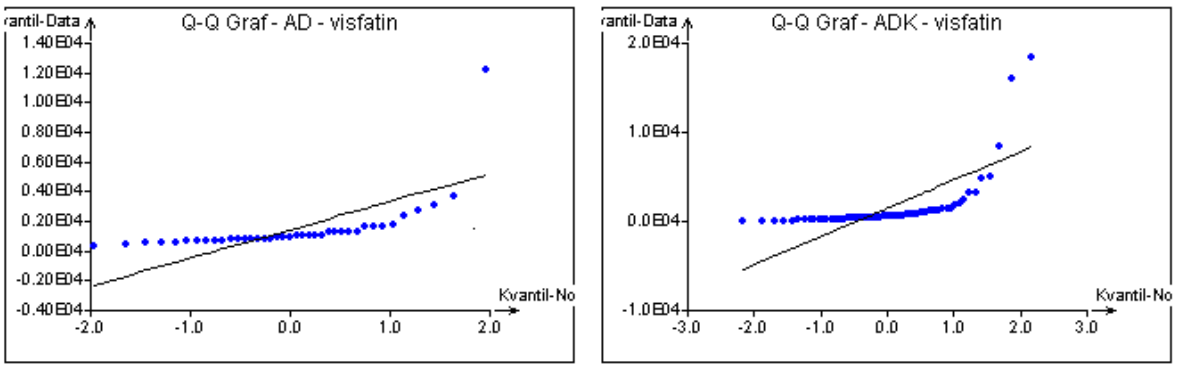
Statistický program QC Expert 3.1

Pacienti s AD (n=39)	Zdravé kontroly (n=64)
Klasické parametry:	
Průměr: 1442,98	Průměr: 1474,94
Spodní mez: 826,00	Spodní mez: 683,99
Horní mez: 2059,96	Horní mez: 2265,88
Rozptyl: 3622562,90	Rozptyl: 10026190,94
Směr. odchylka: 1903,303	Směr. odchylka: 3166,416
Šikmost: 4,802	Šikmost: 4,169
Odchylka od 0: **Významná**	Odchylka od 0: **Významná**
Špičatost: 27.32	Špičatost: 20,709
Odchylka od 3: **Významná**	Odchylka od 3: **Významná**
Robustní parametry:	
Medián: 954,93	Medián: 553,42
IS spodní: 615,91	IS spodní: 315,31
IS horní: 1293,94	IS horní: 791,53
Mediánová směr. odchylka: 167,465	Mediánová směr. odchylka: 119,155
Mediánový rozptyl: 28044,459	Mediánový rozptyl: 14197,971
Znaménkový test:	
Závěr: **Data jsou nezávislá**	Závěr: **Data jsou nezávislá**
Momentový test normality:	
Závěr: **Normalita zamítnuta**	Závěr: **Normalita zamítnuta**
Testové kritérium: 23,855	Testové kritérium: 26,422
Kritický kvantil chi2(22): 5,991	Kritický kvantil chi2(22): 5,991
p-hodnota: 0	p-hodnota: 0
D´Agostinův test normality:	
Závěr: **Normalita zamítnuta**	Závěr: **Normalita zamítnuta**
p-hodnota: 0	p-hodnota: 0
Kolmogorov-Smyrnovův test normality:	
Kritický kvantil chi2(22): 33,924	Kritický kvantil chi2(22): 33,924
Testové kritérium D: 53,143	Testové kritérium D: 75,317
p-hodnota: 0	p-hodnota: 0
Závěr: **Normalita zamítnuta**	Závěr: **Normalita zamítnuta**
Vybočující body:	
Závěr: **Homogenita zamítnuta**	Závěr: **Homogenita zamítnuta**
Počet vybočujících bodů: 4	Počet vybočujících bodů: 7
Spodní mez: -715,258	Spodní mez: -1556,35
Horní mez: 2661,128	Horní mez: 2998,35

1.7.6 Grafické diagnostiky dat bez transformace

Statistický program QC Expert 3.1

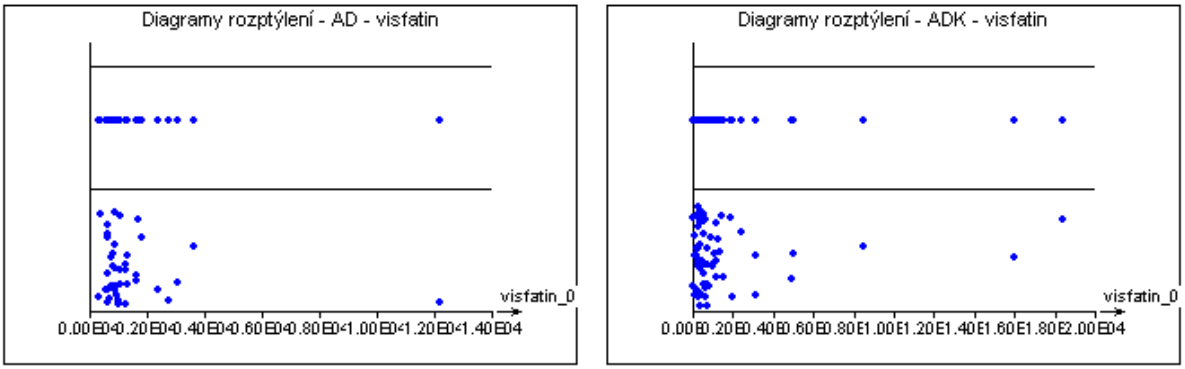
Q-Q grafy



Obr. 7 Q-Q grafy pro visfatin u pacientů s AD a kontrol (ADK)

Zhodnocení Q-Q grafů: U souboru pacientů s AD i u kontrolního souboru jsou vidět odlehlé body s vysokými hodnotami i body s nižšími hodnotami. Vzhledem k tomu, že data neleží na přímce, nejedná se o normální rozdělení těchto dat.

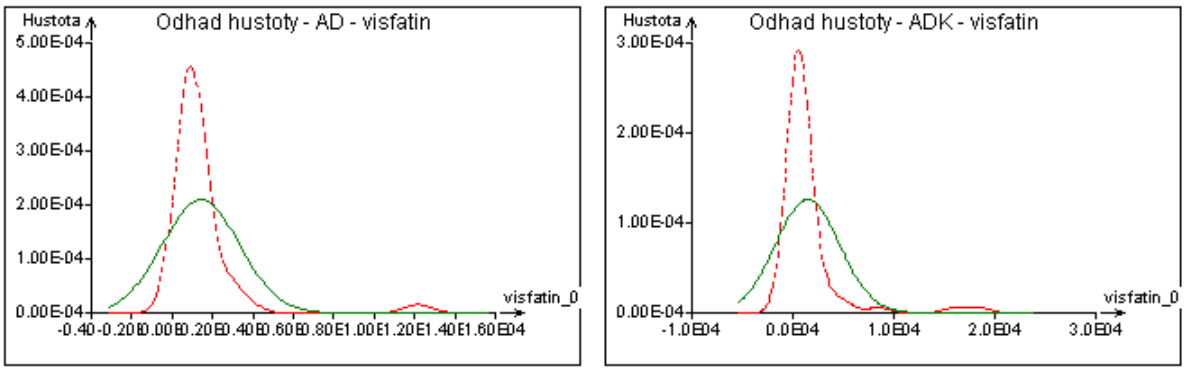
Diagramy rozptýlení



Obr. 8 Diagramy rozptýlení pro visfatin u pacientů s AD a kontrol (ADK)

Zhodnocení diagramů rozptýlení: Na grafech jsou vidět odlehlé body s vysokými hodnotami. U souboru pacientů s AD je jich 5, u kontrolního souboru se jich nachází 7. Tyto grafy poukazují na nenormální rozdělení dat.

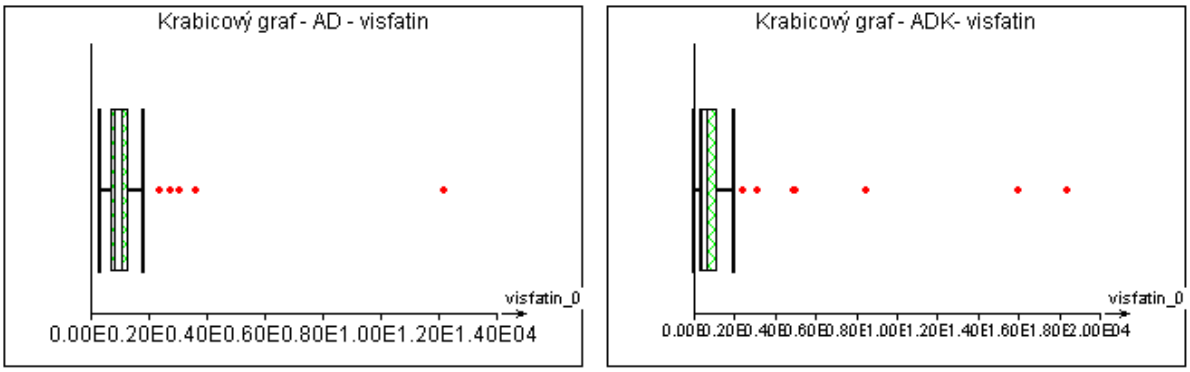
Odhad hustoty



Obr. 9 Odhad hustoty pro visfatin u pacientů s AD a kontrol (ADK)

Zhodnocení grafů odhadů hustoty: Výsledky odhadů hustoty rozložení dat ukazují, že data jsou nerovnoměrně rozložena (pokud by tomu tak nebylo, křivky by byly téměř totožné). U pacientů s AD se vyskytuje navíc jeden malý vrchol, u kontrolního souboru se vyskytují dva menší vrcholy. Ty představují velmi odlehlé hodnoty.

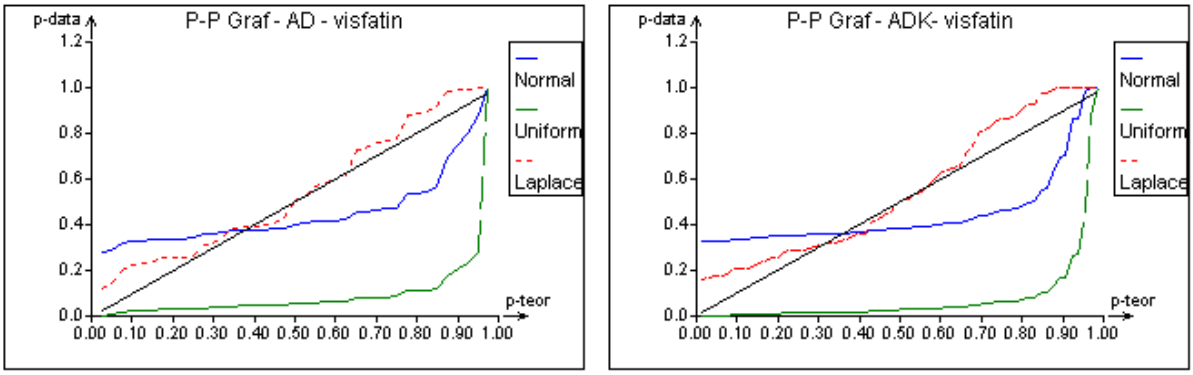
Krabicový graf



Obr. 10 Krabicové grafy pro visfatin u pacientů s AD a kontrol (ADK)

Zhodnocení krabicových grafů: Krabicové grafy ukazují, že u obou souborů se nacházejí vybočující měření. U pacientů s AD se jich nachází 5, u kontrolního souboru se jich nachází 7. Vybočující body poukazují na nerovnoměrné rozložení dat.

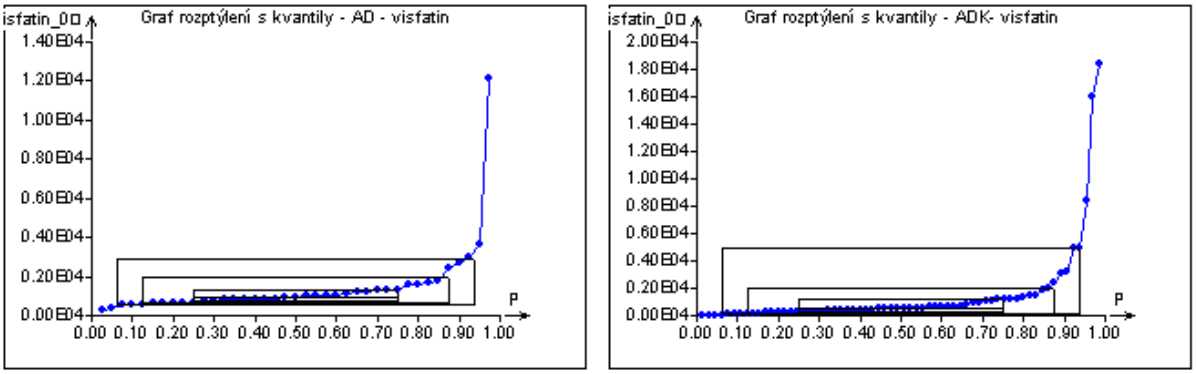
P-P graf



Obr. 11 P-P grafy pro visfatin u pacientů s AD a kontrol (ADK)

Zhodnocení P-P grafů: P-P grafy ukazují, že naměřená data u pacientů s AD stejně jako u kontrolního souboru se nejvíce přibližují Laplaceovu rozložení, nejsou tedy normálně rozdělena. Laplaceovo rozdělení ukazuje na možnou nekonstantnost rozptylu naměřených dat.

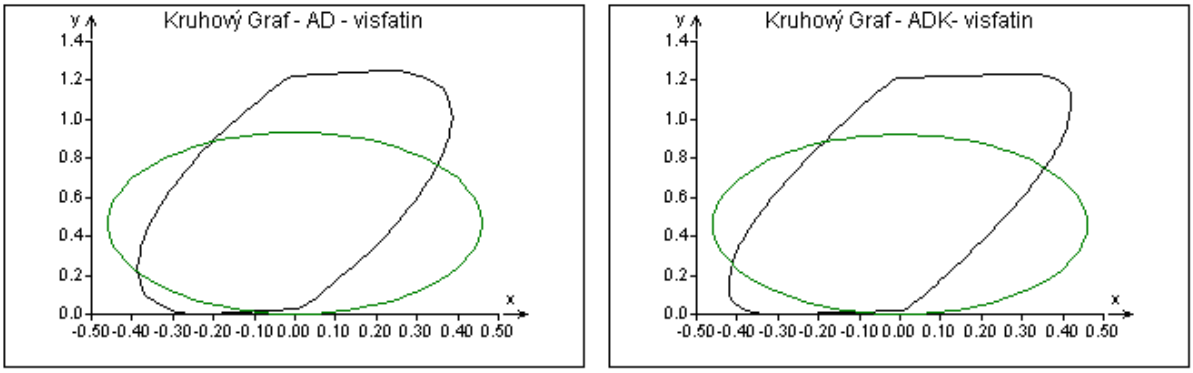
Graf rozptýlení s kvantily



Obr. 12 Grafy rozptýlení s kvantily pro visfatin u pacientů s AD a kontrol (ADK)

Zhodnocení grafů rozptýlení s kvantily: Graf souboru pacientů s AD i graf kontrolního souboru ukazují odlehlé body s vysokými hodnotami. Vzájemná poloha obdélníků poukazuje na asymetrické rozdělení naměřených dat.

