

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Lucie Kloboučková

**Asociace vybraných polymorfismů genů oxidativního stresu s diabetes mellitus 1.
a 2. typu**

**Association of genetic polymorphism of oxidative stress with diabetes mellitus type 1
and 2**

Diplomová práce

Školitel: Ing. Anna Kotrbová – Kozak, PhD.

Praha, 2015

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně odcitovat.

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, 13. 8. 2015

.....

Lucie Kloboučková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Doc. MUDr. Marii Černé, CSc. za to, že mi umožnila vypracování diplomové práce na pracovišti Ústavu obecné biologie a genetiky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Dále bych chtěla poděkovat školitelce Ing. Anně Kotrbové – Kozak, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které mi poskytovala během vypracování mé diplomové práce. Poděkování také patří RNDr. Janě Faulnerové Matějčkové, PhD. za rady a možnost vypracovat chromatografické měření na Oddělení biochemie 3. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Chtěla bych také poděkovat kolegům v laboratoři za vytvoření přátelského kolektivu.

V neposlední řadě mé poděkování patří mým rodičům za podporu během celého studia.

Abstrakt

Diabetes mellitus je chronické onemocnění s komplexní patogenezí vznikající buď v důsledku nedostatku inzulínu nebo zhoršené odezvy na inzulín. Jedná se o poruchu metabolismu sacharidů charakterizovanou zhoršenou schopností udržet správnou hladinu cukru (glukózy) v krvi.

Chronická hyperglykémie indukuje zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species), což vede ke snížení hladiny přirozených antioxidantů v krvi, a tím přispívá ke vzniku komplikací diabetu (např. cévních nebo plicních). V důsledku oxidativního stresu dochází zároveň k zánětům pankreatu s poškozením β -buněk Langerhansových ostrůvků.

Cíle: Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda se určité kombinace genotypů nevyskytují s vyšší frekvencí mezi skupinami diabetiků 1. a 2. typu než u zdravých kontrol.

Metody: Do studie bylo zahrnuto 40 diabetiků 1. typu, 40 diabetiků 2. typu a 45 zdravých kontrol. Nejdříve byly analyzovány polymorfizmy vybraných genů zodpovědných za oxidativní stres, např. geny kódující enzymy superoxiddismutázy *SOD1*, *SOD3*, glutathion-S-transferázy *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, glutathionperoxidáza *GPX1* a kataláza *CAT*. Vybrané polymorfizmy byly stanoveny pomocí metod RFLP, TaqMan sond a alelově specifické PCR. Následně bylo pomocí kapalinové chromatografie měřeno množství malondialdehydu v plazmě jako indikátoru oxidativního stresu.

Výsledky: Statisticky významné rozdíly byly nalezeny ve frekvencích genotypu *SOD1* (null vs. pozitivní genotyp u kontrolní skupiny a T2D a mezi skupinami diabetiků), *SOD3* (T1D vs. T2D), v kombinaci *GSTT1* null a *GSTM1* wild type u diabetiků, a v hladině malondialdehydu mezi jednotlivými skupinami.

Klíčová slova: Diabetes mellitus, oxidativní stres, polymorfismus, superoxiddismutáza, glutathion-S-transferáza, glutathionperoxidáza, kataláza, malondialdehyd.

Abstract

Diabetes mellitus is a chronic autoimmune disease in which the immune system attacks the insulin-secreting β -cells in the pancreas. It leads to an absolute deficiency of insulin.

Chronic hyperglycemia induces increased production of reactive oxygen species, which leads to a decrease of natural antioxidant level in blood, and it contributes to genesis of diabetes complications (e.g. vascular or pulmonic). Moreover, the oxidative stress results in onset of pancreas inflammations and the damage of its β -cells.

Aims: Our aim was to assess whether or not certain genotypes or their combinations occur with higher frequency among groups of patients of type 1 diabetes (T1D) and type 2 diabetes and in a control group of healthy individuals.

Methods: The study included groups of 40 T1D patients, 40 T2D patients and 45 healthy individuals. The polymorphisms of genes involved in the oxidative stress response were analyzed by using RFLP, PCR with TaqMan probes and allele specific PCR. The target genes involved superoxide dismutase *SOD1* and *SOD3* genes; glutathione-S-transferase *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* genes; glutathioneperoxidase gene *GPX1* and catalase gene *CAT*. The levels of plasma malondialdehyde were measured by using liquid chromatography.

Results: Statistically significant differences were found in the frequencies of *SOD1* (null vs. positive polymorphism in control group vs. T2D and T1D vs. T2D), *SOD3* (T1D vs. T2D), combination of *GSTT1* null and *GSTM1* wild type (T1D vs. T2D) genotypes and and as well as (among the groups) in the levels of oxidative stress biomarker malondialdehyde.

Key words: Diabetes mellitus, oxidative stress, polymorphism, superoxide dismutase, glutathione-S-transferase, glutathioneperoxidase, catalase, malondialdehyde.

Obsah

1	Úvod a přehled literatury	9
1.1	Diabetes mellitus a jeho klasifikace.....	10
1.1.1	Diabetes mellitus 1. typu	10
1.1.2	Diabetes mellitus 2. typu	11
1.1.3	Komplikace diabetes mellitus	11
1.2	Oxidativní stres a reaktivní kyslíkové formy (ROS)	12
1.2.1	Vznik ROS	14
1.2.1.1	Autooxidativní glykosylace	16
1.2.1.2	Polyolová cesta	16
1.2.1.3	Hexozaminová cesta	16
1.2.1.4	Aktivace protein kinázy C	16
1.2.2	Patologické účinky ROS	17
1.2.2.1	Lipidová peroxidace	17
1.2.2.2	Poškození DNA	19
1.2.3	Malondialdehyd	20
1.2.4	Obrana organismu proti ROS	21
1.2.4.1	Superoxiddismutázy a jejich funkce	21
1.2.4.2	Glutathionperoxidáza a kataláza a jejich funkce	21
1.2.4.3	Glutathion-S-transferázy a jejich funkce	22
1.2.5	Sledování hladiny oxidativního stresu	23
1.3	Genetika oxidativního stresu	24
1.3.1	Superoxiddismutázy a jejich polymorfizmy	24
1.3.1.1	Polymorfizmus <i>SOD1</i>	24
1.3.1.2	Polymorfizmus <i>SOD3</i>	25
1.3.2	Glutathionperoxidáza a její polymorfizmy	26
1.3.3	Kataláza a její polymorfizmy.....	26
1.3.4	Glutathion-S-transferázy a jejich polymorfizmy	27
1.3.4.1	Polymorfizmy <i>GSTP1</i>	28
1.3.4.2	Polymorfizmy <i>GSTM1</i>	29
1.3.4.3	Polymorfizmy <i>GSTT1</i>	30
2	Cíle práce	32
3	Materiál a metody	33
3.1	Používaný materiál	33
3.1.1	Pufry a roztoky.....	33
3.1.2	Enzymy	33
3.1.3	Komerční soupravy a standardy	33
3.1.4	Primery a sondy	34
3.1.5	Chemikálie	35
3.1.6	Používané přístrojové vybavení.....	36
3.1.7	Používané počítačové programy	36
3.1.8	Soubor pacientů a zdravých jedinců	36
3.2	Metodika práce a postupy	37
3.2.1	Izolace DNA z periferní krve.....	37
3.2.2	Stanovení koncentrace a čistoty DNA	38
3.2.3	Genotypizace polymorfizmů genů.....	38
3.2.3.1	Polymerázová řetězcová reakce.....	39

3.2.3.2	Multiplexová polymerázová řetězcová reakce	40
3.2.3.3	Polymerázová řetězcová reakce – polymorfismus délky restričních fragmentů	42
3.2.3.3.1	RFLP pro geny <i>SOD1</i> , <i>GSTP1</i>	42
3.2.3.4	Genotypizace pomocí Taq Man [®] sond	43
3.2.4	Elektroforetická separace.....	46
3.3	Příprava roztoků a vzorků pro stanovení MDA	47
3.3.1	Příprava zásobního roztoku MDA	47
3.3.2	Příprava interního standardu MeMDA	47
3.3.3	Příprava derivatizačního činidla	47
3.3.4	Derivatizace modelového vzorku MDA	47
3.3.5	Příprava vzorku krevní plazmy pro stanovení MDA	48
3.4	Statistická analýza.....	48
4	Výsledky	49
4.1	Genotypizace vybraných polymorfizmů.....	49
4.1.1	Genotypizace genu <i>GPXI</i>	49
4.1.2	Genotypizace genu <i>CAT</i>	50
4.1.3	Genotypizace genu <i>SOD3</i>	51
4.1.4	Genotypizace genu <i>GSTP1</i>	52
4.1.5	Genotypizace genu <i>SOD1</i>	54
4.1.6	Genotypizace genu <i>GSTT1</i>	57
4.1.7	Genotypizace genu <i>GSTM1</i>	58
4.1.8	Kombinace genotypů genů <i>GSTM1</i> a <i>GSTT1</i>	60
4.2	Stanovení malondialdehydu.....	62
4.2.1	Kalibrační závislosti modelového vzorku MDA	62
4.2.2	Hladina MDA u pacientů s diabetes mellitus 1. a 2. typu	63
4.3	Korelace mezi hladinou MDA v krevní plazmě a vybranými genotypy	65
4.3.1	Závislost koncentrace MDA na genotypech genu <i>SOD1</i>	65
4.3.2	Závislost koncentrace MDA na genotypech genu <i>SOD3</i>	67
4.3.3	Závislost koncentrace MDA na kombinaci genotypů genů <i>GSTM1</i> a <i>GSTT1</i> ..	68
4.4	Závislost koncentrace MDA v plazmě na věku	69
5	Diskuze	70
6	Závěr	74
7	Seznam použité literatury	75
8	Seznam použitých zkratk	85

1 Úvod a přehled literatury

Diabetes mellitus je onemocněním, jehož výskyt v České republice i celosvětově stále stoupá. Protože je diabetes multifaktoriálním onemocněním, nelze jednoznačně určit příčinu rozvoje tohoto onemocnění. Lze však jmenovat několik hlavních rizikových faktorů, které se mohou na patogenezi diabetes mellitus 1. i 2. typu podílet. Faktory, které se podílejí na rozvoji diabetu jsou jak endogenní povahy, např. metabolická kontrola, či povahy exogenní, např. nadváha, strava a fyzická aktivita.

Diabetes mellitus často provázejí chronické komplikace, k nimž dochází pod vlivem následků, které jsou způsobeny metabolickými změnami při nedostatku inzulínu. Postiženy bývají jak buňky, tak mimobuněčná hmota. Vznikající hyperglykémie podmiňuje funkční a morfologické abnormality, čímž dochází k postupnému zhoršování funkce orgánů a tkání a nakonec až k jejich selhání. Jedná se především o cévní onemocnění, diabetickou retinopatii a nefropatii, které jsou způsobené zvýšenou hladinou reaktivních kyslíkových forem.

V současné době narůstá počet důkazů o tom, že v patogenezi diabetes mellitus 1. i 2. typu hraje důležitou roli oxidativní stres a volné radikály jakožto produkty mnoha reakcí jím vyvolaných. Zvýšené hladiny volných radikálů a snížená antioxidační odpověď mohou mít za následek porušení buněčných organel a enzymů, a tím i rozvoj inzulínové rezistence. Oxidační stres při diabetu je v současné době považován za klíčovou příčinu rozvoje pozdních komplikací.

Rozvoj komplikací však nezávisí jen na metabolických abnormalitách, ale též na genetické dispozici, která může jak zesilovat, tak oslabovat vliv metabolických změn na jednotlivé tkáně. Organismus může být k oxidativnímu stresu náchylnější vlivem polymorfizmů genů, jež kódují antioxidační enzymy, jako jsou superoxiddismutázy, glutathionperoxidázy, glutathion-S-transferázy a katalázy, neboť aktivita těchto enzymů může být snížena.

Cílem této diplomové práce je analyzovat polymorfizmy genů kódujících výše zmíněné enzymy a zjistit, zda se jednotlivé varianty genů vyskytují s vyšší četností u pacientů s diabetes mellitus 1. i 2. typu a u zdravých kontrol. Analýza těchto polymorfizmů by mohla přispět k hlubšímu objasnění souvislostí mezi oxidativním stresem, diabetes mellitus a genetickými faktory.

1.1 Diabetes mellitus a jeho klasifikace

Termínem diabetes mellitus je označována skupina klinicky a etiologicky heterogenních chronických onemocnění, které vznikají v důsledku relativního nebo absolutního nedostatku inzulínu, což vede k poruše metabolismu. Hlavním projevem tohoto onemocnění je hyperglykémie, kterou doprovázejí další příznaky, jako jsou polyurie, polyfágie a polydypsie (Pelikánová 2003).

Klasifikace diabetes mellitus vychází z průběhu hyperglykémie a klinických příznaků. Tvoří ji diabetes mellitus 1. typu, který může být imunitně podmíněný nebo idiopatický, dále diabetes mellitus 2. typu, gestační diabetes mellitus a další specifické typy diabetu (WHO 1999). Vzhledem k zadanému tématu práce se budu zabývat jen problematikou typu 1 a 2.

1.1.1 Diabetes mellitus 1. typu

Diabetes mellitus 1. typu (T1D) je onemocnění vznikající u geneticky predisponovaných osob a čítá 5–10 % všech diagnostikovaných případů diabetu celkově (American Diabetes Association 2004). V oběhu pacienta se nachází cirkulující autoprotilátky, které svědčí o autoimunitním původu choroby. Tento autoimunitní proces je zahájen B-lymfocyty, jejichž protilátkami jsou β -buňky Langerhansových ostrůvků pankreatu rozpoznány jako organismu cizorodé. Následně jsou takto označené β -buňky postupně ničeny T-lymfocyty, makrofágy a cytokiny, až v konečné fázi dochází k absolutnímu nedostatku inzulínu (Santamaria 2010; Delmastro & Piganelli 2011).

Tyto autoprotilátky jsou v klinické praxi využívány k predikci onemocnění. Autoprotilátky jsou navázány na antigeny, jako jsou inzulín, dekarboxyláza kyseliny glutamové (izoforma GAD 65), inzulinomový antigen-2 a zinkový transportér (ZnT8), který má vysokou prediktivní hodnotu (Wenzlau *et al.* 2007).

Autoimunitní diabetes se projevuje zejména v dětství a v rané dospělosti, kdy dochází k velmi rychlému zániku β -buněk. Z toho důvodu bývá nazýván juvenilní diabetes mellitus. V případě manifestace typu T1D v období dospělosti probíhá destrukce β -buněk pomalu a diabetes je označován termínem LADA (latentní autoimunitní diabetes dospělých) (Pelikánová 2003).

Impulz, který vede k iniciaci autoimunitní odpovědi, není dosud znám. Byla však prokázána asociace s hlavním histokompatibilním komplexem *MHC II.* třídy, s antigeny

HLA-DR/DQ (Noble *et al.* 1996), a také asociace s molekulami *MHC I* třídy, *HLA-B* a *HLA-A* (Nejentsev *et al.* 2007).

Na patogenezi onemocnění se podílí také faktory vnějšího prostředí. Na rozvoji prediabetu se mohou podílet například virová infekční onemocnění prodělaná v dětství či pití kravského mléka v prvních měsících života dítěte (<http://teddy.epi.usf.edu/>).

1.1.2 Diabetes mellitus 2. typu

Diabetes mellitus 2. typu (T2D) je onemocnění, jež reprezentuje přibližně 90 % všech případů diabetu. Tento typ je způsoben inzulinovou rezistencí s poruchou sekrece inzulinu. Diabetici mohou mít nedostatek i nadbytek inzulinu. T2D bývá však způsoben vlivem jiného mechanismu než autoimunitou. K rozvoji onemocnění přispívá řada multifaktoriálních činitelů, mezi něž lze řadit stres, kouření, nedostatek pohybu, obezitu a familiární výskyt onemocnění (Pelikánová 2003). Ačkoliv má v případě tohoto typu diabetu silný vliv genetická komponenta, genotyp pouze podmiňuje jedince být více či méně náchylný k exogenním faktorům (Permutt *et al.* 2005).

Diabetes mellitus 2. typu je rozvíjen v případě selhávání sekrece inzulinu nebo jeho působení. Poškození působení inzulinu bývá označováno termínem inzulinová rezistence, která se projevuje právě jako potlačení metabolické odpovědi na působení inzulinu. Poškození β -buněk, např. působením kyslíkových radikálů, tedy může vést k dysfunkci sekrece nebo snížené sekreci v β -buňkách (Weir *et al.* 2001; Leahy *et al.* 2010).

Onemocnění bývá manifestováno nejčastěji v dospělosti, po 40. roku života. Začátek choroby bývá pozvolný a diagnostikována bývá spíše náhodně nebo při způsobených komplikacích (Pelikánová 2003).

1.1.3 Komplikace diabetes mellitus

Diabetes mellitus je provázen komplikacemi, k nimž dochází vlivem následků způsobených metabolickými změnami při nedostatku inzulinu. Postiženy jsou buňky i mimobuněčná hmota, u nichž zvýšená koncentrace glukózy podmiňuje funkční a morfologické abnormality, čímž dochází k postupnému zhoršování funkcí orgánů a tkání a v konečné fázi vede až k jejich selhání (Teschfariam & Cohen 1992).

Poruchy vedoucí k hyperglykémii závisí na metabolických abnormalitách a jsou společné pro různé typy diabetu (absolutní nebo relativní nedostatek inzulinu), avšak rozvoj komplikací závisí též na genetické dispozici, která může vliv metabolických změn na jednotlivé tkáně jak zesilovat, tak oslabovat. Podstata této genetické dispozice však

není zatím známá. Předpokládá se kombinace více genů, jde tedy o polygenně podmíněný sklon ke komplikacím (Tsfamariam & Cohen 1992).

Za hlavní vyvolávající faktor rozvoje komplikací při diabetu je považována chronická hyperglykémie. Vlivem zvýšené koncentrace glukózy se mění nejen kvantitativní průběh reakcí, ale vystupňovány jsou i pochody, jejichž produkty podmiňují poruchu regulace funkce buněk (Tsfamariam & Cohen 1992). Podstata spočívá ve struktuře glukózy, která jí umožňuje, aby reagovala s proteiny, čímž může měnit jejich vlastnosti, jednak aby se spontánně oxidovala (tzv. autooxidace) a vytvářela tak reaktivní meziprodukty jako jsou např. glyoxal či metylglyoxal, a přitom umožnila vznik reaktivním formám kyslíku (ROS) (Brownlee 2005).

Komplikace diabetu lze rozlišit na akutní a chronické. Mezi akutní komplikace lze zařadit hyperglykemické kóma (příčinou je předávkování inzulinem), ketoacidózu a hyperosmolární syndrom (Rybka 2007). Ketoacidóza se objevuje u pacientů s diabetes mellitus 1. typu a jedná se o nejčastější příčinu úmrtí diabetiků ve věku mladších než 20 let, úmrtnost se pohybuje okolo 5 %. U již léčených diabetiků ke ketoacidóze dochází spíše při těžších infekcích a kardiovaskulárních příhodách. Hyperosmolární syndrom se objevuje zejména u pacientů diabetes mellitus 2. typu s vážnou prognózou, neboť úmrtnost se pohybuje okolo 15 %. Zatímco u ketoacidózy je velký vliv acidózy z vystupňované ketogeneze jako následek inzulinového deficitu, u hyperosmolárního syndromu je výrazná především hyperglykémie a hyperosmolarita (Pitřhová 2006; Babčák *et al.* 2008).

Chronické komplikace lze rozlišit na nespecifické a specifické. Mezi nespecifické patří kardiovaskulární onemocnění, jako jsou ateroskleróza, nekróza ledvinových papil, katarakta či zvýšená náchylnost ke kožním infekcím. Mezi specifické komplikace patří onemocnění ledvin, jako je nefropatie, dále retinopatie či neuropatie (Sosna 2009). Tyto specifické komplikace může též doprovázet syndrom diabetické nohy (Pitřhová 2008).

1.2 Oxidativní stres a reaktivní kyslíkové formy (ROS)

Klíčovou roli v rozvoji komplikací diabetu hraje oxidativní stres, jehož následné oxidační poškození tkání je konečnou fází chronických onemocnění, jako je právě diabetes mellitus (Bayness & Thorpe 1999). Oxidativní stres lze definovat jako rozdíl mezi vznikem reaktivních kyslíkových forem (ROS) a jejich odstraňováním. Vzniká tedy jako výsledek nerovnováhy mezi volnými radikály a antioxidanty v důsledku zvýšené

produkce ROS, nebo jako pokles hladiny antioxidantů. Produkce ROS může být zvýšena např. vlivem endogenních patologických procesů či exogenním působením xenobiotik. Pokles hladiny antioxidantů může být způsoben inaktivací enzymů podílejících se na likvidaci ROS. Další příčinou oxidativního stresu může být neschopnost organismu opravit oxidační poškození buněčných struktur či dokonce genetické informace (Ďuračková 1998).

Reaktivní formy kyslíku mohou interagovat s jakoukoliv molekulou nebo buněčnou strukturou nacházející se v jejich okolí. Mezi ROS patří volné kyslíkové radikály a sloučeniny kyslíku, které sice nemají charakter radikálů, ale ty z nich mohou vznikat např. homolytickým štěpením, redukcí či oxidací (Halliwell & Gutteridge 1999).

Volné radikály ve svých atomových nebo molekulových orbitalech obsahují nejméně jeden nepárový elektron, který způsobuje vysokou reaktivitu těchto částic tím, že se snaží získat další nepárový elektron. Nejčastěji se jedná o odtržení elektronu z jiné molekuly (iniciace reakce). Poté, co tato molekula odevzdá elektron, stane se sama radikálem, a v tomto stavu může atakovat molekulu další, a přeměnit ji tak v radikál (propagace reakce). Jedná se o reakci řetězovou, jež vede k poškození membrán, buněčných organel, proteinů, enzymatických systémů nebo DNA. Ve většině případech se jedná o oxidační nebo peroxidační reakce (Štípek *et al.* 2000; Masopust 2003). V tabulce (Tab. 1) jsou uvedeny nejdůležitější ROS.

Tab. 1: Přehled reaktivních kyslíkových forem (Štípek *et al.* 2000)

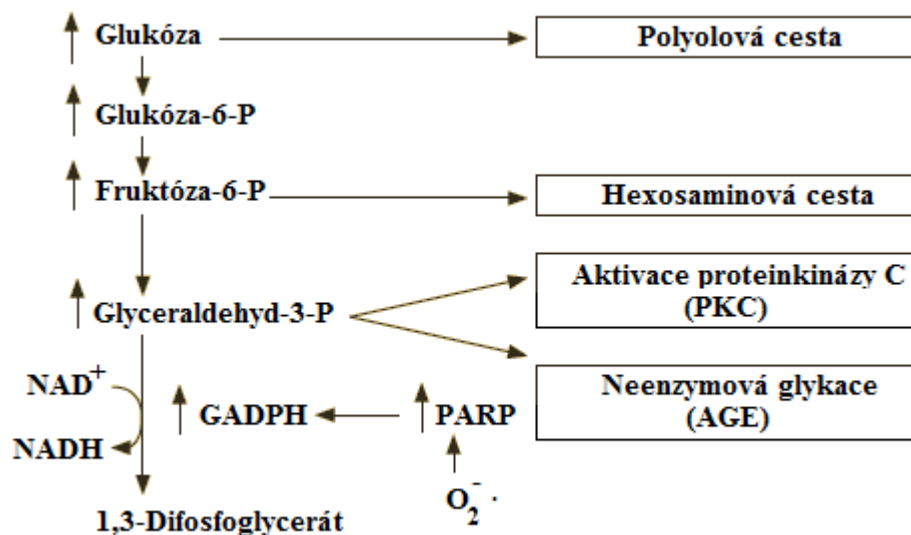
Volné radikály	
Superoxidový	O ₂ ^{-•}
Hydroxylový	•OH
Peroxylový	ROO•
Alkoxylový	RO•
Hydroperoxylový	HO ₂ •
Látky, které nejsou volnými radikály	
Peroxid vodíku	H ₂ O ₂
Kyselina chlorná	HClO
Ozón	O ₃
Singletový kyslík	¹ O ₂

1.2.1 Vznik ROS

ROS vznikají při řadě enzymových reakcí v buněčných organelách, jako jsou mitochondrie, lysozomy, peroxizomy a plazmatická membrána. Hlavními zdroji reaktivních forem kyslíku jsou tedy aerobní metabolismus, dýchací řetězec, peroxizomová β-oxidace mastných kyselin či biotransformace xenobiotik v mikrozomech, jíž se účastní oxidoredukční systém s cytochromem P450. Volné radikály mohou také vznikat ve tkáních účinkem specifických enzymů. Tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů mohou vyvolat také exogenní činitelé, např. UV záření, zánětlivé cytokiny a toxické látky (Štípek *et al.* 2000; Racek 2003).

Hyperglykémie může u diabetiků zapříčinit spuštění řady metabolických drah, které mohou mít za následek tvorbu ROS, a tím zvýšení oxidativního stresu (Hunt *et al.* 1990; Baynes 1991). Buňky reagují na okolní zvýšenou koncentraci glukózy odlišně. Zatímco u některých je vytvořen ochranný mechanismus, který snižuje při vyšší koncentraci vstup glukózy do buňky (např. ve svalu hyperglykémie snižuje transport glukózy zprostředkovaný transportéry GLUT4 „regulovanými dolů“), jiné buňky nejsou chráněny, tudíž u nich dochází k transportu glukózy podle koncentračního spádu (Kaiser *et al.* 1993). K těmto buňkám patří i endotelie, u nichž glukózový transportér GLUT1 nepodléhá při hyperglykémii regulaci dolů (tzv. down-regulaci), která by pak snížila vstup glukózy do buňky. Zvýšená intracelulární koncentrace glukózy podmiňuje vystupňovanou glykolýzu, kdy je následně zpracován pyruvát v citrátovém cyklu. Tím je

zvýšeno množství elektronů pro dýchací řetězec v mitochondriích, který zahrnuje čtyři proteiny (I, II, III, IV), cytochromoxidázu a komplex Q. Při hyperglykémii ale přenašeče elektronů FADH_2 a NADH dodávají do řetězce takové množství elektronů, že gradient napětí na membráně mitochondrie dosáhne kritické hodnoty a komplex III je zablokován. Elektrony z komplexu Q pak alternativně způsobují tvorbu superoxidového radikálu z molekulárního kyslíku. Zvýšená tvorba superoxidového radikálu představuje nebezpečí pro normální běh reakcí uvnitř buňky, včetně poruchy DNA, jejíž mutace jsou opravovány reparačními enzymy. V buněčném jádře takto působí enzym polymeráza ADP-ribózy (PARP), jejíž úkolem je reparovat DNA. Vlivem superoxidového radikálu je aktivována polymeráza ADP-ribózy, která inhibuje glyceraldehydfosfátdehydrogenázu, klíčový enzym glykolýzy. Touto inhibicí je však blokována přeměna glukózy na pyruvát, čímž jsou substráty lokalizované mezi glyceraldehydfosfátem a glukózou kumulovány. K alternativnímu zpracování takto nakumulovaných substrátů v organismu dochází ve čtyřech drahách, které jsou však patogenetickými mechanismy rozvoje komplikací diabetu. Mezi tyto mechanismy patří autooxidativní glykosylace (neenzymová glykace), polyolová cesta, hexosaminová cesta a aktivace proteinkinázy C (Škrha 2009).



Obr. 1: Schématické znázornění cest patogeneze chronických komplikací diabetes mellitus. Vyznačené jsou jednotlivé meziprodukty glykolýzy a vlivy bloky přeměny glyceraldehyd-3-fosfátu superoxidovým radikálem. GADPH – glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, NAD^+ – nikotinamidadeninukleotid (oxidovaná forma), NADH – nikotinamidadeninukleotid (redukováná forma), O_2^- – kyslíkový radikál, PARP – polymeráza ADP-ribózy (Škrha 2009).

1.2.1.1 Autooxidativní glykosylace

Jednou z cest spuštěných vlivem hyperglykémie je autooxidativní glykosylace, proces bez katalytického působení enzymů, který je iniciován oxidací glukózy na více reaktivní dikarbonylový cukr, který poté může reagovat s proteinem. Při této reakci nejprve vzniká labilní, snadno disociovatelná Schiffova base, která přesmykuje na stabilní ketoamin, tzv. Amadoriho produkt (Nessar 2005). Redukované kyslíkaté produkty vytvořené v těchto reakcích také zahrnují superoxidový anion, vodíkový radikál a peroxid vodíku. Tyto částice mohou během glykosylačních reakcí v přítomnosti kovových iontů způsobit fragmentaci proteinů či oxidaci lipidů (Hunt *et al.* 1990; Baynes 1991).

1.2.1.2 Polyolová cesta

Vlivem hyperglykémie dochází ve tkáních, které nejsou závislé na inzulinu (ledviny, nervy, cévy a sítnice), k aktivaci polyolové neboli sorbitolové cesty. Limitujícím enzymem je aldózo-reduktáza, jejíž účinkem je za účasti NADPH glukóza redukována na sorbitol. Sorbitol je následně metabolizován na fruktózu účinkem sorbitol-dehydrogenázy, jejíž kofaktorem je NAD^+ . Pro své silné hydrofilní vlastnosti sorbitol nemůže difundovat buněčnou membránou ven z buňky, čímž dochází k jeho intracelulární akumulaci s osmoticky aktivním účinkem (Gabbay 1973). Využití NAD^+ sorbitol-dehydrogenázou vede k zvýšení poměru NADH/NAD^+ , což je označováno termínem pseudohypoxie a vede k aktivaci patologických metabolických a signalizačních drah (Williamson *et al.* 1993).

1.2.1.3 Hexozaminová cesta

Aktivace hexozaminové cesty patří mezi další patologické mechanismy, které se uplatňují při rozvoji inzulínové rezistence a diabetických vaskulárních komplikací (Ziyadeh *et al.* 1994). Metabolická dráha zahrnuje přeměnu glukózy na glukóza-6- fosfát za účasti enzymu hexokináza, který je následně v procesu glykolýzy přeměněn na fruktóza-6-fosfát. Fruktóza-6-fosfát je následně enzymaticky přeměněn na glukozamin-6-fosfát, který slouží jako substrát pro syntézu mnoha látek, jejichž akumulace vede k aktivaci protein kinázy C (PKC) (Marshall *et al.* 1991).

1.2.1.4 Aktivace protein kinázy C

Bylo prokázáno, že aktivace protein kinázy C a zvýšené hladiny diacylglycerolu (DAG) mají vliv na rozvoj komplikací při hyperglykémii. Aktivovaná protein kináza C

ovlivňuje enzymatickou aktivitu fosfolipázy A, Na⁺/K⁺ ATPázy a genovou expresi komponent extracelulární matrix a kontraktilních proteinů, z čehož vyplývají patologické změny související se zvýšenou hladinou glukózy. Patologické změny souvisí s krevním tlakem v cévách, kontraktilitou, permeabilitou a proliferací bazální membrány. Hyperglykémie je tedy asociována se zvýšenou aktivací různými izoformami PKC, zejména izoformou β. Izoforma PKC-β je predominantně aktivována ve všech vaskulárních tkáních a zodpovídá tedy za cévní poškození (Ishii *et al.* 1998).