Kruhový graf



Obr. 13 Kruhové grafy pro visfatin u pacientů s AD a kontrol (ADK)

Zhodnocení kruhových grafů: U souboru pacientů s AD i u kontrolního souboru je vidět odlišnost naměřených hodnot od optimálního tvaru pro normální rozdělení. Vybočení „elipsy“ na pravou stranu a tvar elipsy dokazuje asymetrické rozdělení zešikmené k vyšším hodnotám.

Závěr grafických diagnostik dat bez transformace

Grafické diagnostiky odpovídají závěrům základní analýzy dat, tj. data mají nenormální rozdělení. Nenormalita je dána především špičatostí a šikmostí. U souboru pacientů s AD obsahují data minimálně 4 odlehlé body (data s nejvyššími hodnotami), u souboru zdravých kontrolních jedinců (ADK) obsahují data minimálně 7 odlehlých bodů (data s nejvyššími hodnotami).

Visfatin je parametr, u kterého není přesně známa biologická variabilita. Každý vzorek byl stanoven vždy 2× a byla vyloučena chyba měření. Není proto důvod odlehlé body ze souboru vyřadit.

Při výběru vhodné statistické metody pro analýzu dat, která nemají normální rozdělení a obsahují mnoho vybočujících bodů (soubor pacientů s AD 4 body, kontrolní soubor 7 bodů), lze postupovat dvěma způsoby:

1) Zvolit neparametrickou metodu, která nevyžaduje normální rozdělení. Je však nutné otestovat homoskedasticitu, tj. shodu rozptylů testovaných skupin.

2) Pokusit se o transformaci dat do normálního rozdělení a následně zvolit parametrickou statistickou metodu.

V diplomové práci budou předvedeny oba způsoby statistického zhodnocení dat.

1.7.7 Základní analýza transformovaných dat

Statistický program QC Expert 3.1.

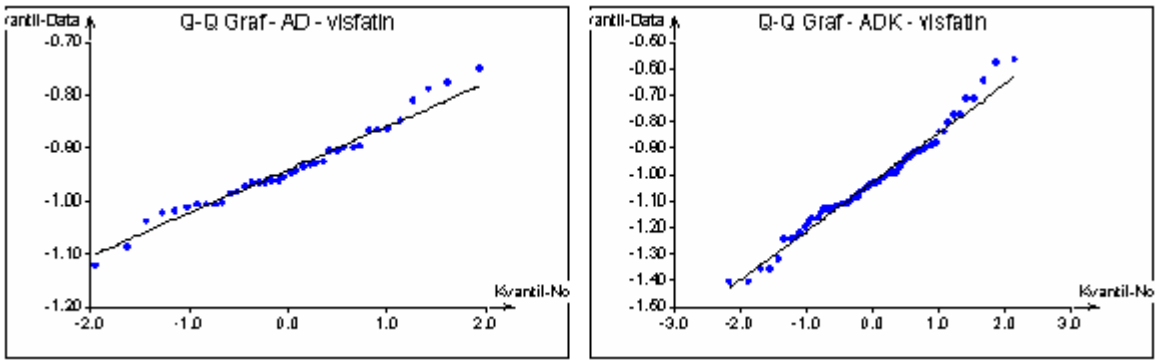
Data byla pomocí Box-Coxovy transformace (v programu Statgraphics Centurion verze XV) přiblížena do normálního rozdělení. V souboru pacientů s AD přesto zůstal jeden vybočující bod (s nejvyšší hodnotou), který by neumožnil použití parametrických metod. Tento bod byl ze souboru odstraněn.

Pacienti s AD (n=38)	**Zdravé kontroly (n=64)**
Klasické parametry:	
Průměr: -0,94	Průměr: -1,02
Spodní mez: -0,96	Spodní mez: -1,07
Horní mez: -0,91	Horní mez: -0,98
Rozptyl: 0,007	Rozptyl: 0,034
Směr. odchylka: 0,081	Směr. odchylka: 0,185
Šikmost: 0,322	Šikmost: 0,294
Odchylka od 0: **Nevýznamná**	Odchylka od 0: **Nevýznamná**
Špičatost: 3,111	Špičatost: 3,181
Odchylka od 3: **Nevýznamná**	Odchylka od 3: **Nevýznamná**
Robustní parametry:	
Medián: -0,95	Medián: -1,03
IS spodní: -1,01	IS spodní: -1,10
IS horní: -0,89	IS horní: -0,96
Mediánová směr odchylka: 0,028	Mediánová směr odchylka: 0,036
Mediánový rozptyl: 0,001	Mediánový rozptyl: 0,001
Znaménkový test:	
Závěr: **Data jsou nezávislá**	Závěr: **Data jsou nezávislá**
Momentový test normality:	
Normalita: **Přijata**	Normalita: **Přijata**
Testové kritérium: 1,063	Testové kritérium: 1,306
Kritický kvantil chi2(22): 5,991	Kritický kvantil chi2(22): 5,991
p-hodnota: 0,588	p-hodnota: 0,521
D´Agostinův test normality:	
Závěr: **Normalita přijata**	Závěr: **Normalita přijata**
p-hodnota: 0,699	p-hodnota: 0,56
Kolmogorov-Smyrnovův test normality:	
Kritický kvantil chi2(22): 33,924	Kritický kvantil chi2(22): 33,924
Testové kritérium D: 19,703	Testové kritérium D: 20,394
p-hodnota: 0,602	p-hodnota: 0,558
Normalita: **Přijata**	Normalita: **Přijata**
Vybočující body:	
Homogenita: **Přijata**	Homogenita: **Přijata**
Počet vybočujících bodů: 0	Počet vybočujících bodů: 0
Spodní mez: -1,234	Spodní mez: -1,611
Horní mez: -0,674	Horní mez: -0,443

1.7.8 Grafické diagnostiky transformovaných dat

Statistický program QC Expert 3.1

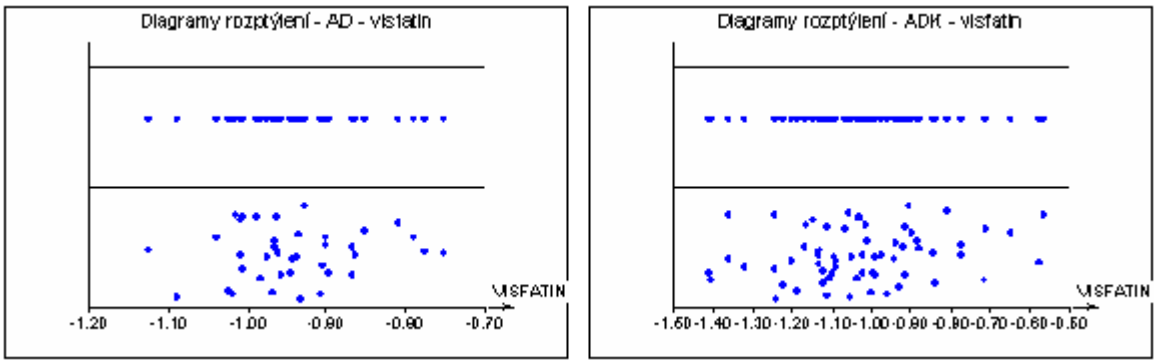
Q-Q graf



Obr. 14 Q-Q grafy pro transformovaná data pro visfatin u pacientů s AD a kontrol (ADK)

Zhodnocení Q-Q grafů: U pacientů s AD i u kontrol je vidět, že naměřená data leží téměř na přímce a nijak zásadně z ní nevybočují. Data tedy mají normální rozdělení.

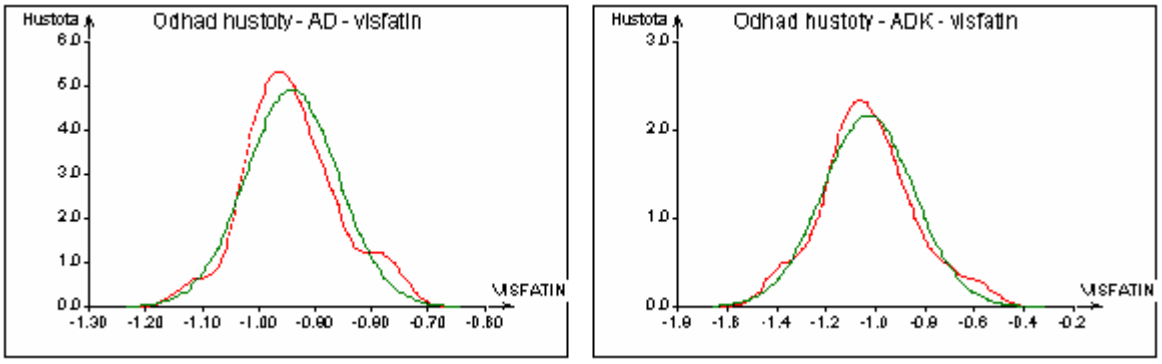
Diagramy rozptýlení



Obr. 15 Diagramy rozptýlení pro transformovaná data pro visfatin u pacientů s AD a kontrol (ADK)

Zhodnocení diagramů rozptýlení: U pacientů s AD i u kontrol je vidět několik mírně odlehlých bodů, které nijak významně nenarušují normální rozdělení dat.

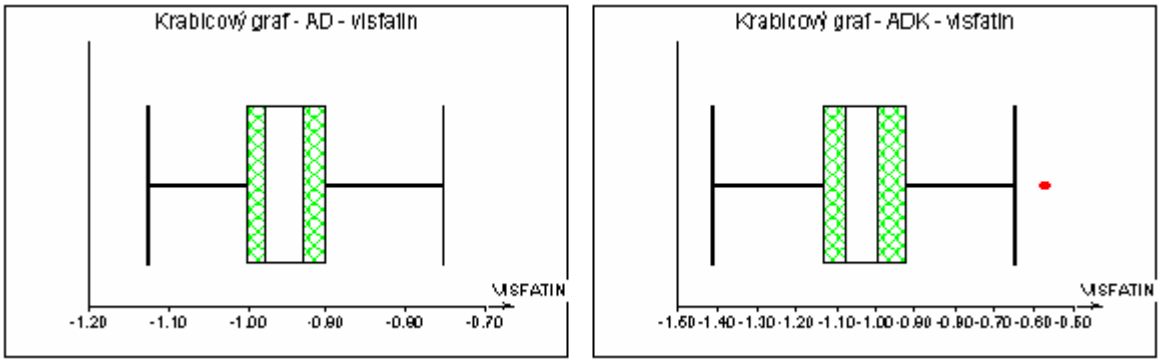
Odhad hustoty



Obr. 16 Odhady hustoty pro transformovaná data pro visfatin u pacientů s AD a kontrol (ADK)

Zhodnocení grafů odhadu hustoty: U pacientů s AD i u kontrol je vidět, že hustota naměřených dat (červená čára) odpovídá hustotě pravděpodobnosti normálního rozdělení (zelená čára). Menší vrcholy na začátku a na konci grafu ukazují mírně odlehlé body.

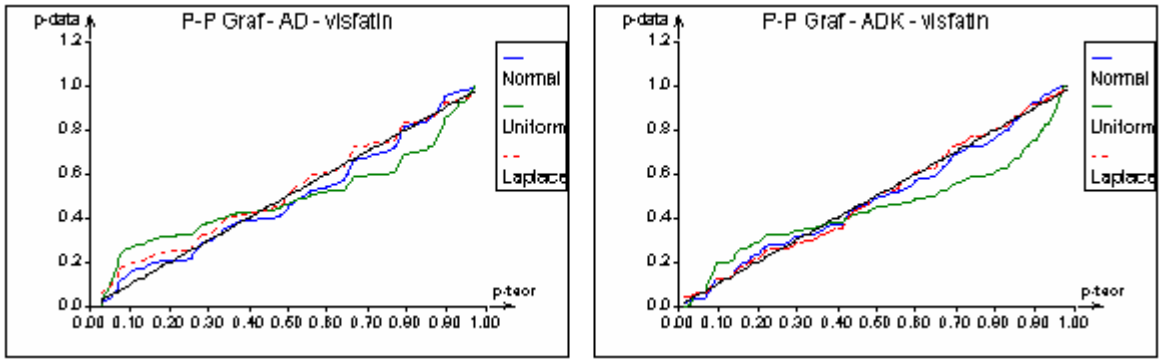
Krabicový graf



Obr. 17 Krabicové grafy pro transformovaná data pro visfatin u pacientů s AD a kontrol (ADK)

Zhodnocení krabicových grafů: Na krabicovém grafu kontrol jsou vidět dva mírně odlehlé body měření, které však významně nenarušují normální rozdělení dat. Na grafu pacientů s AD se žádné odlehlé body nevyskytjí. Data mají proto normální rozdělení.

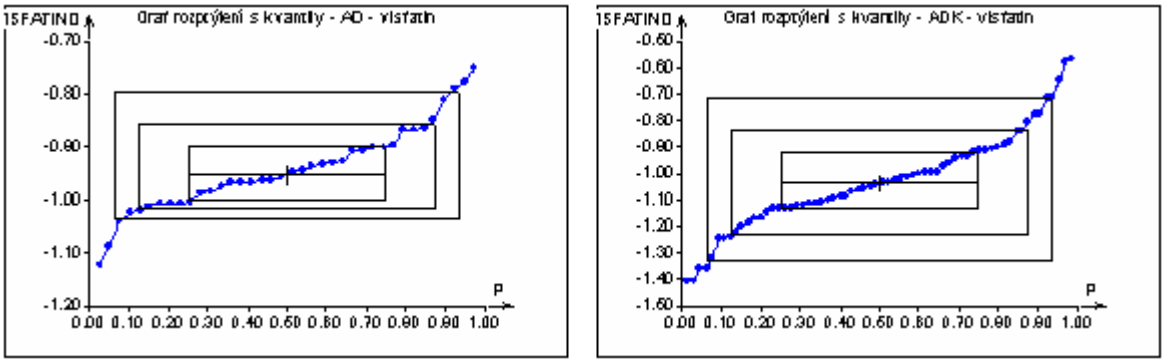
P-P graf



Obr. 18 P-P grafy pro transformovaná data pro visfatin u pacientů s AD a kontrol (ADK)

Zhodnocení P-P grafů: P-P graf pacientů s AD i P-P graf kontrol ukazuje, že naměřená data se nejvíce přibližují normálnímu a Laplaceovu rozložení, data jsou tedy rovnoměrně rozdělena.