1.2.2 Patologické účinky ROS

Nadměrně produkované množství ROS má na buněčné membrány a buněčné komponenty škodlivé účinky. Důsledkem je celá řada poruch v organismu, které se projevují např. lipidovou peroxidací a jejími škodlivými produkty nebo poškozením proteinů a dokonce i genetické informace (Masopust 2005).

1.2.2.1 Lipidová peroxidace

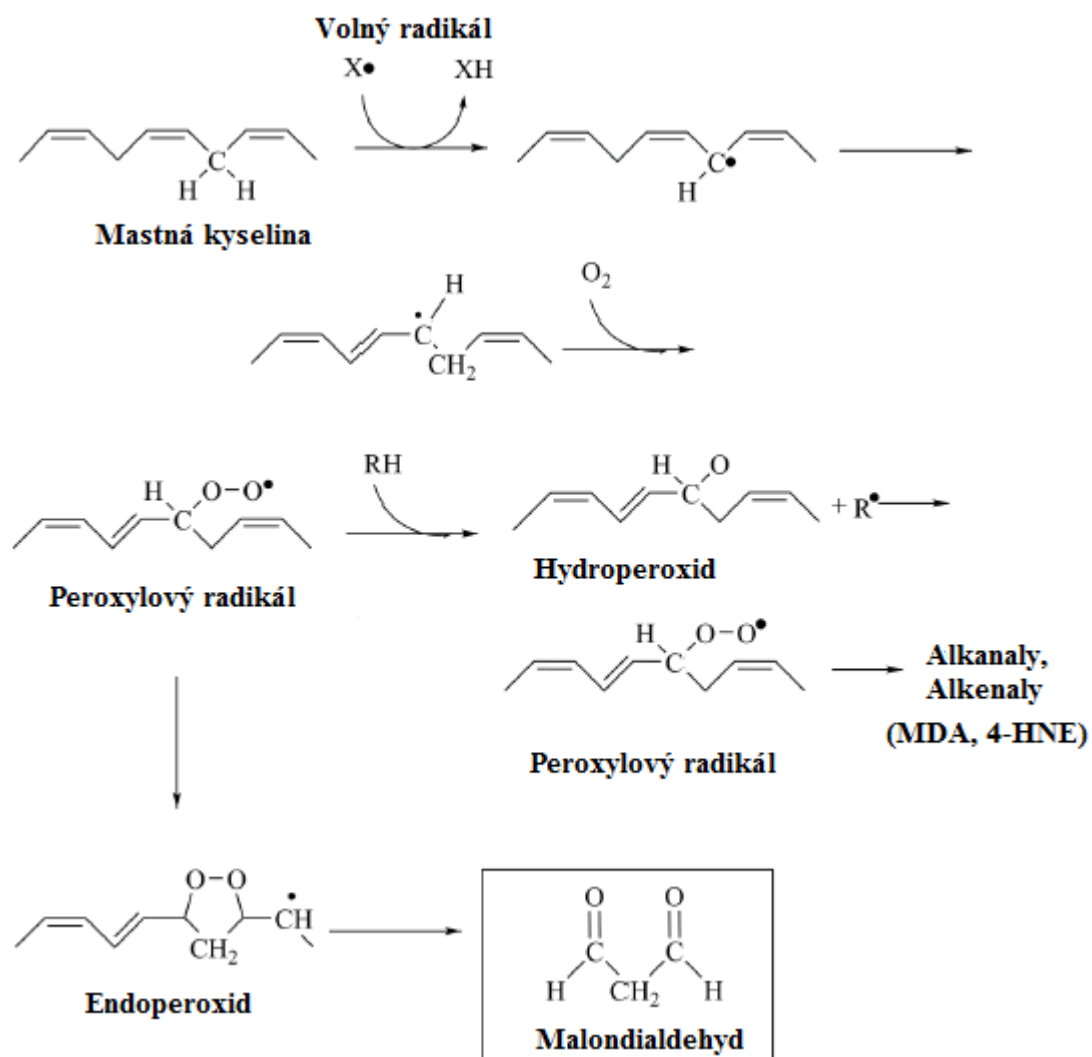
Jedná se o proces oxidační degradace lipidů, kdy volné radikály odebírají elektrony molekulám lipidů v buněčných membránách, což vede k poškození buněk. Proces probíhá mechanismem řetězové reakce volných radikálů a nejčastěji postihuje polynenasycené mastné kyseliny, neboť obsahují větší počet dvojných vazeb, mezi nimiž se nacházejí methylenové skupiny -CH₂- s reaktivními vodíky. Nejčastěji se jedná o kyselinu linolovou (18:2), linolenovou (18:3), arachidonovou (20:4) nebo dokosaheptaenovou (22:6). Dvojná vazba oslabuje vazbu mezi uhlíkem a vodíkem methylenové skupiny a proto může dojít k odtržení vodíkového atomu z methylenové skupiny volným radikálem (Ďuračková 1998).

Stejně jako všechny radikálové reakce, i tato reakce zahrnuje tři hlavní kroky: iniciace, propagace a terminace. Při iniciaci je tvořen vlivem ROS radikál mastné kyseliny (např. hydroxylové radikály reagují s atomem vodíku a vytváří tak radikál mastné kyseliny a molekulu vody). Radikál mastné kyseliny je však nestabilní částice, tudíž následně reaguje s molekulárním kyslíkem, čímž je vytvořen peroxylový radikál mastné kyseliny. Tento radikál je také nestabilní a reaguje s dalšími molekulami mastné kyseliny, a vytvořeny jsou jiný kyselý radikál a lipidový peroxid. Reakce je ukončena v okamžiku, kdy dva radikály při reakci vytvoří neutrální molekulu. Koncentrace dvou radikálů tedy musí být dostatečně vysoká na to, aby mohly mezi sebou reagovat (Ďuračková 1998).

Kromě toho, že jsou produkty této reakce nežádoucí, mohou být navíc mutagenní a karcinogenní – např. hlavní produkt lipidové peroxidace malondialdehyd (MDA) může reagovat s deoxyadenosinem a deoxyguanosinem v DNA, čímž vznikají DNA addukty (Marnett 1999). Na obrázku (obr. 2) je znázorněn mechanismus peroxidace lipidů a vznik MDA.

Pokud není lipidová peroxidace dostatečně rychle ukončena, může způsobit poškození buněčné membrány, jejíž hlavní složkou jsou právě lipidy. Zvýšená hladina oxidantů má velmi škodlivé účinky a může vést až k buněčné smrti. Pokud volné radikály nejsou odstraňovány, poškozují lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Problémy mohou však vyvstat i v opačné situaci, tedy při snížení hladiny ROS, kdy může být narušena fyziologická role oxidantů při buněčné proliferaci nebo při obraně organismu (Finkel & Holbrook 2000).

V živých organizmech existují různé molekuly, které urychlují terminaci zachycováním volných radikálů a chrání tak buněčnou membránu. Takové látky nazýváme antioxidanty, mezi něž patří např. vitamin E, C, A, glutathion nebo stopové prvky jako měď, zinek, selen a mangan, které jsou součástí struktury enzymů produkovaných v organismu (Masella *et al.* 2005). Problematice antioxidantních enzymů se budu věnovat jiné kapitole.



Obr. 2: Mechanismus lipidové peroxidace. Zvýrazněn je malondialdehyd, který vzniká jako konečný produkt lipidové peroxidace spolu s 4-hydroxynonenalem. MDA – malondialdehyd, 4-HNE – 4-hydroxynonenal. (Štípek *et al.* 2000).

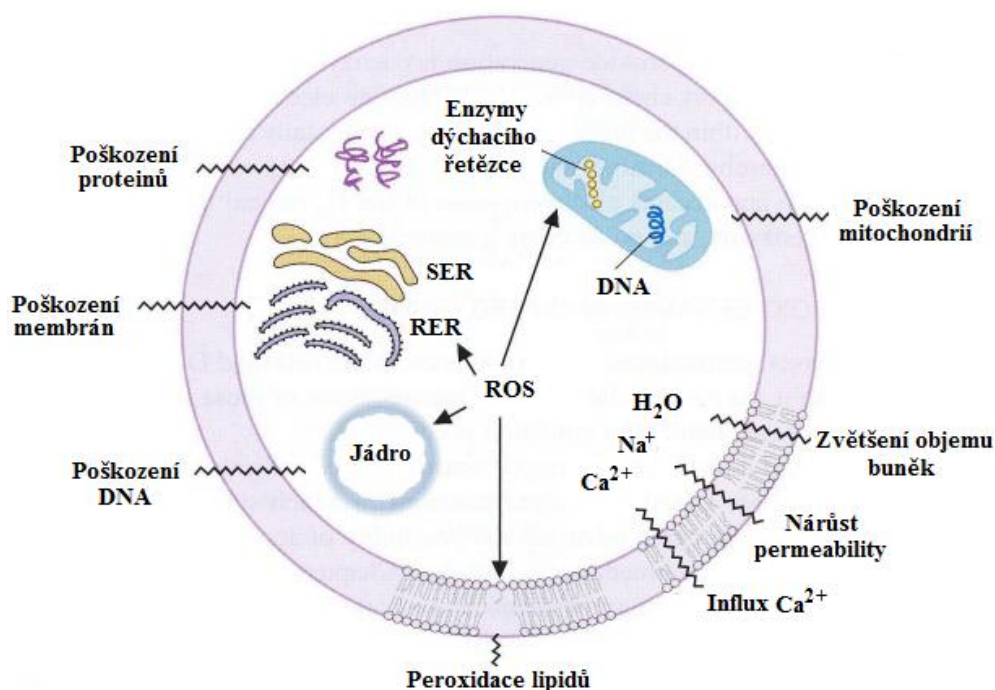
1.2.2.2 Poškození DNA

Reaktivní kyslíkové formy (resp. volné radikály) mohou výrazně poškodit DNA a RNA, např. reakcí hydroxylového radikálu s DNA vznikají různé produkty se změnou strukturou a porušenými vazbami. Tím dochází ke štěpení řetězce DNA a modifikaci bází. Výsledkem je například mutace způsobená špatným párováním bází. Jedná se například o záměnu párů AT za GC a naopak (Šmardová 2011).

1.2.3 Malondialdehyd

Malondialdehyd (MDA) je hlavním biomarkerem oxidativního poškození biomembrán (Nielsen *et al.* 1997) a v organismu se za fyziologických podmínek (pH 7) vyskytuje ve formě enolátového aniontu. Při pH nižší než hodnota 4,5 se vyskytuje spíše ve formě vysoce reaktivního β -hydroxyakroleinu (Esterbauer *et al.* 1991).

Společně s 4-hydroxynonenalem jsou uvolňovány v průběhu štěpení uhlíkového řetězce lipidových hydroperoxidů. Tyto látky potom mohou měnit fluiditu membrán a zvyšovat jejich propustnost pro ionty. V důsledku toho mohou způsobit lýzu buněk nebo snížit membránový potenciál. Váží se přes aminovou nebo thiolovou skupinu na proteiny a nukleové kyseliny, čímž dochází k vytvoření vazby mezi aminokyselinami proteinů a aldehydovými produkty peroxidace lipidů, což zapříčiňuje snížení mobility membránových proteinů. Po navázání MDA na proteiny dochází k jejich agregaci, a takto modifikované proteiny jsou citlivější k proteolytické degradaci (Grotto *et al.* 2009). Proto se malondialdehyd nalézá ve tkáních především jako vázaný a ve volné formě jen v malém množství. Z klinického hlediska je nejdůležitější stanovení celkového malondialdehydu (Esterbauer *et al.* 1991).



Obr. 3: Poškození buňky reaktivními kyslíkovými formami (ROS). SER – hladké endoplazmatické retikulum, RER – drsné endoplazmatické retikulum. Při ataku ROS dochází v buňce k mnoha poškozením (buněčných komponent a DNA) a spuštění peroxidace lipidů (Cheeseman & Slater 1993).

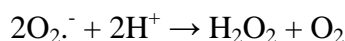
1.2.4 Obrana organismu proti ROS

Organismus si proti ROS vyvinul obranný antioxidační systém, který zahrnuje enzymatický a neenzymatický způsob obrany. První skupinu antioxidantů tvoří vitamin A, vitamin C, vitamin E, glutathion, koenzym Q10, kyselina α -lipoová a karotenoidy. Ve vodě rozpustný vitamin C a v tucích rozpustné vitaminy E a A spolu tvoří antioxidační systém, jež je přímo schopen z organismu ROS odstraňovat, z nichž jako první se antioxidační odpovědi proti lipidové peroxidaci účastní vitamin C (Frei *et al.* 1990).

Druhou skupinu antioxidantů tvoří intracelulární a extracelulární enzymy jako jsou superoxiddismutázy, kataláza, glutathionperoxidáza a glutathion-S-transferázy. Tyto enzymy reprezentují obranný systém fungující proti poškození způsobenému oxidativním stresem (Mates *et al.* 1999; Fang *et al.* 2002) a jejich úkolem je svým působením ROS odstranit. Regulují množství radikálů, čímž udržují homeostázu a chrání buněčné membrány a komponenty cytozolu proti poškození volnými radikály (Štípek *et al.* 2000).

1.2.4.1 Superoxiddismutázy a jejich funkce

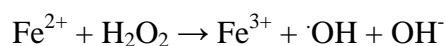
Superoxidový radikál vzniká z molekuly kyslíku přijetím jednoho elektronu. Tato reakce je většinou zprostředkována enzymatickými komplexy jako jsou NADH oxidáza, NADPH oxidáza nebo xantinoxidáza. Může být ale zprostředkována i neenzymaticky v dýchacím řetězci. V organismu se zneškodnění superoxidového radikálu účastní enzymy superoxiddismutázy (SOD). Vlivem obranné funkce cytozolické a mitochondriální SOD (v aktivním centru jsou navázány atomy manganu) superoxidový radikál podléhá tzv. dismutaci, přičemž je současně oxidován a redukován, a jako produkty vznikají peroxid vodíku a molekula kyslíku. Tuto reakci popisuje rovnice:



Peroxid vodíku je slabým oxidantem a relativně stabilní částicí (Štípek 2000; Racek 2003).

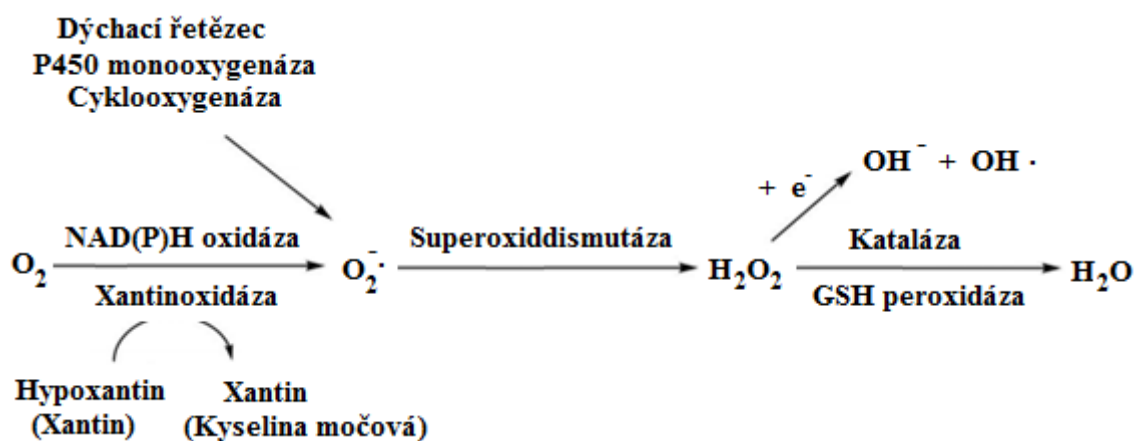
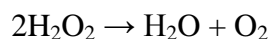
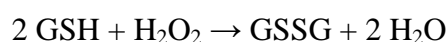
1.2.4.2 Glutathionperoxidáza a kataláza a jejich funkce

Peroxid vodíku může být, na rozdíl od superoxidového radikálu, rychle rozptýlen přes buněčné membrány, a v přítomnosti iontů přechodných kovů (Fe^{2+} , Cu^+) může podléhat redukci, čímž může vzniknout extrémně reaktivní hydroxylový radikál. Tuto reakci znázorňuje rovnice:



Hydroxylový radikál je silným oxidačním činidlem a je schopen reagovat s nenasycenými mastnými kyselinami, aminokyselinami nebo bázemi nukleových kyselin (Štípek 2000; Racek 2003).

Existují však dva enzymové systémy, které mohou negativní vlivy peroxidu vodíku eliminovat – a to glutathionperoxidázy přítomné v cytozolu a mitochondriích a katalázy přítomné v peroxizomech mnoha tkání. Zatímco glutathionperoxidázy hrají hlavní roli v odstranění peroxidu vodíku, který vzniká vlivem působení superoxiddismutáz (glutathion GSH je oxidován na GSSG) (Johansen *et al.* 2005; Fisher *et al.* 2006), katalázy katalyzují odstraňování peroxidu vodíku v případě jeho vysoké koncentrace (Yung *et al.* 2006). Tyto děje jsou popisovány následujícími rovnicemi:



Obr. 4: Přeměna kyslíku na vodu se vznikem ROS. Vlivem přeměny kyslíku za účasti enzymů NAD(P)H oxidázy, superoxiddismutázy, katalázy a glutathionperoxidázy vznikají reaktivní kyslíkové formy jako superoxidový radikál, peroxid vodíku a hydroxylový radikál. Jako vedlejší produkty reakce vznikají za účasti enzymu xantinoxidáza hypoxantin a xantin. Z xantinu dále vzniká kyselina močová. (Droge 2002; Taverne *et al.* 2013).

1.2.4.3 Glutathion-S-transferázy a jejich funkce

Úkolem GST je katalyzovat nukleofilní atak glutathionem, jenž vzniká činností gamma-glutamylcystein-syntetázy a glutathionsyntázy, na elektrofilní atom uhlíku, síry nebo dusíku na molekulách nepolárních cizorodých látek. Tím brání tomu, aby výše zmíněné látky poškozovaly správnou funkci buněčných proteinů nebo nukleových kyselin, na které mohou být vázány. GST se však stávají nefunkčními bez stálého přísunu

redukovaného glutathionu a přenašečů, které odstraňují již konjugované látky z buňky ven (Hayes *et al.* 2005; Josephy 2010).

1.2.5 Sledování hladiny oxidativního stresu

Hladina oxidativního stresu bývá sledována v souvislosti s akutními i chronickými patologickými procesy v organizmu, jež doprovázejí diabetes mellitus. Klinickým projevem oxidačního stresu a jeho sekundárních produktů může být vznik aterosklerózy, ledvinových a kardiovaskulárních onemocnění, rakovinného bujení, zánětlivých procesů či projevů stárnutí (Ďuračková *et al.* 1999; Kand'ár *et al.* 2002).

Vlivem působení ROS a exogenních toxinů vznikají v regulačních genech mutace a polymorfizmy, jejichž důsledkem je nestabilita DNA a chyby v replikaci DNA. Ke vzniku mutací a poškození DNA přispívá produkt lipidové peroxidace, malondialdehyd, který reaguje s nukleovými kyselinami za fyziologického pH. Produkty této reakce jsou deoxyguanosin, deoxyadenosin a deoxycytidin (Grotto *et al.* 2009).

Volné radikály mají velmi krátký poločas eliminace, proto se k popisování oxidačního stresu využívá stanovení produktů, které vznikají jejich reakcemi. Jako indikátory oxidativního stresu jsou tedy využívány produkty lipidové peroxidace, malondialdehyd nebo 4-hydroxynonenal. Mohou být ale také využity i jiné karbonylové sloučeniny, jako jsou formaldehyd, acetaldehyd či aceton. Lze také měřit aktivitu již zmíněných enzymů, které se v organizmu účastní odstraňování ROS. Dalšími možnými indikátory oxidativního stresu jsou také některé antioxidanty, např. vitamin C, vitamin E, glutathion, koenzym Q10, kyselina močová, α -tokoferol či β -karoten (Štípek *et al.* 2000).

V důsledku glykace proteinů nebo autooxidace glukózy, tudíž hyperglykémie, může být zvýšena produkce volných radikálů, a tedy i malondialdehydu. Bylo prokázáno, že v erythrocytech diabetiků bývají přítomny zvýšené hladiny malondialdehydu – u pacientů s DM byla pozorována vyšší hladina v plazmě než u zdravých jedinců (Su *et al.* 2008; Grotto *et al.* 2009; Manohar *et al.* 2013).

Bylo také prokázáno, že diabetici, jež zároveň trpí kardiovaskulárním onemocněním, vykazovali ještě vyšší hladiny MDA než pacienti s DM bez doprovodných komplikací. Toto je důkazem, že i kardiovaskulární choroby souvisejí s peroxidací lipidů a tvorbou volných radikálů (Kesavalu *et al.* 2001).

1.3 Genetika oxidativního stresu

Geny, jež mohou být zodpovědné za oxidativní stres, kódují enzymy superoxiddismutázy, glutation-S-transferázy, glutathionperoxidázu a katalázu, a vykazují polymorfnní charakter. Ve schématech jednotlivých genů jsou znázorněny pouzi námi studované polymorfizmy.

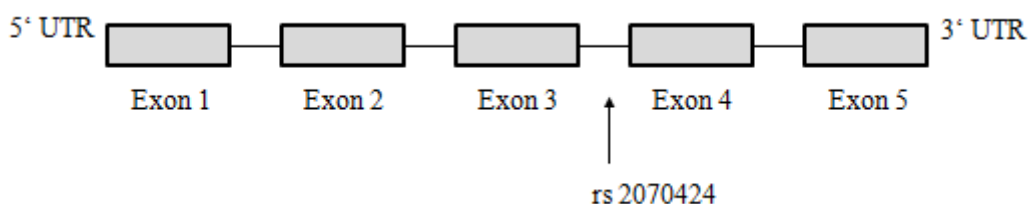
1.3.1 Superoxiddismutázy a jejich polymorfizmy

U lidí jsou exprimovány tři izoformy enzymu SOD, které jsou kódovány třemi různými geny. SOD1 je lokalizována zejména v cytoplazmě (v aktivním centru jsou navázány atomy zinku a mědi), SOD2 v mitochondriích (v aktivním centru je navázán atom manganu) a SOD3 je extracelulární (v aktivním centru jsou navázány atomy zinku a mědi). SOD1 představuje cca 85 % celkové buněčné SOD aktivity u savců a u člověka je nejvíce aktivní v ledvinách (Marklund 1984). V předkládané diplomové práci jsme se zaměřili na polymorfizmy genů *SOD1* a *SOD3*.

1.3.1.1 Polymorfismus *SOD1*

Gen *SOD1* o velikosti 9310 bp je lokalizován na chromozomu 21 v pozici 21q22.1. Je tvořen pěti exony (s UTR oblastmi v exonu 1 a 5) a čtyřmi introny. 5' UTR oblast (v rozmezí 500 bp) zahrnuje vazebná místa transkripčního faktoru a regulující oblasti genu. Z nejvýznamnějších polymorfizmů byly popsány rs 2070424, rs 1041740, rs 1788180, rs 2234694 a rs 17880135. Tyto polymorfizmy se mohou významně uplatňovat v patogenezi a rozvoji komplikací diabetes mellitus a dalších onemocnění. Mohammedi a spolupracovníci ve své studii popsali polymorfizmy rs 1041740 (substituce C/T v intronu mezi exonem 4 a exonem 5) a rs 17880135 (substituce G/T v 3' UTR oblasti genu), které jsou asociovány s rozvojem diabetické nefropatie u pacientů s diabetes mellitus 1. typu. V případě rs 1041740 je za zvýšené riziko diabetické nefropatie zodpovědný genotyp TT, v případě rs 17880135 genotyp GG (Mohammedi *et al.* 2011). Další tři studie se zaměřily na asociaci diabetických komplikací s polymorfizmem rs 2234694 (substituce A/C v intronu mezi exonem 3 a exonem 4) a asociace byla potvrzena s diabetickou nefropatií (Flekač *et al.* 2008, Al-Kateb *et al.* 2008; Panduru *et al.* 2010). U polymorfizmu rs 1788180 v intronu 1 (substituce C/T) byla rovněž prokázána asociace se zvýšeným rizikem nefropatie u pacientů s T1D (Al-Kateb *et al.* 2008; Panduru *et al.* 2010).

Polymorfismus rs 2070424 (substice A/G v intronu mezi exonem 3 a exonem 4) bude dále popsán v diskuzi.

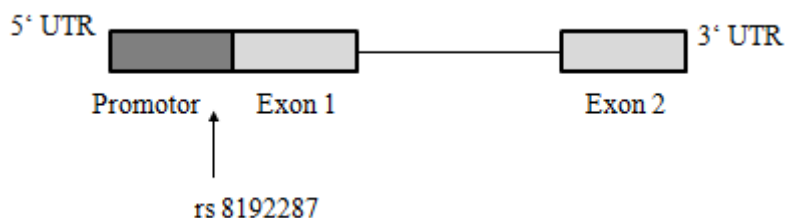


Obr. 5 : Schématické znázornění uspořádání genu *SOD1* se zkoumaným polymorfizmem

Lidský gen *SOD1* je tvořen celkem 5 exony, z nichž exon 1 se nachází v 5' UTR oblasti a exon 5 v 3' UTR oblasti. Polymorfismus rs 2070424 odpovídá substituci A/G v intronu mezi exonem 3 a exonem 4.

1.3.1.2 Polymorfismus *SOD3*

Gen *SOD3* o velikosti 10934 bp je lokalizován na chromozomu 4 v pozici 4p15.2 a zahrnuje dva exony (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6649>). Předpokládá se možná asociace genu s diabetickou polyneuropatií u pacientů diabetes mellitus 1. typu (Zotova *et al.* 2003). Několik studií se zaměřilo na různé polymorfizmy genu *SOD3* v souvislosti s diabetes mellitus a jeho komplikacemi (rs 1799895 a rs 8192288). V případě rs 1799895 se jedná o substituci C/G v exonu 2, u rs 8192288 se jedná o substituci G/T v oblasti promotoru. Ani u jednoho polymorfizmu však nebyla prokázána souvislost s diabetes mellitus a komplikacemi (Campo *et al.* 2005, Siedlinski *et al.* 2009). Mohammedi a spolupracovníci zkoumali polymorfismus rs 2284659 – jedná se o substituci G/T v oblasti promotoru genu. Výsledky jejich studie naznačují, že alela G asociována s nižší aktivitou enzymu a se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních chorob u diabetiků (Mohammedi *et al.* 2015).



Obr. 6 : Schématické znázornění uspořádání genu *SOD3* se zkoumaným polymorfizmem

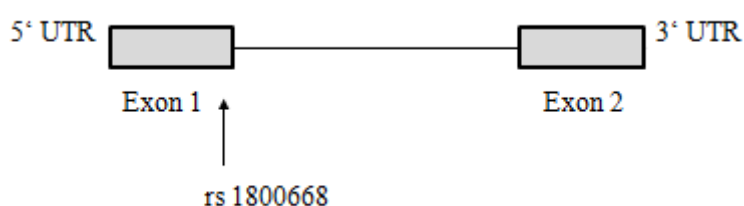
Lidský gen *SOD3* je tvořen celkem dvěma exony, z nichž exon 1 se nachází v 5' UTR oblasti genu. Polymorfismus rs 8192287 odpovídá substituci G/T a nachází se v promotorové oblasti genu.

1.3.2 Glutathionperoxidáza a její polymorfizmy

V lidském organismu je exprimováno pět různých izoform enzymu GPX (1-5), které se nachází v erytrocytech, ledvinách a játrech, cytozolu, plazmě i extracelulárně (Roxborough *et al.* 1999; Whitin *et al.* 1998; Zotova *et al.* 2004). Pozornost jsme zaměřili na gen *GPX1* kódující enzym GPX1.

Gen *GPX1* o velikosti 1425 bp je lokalizován na chromosomu 3 v pozici 3p21.3. Je tvořen dvěma exony a intronem. Lokusy genu jsou asociovány se ztrátou heterozygoty, která zahrnuje delecí chromozomální oblasti jednoho ze dvou autozomů, což vede k detekci jen jedné alelické varianty heterozygotních jedinců. Katalytická aktivita enzymu *GPX1* u heterozygotů je však vyšší než u homozygotů (Ishida *et al.* 1987). Jako nejvýznamnější se jeví polymorfizmy rs 1050450 a rs 1800668. Význam polymorfizmu rs 1800668 bude popsán v diskuzi.

U polymorfizmu rs 1050450 se jedná o jednonukleotidovou substituci v pozici 593 v genu (3' UTR oblast exonu 2), kdy je cytosin nahrazen thyminem (tranzice C/T) v kodonu v pozici 197 (Leu197Leu) (Forsberg *et al.* 1999). Varianta Leu je asociována se 40% redukcí aktivity enzymu *GPX1* a zvýšenou náchylností k rakovinnému bujení (Chen *et al.* 2011; Liwei *et al.* 2012). Byla prokázána i asociace polymorfizmu Pro197Leu s výskytem kardiovaskulárních chorob u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (Hamanishi *et al.* 2004, Nemoto *et al.* 2007). Naproti tomu Harris a spolupracovníci neprokázali žádnou asociaci s diabetes mellitus, ani s jeho komplikacemi (Harris *et al.* 2007).



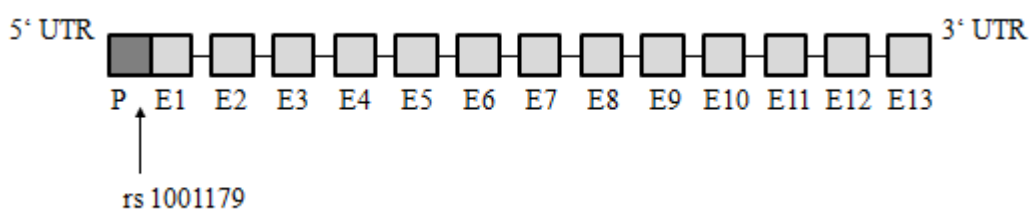
Obr. 7: : Schématické znázornění uspořádání genu *GPX1* se zkoumaným polymorfizmem
Lidský gen *GPX1* je tvořen celkem dvěma exony, z nichž exon 1 se nachází v 5' UTR oblasti. Polymorfizmus rs 1800668 odpovídá substituci G/A a nachází se v exonu 1.

1.3.3 Kataláza a její polymorfizmy

Gen *CAT* o velikosti 33138 bp je lokalizován na chromosomu 11 v pozici 11p13 a zahrnuje 13 exonů.

V souvislosti s onemocněním diabetes mellitus bylo vyšetřováno několik polymorfizmů genu *CAT*, a to tranzice -262C/T v promotoru (rs 1001179), tranzice 389T/C v exonu 1 (rs 1049982), transverze -21A/T v 5' UTR oblasti genu (rs 7943316) a tranzice 11C/T v exonu 9. Vztah k diabetes mellitus byl prokázán pouze u polymorfizmu -262C/T (Pask *et al.* 2006; Flekač *et al.* 2008; Panduru *et al.* 2010; Góth *et al.* 2012).

U polymorfizmu rs 1001179 byla prokázána asociace s diabetes mellitus, blíže o něm však bude pojednáno v diskuzi.



Obr. 8: : Schématické znázornění uspořádání genu *CAT* se zkoumaným polymorfizmem
Lidský gen *CAT* je tvořen celkem 13 exony. Polymorfismus rs 1001179 odpovídá substituci C/T a nachází se v promotorové oblasti genu. P: promotorová oblast genu, E1-E13: jednotlivé exony.