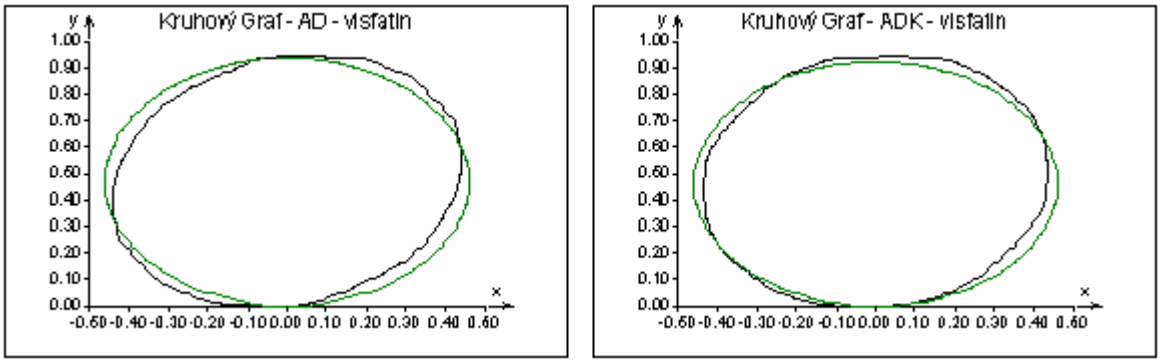
Graf rozptýlení s kvantily



Obr. 19 Grafy rozptýlení s kvantily pro transformovaná data pro visfatin u pacientů s AD a kontrol (ADK)

Zhodnocení grafů rozptýlení s kvantity: Graf rozptýlení s kvantily u pacientů s AD i u kontrol ukazuje několik mírně odlehlých bodů. Vzájemná poloha obdélníků poukazuje na symetrické rozdělení naměřených dat u souboru kontrol (ADK). U pacientů s AD je vidět vliv vyšších hodnot, které mírně narušují symetrii dat.

Kruhový graf



Obr. 20 Kruhové grafy pro transformovaná data pro visfatin u pacientů s AD a kontrol (ADK)

Zhodnocení kruhových grafů: Na kruhovém grafu pacientů s AD i na grafu kontrol je vidět téměř shodný tvar naměřených hodnot a optimálního tvaru pro normální rozdělení. Naměřená data jsou tedy rovnoměrně rozdělena.

Závěr grafických diagnostik transformovaných dat

Grafické diagnostiky odpovídají závěrům základní analýzy dat, tj. transformace dat vedla k normálnímu rozdělení. Data nadále neobsahují vybočující body, pouze několik mírně odlehlých bodů.

1.7.9 Neparametrická jednofaktorová analýza rozptylu

Statistcký program: NCSS 2004

Nejdříve je nutné ověřit homoskedasticitu (shodu rozptylů) porovnávaných skupin. Homoskedasticita je podmínkou pro použití neparametrické ANOVY. Pro její ověření byl použit modifikovaný Levenův test.

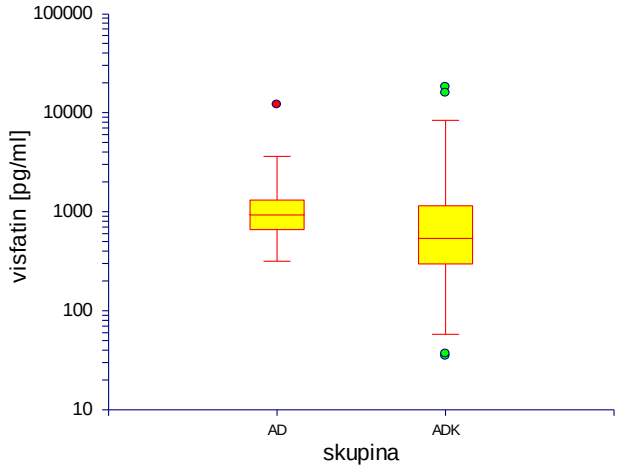
Předpoklady	**testovací hodnota**	**p-hodnota**	**rozhodnutí (na p=0.05)**
modifikovaný Levenův test	0,6848	0,409883	přijímá se

Homoskedasticita byla přijata. Je možné pokračovat v analýze a použít neparametrickou ANOVU – Kruskal-Wallisův test založený na pořadí.

Skupina	**medián**	**95% LCL**	**95% UCL**
pacienti s AD	954,93	801,81	1231,97
kontroly (ADK)	553,42	371,53	706,82

Hypotézy
H0: mediány jsou stejné
Ha: mediány se liší

stupně volnosti	**Chi-Square**	**p-hodnota**	**rozhodnutí (na p=0,05)**
1	11,7663	0,000603	H0 se zamítá



Obr. 21 Krabicový graf pro visfatin u pacientů s AD a u kontrolního souboru (ADK). Osa Y je v logaritmické stupnici. Středová úsečka představuje medián.

<u>Závěr jednofaktorové analýzy rozptylu:</u>

Neparametrický Kruskal-Wallisův test zamítl na hladině α=0,05 nulovou hypotézu o shodě mediánů. Hladiny visfatinu jsou u souboru pacientů s AD statisticky významně vyšší oproti kontrolám.

1.7.10 Vícefaktorová analýza rozptylu

Statistický program: Statgraphics Centurion verze XV.

Po transformaci naměřených dat (všechna data dohromady) vykazují tato data normální rozdělení. V samotné skupině pacientů s AD zůstal jeden vybočující bod, který byl pro následující analýzu odstraněn. Dále se zde vyskytovaly další 3 odlehlé body (1 u pacientů s AD, 2 u kontrol), které byly před další analýzou také vyřazeny. Následně byla provedena vícefaktorová analýza rozptylu, která kromě vlivu skupiny hodnotí i vliv pohlaví a glukózové tolerance na hladinu visfatinu.

Vícefaktorová analýza rozptylu

- Počet závislých proměnných: 1
- Počet kategoriálních faktorů: 3
  - A=pohlaví (muži/ženy)
  - B=glukózová tolerance (N–normální gluk. tolerance/PGT–porušená gluk. tolerance)
  - C=skupina (pacienti s AD/zdravé kontroly)

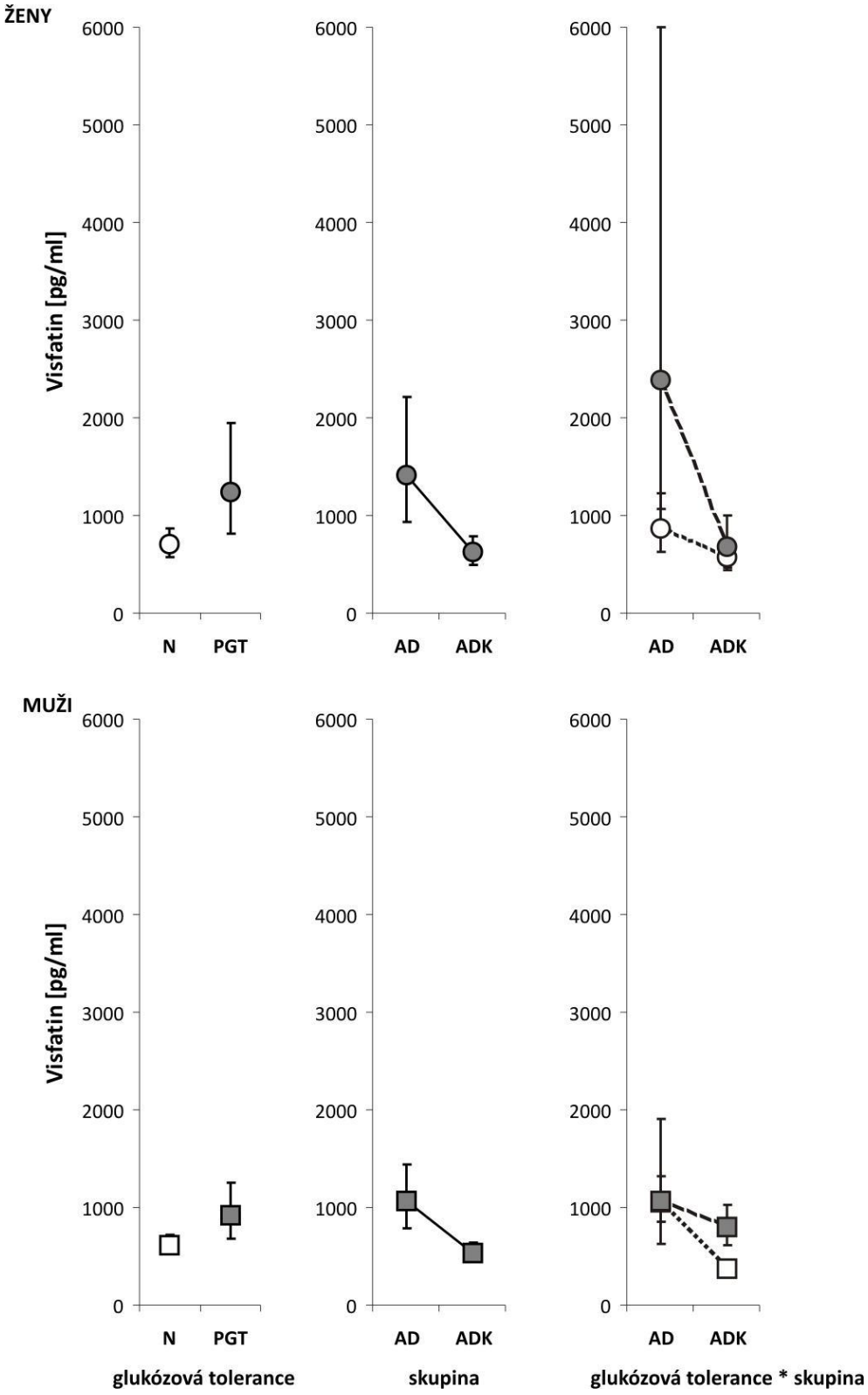
1. výstup analýzy variance pro VISFATIN

Zdroj variability	Součet čtverců	Počet stupňů volnosti	Průměrný čtverec	F-kritérium	P-hodnota
Model	0,48321	7	0,06903	3,61	0,002
Rezidua	1,75751	92	0,0191		
Celkem	2,24072	99			

2. výstup analýzy variance pro VISFATIN

Zdroj variability	Součet čtverců	Počet stupňů volnosti	Průměrný čtverec	F-kritérium	P-hodnota
A=pohlaví	0,02764	1	0,02764	1,45	0,232
B=glukózová tolerance	0,06786	1	0,06786	3,55	0,062
C=skupina	0,25222	1	0,25222	13,2	0,001
A*B	0,03161	1	0,03161	1,65	0,201
A*C	0,0082	1	0,0082	0,43	0,514
B*C	0,0007	1	0,0007	0,04	0,849
A*B *C	0,01071	1	0,01071	0,56	0,455
Rezidua	1,75751	92	0,0191		
Celkem	2,24072	99			

- R-Squared = 21,6 %
- R-Squared (upraveno na počet stupňů volnosti) = 15,6 %



Obr. 22 Interakce mezi faktory glukózové tolerance a pohlaví u pacientů s AD a kontrolních jedinců **Ženy:** glukózová tolerance (B): F=2,79, p=0,099; skupina (C): F=5,9, p=0,018; B×C: F=1,29, p=0,259; **Muži:** glukózová tolerance (B): F=2,99, p=0,093; skupina (C): F=8,67, p=0,006; B×C: F=2,86, p=0,101; **Celkem**: pohlaví (A): F=1,45, p=0,232; glukózová tolerance (B): F=3,55, p=0,062; skupina (C): F=13,2, p=0,001; A×B: F=1,65, p=0,201; A×C: F=0,43, p=0,514; B×C: F=0,04, p=0,849; A×B×C: F=0,56, p=0,455

Závěr vícefaktorové analýzy rozptylu:

První výstup analýzy variance pro visfatin shrnuje výsledky obecného lineárního statistického modelu, který popisuje vztah visfatinu a 3 prediktivních faktorů. Vzhledem k tomu, že P-hodnota je menší než 0,05, je statisticky významný vztah mezi visfatinem a prediktory (95% konfidenční interval).

Druhý výstup analýzy variance pro visfatin testuje statistickou významnost každého z faktorů v modelu. P-hodnota je menší než 0,05 pouze u faktoru „skupina“, tzn. významně rozdílné jsou hladiny visfatinu mezi pacienti s AD a zdravými kontrolami (pacienti s AD mají vyšší hladiny visfatinu ve srovnání s kontrolami). Faktor pohlaví, glukózové tolerance ani interakce mezi faktory nejsou statisticky významné (Obr. 22).

Statistika R-Squared indikuje, že model vysvětluje 21,6 % variability visfatinu. Statistika R-squared upravená na počet stupňů volnosti, která je vhodnější pro srovnávání modelů s různým počtem nezávislých proměnných, indikuje, že model vysvětluje 15,6 % variability visfatinu.

1.8 Genetická část

1.8.1 Gen pro APOE

Statistický program NCSS 2004

Frekvence genotypů a rizikové alely ε4 v genu pro *APOE* u jednotlivých souborů shrnuje Tab. 10. Frekvence této alely se mezi sledovanými soubory nijak významně neliší.

Tab. 10 Frekvence genotypů a rizikové alely ε4 v genu *APOE* u jednotlivých souborů

Soubor	**GDM**	**DM2**	**PGT**	**NGT**
Genotyp *APOE*	**Frekvence (%)**			
22	0,3	0,2	0,0	0,0
23	11,6	12,1	13,5	10,5
24	2,6	1,0	0,0	1,3
33	68,4	66,8	59,6	66,6
34	15,6	19,2	25,0	20,4
44	1,5	0,7	1,9	1,2
Alela ε4	**10,5**	**10,9**	**14,4**	**11,3**

Vliv rizikové alely ε4 v genu pro *APOE* na glukózový a lipidový metabolismus byl hodnocen u následujících parametrů: hodnoty glykémie, hladiny inzulínu a C-peptidu, hodnoty HOMAR a Matsuda indexu, hladiny celkového cholesterolu, LDL cholesterolu,

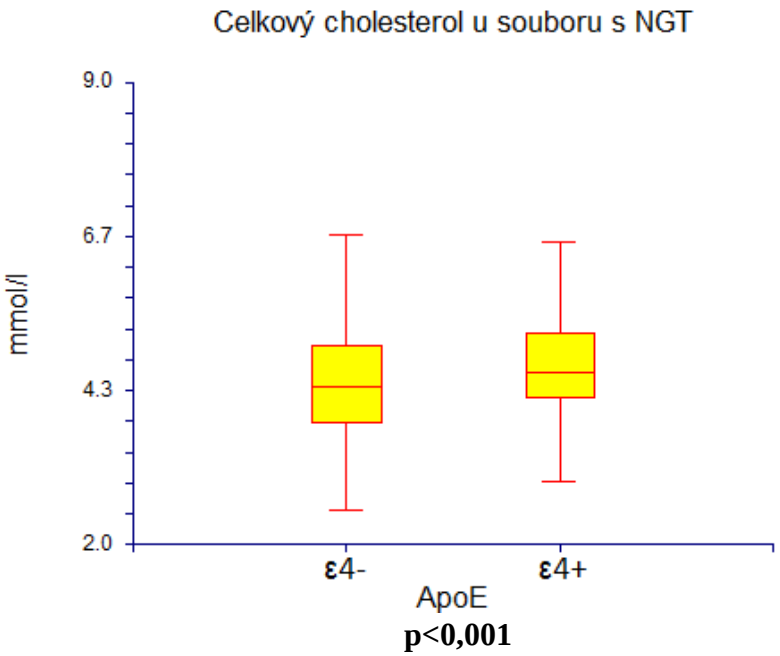
HDL cholesterolu a triacylglycerolů. Vliv alely ε4 na tělesné složení byl hodnocen u následujících parametrů: BMI, BAI, WHR, obvodu pasu, břicha a gluteálního obvodu a u součtu 4 kožních řas (řasa nad tricepsem, nad bicepsem, suprailiakální řasa, subscapulární řasa).