1.3.4 Glutathion-S-transferázy a jejich polymorfizmy

Glutathion-S-transferázy (GST) jsou enzymy účastníci se druhé fáze metabolické detoxikace. Jejich zástupci vykazují odlišnosti v sekvenci aminokyselin a velké množství sekvencí GST ve veřejných databázích má stále neznámou funkci (Atkinson & Babbitt 2009). Na základě proteinové sekvence a struktury jsou GST rozdělovány do tří tříd – cytozolické, mitochondriální a mikrozomální (Udomsinprasert *et al.* 2005; Allocati *et al.* 2009). V této práci se zaměřím na cytozolické GST, které jsou dle struktury u člověka rozděleny do osmi tříd: alfa α (GSTA), zeta τ (GSTZ), kappa κ (GSTK), theta θ (GSTT), mu μ (GSTM), pi π (GSTP), sigma σ (GSTS) a omega ω (GSTO) (Josephy 2010; Oakley 2011).

Genová exprese enzymů GST závisí na jednotlivých polymorfizmech. Jednotlivé varianty enzymů regulují odstranění toxických meziproductů DNA a mohou být zodpovědné i za náchylnost k oxidativnímu stresu a poruše β -buněk pankreatu (Yildirim *et al.* 2005). Některé polymorfizmy *GST* (rs 1138272, rs1695, *GSTT* null, *GSTM* null) mají vliv na vznik astmatu, aterosklerózy, alergie či dalších zánětlivých onemocnění (Hayes *et al.* 2005).

U genů *GSTM1*, *GSTT1* a *GSTP1* bylo zjištěno, že vykazují polymorfizmy napříč celkovou populací, přičemž nejčastější se vyskytují v genech *GSTM1* a *GSTT1* (Hayes *et al.* 2005).

1.3.4.1 Polymorfizmy *GSTP1*

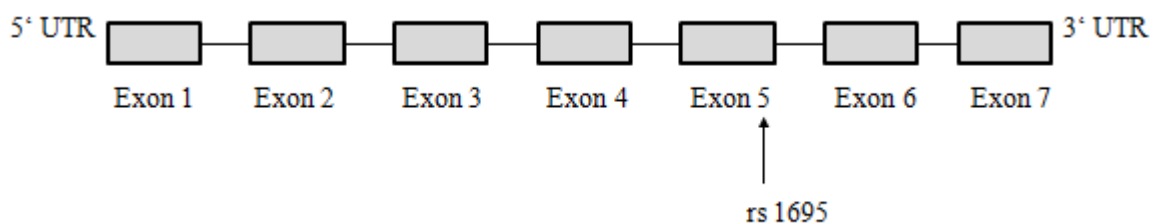
Gen *GSTP1* o velikosti 3066 bp je lokalizován na chromozomu 11 v pozici 11q13 a je tvořen sedmi exony a šesti introny (Board *et al.* 1989; Morrow *et al.* 1989; Xu *et al.* 2014). Nejvýznamnějšími polymorfizmy jsou rs 1695 v kodonu 105 (substituce Ile/Val) a rs 1799811 v kodonu 114 (substituce Ala/Val) se signifikantní odlišností v katalytické aktivitě enzymu (Ali-Osman *et al.* 1997).

Byly popsány čtyři různé varianty genu *GSTP1* – *GSTP1**A (wild type), *GSTP1**B, *GSTP1**C a *GSTP1**D. Varianta *GSTP1**A představuje záměnu Ala/Val na kodonu 114 (rs 1138272) a je asociována s multifaktoriálními onemocněními, jako jsou astma a alergie (Carlsten *et al.* 2011).

Varianta *GSTP1**B je substitučním polymorfizmem (záměna C/T na nukleotidu 341), kdy v kodonu 114 exonu 6 dochází k záměně Ala/Val (Hayes *et al.* 2005; McIlwain *et al.* 2006).

Varianta *GSTP1**C představuje jednonukleotidovou záměnu na kodonu 114. Dochází však k synonymní substituci, při které je zachována aminokyselina (Val), tudíž katalytická aktivita enzymu se nemění (Hayes *et al.* 2005; McIlwain *et al.* 2006). Dle výsledků studie Jiao *et al.* má tato varianta protektivní charakter vůči rakovině slinivky (Jiao *et al.* 2007).

Varianta *GSTP1**D (rs 1695) představuje substituci A/G na nukleotidu 313 v exonu 5 (dochází k záměně v kodónu 105 z ATC (Ile) do GTC (Val)). Tento kodon je součástí aktivního centra enzymu a substituce aminokyseliny způsobuje pokles substrátově-specifické katalytické aktivity enzymu. Varianta *GSTP1**D, tedy může být rizikovým faktorem a indikátorem rozvoje mnoha onemocnění (Hayes *et al.* 2005; McIlwain *et al.* 2006).



Obr. 9: : Schématické znázornění uspořádání genu *GSTP1* se zkoumaným polymorfizmem

Lidský gen *GSTP1* je tvořen celkem sedmi exony a šesti introny. Polymorfismus rs 1695 odpovídá substituci A/G v exonu 5.

1.3.4.2 Polymorfizmy *GSTM1*

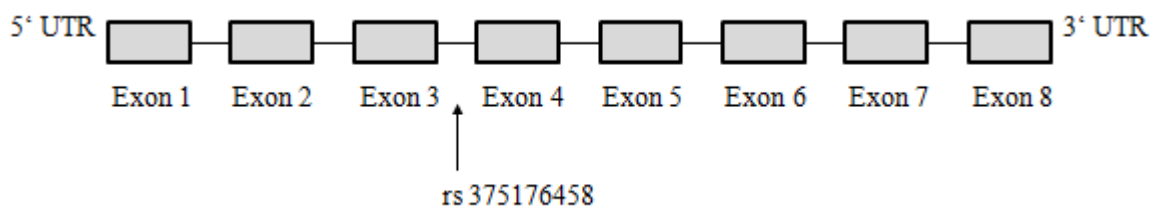
Geny *GSTM* o velikosti 21244 bp se nachází na chromozomu 1p13.3 a tvoří pět tříd (*GSTM1-5*) (Ross *et al.* 1993). Tato diplomová práce je zaměřena na polymorfismus *GSTM1*, proto nebudou polymorfizmy ostatních genů *GSTM* popsány.

V genu *GSTM1* byly analyzovány polymorfizmy *GSTM1*0*, *GSTM1*A*, *GSTM1*B* a *GSTM1-1x2* (Wu *et al.* 2013).

V případě *GSTM1*0* se jedná o tzv. null polymorfismus, tedy homozygotní delecii, kdy není exprimován žádný protein, což vede k absenci jeho aktivity. Frekvence tohoto polymorfismu se pohybuje mezi 45–50 % v celkové populaci (Capoluongo *et al.* 2006). Bylo prokázáno, že null polymorfismus je asociován s rostoucím počtem pacientů s rakovinou v důsledku zvýšené náchylnosti ke karcinogenům vznikajících při oxidativním stresu (Filippova *et al.* 2012).

*GSTM1*A* a *GSTM1*B* polymorfizmy jsou tzv. wild type genotypy – liší se v jedné bázi v exonu 7, jedná se o substituci C/G na pozici 534 vedoucí k záměně Lys/Asn (Widersten *et al.* 1991). Katalytické účinnosti enzymů kódovaných těmito alelami jsou si ale podobné (Capoluongo *et al.* 2006).

Polymorfismus *GSTM1*1x2* byl popsán pouze u arabské populace. Tento polymorfismus vznikl vlivem duplikace genu a zodpovídá za zvýšenou expresi genu, a tudíž zvýšenou aktivitu enzymu (Wu *et al.* 2013).

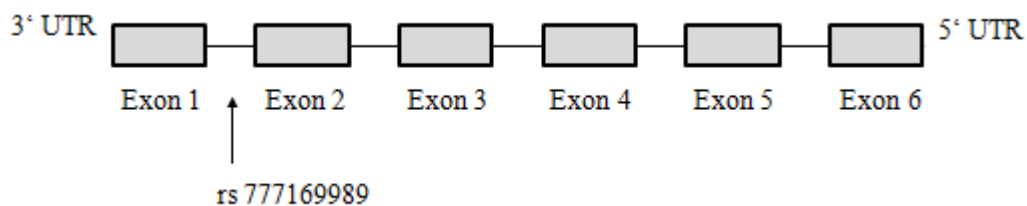


Obr. 10: : Schématické znázornění uspořádání genu *GSTM1* se zkoumaným polymorfizmem
Lidský gen *GSTM1* je tvořen celkem osmi exony. Polymorfizmus rs 375176458 odpovídá deleci -/C v intronu mezi exonem 3 a exonem 4.

1.3.4.3 Polymorfizmy *GSTT1*

Geny *GSTT* jsou lokalizovány na chromozomu 22 v pozici 22q11.23 a jsou rozděleny do dvou podtříd (*GSTT1* a *GSTT2*), které sdílejí 55 % aminokyselinové sekvence a jsou od sebe vzdálené přibližně 50 kb (Pemble *et al.* 1994, Webb *et al.* 1996). V diplomové práci jsme se zaměřili však na podtřídou 1, resp. gen *GSTT1* o velikosti 8146 bp.

GSTT1 genotyp je tvořen dvěma variantami – *GSTT1*1* a *GSTT*0*. V případě *GSTT1*1* (wild type) se jedná o funkční genotyp. V případě *GSTT1*0* neboli null polymorfizmu se jedná o homozygotní deleci, a tedy ztrátu funkční aktivity enzymu (Hayes & Strange 2000). V důsledku toho může vést až ke vzniku mnoha maligních nádorů (Hayes *et al.* 2005; Cheng *et al.* 2012; Pan *et al.* 2012; Ruiz-Cosano *et al.* 2012). Frekvence genotypu *GSTT1*0* se pohybuje v pásmu 11–38 % celkové populace (Doney *et al.* 2005; Wang *et al.* 2006).



Obr. 11: : Schématické znázornění uspořádání genu *GSTT1* se zkoumaným polymorfizmem
Lidský gen *GSTT1* obsahuje šest exonů. Polymorfizmus rs 777169989 odpovídá deleci -/G v intronu mezi exonem 1 a exonem 2.

Kromě vyšetření samostatných polymorfizmů genů *GST* hrají významnou roli i asociační studie mezi kombinacemi polymorfizmů *GSTM1* a *GSTT1*. Bylo prokázáno, že *GSTT1* a *GSTM1* null polymorfizmy, ať už v kombinaci nebo samostatně, jsou

asociovány se zvýšeným rizikem rozvoje diabetes mellitus 2. typu. Pouze *GSTM1* null polymorfismus má přímý účinek na kontrolu glykémie (Amer *et al.* 2011). Yalin a spolupracovníci se zaměřili na asociace polymorfizmů genů *GSTM1* a *GSTT1* (jejich vzájemných kombinací) u zdravých jedinců a diabetických pacientů s predikcí diabetických komplikací. Ačkoliv pacienti měli vyšší frekvence null genotypů, nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl ve frekvencích genotypů mezi skupinami. Výsledky ale poukázaly, že null genotypy mohou hrát roli v etiopatogenezi diabetes mellitus a null polymorfismus genu *GSTM1* může být markerem predikce diabetu (Yalin *et al.* 2007).

2 Cíle práce

Tato diplomová práce, realizovaná na Ústavu obecné biologie a genetiky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, je koncipována jako asociační studie zahrnující vyšetření vybraných polymorfizmů genů oxidativního stresu a vyšetření hladiny malondialdehydu v krevní plazmě u osob postižených diabetes mellitus a u zdravých kontrol. Cílem této diplomové práce je zjistit, zda se vybrané polymorfizmy genů *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *SOD1*, *SOD3*, *GPX1* a *CAT* vyskytují s vyšší frekvencí ve skupině diabetických pacientů než u zdravých kontrol. Dalším výstupem práce jsou naměření hodnot koncentrace malondialdehydu jakožto markeru oxidativního stresu a zjištění korelace mezi studovanými skupinami.

Cíle práce

1. Genotypizovat vybrané polymorfizmy genů *SOD1*, *SOD3*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *GPX1* a *CAT* v souboru 40 pacientů s T1D, 40 pacientů s T2D a 45 zdravých jedinců.
2. Změřit koncentraci malondialdehydu jakožto markeru oxidativního stresu.
3. Analyzovat míru tvorby malondialdehydu v závislosti na výše uvedených polymorfizmech mezi jednotlivými skupinami.

3 Materiál a metody

3.1 Používaný materiál

3.1.1 Pufry a roztoky

Vysolovací metoda izolace DNA

RCLB (Red Cell Lysis Buffer): 320 mM sacharóza

1% (v/v) Triton X100

12 mM TRIS HCl, 5 mM MgCl₂ · 6 H₂O

WCLB (White Cell Lysis Buffer): 120 mM EDTA pH=8

375 mM NaCl

Agarózová gelová elektroforéza

TBE pufr: 890 mM TRIS báze

890 mM kyselina boritá

20 mM EDTA pH=8

Loading Dye 6× (Fermentas, Kanada): 0,25 % bromfenolová modř

0,25 % xylencylonová modř

30 % glycerol

3.1.2 Enzymy

Restrikční enzymy

Alw26I (Thermo Scientific™, USA)

Msp I (Thermo Scientific™, USA)

Modifikační enzymy

Proteináza K 30 units/mg (Sigma Aldrich, USA)

Taq DNA polymeráza 500 U, 5U/μl (Fermentas, Kanada)

3.1.3 Komerční soupravy a standardy

PCR reakční kit (Fermentas, Kanada)

<i>Taq</i> DNA polymeráza 500 U, 5U/ μ l	(Fermentas, Kanada)
dNTPs - dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM)	(Sigma Aldrich, USA)
10 \times <i>Taq</i> pufr s (NH ₄) ₂ SO ₄	(Fermentas, Kanada)
25 mM MgCl ₂	(Fermentas, Kanada)
10 x Tango pufr	(Thermo Scientific™, USA)
10 x Fast Digest pufr	(Thermo Scientific™, USA)
TaqMan Universal PCR Master Mix	(LifeTechnologies, USA)
Marker pUC19 DNA/MspI	(Fermentas, Kanada)

3.1.4 Primery a sondy

Syntetické jednořetězcové oligonukleotidy sloužící jako primery pro PCR byly dodány firmou KRD (ČR) a Taq Man fluorescenčně značené (VIC/FAM) genotypizační sondy byly dodány firmou LifeTechnologies (USA). Obsahující sekvence primerů a sond jsou zobrazeny v tabulkách (Tab. 2, Tab.3).

Tab. 2: Seznam primerů použitých při polymerázové řetězcové reakci

Primer	Sekvence (5' \rightarrow 3')	Délka primeru	T _m (° C)
SOD1-F	AGTACTGTCAACCACTAGCA	20	64
SOD1-R	CCAGTGTGGGCCCAATGATG	20	64
GSTT1-F	TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC	23	61
GSTT1-R	TCACCGGATCATGGCCAGCA	20	61
GSTM1-F	CAAATTCTGGATTGTAGCAGATCATGC	27	59
GSTM1-R	CACAGCTCCTGATTATGACAGAAGCC	26	59
GSTP1-F	ACCCAGGGCTCTATGGGAA	20	59
GSTP1-R	TGAGGGCACAAGAAGCC	18	59

Tab. 3: Seznam sond použitých při genotypizaci

Sonda ID	Obsahující sekvence (5' \rightarrow 3') [VIC/FAM]	T _m (° C)
SOD3	TGCGGCTAGTGCCAGCCACTGTGTT[G/T]TCACTG	60
C__2668725_10	GGCGAGTAATGATCTCATT	
GPX1	CAGCGGAGCGCCCCGAACAAGCACT[G/A]TAAGG	60
C__7912052_40	GGAGGCCAGCAGGCGCCTCC	
CAT	GGAGCCCCGCCCTGGGTTCCGGCTAT[C/T]CCGGGC	60
C__11468118_10	ACCCCGGGCCGGCGGGGCG	

3.1.5 Chemikálie

Agaróza	(Serva, Německo)
CaCl ₂ (chlorid vápenatý)	(Sigma Aldrich, USA)
CH ₃ COOH (kyselina octová)	(Lach-Ner, ČR)
DNA žebříček 100 bp	(Norgen Biotek, Kanada)
EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová)	(Sigma Aldrich, USA)
Ethanol (96%, 70%)	(FNKV, ČR)
Ethanol absolutní (100%)	(Sigma Aldrich, USA)
Etidium bromidTB	(Top-bio, ČR)
GelRed (interakalační činidlo)	(Biotium, USA)
HCl (kyselina chlorovodíková)	(Sigma Aldrich, USA)
Marker pUC19 DNA/ <i>Msp I</i>	(Fermentas, Kanada)
MgCl ₂ (chlorid hořečnatý)	(Serva, Německo)
NaCl (chlorid sodný)	(Serva, Německo)
NaOH (hydroxid sodný)	(Penta, ČR)
Nanášecí pufr (6x konc.)	(Takara, Japonsko)
SDS (dodecylsulfát sodný)	(Sigma Aldrich, USA)
Tris baze	(Carl Roth, Německo)
Voda bez RNase, DNase	(Sigma Aldrich, USA)

Pro stanovení MDA byly použity tyto chemikálie:

1,1,3,3-tetrametoxypropan (99%)	(Sigma Aldrich, USA)
(3-dimethyl-amino)-2-methyl-2-propenal (99%)	(Sigma Aldrich, USA)
2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH) (99%),	(Sigma Aldrich, USA)
Aceton	(Lachema, ČR)
AcN (99 %)	(LachNer, ČR)
Etanol	(LachNer, ČR)
Hexan	(LachNer, ČR)
Hydroxid sodný	(LachNer, ČR)
Kyselina chloristá (70%)	(Lachema, ČR)
Kyselina chlorovodíková (35%)	(Penta, ČR)
Kyselina sírová (96%)	(Lachema, ČR)

Veškeré používané chemikálie a rozpouštědla dosahovaly analytického stupně čistoty a dle potřeby byly certifikovány certifikovaných pro elektroforézu nebo molekulární biologii. Pro přípravu všech roztoků byla použita deionizovaná voda (Demiwa 3, Watek, ČR).

3.1.6 Používané přístrojové vybavení

Autokláv Systec DE-23	(Systec, Německo)
Digitální váhy 40 SM - 200 A	(Precisa, Švýcarsko)
Hlubokomrazicí box U410	(New Brunswick, UK)
Kombinovaná lednička	(Whirlpool, USA)
LabCycler SensoQuest	(Scholler, Německo)
Laminární box Aura Mini	(BioAir, Itálie)
Laminární box CleanAir	(Scholler, Německo)
Mikrovlnná trouba	(Zanussi, Itálie)
Minicentrifuga Z 100M	(Hermle, Německo)
Mraznička zásuvková	(Whirlpool, USA)
Nanophotometr	(Implen, Německo)
Systém pro elektroforézu OWL A1	(Thermo Scientific, USA)
Stolový vortex	(Scientific Industrie, USA)
ThermoCycler C1000	(Bio Rad, USA)
Zdroj napětí pro elektroforézu	(Major Science, USA)

3.1.7 Používané počítačové programy

NanoPhotometr TM PVC software 5.2.2.2	(Implen, Německo)
Kodak Molecular Imaging software 5.0.	(Kodak, USA)
GraphPad Prism 6.00	(GraphPad Software, USA)

3.1.8 Soubor pacientů a zdravých jedinců

Zkoumaný soubor jedinců (kavkazská populace) zahrnuje 45 zdravých kontrol, 40 pacientů T1D a 40 pacientů T2D evidovaných ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady. Při zohledňování kritéria zdravého jedince jsme vycházeli z dotazování se na úrovni osobní anamnézy. Všichni účastníci studie byli předem seznámeni o jejích cílech a před vlastním odběrem podepsali informovaný souhlas. Experimenty byly schváleny etickou komisí 3. LF UK.

Počet jedinců a parametry jsou shrnuty do tabulky (Tab. 4). Všem jedincům bylo odebráno 6 ml nesrážlivé krve. Z 1 ml krve byla separována plazma za účelem stanovení malondialdehydu a zbytek byl použit k izolaci DNA.

Tab. 4: Charakteristika a klinická data zkoumaného souboru

Parametr	T1D	T2D	ZK
Počet jedinců	40	40	45
Počet žen	22	18	30
Počet mužů	18	22	15
Průměrný věk (roky)	44,9 ± 15,7	65,2 ± 11,5	36 ± 14,2
Věkový rozptyl	36–88	20–70	15–71
Počet pacientů s nefropatií	5	2	-
Počet pacientů s neuropatií	8	3	-
Počet pacientů s kardiovaskulárními komplikacemi	1	6	-
Počet pacientů s retinopatií	10	1	-
Cholesterol (mmol.l ⁻¹)	5,2	5,0	n/a
LDL cholesterol (mmol.l ⁻¹)	2,8	4,8	n/a
HDL cholesterol (mmol.l ⁻¹)	1,6	1,3	n/a
TAG (mmol.l ⁻¹)	1,2	1,8	n/a

n/a – neanalyzováno, T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly

3.2 Metodika práce a postupy

3.2.1 Izolace DNA z periferní krve

K izolaci DNA byla použita plná nesrážlivá periferní krev s EDTA, čerstvá nebo zmrazená na -20 °C. K samotné izolaci byla využita vysolovací metoda dle Millera (Miller *et al.* 1988).

Princip

V prvním kroku byly dezintegrovány membrány erytrocytů. Následně byla získána směs proteinů a DNA dezintegrací leukocytární membrány proteinázou K za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) jako detergentu. Poté byla k roztoku DNA přidána vysoká

koncentrace NaCl. Ionty NaCl vytvářejí hydratační obal, díky kterému je DNA tzv. vysolena z roztoku. V posledním kroku dochází vlivem přidání 96% etanolu k precipitaci DNA. Následovalo promytí DNA 70% ethanolem, který zvyšuje čistotu DNA.

Postup

- 1) K 500 μ l plné krve byl přidán 1 ml RCLB pufru a směs byla 30 s třepána lehce obrácením zkumavky. Poté byla zkumavka stočena 3 min při 16 000 g. Získaný supernatant byl odstraněn.
- 2) Sediment byl resuspendován v 1 ml destilované vody a stočen při 16 000 g. Promývání bylo opakováno, dokud nebyl sediment světlý, bez erytrocytů.
- 3) K sedimentu bylo přidáno 235 μ l destilované H₂O, 80 μ l WCLB a obsah byl resuspendován. Poté bylo přidáno 40 μ l 10 % SDS a 15 μ l proteinázy K a zkumavka byla inkubována na otáčecím rotátoru při 55 °C po dobu 60 min. Po inkubaci byl obsah zkumavky zchlazen na pokojovou teplotu.
- 4) Poté bylo přidáno 100 μ l 6M NaCl a následně bylo se zkumavkou silně třepáno 15 s. Obsah byl stočen 6 min při 16 000 g a supernatant byl přenesen do nové zkumavky.
- 5) Supernatant byl promíchán s 1 ml čistého etanolu vychlazeného na -20 °C. DNA byla vysrážena lehkým obrácením zkumavky a poté inkubována 20 min na ledě. Po inkubaci byl obsah stočen 2 min při 16 000 g a supernatant byl odebrán.
- 6) DNA byla promyta 1 ml 70% ethanolu a stočena 2 min při 16 000 g. Gázou byly stěny zkumavky opatrně zbaveny zbytků ethanolu. Poté byla DNA sušena a rozpuštěna ve 100 μ l destilované H₂O. DNA byla uchovávána při 4 °C.

3.2.2 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Kvalita a kvantita DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí nanofotometru v křemenných kyvetách při vlnové délce λ 260 a 280 nm. Kontaminace DNA proteiny a RNA byla určena porovnáním podílu absorbancí A₂₆₀/A₂₈₀ a A₂₆₀/240 v doporučeném rozmezí pro čistotu DNA 1,8–2.

3.2.3 Genotypizace polymorfizmů genů

Pro účel genotypizace byl nejprve amplifikován požadovaný úsek DNA pomocí PCR. Amplifikované produkty byly podrobeny elektroforetickému stanovení přímo nebo po štěpení vhodnou restrikční endonukleázou.

3.2.3.1 Polymerázová řetězcová reakce

Polymerázová řetězcová reakce (PCR) slouží k rychlé a selektivní amplifikaci požadovaného úseku DNA. Princip je založen na využití termostabilní polymerázy, která nepodléhá denaturaci při zvýšené teplotě. Každý cyklus se skládá ze tří po sobě jdoucích kroků: denaturace, nasednutí primerů (hybridizace primerů) a elongace. Během denaturace dojde vlivem vysoké teploty k oddělení obou řetězců templátové DNA. V druhé fázi dochází k ochlazení vzorku a hybridizaci primerů na komplementární sekvenci DNA. Ve třetím kroku probíhá syntéza příslušného úseku DNA.

Obecné kroky amplifikace:

A) denaturace templátové DNA při teplotě 95 °C

B) krok připojení primerů – teplota připojení závisí na teplotě T_m obou primerů

C) krok prodloužení (elongace) připojených primerů *Taq* DNA polymerázou, reakce probíhá při teplotě 72 °C, doba závisí na délce amplifikovaného úseku DNA. Rychlost připojování jednotlivých bazí *Taq* DNA polymerázou činí 2–4 kb / min.

Tab. 5: Složení směsi pro jednu PCR reakci

Složka	Množství (μl)
Taq Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄ (10 x)	2,5
MgCl ₂ (2 mM)	2
dNTPs (2,5 mM)	0,5
Forward Primer (100 μM)	0,15
Reverse Primer (100 μM)	0,15
Taq polymeráza (5U/μl)	0,2
H ₂ O	17,5
Celkový objem	23

Všechny reagenty byly rozmrazeny a reakční směs byla připravena v laminárním boxu na ledu. Reakční směsi byly připraveny podle tabulky (Tab. 5), jako poslední byla přidána *Taq* DNA polymeráza. Připravená reakční směs o objemu 23 μl byla rozpipetována ke 2 μl vzorku DNA.

Podmínky PCR pro polymorfismus *SOD1* genu:

1. počáteční denaturace	30 s při 95 °C	}	45 cyklů
2. denaturace	30 s při 95 °C		
3. hybridizace primerů	60 s při 64 °C		
4. elongace	60 s při 72 °C		
5. dokončení produktů	3 min při 72 °C		

Podmínky PCR pro polymorfismus *GSTP1* genu

1. počáteční denaturace	30 s při 95 °C	}	45 cyklů
2. denaturace	30 s při 95 °C		
3. hybridizace primerů	60 s při 59 °C		
4. elongace	60 s při 72 °C		
5. dokončení produktů	3 min při 72 °C		

Po PCR byla amplifikace příslušného produktu kontrolována pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

3.2.3.2 Multiplexová polymerázová řetězcová reakce

Metoda multiplex PCR je obměnou polymerázové řetězové reakce, kdy je do reakční směsi přidáno násobné množství párů primerů, což umožňuje analyzovat více parametrů v průběhu jednoho reakčního procesu. Těto metody jsme využili k testování delecí. Pro každou reakci je zařazena pozitivní kontrola v podobě β -globinového genu. Připravená reakční směs o objemu 18,4 μ l byla rozpipetována k 1,6 μ l vzorku DNA. Reakční směsi byly připraveny podle tabulky (Tab. 6). Sledované polymorfizmy genů *GSTT1* a *GSTM1* jsou uvedeny v tabulce (Tab. 7).

Tab. 6: Složení směsi pro jednu multiplex PCR reakci

Složka	Množství (μl)
Master Mix	10
Q-solution	4
Forward Primer (100 μM)	0,04
Reverse Primer (100 μM)	0,04
Forward Primer Globin (100 μM)	0,04
Reverse Primer Globin (100 μM)	0,04
H ₂ O	4,24
Celkový objem	18,4

Podmínky multiplex PCR pro polymorfismus *GSTT1* genu

1. počáteční denaturace	5 min při 94 °C	}	40 cyklů
2. denaturace	60 s při 94 °C		
3. hybridizace primerů	60 s při 61 °C		
4. elongace	60 s při 72 °C		
5. dokončení produktů	7 min při 72 °C		

Podmínky multiplex PCR pro polymorfismus *GSTM1* genu

1. počáteční denaturace	5 min při 94 °C	}	40 cyklů
2. denaturace	60 s při 94 °C		
3. hybridizace primerů	60 s při 59 °C		
4. elongace	60 s při 72 °C		
5. dokončení produktů	7 min při 72 °C		

Podmínky multiplex PCR pro polymorfismus *SOD1* genu (delece)

1. počáteční denaturace	5 min při 94 °C	}	40 cyklů
2. denaturace	60 s při 94 °C		
3. hybridizace primerů	60 s při 64 °C		
4. elongace	60 s při 72 °C		
5. dokončení produktů	7 min při 72 °C		

Tab. 7: Sledované polymorfizmy genů *GSTT1* a *GSTMI*

Gen	Genotyp	Charakter polymorfizmu	db SNP
<i>GSTT1</i>	null	delece -/G	rs 777169989
	wild type (*1)		
<i>GSTMI</i>	null	delece -/C	rs 72549311
	wild type		

SNP – jednonukleotidová záměna, db SNP – The Single Nucleotide Polymorphism database, null – deleční polymorfizmus, wild type – genotyp bez delece, rs – referenční číslo SNP. Označení alel např. -/C poukazuje na delecí nukleotidu v cílové sekvenci.

3.2.3.3 Polymerázová řetězcová reakce – polymorfizmus délky restričních fragmentů

PCR-RFLP („polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism“), polymerázová řetězcová reakce – polymorfizmus délky restričních fragmentů) je modifikací standardní PCR používaná pro typizaci cílové sekvence, obsahující sekvenční polymorfizmus. Působením určité restriční endonukleázy na amplifikovanou sekvenci DNA dochází k jejímu rozštěpení na fragmenty rozdílné délky podle umístění cílových sekvencí štěpení pro použitou restriktázu. DNA od různých jedinců stejného druhu může mít délku fragmentu shodnou nebo rozdílnou. Příčinou vzniku polymorfizmu délky restričních fragmentů může být mutace některého nukleotidu v cílové sekvenci štěpení. Restriční endonukleáza pak v takto pozměněné cílové sekvenci neštěpí a vzniká fragment, jehož délka je součtem délek dvou sousedních původních fragmentů. Naopak je možné, že mutací vznikne nová cílová sekvence, a tak dojde ke zkrácení délky restričního fragmentu.

3.2.3.3.1 RFLP pro geny *SOD1*, *GSTP1*

V předkládané práci byly analyzovány dva polymorfizmy genů *SOD1* a *GSTP1* pomocí příslušných restričních endonukleáz, viz tabulka (Tab. 8). Jednotlivé polymorfizmy byly sledovány u zkoumaných skupin pacientů a zdravých kontrol. Správnost PCR produktu byla ověřena gelovou elektroforézou. Po ověření kvality PCR produktů byly vyhovující produkty podrobeny štěpení podle podmínek uvedených v tabulkách (Tab. 9). Reagencie (vyjma enzymu, který byl uchováván na ledu) byly rozmrazeny a napipetovány podle níže uvedených tabulek. Naštěpená DNA byla uchovávána při 4° C.