Naměřené hodnoty u pacientů s DM2 shrnuje Tab. 11 (viz příloha). U žádného z parametrů se hodnoty u nositelů nebo nenositelů alely ε4 nijak významně neliší.

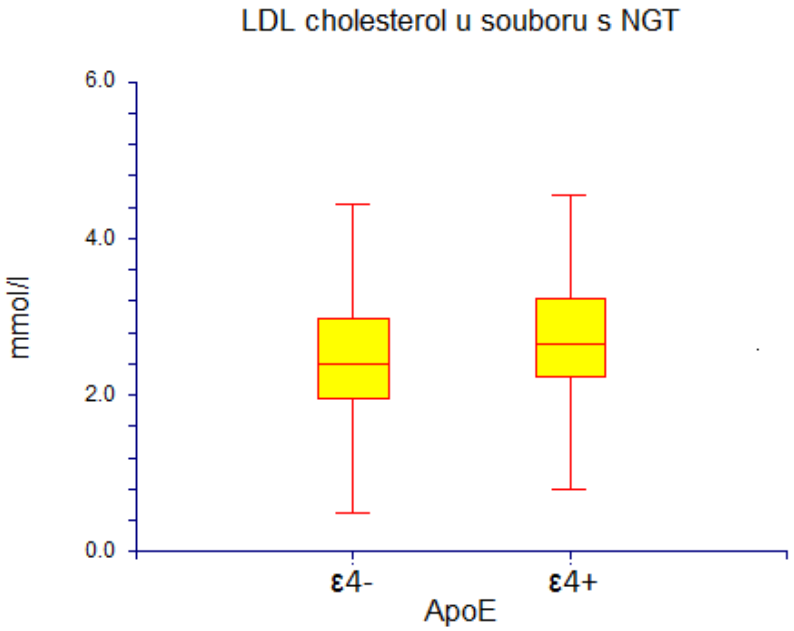
Naměřené hodnoty u pacientek s gestačním diabetem shrnuje Tab. 12 (viz Příloha). U žádného z parametrů se hodnoty u nositelek nebo nenositelek alely ε4 nijak významně neliší.

Naměřené hodnoty u nediabetického souboru s porušenou glukózovou tolerancí shrnuje Tab. 13 (viz Příloha). Naměřené hodnoty se u žádného parametru mezi nositeli a nenositeli rizikové alely nijak významně neliší.

Naměřené hodnoty u nediabetického souboru s normální glukózovou tolerancí shrnuje Tab 14 (viz Příloha). U naměřených hodnot celkového cholesterolu (Obr. 23) a LDL-cholesterolu (Obr. 24) je hladina významnosti $p<0,001$. V obou případech je hladina daného parametru významně vyšší u nositelů alely ε4. U ostatních parametrů se naměřené hodnoty u nositelů nebo nenositelů rizikové alely nijak významně neliší.



Obr. 23 Hladina celkového cholesterolu u nositelů aspoň jedné alely ε4 a u nenositelů této alely v souboru jedinců s NGT



p<0,001

Obr. 24 Hladina LDL-cholesterolu u nositelů aspoň jedné alely ε4 a u nenositelů této alely v souboru jedinců s NGT

1.8.2 Gen pro BIN1

Statistický program NCSS 2004

Frekvence genotypů a rizikové alely G rs744373 v genu pro BIN1 u jednotlivých souborů shrnuje Tab. 15. Frekvence této alely se mezi sledovanými soubory nijak významně neliší.

Tab. 15 Frekvence genotypů a rizikové alely G rs744373 v genu *BIN1* u jednotlivých souborů

Soubor	**GDM**	**DM2**	**PGT**	**NGT**
Genotyp *BIN1*	**Frekvence (%)**			
AA	56,1	52,3	61,7	49,7
AG	35,7	38,9	29,8	43,9
GG	8,2	8,8	8,5	6,4
Alela G	**26,1**	**28,3**	**26,6**	**27,3**

Vliv rizikové alely G v genu pro *BIN1* na glukózový a lipidový metabolismus byl hodnocen u následujících parametrů: hodnoty glykémie, hladiny inzulínu a C-peptidu, hodnoty HOMAR a Matsuda indexu, hladiny celkového cholesterolu, LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a triacylglycerolů. Vliv alely ε4 na tělesné složení byl hodnocen u následujících parametrů: BMI, BAI, WHR, obvodu pasu, břicha a gluteálního obvodu a u sumy4 kožních řas (řasa nad tricepsem, nad bicepsem, suprailiakální řasa, subscapulární řasa).

Naměřené hodnoty u pacientů s DM2 shrnuje Tab. 16 (viz Příloha). U žádného z parametrů se hodnoty u nositelů nebo nenositelů rizikové alely G nijak významně neliší.

Naměřené hodnoty u pacientek s gestačním diabetem shrnuje Tab. 17 (viz Příloha). U naměřených hodnot indexu BAI, gluteálního obvodu a u ∑4 kožních řas je hladina významnosti $p<0,050$. U všech těchto parametrů je hodnota vyšší u nenositelek rizikové alely G. Naměřené hodnoty jsou však na hranici významnosti, a proto jsou pro tuto práci celkem nevýznamné. U ostatních parametrů se naměřené hodnoty u nositelek nebo nenositelek rizikové alely nijak významně neliší.

Naměřené hodnoty u nediabetického souboru s porušenou glukózovou tolerancí shrnuje Tab. 18 (viz Příloha). Naměřené hodnoty se u žádného parametru mezi nositeli a nenositeli rizikové alely G nijak významně neliší.

Naměřené hodnoty u nediabetického souboru s normální glukózovou tolerancí shrnuje Tab 19 (viz Příloha). U naměřených hodnot parametru HOMAR je hladina významnosti $p<0,050$. Hodnoty tohoto parametru jsou vyšší u nenositelů alely G. Naměřené hodnoty jsou však na hranici významnosti, a proto jsou pro tuto práci celkem nevýznamné. U ostatních parametrů se naměřené hodnoty u nositelů nebo nenositelů rizikové alely nijak významně neliší.

7. Diskuze

Alzheimerova demence je neurodegenerativní onemocnění, jehož prevalence neustále stoupá, a které bez včasné diagnózy představuje velkou zátěž pro pacienta i jeho okolí. Je známa spousta markerů podílejících se na patologii AD. Mezi ověřené rizikové faktory se řadí věk a familiární anamnéza. Mezi předpokládané a stále diskutované markery ovlivňující toto onemocnění patří ženské pohlaví, poranění hlavy, hypertenze, hliník nebo kouření (Jirák a Koukolík, 2004). V roce 2005 byl popsán nový adipokin – visfatin (Fukuhara et al., 2005). Později se ukázalo, že tento protein byl pod názvem pre-B cell colony-enhancing factor popsán již v roce 1994 (Samal et al., 1994). Dnes se visfatin řadí mezi prozánětlivé cytokiny. Jako prozánětlivý cytokin hraje visfatin důležitou roli při vzniku zánětu mozku u pacientů s AD.

Hladiny visfatinu v mozku se během normálního stárnutí zvyšují. Vyšší akumulace tohoto cytokinu může vést k poškození hematoencefalické bariéry, tvorbě β-amyloidu a k poškození mozku (Adams 2008). Tato poškození mohou hrát důležitou úlohu v patologii AD. Studie Takebayashiho et al. potvrdila, že vyšší koncentrace plazmatického visfatinu je asociována s vaskulární demencí, endotheliální disfunkcí a s DM2 (Takebayashi et al., 2007).

Imunoreaktivní visfatin byl detekován při kultivaci lidských endotheliálních buněk. Hladiny visfatinu byly nejvíce zvýšeny při výskytu zánětu nebo nemoci. Pokud se objeví zánět, endothelální buňky začnou produkovat více visfatinu (Romacho et al, 2013). Některé studie ukázaly, že i jiné tělní buňky produkují visfatin jako odpověď na zánětlivý stav, např. při akutním zánětu plic – plicní endotheliální buňky (Ye et al., 2005), sepsi – neutrofilní granulocyty (Jia et al., 2004) nebo revmatické artritidě – buňky synoviální membrány (Nowell et al., 2006). Kromě zvyšování syntézy visfatinu ovlivňuje zánět také distribuci tohoto cytokinu a současně zvyšuje sekreci adipokinů do extracelulárního prostoru (Romacho et al., 2013). Studie, které by hodnotily hladinu visfatinu v krevním séru, nebyly zatím publikovány.

Diplomová práce ukázala, že u pacientů s AD se vyskytují vyšší hladiny visfatinu v krevním séru. Práce tedy naznačuje, že hladina visfatinu v krevním séru by mohla fungovat jako prozánětlivý marker, který by mohl přispět k diagnostice AD. Vyšší hladiny visfatinu by mohly odrážet přítomnost zánětu v mozku a tím i omezit další invazivní vyšetření mozku. Diplomová práce nezjistila vliv visfatinu na glukózový a lipidový metabolismus ani jeho vliv na tělesné složení.

AD má dvě formy lišící se od sebe v době nástupu. Genetické pozadí časné formy AD (*early-onset AD*) je dáváno do souvislosti s mutacemi v genech *APP, PSEN1* a *PSEN2* (Vilatela et al., 2012). U pozdní formy AD (*late-onset AD*) není genetické pozadí úplně popsáno. Jediným prokázaným markerem souvisejícím s touto formou AD je gen pro *APOE* a výskyt jeho rizikové alely ε4 (Corder et al., 1993). Tato alela se u pacientů s pozdní formou AD vyskytuje v cca 50 % případů oproti běžné populaci, kde se vyskytuje s frekvencí 20–25 % (Nahid et al., 2007). Studie Vilateli et al. uvádí, že přítomnost jedné alely ε4 zvyšuje riziko vzniku pozdní formy AD 3×, přítomnost obou rizikových alel může až 12× zvyšovat riziko vzniku této formy AD (Vilatela et al., 2012). V evropské populaci se alela ε4 vyskytuje s frekvencí 7,5–15,6 % (McKay et al., 2011), v americké populaci s frekvencí 20–30 % (Thies and Bleier,2013), v asijské populaci se vyskytuje s frekvencí 6,6–8,2 % (Zhou et al., 2012). Studie Beránka et al., která hodnotila frekvenci rizikové alely v České republice (vzorky byly odebírány v Praze a v Hradci králové) ukázala, že alela ε4 se zde vyskytuje s frekvencí 15,7 % (Beránek et al., 1999).

Riziková alela ε4 je marker, který zvyšuje riziko vzniku AD, ale sám o sobě tuto nemoc nevyvolá. Vědět, zda daný jedinec je nositelem nebo nenositelem této alely je přínosem pro případnou diagnostiku AD, ne však nezbytnou a jedinou podmínkou pro potvrzení diagnózy. Přítomnost AD v rodině také zvyšuje riziko vzniku této nemoci, které je však podmíněno kombinací genetických faktorů s vlivy zevního prostředí (Jirák a Koukolík, 2004).

V diplomové práci jsme potvrdili, že riziková alela ε4 souvisí s lipidovým metabolismem. U kontrolního (nediabetického) souboru u jedinců s normální glukózovou tolerancí byly vyšší hladiny celkového a LDL-cholesterolu u nositelů této alely oproti nenositelům této alely. Souvislost s glukózovým metabolismem a vlivem na tělesné složení nebyla prokázána. Frekvence alely ε4 se mezi sledovanými soubory významně nelišila.

V posledních letech vzešlo z celogenomových asociačních studií 10 nových genů souvisejících s pozdní formou AD. Mezi nejvýznamnější z nich patří gen *BIN1* a jeho polymorfismus rs744373 (Hu et al, 2011, Kamboh et al. 2012). Produkt tohoto genu se podílí na tvorbě zánětu, propojuje mikrotubuly tau proteinu a podílí se tak na tvorbě neurofibrilárních klubek (Meunier at el., 2009). Produkt genu *BIN1* se účastní metabolismu cholesterolu, synaptické funkce a podílí se na imunitní odpovědi (Karch et al., 2012).

U pacientů s AD byly naměřeny vyšší hladiny exprese tohoto genu v mozku oproti zdravým kontrolám. *BIN1* má tedy neuropatologickou úlohu v mozkové tkáni. Zvýšená

exprese genu *BIN1* je spojována s nástupem AD v pozdějším věku a s rychlejším průběhem tohoto onemocnění (Kach et al., 2012). Studie Tana et al. uvádí, že minoritní alela G polymorfismu rs744373 koreluje s rychlostí poklesu kognitivních funkcí (Tan et al., 2013).

Diplomová práce neprokázala vliv minoritní alely G polymorfismu rs744373 v genu pro *BIN1* na glukózový a lipidový metabolismus ani vliv na tělesní složení. Frekvence této alely se mezi sledovanými soubory významně nelišila.

Mnoho studií prokázalo spojitost mezi DM2, AD a inzulínovou rezistencí. Evropská studie Otty et al. zjistila, že DM2 může až 2× zvyšovat riziko vzniku AD (Ott et al., 1996). Na druhou stranu některé studie žádnou spojitost mezi těmito patologiemi nenašly (Thambisetty et al., 2013). Objevila se i studie, která podpořila návrh, že DM2 může paradoxně působit jako protektivní faktor AD (Gaspariny et al., 2002). Výsledky diplomové práce neprokázaly souvislost rizikové alelou ε4 a minoritní alely G s hladinou inzulínu a glukózovým metabolismem.