Tab. 8: Sledované polymorfizmy genů *GSTP1* a *SOD1*

SNP	Cílová sekvence RE	Genotyp	Gen	db SNP
<i>Alw26I</i>	5' G T C T C N ₁ ↓ 3' 3' C A G A G N ₅ ↑ 5'	AA	<i>GSTP1</i>	rs 1695
		AG		
		GG		
<i>MspI</i>	5' C ↓ C G G 3' 3' G G C ↑ C 5'	AA	<i>SOD1</i>	rs 527717238
		AG		
		GG		

SNP – jednonukleotidová záměna, RE – restriční endonukleáza, db SNP – The Single Nucleotide Polymorphism database, rs – referenční číslo SNP. Označení alel např. AA nebo AG vychází se záměny nukleotidu v cílové sekvenci. Název polymorfizmu (*Alw26I* atd.) je odvozen od názvu restriční endonukleázy, která rozeznává cílovou sekvenci polymorfizmu. ↓ a ↑ označují cílové místo restriktázy.

Tab. 9: Složení směsi pro jedno restriční štěpení

Složka	Množství (μl)
Buffer 10 x M	2,5
Enzym	0,5
H ₂ O	12
Produkt PCR	10
Celkový objem	25

Pro polymorfizmus *Alw26I* štěpení probíhalo 12 hod při 37° C. Enzym byl poté inaktivován zahříváním po dobu 20 min při 65° C. Pro polymorfizmus *MspI* štěpení probíhalo 10 min při 37° C. Enzym byl poté inaktivován zahříváním po dobu 10 min při 80° C.

3.2.3.4 Genotypizace pomocí Taq Man[®] sond

Metoda využívá dvě fluorescenčně značené sondy (VIC[^] a FAM[™]). Na 5'-konci je navázán flouorfor s krátkou vlnovou délkou emitovaného záření, na 3'-konci se nalézá tlumič (quencher) s delší vlnovou délkou. Sondy jsou navázány na vnitřní část amplifikované sekvence, a pokud vytvoří homoduplex, exonukleázová aktivita Taq DNA-polymerázy způsobí oddálení fluorescenční značky od zhášeče a dojde k nárůstu fluorescence, neboť při rozpadu sondy je uvolněný flouorfor vymaněn z vlivu tlumiče a začne emitovat záření o krátké vlnové délce. Detekovaná fluorescence určuje, jaký polymorfizmus se v amplifikovaném úseku nachází. Pokud je detekována fluorescence

pouze fluorochromu VIC[®], jedná se o homozygota jednoho typu, pokud je detekována pouze FAM[™], jedná se o homozygota druhého typu. Pokud jsou detekovány oba fluorochromy, jedná se o heterozygota.

Polymorfizmy

Taq Man[®] genotypizační sondy byly využity k analyzování polymorfizmů tří kandidátních genů: *SOD3*, *CAT* a *GPXI* (specifické polymorfizmy jsou popsány v Tab. 10). Pro každý testovaný gen byla připravena reakční směs podle pokynů výrobce (Tab. 11). Množství připravené směsi bylo upraveno podle počtu měřených vzorků se započítanou negativní kontrolou a vše bylo vynásobeno dvěma, neboť reakce probíhala v dubletech. Příklad grafického znázornění rozdělení jednotlivých genotypů je znázorněn na obrázku (Obr. 12).

Tab. 10: Sledované polymorfizmy genů oxidativního stresu

Gen	Cílová sekvence [VIC/FAM]	Genotypy	db SNP
<i>SOD3</i>	TGCGGCTAGTGCCAGCCACTGTGTT <u>[G/T]</u> TCACT GGGCGAGTAATGATCTCATT	GG	rs8192287
		GT	
		TT	
<i>GPXI</i>	CAGCGGAGCGCCCCGAACAAGCACT <u>[G/A]</u> TAAG GGGAGGCCAGCAGGCGCCTCC	GG	rs1800668
		GA	
		AA	
<i>CAT</i>	GGAGCCCCGCCCTGGGTTCGGCTAT <u>[C/T]</u> CCGGG CACCCCGGGCCGGCGGGGCG	CC	rs1001179
		CT	
		TT	

SNP – jednonukleotidová záměna, db SNP – The Single Nucleotide Polymorphism database, rs – referenční číslo SNP. Označení alel např. GG nebo GA vychází se záměny nukleotidu v cílové sekvenci. Označení báze tučným písmem a podtržením poukazuje na oblast, ve které dochází k jednonukleotidové záměně.

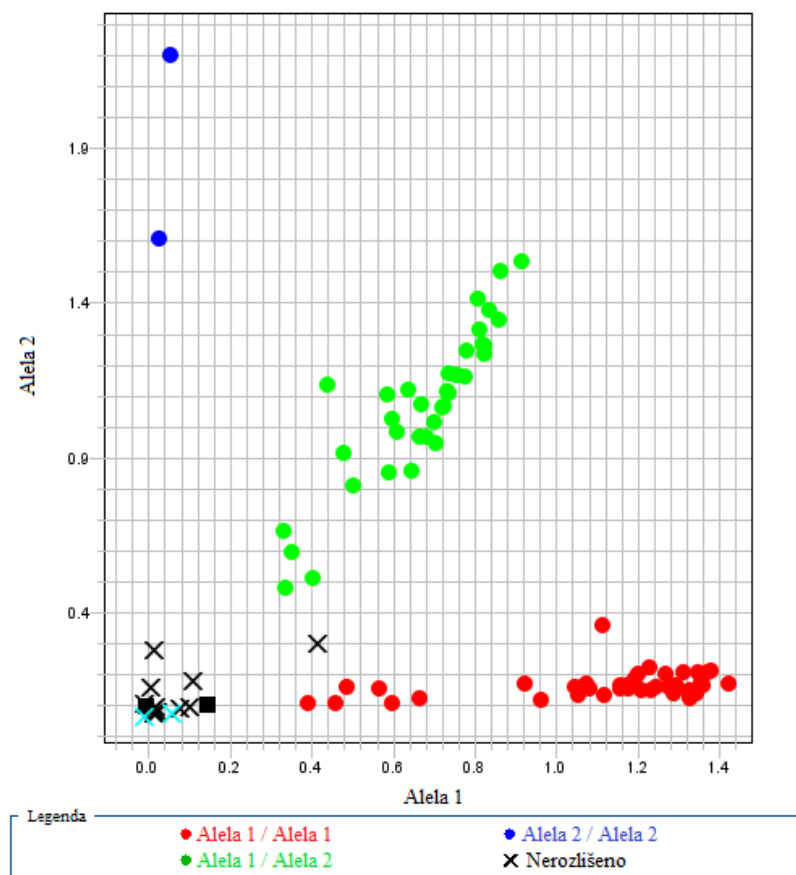
Tab. 11: Složení směsi pro jednu Real – Time PCR reakci

Složka	Množství (μl)
TaqMan Gene Expression Master Mix	5
Assay-on-Demand Gene Expression Master Mix	0,5
H ₂ O	1
Celkem	6,5

Reakční směs o objemu 6,5 μl byla přidána ke 3,5 μl testované DNA (jednotlivé genotypizační reakce probíhaly ve dvojicích). Před proběhnutím reakce byla destička centrifugována při 500 g po dobu 2 min.

Podmínky reakce

1. krok	1 min při 60 °C	
2. krok (hot start)	10 min při 95 °C	
3. krok (denaturace)	15 s při 95 °C	} 40 cyklů
4. krok (hybridizace, extenze)	1 min při 60 °C	
5. krok	1 min při 60 °C	



Obr. 12: Ukázka grafického znázornění rozdělení jednotlivých genotypů

Jednotlivé body znázorňují distribuce jednotlivých genotypů po amplifikaci a označení sondou.

Alela 1 / Alela 1 – homozygot s fluorescenčně navázanou VIC sondou (červená barva),
 Alela 1 / Alela 2 – heterozygot s fluorescenčně navázanou VIC a FAM sondou (zelená barva),
 Alela 2 / Alela 2 – homozygot s fluorescenčně navázanou FAM sondou (modrá barva).

3.2.4 Elektroforetická separace

Pro identifikaci a separaci jednotlivých fragmentů DNA byla použita horizontální gelová elektroforéza. Pro rozdělení fragmentů DNA byl zvolen gel vhodné koncentrace (2–2,5%). Agarózový gel byl připraven z příslušného množství agarózy a rozpuštěn v 1% TBE pufru. Za účelem vizualizace produktů na 100 ml připravovaného gelu bylo přidáno 2,5 µl interkalačního barviva GelRed. Současně se vzorky s 6 × koncentrovaným vzorkovým pufrům byl na gel nanesen i marker velikosti DNA. Elektroforetická separace probíhala při konstantním napětí 5 V/cm. Produkty PCR reakce, multiplex PCR reakce a restrikčního štěpení PCR reakce byly rozděleny podle velikosti a vizualizovány pod UV světlem.

3.3 Příprava roztoků a vzorků pro stanovení MDA

3.3.1 Příprava zásobního roztoku MDA

Zásobní roztok MDA o koncentraci 10 mmol.l^{-1} byl připraven hydrolyzou $412 \text{ } \mu\text{l}$ 1,1,3,3-tetrametoxypropanu ve 250 ml 1% kyseliny sírové při laboratorní teplotě po dobu dvou hodin. Pro svou nestálost byl zásobní roztok MDA připravován každý den čerstvý. Přesná koncentrace standardního roztoku MDA byla zjištěna měřením absorbance při 267 nm (molární absorpční koeficient je $31800 \text{ l mol}^{-1}\text{.cm}^{-1}$).

3.3.2 Příprava interního standardu MeMDA

Jako interní standard byl použit MeMDA. Zásobní roztok MeMDA byl připraven reakcí $0,2 \text{ g}$ pevného NaOH a $0,5 \text{ g}$ (3-dimethylamino)-2-methyl-2-propenalu v $700 \text{ } \mu\text{l}$ vody. Reakce byla provedena v uzavřené zkumavce ve vodní lázni zahřívané na teplotu 75° C po dobu 45 min , kdy se původní dvě fáze spojily v jednu fázi. Následně byla reakční směs odpařena do sucha proudem dusíku při teplotě 40° C a odparek byl rozpuštěn v 8 ml směsi aceton/ethanol ($1 : 1, \text{ v/v}$). Z vytvořeného MeMDA byl vytvořen roztok o výsledné koncentraci 5 mmol.l^{-1} , který byl uchováván při teplotě -20° C . Přesná koncentrace standardního roztoku MeMDA byla zjištěna měřením absorbance při 322 nm (molární absorpční koeficient je $29900 \text{ l mol}^{-1}\text{.cm}^{-1}$).

3.3.3 Příprava derivatizačního činidla

Roztok derivatizačního činidla DNPH o koncentraci 5 mmol.l^{-1} byl připraven rozpuštěním 2,4-DNPH v $2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HCl}$ a byl uchováván v lednici v tmavé láhvi. Přesná koncentrace roztoku DNPH byla kontrolována měřením absorbance při 458 nm .

3.3.4 Derivatizace modelového vzorku MDA

Ze zásobního roztoku MDA o koncentraci 10 mmol.l^{-1} bylo připraveno pět kalibračních roztoků MDA o koncentraci $1; 2,5; 5; 7,5; \text{ a } 10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$.

K přípravě modelového vzorku bylo použito $100 \text{ } \mu\text{l}$ roztoku MDA, který byl smíchán se $100 \text{ } \mu\text{l}$ interního standardu MeMDA ($50 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$) a $400 \text{ } \mu\text{l}$ $1,5 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$. Směs byla zahřívána ve skleněné vialce při teplotě 60° C po dobu 60 min . Po vychladnutí bylo ke směsi přidáno $200 \text{ } \mu\text{l}$ 35% HClO_4 . Následně byl vzorek derivatizován přidávkem $50 \text{ } \mu\text{l}$ 5 mmol.l^{-1} DNPH při teplotě 60° C po dobu 30 min . K vychladlému vzorku byly přidány 2 ml hexanu a směs byla 8 min protřepávána. Následně byl vzorek centrifugován

3 min při zrychlení 1780 g. Extrakce byla opakována ještě jednou. Odebraný supernatant byl vysušen do sucha proudem dusíku při teplotě 40° C a odparek byl následně rozpuštěn ve 250 µl mobilní fáze (AcN : voda) a použit k HPLC analýze.

3.3.5 Příprava vzorku krevní plazmy pro stanovení MDA

Plná nesrážlivá krev o objemu 1 ml byla centrifugována při zrychlení 1000 g po dobu 10 min. Oddělená krevní plazma byla zmrazena a skladována při teplotě -80° C.

K přípravě vzorku krevní plazmy pro HPLC stanovení MDA bylo použito 100 µl rozmražené krevní plazmy, která byla smíchána se 100 µl interního standardu MeMDA (50 µmol·l⁻¹) a 400 µl 1,5 mol·l⁻¹ NaOH v nádobce Eppendorf. Takto připravená směs byla pro alkalickou hydrolýzu biologického materiálu zahřívána při teplotě 60° C po dobu 60 min. Po vychladnutí bylo ke směsi přidáno 200 µl 35% HClO₄. Směs byla protřepána a centrifugována po dobu 4 min při zrychlení 7000 g. Supernatant byl odebrán do skleněné vialky a derivatizován 50 µl 5 mmol·l⁻¹ DNPH při 60° C po dobu 30 min a následně extrahován do hexanu (dle stejného postupu jako modelový vzorek).

3.4 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena v programu GraphPad Prism verze 6.00. Četnost genotypů mezi jednotlivými skupinami byla porovnána prostřednictvím chí-kvadrát testu s hladinou významnosti 0,05. Četnost výskytu alel byla porovnána s využitím Fisherova dvoustranného testu s hladinou významnosti 0,05. Hladiny malondialdehydu byly mezi jednotlivými skupinami porovnány s využitím t-testu s hladinou významnosti 0,05.

4 Výsledky

4.1 Genotypizace vybraných polymorfizmů

Byla provedena genotypizace sedmi polymorfizmů – tří polymorfizmů (rs 1800668 v genu *GPXI*, rs 1001179 v genu *CAT* a rs 8192287 v genu *SOD3*) metodou PCR s využitím fluorescenčních Taq Man[®] sond, dvou polymorfizmů (rs 1695 v genu *GSTP1* a rs 2070424 v genu *SOD1*) metodou PCR-RFLP a dvou polymorfizmů (rs 375176458 v genu *GSTM1* a rs 777169989 v genu *GSTT1*) metodou multiplexové PCR.

4.1.1 Genotypizace genu *GPXI*

Z celkového počtu 40 pacientů ve skupině T1D, 40 pacientů ve skupině T2D a 45 zdravých jedinců byla genotypizace polymorfizmu rs 1800668 úspěšná u všech vyšetřovaných jedinců. Mezi jednotlivými vyšetřovanými skupinami bylo nalezeno následující zastoupení genotypů a frekvence alel – viz tabulka (Tab. 12). U skupin T1D a zdravých kontrol se nejčastěji vyskytoval genotyp GG, u skupiny T2D genotyp GA. U všech skupin se nejméně často vyskytoval genotyp AA. Mezi jednotlivými skupinami nebyla prokázána žádná statistická významnost.

Tab. 12: Frekvence genotypů a alel polymorfizmu rs 1800668 genu *GPXI* u pacientů T1D a T2D v porovnání se zdravými kontrolami (ZK)

<i>GPXI</i>	T1D	T2D	ZK
Genotyp / alely	% (n = 40)	% (n = 40)	% (n = 45)
GG	47.50 (19)	45.00 (18)	57.78 (26)
GA	45.00 (18)	50.00 (20)	35.56 (16)
AA	7.50 (3)	5.00 (2)	6.66 (3)
P-value (vs. ZK)	0.63	0.40	
P-value (vs. T2D)	0.85		
G	70.00 (56)	70.00 (56)	75.56 (68)
A	30.00 (24)	30.00 (24)	24.44 (22)
P-value; OR (95% CI)	0.49; 1.325	0.49; 1.325	
(vs. ZK)	(0.67-2.61)	(0.67-2.61)	
P-value; OR (95% CI)	1.00; 1.00		
(vs. T2D)	(0.51-1.97)		

T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly, n – počet (vyšetřených jedinců v dané skupině s výsledným genotypem, počet alel). Hodnota P-value udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %.