V poslední době se také často vyskytuje otázka, zda by AD mohla být považována za diabetes mellitus 3. typu. Některé studie ukazují, že AD je v zásadě specifická mozková forma diabetu (Rivera et al, 2005; Stárka 2009). Tyto studie potvrzují i pokusy na zvířatech, kterým byl intracerebrálně podán streptozocin (látka toxická pro β-buňky produkující inzulín). To vedlo k nedostatku mozkového nikoli pankreatického inzulínu a k inzulínové rezistenci. Současně došlo ke vzniku neurodegenerativních změn, které měly společné znaky s AD (de la Monte et al., 2006). AD je asociována s progresivní mozkovou inzulínovou rezistencí bez přítomnosti DM2, obezity nebo periferní inzulínové rezistence (Steen et al., 2005). Nicméně studie prováděné *post mortem* ukazují, že molekulární, biochemické a signální abnormality v AD jsou prakticky identické s těmi, které se vyskytují u DM1 a DM2 (Pasquier et al., 2006). Stále však není potvrzena stoprocentní korelace mezi AD a DM (Arvanitakis, 2006), a proto se označení diabetes mellitus 3. typu pro AD nepoužívá.

Z již publikovaných studií i z této diplomové práce vyplývá, že u pozdní formy AD nelze pochybovat o významnosti genetického pozadí této nemoci. Prozatím se však pouze toto pozadí nedá využít k diagnostice AD a je třeba použít více markerů pro potvrzení případně vyloučení přítomnosti tohoto onemocnění.

8. Závěr

Alzheimerova demence je závažné onemocnění, jehož prevalence neustále stoupá a je odhadováno, že každých 20 let se počet pacientů s AD zdvojnásobuje. AD je velkou zátěží nejen pro samotné pacienty, ale i pro blízké příbuzné. AD bere pacientům možnost důstojně zestárnout a odkazuje je na trvalou pomoc ostatních. I financování léčby AD je velmi nákladné.

Mnohé studie zabývající se AD se snaží odhalit markery, které by včas odhalily nástup AD a umožnily tak zkvalitnit stáří pacientům trpících touto chorobou. V posledních letech se objevil nový významný biochemický marker – visfatin. Tento prozánětlivý cytokin byl zkoumán v mozkové tkáni, ale i při kultivaci endoteliálních buněk. Diplomová práce se zaměřila na hladiny visfatinu v krevním séru (studie zabývající se vyšetřením hladiny visfatinu z krve zatím nebyly publikovány). Vyšetření hladiny visfatinu z krve by mohlo být možné i při běžné preventivní prohlídce, aniž by byla nutná biopsie mozku nebo jiná invazivní metoda. Z výsledků diplomové práce vyplývá, že vyšetření hladiny visfatinu z krve by mohlo být použito jako další z možných diagnostický markerů.

U pozdní formy AD se předpokládá polygenní dědičnost. Apolipoprotein E a riziková alela ε4 v genu pro *APOE* je brána jako nejvýznamnější genetický rizikový faktor ovlivňující AD. Diplomová práce potvrdila význam této alely jako rizikového faktoru. V celogenomových asociačních studiích bylo popsáno dalších 10 genů ovlivňujících AD. Nejvýraznějším rizikovým genem vycházejícím z těchto studií je gen *BIN1* a jeho polymorfismus rs744373, na který se naše studie zaměřila. Byla zkoumána asociace tohoto genu a inzulínové rezistence, která se často vyskytuje u pacientů s AD. Studie souvislost mezi inzulínovou rezistencí a genem *BIN1* nepotvrdila.

9. Literatura

1. Adams JD Jr. Alzheimer´s disease, ceramide, visfatin and NAD. *CNS & Neurological Disorders – Drug Targets.* (2008), 7(6), 492-498(7).

2. Alloul K, Sauriol L, Kennedy W, Laurier C, Tessier G, Novosel S and Contadriopoulos A. Alzheimer´s disease: a review of the disease, its epidemiology and economic impact. Archives of Gerontology and Geriatrics. (1998), 27(3), 189-221.

3. AL-Sushaimi EA and Shehzad A. Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. European *Journal of Medical research*. (2013), 18(12), 1-13.

4. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* (2013), 36(1), 67-74.

5. Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE and Lustman PJ. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes. *Diabetes Care.* (2001), 24(6), 1069-78.

6. Arvanitakis Z, Schneider JA, Wilson RS, Li Y, Wang Z and Bennett DA.. Diabetes is related to cerebral infarction but not to AD pathology in older persons. *Neurology.* (2006), 67(11), 1960-5.

7. Becker JT, Chang Y-F, Lolez OL, Dew MA, Sweet RA, Barnes D, Yaffe K, Young J, Kuller L and Reynolds ChF. Depressed mood is not a risk factor for incident dementia in a community-based cohort. *Am J Geriatr Psychiatry.* (2009), 17(8), 653-663.

8. Beránek M, Friedecký B and Palicka V. Heterogenity of the frequency of the apolipoprotein E-epsilon 4 allele in the European population. *Časopis lékařů českých.* (1999), 138(16), 500-3.

9. Bergman RN, Stefanovski D and Watanabe RM. A better index of body adiposity. *Obesity (Silver Spring).* (2011), 19(5), 1083-1089.

10. Bergman RN, Stefanovski D and Kim SP. Systems analysis and the prediction and prevention of Type 2 diabetes mellitus. *Current Opinion in Biotechnology.* (2014), 28, 165-170.

11. Binici By DN, Karaman A, Coskun M, Oglu UA and Ucar F. Genomic damage in patiens with type-2 diabetes mellitus. *Genet Couns.* (2013), 24(2), 149-56.

12. Bravata DM, Wells CK, Concato J, Kernan WN, Brass LM and Gulanski BI. Two measures of insulin sensitivity provided similar information in a U.S. population. *Journal of Clinical Epidemiology.* (2004), 57(11),1214-7.

13. Brown LC, Majumdar SR, Newman SC and Johnson JA. Type 2 diabetes does not increase risk of depression. *CMAJ.* (2006), 175(1), 42-6.

14. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL and Periack-Vance MA. Gene dose of Apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer´s disease in late onset Families. *Science.* (1993), 261(5123), 921-3.

15. Craft S and Watson GS. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanism. *THE LANCET Neurology.* (2004), 3(3), 169-178.

16. Craft S, Asthana S, Schellenberg G, Baker L, Cherrier M, Boyt AA, Martins RN, Raskind M, Peskind E and Plymate S. Insulin effects on glucose metabolism, memory, and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer´s disease differ according to apolipoprotein-E genotype. *Annals of the New York Academy of Science.* (2000), 903, 222-228.

17. Cukierman T, Gerstein HC and Williamson JD. Cognitive decline and dementia in diabetes- systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia.* (2005), 48(12), 2460-9.

18. de la Monte SM and Wands JR. Review of insulin and insulin-like growth factor and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer´s disease. *Journal Of Alzheimer's Disease: JAD.* (2006), 9(2), 167-81.

19. Egede LE. Effects of depression on work loss and disability bed days in individuals with diabetes. *Diabetes Care.* (2004), 27(7), 1751-3.

20. Farooqui AA, Farooqui T, Panza F and Frisardi V. Metabolic syndrome as a risk factor for neurological disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences.* (2012), 69(5), 741-762.

21. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E and Scazufca M. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet.* (2005), 366(9503), 2112-2117.

22. Finkelstein EA, Bray JW, Chen H, Larson MJ, Miller K, Tompinks C, Keme A and Manderscheid R. Prevalence and costs of major depression among elderly claimants with diabetes. *Diabetes Care.* (2003), 26(2), 415-20.

23. Fitzpatrick AL, Kuller LH, Ives DG, Lopez OL, Jagust W, Breitner JCS, Jones B, Lyketsos C and Dulberg C. Incidence and prevalence of dementia in the cardiovascular health study. *Journal of the American Geriatrics Society.* (2004), 52(2), 195-204.

24. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL and Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults. *The Journal of the American Medical Association.* (2010), 303(3), 235-41.

25. Frölich L, Blum-Degen L, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich L, Laufer S, Muschner D, Thalheimer A, Türk A, Hoyer S, Zöchling R, Boissl KW, Jellinger K and Riederer P. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer´s disease. *Journal of Neural Transmission.* (1998), 105(4-5). 423-38.

26. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y and Shimomura I. Visfatin: A protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science.* (2005), 307(5708), 426-30.

27. Garten A, Petzold S, Körner A, Omak S-I and Kiess W. Nampt: Linking NAD biology, metabolism, and cancer. *Trends Endocrinol Metab.* (2009), 20(3), 130-138.

28. Gasparini L, Netzer WJ, Greengard P and Xu H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer´s disease? *Trends in Pharmacological Scienses.* (2002), 23(6), 288-293.

29. Gatz M, Fiske A, Reynolds ChA, Wetherell JL, Johansson B and Pedersen NL. Sex differences in genetics risk for dementia. *Behavior Genetics.* (2003), 33(2), 95-105.

30. Golden SH, Lazo M, Carnethon M, Bertoni AG, Schreiner PJ, Diez RAV, Lee HB and Lyketsos C. Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes. *The Journal of the American Medical Association.* (2008), 299(23), 2751-9.

31. Greenwalt DM, Sieberts SK, Cornelis MC, Girman CJ, Zhong H, Yang X, Guiney J, Qi L and Hu FB. Integrating genetic association, genetics of gene expression, and single nukleotide polymorphism set analysis to identify susceptibility loci for Type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Epidemiology.* (2012), 176(5), 423-430.

32. Gustafson DR, Bäckman K, Waern M, Östling S, Guo X, Znadi P, Mielke MM, Bengtsson C and Skoog I. Adiposity indicators and dementia over 32 years in Sweden. *Neurology.* (2009), 73(19), 1559-1566.

33. Hampel H, Prvulovic D, Teipel S, Jessen F, Luckhaus Ch, Frölich L, Riepe MW, Dodel R, Leyhe T, Bertram L, Hoffmann W and Faltraco F. The future of Alzheimer´s disease: The next 10 years. *Progress in Neurobiology.* (2011), 95(4), 718-28).

34. Hardy J and Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer´s disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* (2002), 297(5580), 353-6.

35. Hu X, Pickering E, Liu YC, Hall S, Fournier H, Katz E, Bryan D, John S, Van Eerdewegh P and Soares H. Meta-analysis for genome-wide association study identifies multiple variants at the BIN1 locus associated with Late-onset Alzheimer´s disease. *Plos one.* (2011), 6(2), e16616.

36. Jia SH, Li Y, Parodo J, Kapus A, Fan L, Rotstein OD and Marshall JC. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *The Journal of Clinical Investigation.* (2004), 113(9), 1318-1327.

37. Jirák R a Koukolík F. *DEMENCE Neurobiologie, klinický obraz, terapie.* 1. vyd. Praha: Galén, 2004. ISBN 80-7262-268-4.

38. Jorm AF. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry.* (2001), 35(6), 776-781.

39. Kalaria RN. Vascular basis for brain degeneration: Faltering controls and risk factors for dementia. *Nutrition reviews.* (2010), 68(Suppl 2), 74-87.

40. Kamboh MI, Demirci FY, Wang X, Minster RL, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Saykin AJ, Jun G, Baldwin C, Logue MW, Buros J, Farrer L, Pericak-Vance MA, Haines JL, Sweet RA, Ganguli M, Feingold E, DeKosky ST, Lopez OL and Barmada MM. Genome-wide association study of Alzheimer´s disease. *Translational Psychiatry.* (2012), 2, e117.

41. Karch CM., Jeng AT., Nowotny P, Cady J, Cruchaga C, Goate AM.. Expression of novel alzheimer´s disease risk genes in control and alzheimer´s disease brains. *Plos one.* (2012), 7(11), e50976.

42. Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature.* (2010), 464(7288), 504-512.

43. Kesavulu MM, Rao KB, Giri R, Vijaya J, Sumbramanyam G and Apparao Ch. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diabetes Research and Clinical Practice.* (2001), 53(1), 33-9.

44. Knol MJ, Twisk WR, Beckman ATF, Heine RJ, Snoek FJ and Pouwer F. Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A meta-analysis. *Diabetologia.* (2006), 49(5), 837-45.

45. Lesort M and Johnson GVW. Insulin-like growth factor-1 and insulin mediate transient site-selective increases in tau phosphorylation in primary cortical neurons. *Neuroscience.* (2000), 99(2), 305-316.

46. Li L, Yang G, Li Q, Tang Y, Yang M, Yang H and Li K. Changes and relations of cicrulating visfatin, apelin and resistin levels in normal, impaired glukose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* (2006), 114(10), 544-8.

47. Liu L-Y, Wang F, Zhang X-Y, Juany P, Lu Y-B, Wei E-Q and Zhang P. Nicotinamide phosphoribosyltransferaze may be involved in age-related brain diseases. *Plos one*. (2012), 7(10), e44933.

48. López S, Bermúdez B, Pacheco YM, Villar J, Abia R and Muriana FJ. Distinctive postprandial modulation of beta cell function and insulin sensitivity by dietary fats: monounsaturated compared with saturated fatty acids. *American Journal of Clinical Nutrition.* (2008), 88(3), 638-44.

49. Luchsinger JA and Gustafson DR. Adiposity, type 2 diabetes and Alzheimer´s disease. *Journal of Alzheimer´s disease.* (2009), 16(4), 693-704.

50. Maccioni RB, Farías G, Morales I and Navarrete L. The revitalized tau hypothesis on Alzheimer´s disease. *Archives of Medical Research.* (2010), 41(3), 226-31.

51. Mahley RW. and Rall SC.. APOLIPOPROTEIN E: Far than a lipid transport protein. *Annual Reviews Genomics Human Genetics.* (2000), 1, 507-37.

52. Matsuda M and DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. *Diabetes Care.* (1999), 22(9), 1462-1470.

53. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF and Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistence and β-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* (1985), 28(7), 412-9.

54. McGee KC, Harte AL, da Silva NF, Al-Daghri N, Creely SJ, Kusminski ChM, Tripathi G, Levick PL, Khanolkar M, Evanc M, Chittari MV, Patel V, Kumar S and McTernan PG. Visfatin is regulated by Rosiglitazone in Type 2 Diabetes Mellitus and Influenced by NFkB and JNK in Human Abdominal Subcutaneous Adipocytes. *Plos One.* (2011), 6(6), e20287.

55. McKay GJ, Silvestri G, Chakravarthy U et al.. Variations in Aolipoprotein E frequency with age in a pooled analysis of a large group of older people. *American Journal of Epidemiology.* (2011), 173(2), 1357-1364.

56. Mercader J, Granados N, Caimari A, Oliver P, Bonet ML and Palou A. Retinol-binding protein 4 and nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin in rat obesity models. *Hormone and Metabolic Research.* (2008), 40(7), 467-72.

57. Meunier B, Quaranta M, Daviet L, Hatzoglou A and Leprince C. The membrane-tubulating potential of amphiphysin 2/BIN1 is dependent on the mikrotubule-binding cytoplasmic linker protein 170 (CLIP-170). *European Journal of Cell Biology.* (2009), 88(2), 91-102.

58. Mochen AR., Geiger S, Gerner R and Tilg H. Pre-B cell colony enhancing factor/NAMPT/visfatin and its role in inflammation-related bone disease. *Elsevier.* (2010), 690(1-2), 95-101.

59. Moreira RO, Campos SC and Soldera AL. Type 2 Diabetes mellitus and Alzheimer´s disease: from physiopathology to treatment implications. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews.* (2013), n/a-n/a.

60. Morley JE and Farr SA. The role of amyloid-beta in the regulation of memory. *Biochemical Pharmacology.* (2014), 88(4), 479-85.

61. Nahid AA., Al Bugami M and Loy-English I. Gender differences in dementia risk factors. *Gender Medicine.* (2007), 4(2), 120-9.

62. Nouwen A, Winkley T, Twisk J, Lloyd CE, Peyrot M, Ismail K, Pouwer F and European Depresion in Diabetes (EDID) Research consortium. Type 2 diabetes mellitus as a risk factor for the onset of depression: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia.* (2010), 53(12), 2480-6.

63. Nowell MA, Richards PJ, Fielding CA, Ognjanovic S, Topley N, Williams AS, Bryant-Greenwood G and Jones SA. Regulation of pre-B cell colony-enhancing factor by STAT-3-dependent interleukin-6 *trans*-signaling. *Arthritis & Rheumatism.* (2006), 54(7), 2084-2095.

64. O´Connor PJ, Crain LA, Rush WA, Hanson AM, Fischer LR and Kluznik JC. Does diabetes double the risk of depression? *Annals of Family Medicine.* (2009), 7(4), 328-335.

65. Obrosova IG, Van Huysen C, Fathallah L, Cao X, Greene DA and Stevens MJ. An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes- induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. *The FASEB Journal.* (2001), 16(1), 123-5.

66. Ogden CL., Carrol MD. and Flegal KM.. High body mass index for age among US children and adolescents, 2003-2006. *The Journal Of the American Medical Association.* (2008), 299(20), 2401-2405.

67. Ognjanovic S, Bao S, Yamamoto SY, Garibay-Tupas J, Samal B and Bryant-Greenwood GD. Genomic organization of the gene conding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *Journal of Molecular Endocrinology.* (2001), 26(2), 107-17.

68. Ott A, Stolk RP, Hofman A, van Harskamp F, Grobbee E and Breteler MMB. Association of diabetes mellitus and dementia:The Rotterdam Study. *Diabetologia.* (1996), 39(11), 1392-1397.

69. Pan H-Z, Zhang H, Chang D, Li H and Sui H. The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *British Journal of Ophtthalmology.* (2008), 92, 548-551.

70. Pasquier F, Boulogne A, Leys D and Fontaine P. Diabetes mellitus and dementia. *Diabetes & Metabolism.* (2006), 32(5), 403-414.

71. Pendlebury ST and Rothwell PM. Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementi: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology.* (2009), 8(11), 1006-1018.

72. Perreault L, Pan Q, Mather KJ, Watson KE, Hamman RF and Kahn SE. Effect of regression form prediabetes to normal glucose regulation on long-term reduction in diabetes risk: results from the Diabetes prevention program outcomes study. *Lancet.* (2012), 379(9833), 2243-51.

73. Piers LS, Walker KZ, Stoney RM, Soares MJ and O´Dea K. The influence on the type of dietary fat on postprandial fat oxidation rates: monounsaturated (olive oil) vs saturated fat (cream). *International Journal of Obesity.* (2002), 26(6), 814-21.

74. Pimplikar SW. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer´s disease. *The International Journal of Biochemistry &Cell Biology.* (2009), 41(6), 1261-1268.

75. Poulen P, Kyvik OK, Vaag A and Beck-Nielsen H. Heritability of Type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glukose tolerance – a population-based twin study. *Diabetologia.* (1999), 42(2), 139-45.

76. Profenno LA, Porsteinsson AP and Faraone SV. Meta-analysis of Alzheimer´s disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biological Psychiatry.* (2010), 67(6), 505-512.

77. Prokic I, Cowling BS and Laporte J. Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *Journal of Molecular Medicine.* (2014), 92(5), 453-463.

78. Raber J, Huang Y and Ashford WJ.. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiology of Aging.* (2004), 25(5), 641-50.

79. Raffaitin Ch, Gin H, Empana J-P, Helmer C, Berr C, Tzourio Ch, Portet F, Dartigues J-F, Alpérovitch A and Barberger-Gateau P. Metabolic Syndrome and risk for incident Alzheimer´s disease or vascular dementia. *Diabetes Care.* (2009), 32(1), 169-174.

80. Ramirez-Bermudez J. Alzheimer´s disease: Critical notes on the history of a medical concept. *Archives of Medical Research.* (2012), 43(8), 595-599.

81. Ravona-Springer R and Schnaider-Beeri M. The association of diabetes and dementia and possible implications for nondiabetic populations. *Expert Rev Neurother.* (2011), 11(11), 1609-1617.

82. Reitz Ch, Brayne Cand and Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* (2011), 7(3), 137-152.

83. Ribaric G, Buchwald JN a nd McGlennon TW. Diabetes and weight in comparative studie sof bariatric surgery vs conventional medical therapy: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Surgery*. (2014), 24(3), 437-455.

84. Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR and de la Monte SM. Insulin and insulin-like growth factor expresion and function deteriorate with progression of Alzheimer´s disease: link to brain reductions in acetylcholine. *Journal Of Alzheimer's Disease: JAD.* (2005), 8(3), 247-68.

85. Romacho T, Villalobos LA, Cercas E, Carraro R, Sánchez-Ferrer CF and Peiró C. Visfatin as a novel mediator released by inflamed human endothelial cells. *Plos One.* (2013), 8(10), e78283.

86. Rotella F and Mannuci E. Diabetes mellitus as a risk factor for depression. A meta-analysis of longitudinal studies. *Diabetes Research and Clinical Practice.* (2013), 99(2), 98-104.

87. Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie Ch, Suggs S and McNiece I. Cloning and charakterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Molecular and Cellular Biology.* (1994), 14(2), 1431-1437.

88. Serván PR. Obesity and diabetes. *Nutrición Hospitalaria.* (2013), 28(5), 138-143.

89. Schulingkamp RJ, Pagano TC, Hung D and Raffa RB. Insulin receptors and insulin action in brain: review and clinical implications. *Neuroscience and Biobehavioral reviews.* (2000), 24(8), 855-72.

90. Solfrizzi V, Scafato E, Capurso C, D´Introno A, Colacicco AM, Frisardi V, Vendemiale G, Baldereschi M, Crepaldi G, Di Carlo A, Galluzzo L, Gandin C, Inzitari D, Maggi S, Capurso A, Panza F. Metabolic syndrome, mild cognitive impairment, and progression to dementia. The Italian longitudinal study of aging. *Neurobiology of Aging.* (2011), 32(11), 1932-1941.

91. Sorrentino P, Uiliano A, Polverino A, Jacini F and Sorrentino G. The dark sides of anuloid in Alzheimer´s disease pathogenesis. *FEBS letters.* (2014), 588(5), 641-52.

92. Stárka L. Diabetes mellitus 3. typu?? *Diabetologie.* (2009), 12(1), 16-18.

93. Steen E, Terry BM, Rivera EJ., Cannon JL., Neely TR., Tavares R, Xu XJ, Wands JR and de la Monte SM. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression nd signaling mechanisms in Alzheimer´s disease – is this type 3 diabetes? *Journal of Alzeimer´s Disease.* (2005), 7(1), 63-80.

94. Suri S, Heise V, Trachtenberg AJ and Mackay CE. The forgotten APOE allele: A review of the evidence and suggested mechanisms fir the protective effect of APOE ε2. *Elseiver.* (2013), 37(10 Pt 2), 2878-86.

95. Takebayashi K, Suetsugu M, Wakabayashi S, Aso Y and Inukai T. Association between plasma visfatin and vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* (2007), 56(4), 451-458.

96. Tan M-S, Yu J-T and Tan L. Bridging integrator 1 (BIN1): form, function, and Alzheimer´s disease. *Trends in Molecular Medicine.* (2013), 19(10), 594-603.

97. Thambisetty M, Metter J, Yang A, Dolan H, Marano Ch, Zonderman AB, Troncoso JC, Zhou Y, Wong DF, Ferrucci L, Egan J, Resnick SM and O´Brien RJ. Glucose Intolerance, Insulin Resistance, and Pathological Features of Alzheimer Disease in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *JAMA Neurology.* (2013), 70(9), 1167-1172.

98. Thies W and Bleiler L. 2013 Alzheimer´s disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia : the Journal of the Alzheimer's Association.* (2013), 9(2), 208-245.

99. Vilatela MEA, López-López M and Yescas-Gómez P. Genetics of Alzheimer´s disease. *Archives of Medical Research.* (2012), 43(8), 622-631.

100. Weisgraber KH, Rall SC Jr. and Mahley W. Human E apoprotein heterogenity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *Journal of Biological Chemistry.* (1981), 256(17), 9077-83.

101. Weishaupt JH, Kussmaul L, Grötsch P, Heckel A, Rohde G, Roming H, Bähr M and Gillardon F. Inhibition of CDK5 is protective in necrotic and apoptotic paradigms of neuronal cell death and prevents mitochondrial dysfunction. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 2003, 24(2), 489-502.

102. Whitmer RA, Gustafson DR, Barret-Connor E, Haan MN, Gunderson EP and Yaffe K. Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *Neurology.* (2008), 71(14), 1057-64.

103. Yaffe K, Weston AL, Blackwell T and Krueger KA. The metabolic syndrome and development of cognitive impairment among older women. *Archives of Neurology.* (2009), 66(3), 324-328.

104. Yang H, Lavu S and Sinclair DA. Nampt/PBEF/Visfatin: A regulátor of mammalian health and longevity? *Exp Gerontol.* (2006), 41(8), 718-726.

105. Ye SQ, Simon A, Maloney JP, Zambelli-Weiner A, Gao L, Grant A, Easley RB, McVerry BJ, Tuder RM, Standiford T, Brower RG, Barnes KC and Garcia JGN. Pre-B-cell colony-enhancing factor as a potential novel biomarker in acute lung injury. *ATSJournals.* (2005), 171(4), 361-370.

106. Zhou X, Miamo H, Rausch WD, Long M, Luo X, Yu H, Zhang X, Bayahemaiti K, Abulizi P, and Keyimu K. Association between apolipoprotein E gene polymorphism and Alzheimer´s disease in Uighur and Han populations. *Psychogeriatrics.* (2012), 12(2), 83-87.

10. Internetové zdroje

1. Česká Alzheimerovská společnost [online]. [cit. 12.3.2014].

Dostupné z: http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/vyskyt-demence/

2. Diabetická asociace ČR [online]. [cit. 20.2.2014].

Dostupné z: http://www.diabetickaasociace.cz/co-je-diabetes/data-o-diabetu-v-cr/

3. International Diabetes Federation [online]. [cit. 20.2.2014].

Dostupné z: http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures

4. The Emory Health Sciences Research Blog [online]. [cit. 23.6.2014].

Dostupné z: http://www.emoryhealthsciblog.com/tag/pathology/

11. Seznam zkratek

ABCA7	ATP-binding cassette transporter
AD	Alzheimerova demence
ADK	Alzheimerova demence-kontroly
APOE	apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
ATP	adenosintrifosfát
BAI	body adiposity index
BIN1	bridging integrator-1
BMI	body mass index
CD2AP	CD2-associated protein
CD33	sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin
CDK5	cyklin-dependentní kináza 5
CLU	clusterin
CNS	centrální nervová soustava
CR1	complement receptor 1
DM	diabetes mellitus
DM1	diabetes mellitus 1. typu
DM2	diabetes mellitus 2. typu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbet assay
EPHA1	ephrin receptor A1
GDM	gestační diabetes mellitus
GWAS	celogenomová asociační studie (genome-wide association study)
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
HOMAR	index inzulínové rezistence (homeostasis model assessment-estimated insulin resistance)
IDE	inzulín degradující enzym
IDF	International Diabetes Federation
IR	inzulínová rezistence
LCL	lower control limit
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (low density lipoprotein)

MS4A4	cluster--membrane-spanning 4-domains subfamily A
MS4A6E	membrane-spanning 4-domains subfamily A member 6E
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NAMPT	nikotinamid fosforybosyltransferáza
NGT	normální glukózová tolerance
OGTT	orální glukózový toleranční test
PBEF	Pre-B cell colony-enhancing factor
PCR	polymerázová řetězcová reakce (polymerase chain reaction)
PGT	porušená glukózová tolerance
PICALM	phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein
PSEN1	presenilin 1
PSEN2	presenilin 2
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	PCR v reálném čase (RealTime PCR)
TNF-α	faktor nádorové nekrózy α (tumor necrosis factor α)
UCL	upper control limit
WHR	poměr obvodu pasu a boků (waist to hip ratio)

12. Přílohy

Tab. 5 Antropometrické charakteristiky kontrolního souboru a pacientů s AD.

kontrolní soubor	**muži (n=23)**			**ženy (n=41)**		
	medián	95% LCL	95% UCL	medián	95% LCL	95% UCL
věk (roky)	67,5	64,7	72,4	64,6	63	67,8
obvod pasu (cm)	101,0	91,5	107,0	85,1	82,5	90,2
obvod břicha (cm)	102,5	95	112,5	97,0	91,3	100,2
gluteální obvod (cm)	104,0	101,3	107,5	103,5	100	109,5
BMI (kg/m^2)	28,7	26,3	29,3	26,4	24,7	28,4
WHR	0,93	0,91	0,98	0,84	0,80	0,85
BAI (%)	25,3	24,7	27,7	32,2	29,3	33,9
pacienti s AD	**muži (n=15)**			**ženy (n=24)**		
	medián	95% LCL	95% UCL	medián	95% LCL	95% UCL
věk (roky)	73,2	68,2	85,0	73,6	65,9	76,6
obvod pasu (cm)	93,0	88,0	98,0	100,5	87,0	105,0
obvod břicha (cm)	96,0	91,0	102,0	107,0	95,0	110,0
gluteální obvod (cm)	99,0	94,0	106,0	103,5	100,0	109,5
BMI (kg/m^2)	26,2	23,4	27,4	25,7	21,8	27,9
WHR	0,92	0,89	0,97	0,82	0,78	0,85
BAI (%)	26,2	24,0	29,0	33,6	28,7	34,9

Tab. 6 Biochemické charakteristiky kontrolního souboru a pacientů s AD.

kontrolní soubor	**muži (n=23)**			**ženy (n=41)**		
	medián	95% LCL	95% UCL	medián	95% LCL	95% UCL
glykémie (mmol/l)	5,4	5,1	5,8	5,3	5,1	5,5
inzulín (mIU/l)	7,6	5,5	14,9	8,4	6,3	9,5
C-peptid (nmol/l)	0,84	0,57	1,14	0,76	0,65	0,84
HOMAR	2,12	1,17	3,90	2,02	1,48	2,37
celkový cholesterol (mmol/l)	4,95	4,64	5,31	5,15	4,79	5,27
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,35	1,23	1,65	1,68	1,46	1,83
LDL-cholesterol (mmol/l)	2,89	2,35	3,19	2,92	2,71	3,11
triacylglyceroly (mmol/l)	1,13	0,80	1,58	1,10	0,91	1,19
pacienti s AD	**muži (n=15)**			**ženy (n=24)**		
	medián	95% LCL	95% UCL	medián	95% LCL	95% UCL
glykémie (mmol/l)	5,0	4,7	5,3	5,1	4,7	5,2
inzulín (mIU/l)	11,8	8,8	18,0	8,3	7,3	11,1
C-peptid (nmol/l)	1,04	0,74	1,33	0,77	0,67	0,88
HOMAR	2,56	1,91	4,02	1,74	1,49	2,52
celkový cholesterol (mmol/l)	4,70	3,80	5,89	5,20	4,60	5,98
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,30	1,10	1,60	1,50	1,30	2,00
LDL-cholesterol (mmol/l)	2,82	2,07	3,56	2,97	2,40	3,64
triacylglyceroly (mmol/l)	1,21	0,75	1,30	1,20	1,00	1,70

Tab. 8 Antropometrická charakterizace souborů pacientů s DM2, žen s gestačním diabetem a nediabetických jedinců.

pacienti s DM2	**muži (n=159)**			**ženy (n=258)**		
	medián	95% LCL	95% UCL	medián	95% LCL	95% UCL
věk (roky)	62,0	60,0	64,0	60,2	59,0	62,0
obvod pasu (cm)	104,0	101,0	106,5	100,2	99,0	102,0
obvod břicha (cm)	105,8	101,5	116,0	106,2	102,0	109,5
gluteální obvod (cm)	107,0	106,0	109,0	114,0	112,0	116,0
BMI (kg/m^2)	28,7	27,9	29,7	31,0	30,4	31,6
WHR	0,96	0,95	0,97	0,87	0,86	0,88
BAI (%)	28,2	27,4	29,2	37,4	36,7	38,3

ženy s gestačním diabetem v anamnéze	**(n=335)**		
	medián	95% LCL	95% UCL
věk (roky)	33,5	33,0	34,3
obvod pasu (cm)	76,0	74,8	77,3
obvod břicha (cm)	85,2	83,5	87,0
gluteální obvod (cm)	98,2	97,2	100,1
BMI (kg/m^2)	23,1	22,3	23,7
WHR	0,78	0,77	0,79
BAI (%)	27,5	27,0	28,4
kožní řasy (mm)			
suprailiakální	17	15	18
nad bicepsem	9,5	8,5	10
nad tricepsem	23	22	24
subskapulární	16	14,5	17
Σ 4 kožních řas	65,5	60	69

nediabetičtí jedinci	**muži (n=220)**			**ženy (n=414)**		
	medián	95% LCL	95% UCL	medián	95% LCL	95% UCL
věk (roky)	31,0	29,1	33,9	28,1	26,8	30,1
obvod pasu (cm)	84,8	83,0	86,9	72,5	71,4	73,8
obvod břicha (cm)	87,8	86,2	89,1	80,0	78,8	81,2
gluteální obvod (cm)	99,1	98,2	100,3	99,2	98,4	100,0
BMI (kg/m^2)	24,6	24,2	25,3	22,7	22,4	23,2
WHR	0,85	0,84	0,86	0,73	0,72	0,73
BAI (%)	23,0	22,4	23,5	27,4	27,0	28,0
kožní řasy (mm)						
suprailiakální	13	12	14	14	13	15
nad bicepsem	4	3,5	4	8,5	7,5	9
nad tricepsem	11	10	12	19	18	20
subskapulární	13	11,5	14	13	12	14
Σ 4 kožních řas	41	37	44	54,5	50,5	58

Tab. 9 Biochemická charakterizace souborů pacientů s DM2, žen s gestačním diabetem a nediabetických jedinců.

pacienti s DM2	**muži (n=159)**			**ženy (n=258)**		
	medián	95% LCL	95% UCL	medián	95% LCL	95% UCL
glykémie (mmol/l)	7,8	7,2	8,5	7,35	7,0	7,8
inzulín (mIU/l)	10,8	9,5	12,3	12,4	11,2	13,0
C-peptid (nmol/l)	0,87	0,78	0,92	0,88	0,83	0,95
HOMAR	3,81	3,31	4,46	4,03	3,66	4,53
celkový cholesterol (mmol/l)	5,67	5,52	5,80	6,03	5,85	6,22
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,14	1,10	1,25	1,39	1,33	1,44
LDL-cholesterol (mmol/l)	3,58	3,40	3,79	3,80	3,56	3,94
triacylglyceroly (mmol/l)	1,64	1,34	1,73	1,64	1,50	1,79

ženy s gestačním diabetem v anamnéze			**(n=335)**
	medián	95% LCL	95% UCL
glykémie (mmol/l)	4,8	4,7	7,9
inzulín (mIU/l)	5,6	5,2	6,1
C-peptid (nmol/l)	0,60	0,58	0,62
HOMAR	1,21	1,1	1,31
Matsuda index	7,65	7,04	8,17
celkový cholesterol (mmol/l)	4,51	4,39	4,58
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,55	1,52	1,60
LDL-cholesterol (mmol/l)	2,49	2,38	2,62
triacylglyceroly (mmol/l)	0,76	0,72	0,80

nediabetičtí jedinci	**muži (n=220)**			**ženy (n=414)**		
	medián	95% LCL	95% UCL	medián	95% LCL	95% UCL
glykémie (mmol/l)	4,8	4,7	4,8	4,6	4,6	4,7
inzulín (mIU/l)	6,0	5,6	6,7	6,1	5,6	6,4
C-peptid (nmol/l)	0,58	0,53	0,63	0,55	0,54	0,58
HOMAR	1,29	1,19	1,40	1,27	1,16	1,33
Matsuda index	7,72	7,39	8,61	8,05	7,51	8,62
celkový cholesterol (mmol/l)	4,49	4,37	4,63	4,49	4,38	4,59
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,24	1,19	1,30	1,57	1,54	1,61
LDL-cholesterol (mmol/l)	2,65	2,52	2,75	2,40	2,31	2,52
triacylglyceroly (mmol/l)	1,01	0,91	1,12	0,86	0,82	0,92

Tab. 11 Vliv alely ε4 v genu *APOE* na parametry glukózového a lipidového metabolismu a na tělesné složení u pacientů s DM2

		DM2 (n=417)		
	Parametr	**ε4+**	**ε4-**	**p**
	glykémie (mmol/l) *	7,5 (7,0–8,5)	7,2 (6,7–7,4)	0,250
	inzulín (mIU/l) *	12,3 (10,5–15,4)	11,9 (10,6–12,7)	0,537
	C-peptid (nmol/l)	0,86 (0,71–0,98)	0,87 (0,83–0,92)	0,850
	HOMAR*	4,55 (3,69–5,79)	3,86 (3,60–4,28)	0,191
	celkový cholesterol (mmol/l)	5,95 (5,70–6,28)	5,83 (5,71–5,95)	0,199
	LDL-cholesterol (mmol/l)	3,63 (3,35–3,94)	3,67 (3,55–3,85)	0,757
	triacylglyceroly (mmol/l)	1,72 (1,47–2,04)	1,58 (1,48–1,69)	0,197
muži (n=159)	HDL-cholesterol (mmol/l)	1,11 (1,03–1,31)	1,15 (1,10–1,28)	0,558
	BMI (kg/m^2)	30,1 (27,4–30,5)	28,7 (27,6–29,6)	0,798
	BAI (%)	28,8 (26,1–30,3)	28,2 (27,3–29,2)	0,836
	WHR	0,96 (0,93–1,00)	0,96 (0,95–0,98)	0,933
	obvod pasu (cm)	104,5 (100,1–108,9)	103,9 (101,2–107,0)	0,997
	obvod břicha (cm)	108,6 (97,2–117,0)	105,3 (100,5–116,5)	0,854
	gluteální obvod (cm)	108,3 (104,2–111,0)	107,0 (106,2–109,0)	0,750
ženy (n=258)	HDL-cholesterol (mmol/l)	1,38 (1,28–1,55)	1,40 (1,33–1,44)	0,800
	BMI (kg/m^2)	30,3 (28,8–32,0)	31,2 (30,4–31,9)	0,223
	BAI (%)	37,4 (36,2–39,8)	37,4 (36,6–38,3)	0,867
	WHR	0,87 (0,83–0,89)	0,87 (0,86–0,88)	0,797
	obvod pasu (cm)	100,0 (94,0–104,8)	101,0 (99,0–102,0)	0,479
	obvod břicha (cm)	108,5 (97,9–124,7)	105,8 (102,0–109,5)	0,424
	gluteální obvod (cm)	111,4 (109,2–116,0)	115,0 (112,9–116,5)	0,211

Medián (95% LCL–95% UCL), program NCSS 2004, Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test
** G0, I0, HOMAR- pacienti bez léčby inzulínem*
ε4+ = nositel aspoň jedné alely ε4; ε4- = nenositel alely ε4

Tab. 12 Vliv alely ε4 v genu *APOE* na parametry glukózového a lipidového metabolismu a na tělesné složení u pacientek s GDM

	GDM (n=335)		
Parametr	**ε4+**	**ε4-**	**p**
glykémie (mmol/l)	4,9 (4,7–4,9)	4,8 (4,7–4,8)	0,557
inzulín (mIU/l)	5,3 (4,7–6,6)	5,7 (5,2–6,1)	0,645
C-peptid (nmol/l)	0,61 (0,55–0,65)	0,60 (0,57–0,62)	0,969
HOMAR	1,06 (0,96–1,47)	1,21 (1,08–1,30)	0,744
Matsuda index	7,66 (6,03–9,44)	7,78 (7,10–8,24)	0,737
celkový cholesterol (mmol/l)	4,45 (4,31–4,90)	4,46 (4,37–4,56)	0,309
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,57 (1,42–1,69)	1,56 (1,52–1,62)	0,535
LDL-cholesterol (mmol/l)	2,60 (2,28–2,87)	2,47 (2,36–2,59)	0,184
triacylglyceroly (mmol/l)	0,78 (0,72–0,92)	0,74 (0,66–0,78)	0,126
BMI (kg/m^2)	22,1 (20,7–23,1)	23,1 (22,3–23,6)	0,149
BAI (%)	26,4 (25,7–27,7)	27,5 (26,9–28,6)	0,064
WHR	0,76 (0,74–0,77)	0,78 (0,77–0,79)	0,051
obvod pasu (cm)	74,0 (72,0–76,5)	76,0 (74,5–77,5)	0,167
obvod břicha (cm)	82,0 (81,0–86,0)	85,9 (83,8–87,4)	0,386
gluteální obvod (cm)	98,0 (95,0–99,0)	98,0 (97,0–100,0)	0,861
Σ 4 kožních řas (mm)	63,0 (54,0–68,0)	65,5 (59,5–70,0)	0,320

Medián (95% LCL–95% UCL), program NCSS 2004, Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test
Σ 4 kožních řas = suprailiakální řasa, biceps, triceps, subscapulární řasa
ε4+ = nositel aspoň jedné alely ε4; ε4- = nenositel alely ε4

Tab. 13 Vliv alely ε4 v genu *APOE* na parametry glukózového a lipidového metabolismu a na tělesné složení u souboru jedinců s PGT

		PGT (n=43)		
	Parametr	**ε4+**	**ε4-**	**p**
	glykémie (mmol/l)	5,7 (5,2–5,8)	5,6 (5,0–5,7)	0,858
	inzulín (mIU/l)	14,6 (4,5–16,7)	7,3 (5,6–11,1)	0,474
	C-peptid (nmol/l)	0,91 (0,59–1,15)	0,69 (0,54–0,87)	0,294
	HOMAR	3,80 (0,96–4,41)	1,60 (1,29–2,76)	0,406
	Matsuda index	3,05 (1,95–9,42)	6,19 (3,65–8,82)	0,176
	celkový cholesterol (mmol/l)	5,22 (4,96–6,36)	5,11 (4,15–5,40)	0,249
	LDL-cholesterol (mmol/l)	3,14 (2,55–4,09)	2,82 (2,44–3,27)	0,425
	triacylglyceroly (mmol/l)	1,64 (1,18–2,23)	1,22 (0,84–1,43)	0,062
muži (n=18)	HDL-cholesterol (mmol/l)	1,20 (0,85–1,98)	1,10 (0,93–1,26)	0,496
	BMI (kg/m^2)	26,8 (25,6–31,2)	26,8 (21,8–27,4)	0,389
	BAI (%)	25,2 (22,2–30,6)	23,5 (21,1–24,8)	0,189
	WHR	0,97 (0,87–1,06)	0,84 (0,78–1,02)	0,257
	obvod pasu (cm)	98,0 (90,0–116,0)	88,2 (76,6–111,4)	0,221
	obvod břicha (cm)	100,0 (93,6–107,3)	94,8 (82,2–108,2)	0,423
	gluteální obvod (cm)	103,0(100,0–109,0)	102,0 (96,0–108,0)	0,414
	Σ 4 kožních řas (mm)	45,0 (33,4–65,1)	46,0 (34,0–57,0)	0,738
ženy (n=25)	HDL-cholesterol (mmol/l)	1,51 (1,01–2,05)	1,42 (1,35–1,64)	0,906
	BMI (kg/m^2)	26,2 (23,3–33,2)	25,5 (21,5–29,6)	0,610
	BAI (%)	33,8 (26,5–38,9)	29,2 (26,3–35,1)	0,367
	WHR	0,79 (0,75–0,83)	0,80 (0,74–0,89)	0,906
	obvod pasu (cm)	89,0 (76,7–95,5)	85,0 (74,7–93,4)	0,753
	obvod břicha (cm)	92,8 (81,3–104,0)	94,2 (80,6–97,0)	0,622
	gluteální obvod (cm)	101,0 (99,4–116,5)	103,5 (97,1–107,8)	0,783
	Σ 4 kožních řas (mm)	90,0 (47,0–115,0)	71,0 (55,5–95,0)	0,420

Medián (95% LCL–95% UCL), program NCSS 2004, Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test
Σ 4 kožních řas = suprailiakální řasa, biceps, triceps, subscapulární řasa
ε4+ = nositel aspoň jedné alely ε4; ε4- = nenositel alely ε4

Tab. 14 Vliv alely ε4 v genu *APOE* na parametry glukózového a lipidového metabolismu a na tělesné složení u souboru jedinců s NGT

		NGT (n=591)		
	Parametr	**ε4+**	**ε4-**	**p**
	glykémie (mmol/l)	4,7 (4,5–4,7)	4,6 (4,6–4,7)	0,366
	inzulín (mIU/l)	6,1 (5,5–7,2)	5,9 (5,5–6,2)	0,221
	C-peptid (nmol/l)	0,55 (0,52–0,60)	0,55 (0,54–0,58)	0,889
	HOMAR	1,29 (1,12–1,43)	1,23 (1,13–1,30)	0,326
	Matsuda index	8,15 (7,48–9,31)	8,03 (7,65–8,64)	0,981
	celkový cholesterol (mmol/l)	4,62 (4,51–4,81)	4,38 (4,28–4,45)	**<0,001**
	LDL-cholesterol (mmol/l)	2,68 (2,56–2,80)	2,37 (2,27–2,47)	**<0,001**
	triacylglyceroly (mmol/l)	0,96 (0,83–1,08)	0,87 (0,82–0,92)	0,195
muži (n=202)	HDL-cholesterol (mmol/l)	1,18 (1,07–1,38)	1,26 (1,20–1,32)	0,402
	BMI (kg/m^2)	24,4 (23,4–25,6)	24,5 (23,7–25,2)	0,742
	BAI (%)	22,6 (21,9–23,6)	22,7 (22,2–23,5)	0,714
	WHR	0,85 (0,82–0,87)	0,84 (0,84–0,86)	0,405
	obvod pasu (cm)	83,7 (80,5–89,9)	84,3 (82,2–86,5)	0,582
	obvod břicha (cm)	88,5 (84,0–93,2)	87,3 (85,4–89,0)	0,240
	gluteální obvod (cm)	99,0 (95,9–102,0)	98,9 (97,8–100,0)	0,913
	Σ 4 kožních řas (mm)	47,0 (34,5–64,0)	40,0 (35,0–45,0)	0,139
ženy (n=389)	HDL-cholesterol (mmol/l)	1,56 (1,50–1,64)	1,58 (1,54–1,64)	0,712
	BMI (kg/m^2)	22,9 (21,9–23,9)	22,6 (22,3–23,0)	0,586
	BAI (%)y	27,4 (26,3–28,9)	27,4 (26,9–27,9)	0,637
	WHR	0,74 (0,73–0,74)	0,72 (0,72–0,73)	0,744
	obvod pasu (cm)	72,2 (70,6–75,1)	71,9 (70,9–73,2)	0,466
	obvod břicha (cm)	81,0 (76,6–83,2)	79,2 (78,3–80,3)	0,467
	gluteální obvod (cm)	99,8 (97,9–102,5)	98,6 (98,0–99,9)	0,140
	Σ 4 kožních řas (mm)	52,0 (47,0–59,5)	53,7 (50,0–58,0)	0,894

Medián (95% LCL–95% UCL), program NCSS 2004, Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test
Σ 4 kožních řas = suprailiakální řasa, biceps, triceps, subscapulární řasa
ε4+ = nositel aspoň jedné alely ε4; ε4- = nenositel alely ε4

Tab. 16 Vliv alely G polymorfismu rs744373 v genu *BIN1* na parametry glukózového a lipidového metabolismu a na tělesné složení u pacientů s DM2

		DM2 (n=417)		
	Parametr	**G+**	**G-**	**p**
	glykémie (mmol/l) *	6,8 (6,5–7,5)	7,4 (7,0–8,1)	0,143
	inzulín (mIU/l) *	11,9 (10,5–12,8)	12,3 (10,6–13,9)	0,462
	C-peptid (nmol/l)	0,88 (0,82–0,96)	0,85 (0,79–0,92)	0,410
	HOMAR*	3,67 (3,27–4,05)	4,32 (3,81–4,84)	0,096
	celkový cholesterol (mmol/l)	5,80 (5,62–5,95)	5,91 (5,79–6,04)	0,495
	LDL-cholesterol (mmol/l)	3,63 (3,44–3,87)	3,76 (3,57–3,89)	0,724
	triacylglyceroly (mmol/l)	1,57 (1,44–1,81)	1,65 (1,54–1,73)	0,578
muži (n=159)	HDL-cholesterol (mmol/l)	1,12 (1,05–1,28)	1,15 (1,06–1,28)	0,568
	BMI (kg/m^2)	29,6 (28,0–30,4)	28,3 (27,1–29,2)	0,198
	BAI (%)	28,1 (27,0–29,5)	28,9 (27,2–29,5)	0,965
	WHR	0,97 (0,95–0,99)	0,95 (0,93–0,97)	0,354
	obvod pasu (cm)	105,0 (101,0–108,0)	103,0 (100,0–106,0)	0,560
	obvod břicha (cm)	107,4 (101,2–116,5)	105,6 (98,0–121,0)	0,774
	gluteální obvod (cm)	107,0 (106,0–110,0)	107,0 (105,0–110,0)	0,888
ženy (n=258)	HDL-cholesterol (mmol/l)	1,39 (1,33–1,43)	1,40 (1,30–1,45)	0,860
	BMI (kg/m^2)	30,3 (29,6–31,3)	31,6 (30,4–32,8)	0,050
	BAI (%)	36,7 (35,9–37,8)	37,9 (36,9–38,7)	0,095
	WHR	0,87 (0,85–0,88)	0,87 (0,86–0,88)	0,332
	obvod pasu (cm)	99,0 (97,0–101,1)	102,0 (99,8–105,0)	0,089
	obvod břicha (cm)	107,5 (99,5–110,2)	105,5 (101,6–110,5)	0,980
	gluteální obvod (cm)	113,0 (112,0–115,0)	116,0 (112,0–118,0)	0,219

Medián (95% LCL–95% UCL), program NCSS 2004, Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test
** G0, I0, HOMAR- pacienti bez léčby inzulínem*
G+ = nositel aspoň jedné alely G; G- = nenositel alely G

Tab. 17 Vliv alely G polymorfismu rs744373 v genu *BIN1* na parametry glukózového a lipidového metabolismu a na tělesné složení u pacientek s GDM

	GDM (n=335)		
Parametr	**G+**	**G-**	**p**
glykémie (mmol/l)	4,8 (4,7–4,9)	4,8 (4,7–4,8)	0,787
inzulín (mIU/l)	5,4 (4,7–5,9)	5,7 (5,3–6,6)	0,104
C-peptid (nmol/l)	0,59 (0,54–0,62)	0,61 (0,59–0,65)	0,395
HOMAR	1,11 (1,00–1,29)	1,24 (1,10–1,40)	0,107
Matsuda index	8,17 (6,83–8,94)	7,43 (6,94–8,14)	0,164
celkový cholesterol (mmol/l)	4,49 (4,37–4,62)	4,45 (4,28–4,58)	0,736
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,55 (1,49–1,64)	1,57 (1,53–1,67)	0,582
LDL-cholesterol (mmol/l)	2,53 (2,31–2,70)	2,46 (2,35–2,59)	0,995
triacylglyceroly (mmol/l)	0,76 (0,71–0,85)	0,75 (0,66–0,79)	0,082
BMI (kg/m^2)	22,4 (21,6–23,1)	23,5 (22,3–24,6)	0,063
BAI (%)	26,7 (26,0–27,1)	28,1 (27,3–29,0)	**0,021**
WHR	0,78 (0,77–0,78)	0,77 (0,76–0,78)	0,644
obvod pasu (cm)	74,8 (74,0–76,3)	76,0 (74,2–79,5)	0,223
obvod břicha (cm)	84,0 (82,7–86,0)	85,9 (83,0–89,0)	0,348
gluteální obvod (cm)	97,0 (95,4–98,3)	99,3 (97,5–101,9)	**0,037**
Σ 4 kožních řas (mm)	58,5 (54,0–66,0)	67,2 (63,0–75,5)	**0,031**

Medián (95% LCL–95% UCL), program NCSS 2004, Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test
Σ 4 kožních řas = suprailiakální řasa, biceps, triceps, subscapulární řasa
G+ = nositel aspoň jedné alely G; G- = nenositel alely G

Tab. 18 Vliv alely G polymorfismu rs744373 v genu *BIN1* na parametry glukózového a lipidového metabolismu a na tělesné složení u souboru jedinců s PGT

		PGT (n=43)		
	Parametr	**G+**	**G-**	**p**
	glykémie (mmol/l)	5,7 (4,9–6,2)	5,6 (5,0–5,7)	0,414
	inzulín (mIU/l)	13,2 (6,1–16,7)	6,7(5,4–1,04)	0,093
	C-peptid (nmol/l)	0,96 (0,68–1,21)	0,65 (0,55–1,00)	0,085
	HOMAR	3,63 (1,41–4,38)	1,49 (1,35–2,49)	0,140
	Matsuda index	4,41 (2,24–8,95)	5,80 (3,09–7,18)	0,654
	celkový cholesterol (mmol/l)	5,17 (4,00–6,45)	5,20 (4,76–5,43)	0,871
	LDL-cholesterol (mmol/l)	3,11 (2,49–4,21)	2,83 (2,44–3,40)	0,380
	triacylglyceroly (mmol/l)	1,53 (0,98–2,15)	1,25 (0,79–1,59)	0,148
muži (n=18)	HDL-cholesterol (mmol/l)	1,14 (0,85–1,37)	1,15 (0,90–1,26)	0,772
	BMI (kg/m^2)	27,1 (24,3–29,9)	26,3 (21,8–30,3)	0,630
	BAI (%)	23,7 (22,7–29,4)	24,2 (21,1–26,7)	1,000
	WHR	0,94 (0,79–1,03)	0,95 (0,83–1,02)	0,923
	obvod pasu (cm)	98,0 (82,6–112,0)	95,8 (80,0–111,4)	0,700
	obvod břicha (cm)	96,0 (82,2–107,7)	95,6 (83,9–108,2)	0,431
	gluteální obvod (cm)	107,0 (98,8–109,0)	101,8 (96,0–107,0)	0,247
	Σ 4 kožních řas (mm)	53,5 (34,0–67,0)	45,5 (39,5–73,0)	0,886
ženy (n=25)	HDL-cholesterol (mmol/l)	1,23 (1,17–1,54)	1,63 (1,41–1,89)	0,077
	BMI (kg/m^2)	28,8 (24,6–29,4)	25,3 (20,4–29,6)	0,138
	BAI (%)	33,8 (27,8–46,9)	28,1 (23,3–35,1)	0,194
	WHR	0,88 (0,78–0,98)	0,79 (0,72–0,84)	0,051
	obvod pasu (cm)	93,4 (79,1–123,0)	84,0 (71,0–93,1)	0,095
	obvod břicha (cm)	101,5 (83,0–135,2)	91,7 (81,0–97,0)	0,457
	gluteální obvod (cm)	101,1 (100,5–110,6)	104,7 (96,5–107,8)	0,516
	Σ 4 kožních řas (mm)	95,7 (65,4–104,2)	72,0 (36,0–95,0)	0,242

Medián (95% LCL–95% UCL), program NCSS 2004, Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test
Σ 4 kožních řas = suprailiakální řasa, biceps, triceps, subscapulární řasa
G+ = nositel aspoň jedné alely G; G- = nenositel alely G

Tab. 19 Vliv alely G polymorfismu rs744373 v genu *BIN1* na parametry glukózového a lipidového metabolismu a na tělesné složení u souboru jedinců s NGT

		NGT (n=591)		
	Parametr	**G+**	**G-**	**p**
	glykémie (mmol/l)	4,6 (4,5–4,7)	4,7 (4,6–4,7)	0,151
	inzulín (mIU/l)	5,6 (5,0–6,2)	6,3 (5,9–7,0)	0,055
	C-peptid (nmol/l)	0,55 (0,53–0,58)	0,57 (0,53–0,60)	0,432
	HOMAR	1,13 (1,06–1,26)	1,31 (1,23–1,40)	**0,040**
	Matsuda index	8,48 (7,80–9,13)	7,84 (7,32–8,57)	0,152
	celkový cholesterol (mmol/l)	4,45 (4,35–4,60)	4,46 (4,37–4,57)	0,933
	LDL-cholesterol (mmol/l)	2,56 (2,35–2,67)	2,41 (2,33–2,57)	0,747
	triacylglyceroly (mmol/l)	0,89 (0,84–0,96)	0,89 (0,82–1,01)	0,831
muži (n=202)	HDL-cholesterol (mmol/l)	1,20 (1,15–1,33)	1,28 (1,20–1,36)	0,417
	BMI (kg/m^2)	24,8 (24,0–25,9)	24,2 (23,2–24,8)	0,446
	BAI (%)	23,2 (22,3–23,8)	22,4 (21,8–23,3)	0,415
	WHR	0,86 (0,84–0,88)	0,85 (0,82–0,87)	0,441
	obvod pasu (cm)	86,1 (83,0–88,0)	82,6 (80,5–87,0)	0,417
	obvod břicha (cm)	88,5 (86,3–90,9)	86,0 (84,0–89,1)	0,370
	gluteální obvod (cm)	99,0 (97,3–100,8)	98,0 (95,9–99,9)	0,507
	Σ 4 kožních řas (mm)	42,0 (38,0–50,0)	41,5 (34,0–50,0)	0,631
ženy (n=389)	HDL-cholesterol (mmol/l)	1,58 (1,53–1,64)	1,56 (1,50–1,62)	0,566
	BMI (kg/m^2)	22,8 (22,3–23,3)	22,5 (22,0–23,0)	0,918
	BAI (%)y	27,2 (26,5–28,1)	27,4 (26,8–28,1)	0,648
	WHR	0,73 (0,72–0,73)	0,72 (0,71–0,73)	0,828
	obvod pasu (cm)	72,0 (70,9–73,8)	71,7 (70,5–73,6)	0,925
	obvod břicha (cm)	79,2 (77,5–80,8)	79,9 (78,4–81,4)	0,460
	gluteální obvod (cm)	99,3 (98,0–100,4)	98,6 (97,6–100,1)	0,977
	Σ 4 kožních řas (mm)	52,0 (50,0–56,0)	55,0 (48,0–60,0)	0,921

Medián (95% LCL–95% UCL), program NCSS 2004, Kruskal-Wallis One-Way ANOVA test
Σ 4 kožních řas = suprailiakální řasa, biceps, triceps, subscapulární řasa
G+ = nositel aspoň jedné alely G; G- = nenositel alely G