4.1.2 Genotypizace genu *CAT*

Z celkového počtu 40 pacientů ve skupině T1D, 40 pacientů ve skupině T2D a 45 zdravých jedinců byla genotypizace polymorfizmu rs 1001179 úspěšná všech vyšetřovaných jedinců. Mezi jednotlivými vyšetřovanými skupinami bylo nalezeno následující zastoupení genotypů a frekvence alel – viz tabulka (Tab. 13). U všech skupin se nejčastěji vyskytoval genotyp CC, méně častěji genotyp CT a nejméně často genotyp TT. Mezi jednotlivými skupinami nebyla prokázána žádná statistická významnost.

Tab. 13: Frekvence genotypů a alel polymorfizmu rs 1001179 genu *CAT* u pacientů T1D a T2D v porovnání se zdravými kontrolami (ZK)

<i>CAT</i>	T1D	T2D	ZK
Genotyp / alely	% (n = 40)	% (n = 40)	% (n = 45)
CC	52.50 (21)	62.50 (25)	53.33 (24)
CT	42.50 (17)	35.00 (14)	33.34 (15)
TT	5.00 (2)	2.50 (1)	13.33 (6)
P-value (vs. ZK)	0.3610	0.1879	
P-value (vs. T2D)	0.6152		
C	73.75 (59)	80.00 (64)	70.00 (63)
T	26.25 (21)	20.00 (16)	30.00 (27)
P-value; OR (95% CI)	0.6126; 0.8305	0.1588; 0.5833	
(vs. ZK)	(0.4242-1.6260)	(0.2869-1.186)	
P-value; OR (95% CI)	0.4536; 0,7024		
(vs. T2D)	(0.3349-1.4730)		

T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly, n – počet (vyšetřených jedinců v dané skupině s výsledným genotypem, počet alel). Hodnota P-value udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %.

4.1.3 Genotypizace genu *SOD3*

Z celkového počtu 40 pacientů ve skupině T1D, 40 pacientů ve skupině T2D a 45 zdravých jedinců byla genotypizace polymorfizmu rs 8192287 úspěšná všech vyšetřovaných jedinců. Mezi jednotlivými vyšetřovanými skupinami bylo nalezeno následující zastoupení genotypů polymorfizmu rs 8192287 – viz tabulka (Tab. 14). U všech skupin se nejčastěji vyskytoval genotyp GG, u skupiny T2D dokonce v četnosti 100 %. Naopak genotyp TT se nevyskytoval u žádné ze skupin. Statistická významnost byla prokázána pouze mezi skupinami diabetiků T1D a T2D.

Tab. 14: Frekvence genotypů a alel polymorfizmu rs 8192287 genu *SOD3* u pacientů T1D a T2D v porovnání se zdravými kontrolami (ZK)

<i>SOD3</i>	T1D	T2D	ZK
Genotyp / alely	% (n = 40)	% (n = 40)	% (n = 45)
GG	85.00 (34)	100.00 (40)	91.11 (41)
GT	15.00 (6)	0.00 (0)	8.89 (4)
TT	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)
P-value (vs. ZK)	0.3827	0.0534	
P-value (vs. T2D)	0.0109		
G	92.50 (74)	100.00 (80)	95.56 (86)
T	7.50 (6)	0.00 (0)	4.44 (4)
P-value; OR (95% CI)	0.5188; 0.5736	0.1232; 8.3760	
(vs. ZK)	(0.1559-2.1110)	(0.4436-158.1)	
P-value; OR (95% CI)	0.0284 ; 0.07119		
(vs. T2D)	(0.003939-1.287)		

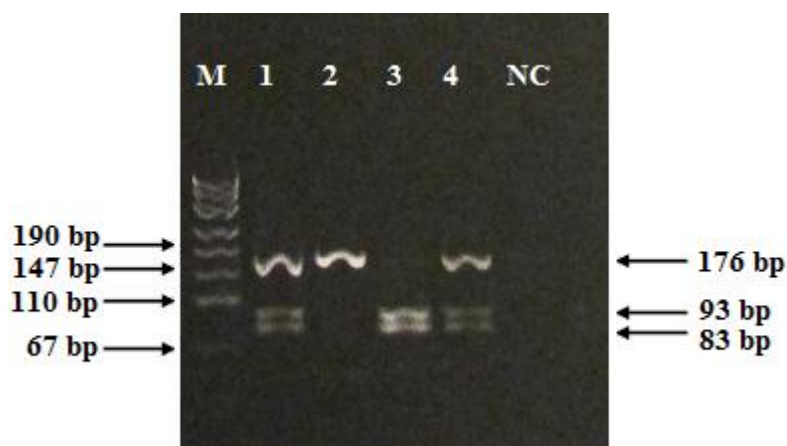
T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly, n – počet (vyšetřených jedinců v dané skupině s výsledným genotypem, počet alel). Hodnota P-value udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %. Zvýrazněné hodnoty jsou statisticky významné.

4.1.4 Genotypizace genu *GSTP1*

Za účelem genotypizace polymorfizmu byla použita sada primerů GSTP1-R a GSTP1-F, která tvořila očekávaný produkt o délce 176 bp. Pokud byla přítomna substituce A/G, restriktáza *Alw26I* tento produkt štěpila na dva fragmenty o délce 83 bp a 93 bp. Homozygot AA byl detekován přítomností neštěpeného fragmentu o délce 176 bp. V případě heterozygota AG byly detekovány tři fragmenty o délce 176 bp, 83 bp a 93 bp. Homozygot GG byl detekován přítomností dvou fragmentů o délce 83 bp a 93 bp (viz Obr. 13). Jako negativní kontrola byla do reakce místo DNA přidána voda.

Z celkového počtu 40 pacientů ve skupině T1D, 40 pacientů ve skupině T2D a 45 zdravých jedinců byla genotypizace polymorfizmu rs 1695 úspěšná u všech vyšetřovaných jedinců. Mezi jednotlivými vyšetřovanými skupinami bylo nalezeno následující zastoupení genotypů a frekvence alel – viz tabulka (Tab. 15). U skupin T1D a T2D se nejčastěji vyskytoval genotyp AA, naproti tomu u zdravých kontrol se nejčastěji vyskytoval heterozygotní genotyp AG. Genotyp GG se u všech skupin vyskytoval

s nejnižší četností. Mezi jednotlivými skupinami nebyla prokázána statistická významnost.



Obr. 13: Genotypizace polymorfizmu *Alw26I* v genu *GSTP1*

Výsledek restriční štěpení náhodně vybraných vzorků pacientů 1–4. Homozygot AA je detekován přítomností fragmentů o délce 176 bp – vzorek v dráze 2. Heterozygot AG je detekován přítomností fragmentů o délce 176 bp, 83 bp a 93 bp – vzorky v dráze 1 a 4. Homozygot GG je detekován přítomností fragmentů o délce 83 bp a 93 bp – vzorek v dráze 3. M – marker molekulové hmotnosti (50 bp), NC – negativní kontrola.

Tab. 15: Frekvence genotypů a alel polymorfizmu rs 1695 genu *GSTP1* u pacientů T1D a T2D v porovnání se zdravými kontrolami (ZK)

<i>GSTP1</i>	T1D	T2D	ZK
Genotyp / alely	% (n = 40)	% (n = 40)	% (n = 45)
AA	62.50 (25)	52.50 (21)	42.22 (19)
AG	27.50 (11)	42.50 (17)	51.11 (23)
GG	10.00 (4)	5.00 (2)	6.67 (3)
P-value (vs. ZK)	0.0855	0.6348	
P-value (vs. T2D)	0.3166		
A	76.25 (61)	73.75 (59)	67.78 (61)
G	23.75 (19)	26.25 (21)	32.22 (29)
P-value; OR (95%CI)	0.2368; 0.6552	0.4054; 0.7487	
(vs. ZK)	(0.3323-1.2920)	(0.3846-1.4570)	
P-value; OR (95%CI)	0.8553; 1.1430		
(vs. T2D)	(0.5581-2.3400)		

T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly, n – počet (vyšetřených jedinců v dané skupině s výsledným genotypem, počet alel). Hodnota P-value udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %.

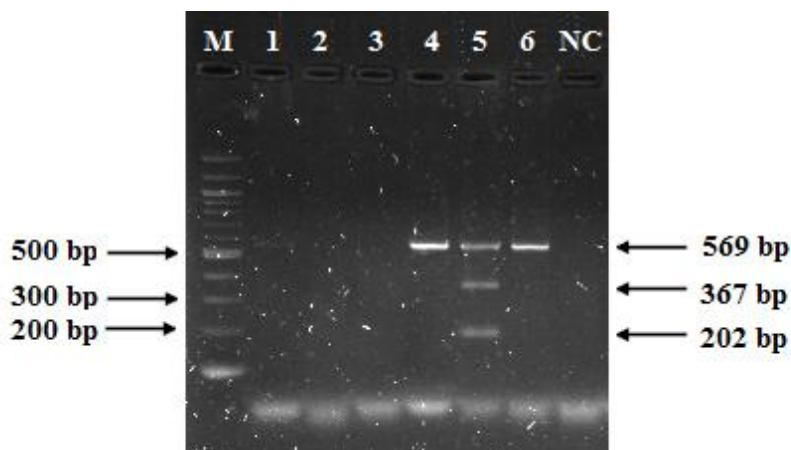
4.1.5 Genotypizace genu *SOD1*

Za účelem genotypizace polymorfizmu byla použita sada primerů SOD1-R a SOD1-F, která tvořila očekávaný produkt o délce 569 bp. Pokud byla přítomna substituce A/G, restriktáza *MspI* tento produkt štěpila na dva fragmenty o délce 368 bp a 201 bp. Homozygot AA byl detekován přítomností neštěpeného fragmentu o délce 569 bp. V případě heterozygota AG byly detekovány 3 fragmenty o délce 569 bp, 368 bp a 201 bp. Homozygot GG nebyl detekován – nebyla přítomnost fragmentů o délce 368 bp a 201 bp (viz Obr. 14). Jako negativní kontrola byla do reakce místo DNA přidána voda.

U vzorků, u nichž se neobjevil žádný fragment byla dále za využití metody multiplexové PCR ověřena přítomnost delečního polymorfizmu ve zkoumané oblasti.

Z celkového počtu 40 pacientů ve skupině T1D, 40 pacientů ve skupině T2D a 45 zdravých jedinců se pouze u 49 jedinců vyskytoval polymorfizmus rs 2070424 (12 pacientů T1D, 22 pacientů T2D a 15 zdravých kontrol). U zbylých jedinců byla potvrzena přítomnost delečního polymorfizmu (28 pacientů T1D, 18 pacientů T2D a 30 zdravých kontrol).

Mezi jednotlivými vyšetřovanými skupinami bylo nalezeno následující zastoupení genotypů polymorfizmu rs 2070424 – viz tabulka (Tab. 16). U všech skupin se nejčastěji vyskytoval genotyp AA, naproti tomu heterozygotní genotyp AG se u všech skupin vyskytoval nejméně často. Genotyp GG se nevyskytoval u žádné ze skupin. Mezi jednotlivými skupinami nebyla prokázána statistická významnost.



Obr. 14: Genotypizace polymorfizmu *MspI* v genu *SOD1*

Výsledek restriktčního štěpení náhodně vybraných vzorků pacientů 1–6. Homozygot AA je detekován přítomností fragmentu o délce 569 bp – vzorky v dráze 4 a 6. Heterozygot AG je detekován přítomností fragmentů o délce 569 bp, 367 bp a 202 bp – vzorek v dráze 5. U vzorků v dráze 1, 2 a 3 nebyl detekován žádný fragment. M – marker molekulové hmotnosti (100 bp), NC – negativní kontrola.

Tab. 16: Frekvence genotypů a alel polymorfizmu rs 2070424 genu *SOD1* u pacientů T1D a T2D v porovnání se zdravými kontrolami (ZK)

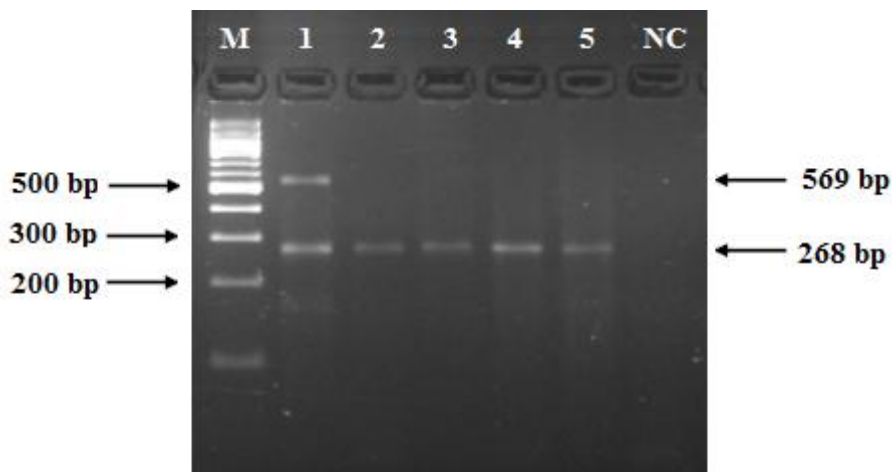
<i>SOD1</i>	T1D	T2D	ZK
Genotyp / alely	% (n = 12)	% (n = 22)	% (n = 15)
AA	83.33 (10)	81.82 (18)	86.67 (13)
AG	16.67 (2)	18.18 (4)	13.33 (2)
GG	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)
P-value (vs. ZK)	0.8086	0.6944	
P-value (vs. T2D)	0.9118		
A	91.67 (22)	90.91 (40)	93.33 (28)
G	8.33 (2)	9.09 (4)	6.67 (2)
P-value; OR (95% CI)	1.00; 0.7857	1.00; 0.8824	
(vs. ZK)	(0.1023-6.033)	(0.4843-1.608)	
P-value; OR (95% CI)	1.00; 1.100		
(vs. T2D)	(0.1863-6.495)		

T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly, n – počet (vyšetřených jedinců v dané skupině s výsledným genotypem, počet alel). Hodnota P-value udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %.

Za účelem ověření delečního polymorfizmu (u jedinců, u kterých se nevyskytoval polymorfizmus rs 2070424) byla použita sada primerů *SOD1-R* a *SOD1-F*, která tvořila očekávaný produkt o délce 569 bp. Jako pozitivní kontrola byla použita sada primerů β -globin-R a β -globin-F amplifikující fragment β -globinového genu o velikosti 268 bp. Pokud byla přítomna delece, nebyl detekován žádný fragment specifickou *SOD* sadou primerů, pouze fragment pozitivní kontroly (viz Obr. 15).

V testované oblasti genu se však nachází několik delečních polymorfizmů a pro přesnou specifikaci, o který polymorfizmus se jedná, je potřeba dalšího zkoumání, které však bylo nad rámec diplomové práce. Z tohoto důvodu zde uvádím pouze přítomnost nebo nepřítomnost delece.

Mezi skupinami pacientů a zdravých jedinců bylo nalezeno následující zastoupení genotypů null a pozitivního polymorfizmu – viz tabulka (Tab. 17). Mezi skupinami T1D a T2D byla prokázána statistická významnost. Procentuální zastoupení jednotlivých genotypů genu *SOD1* mezi skupinami je znázorněno na obrázku (Obr. 16).



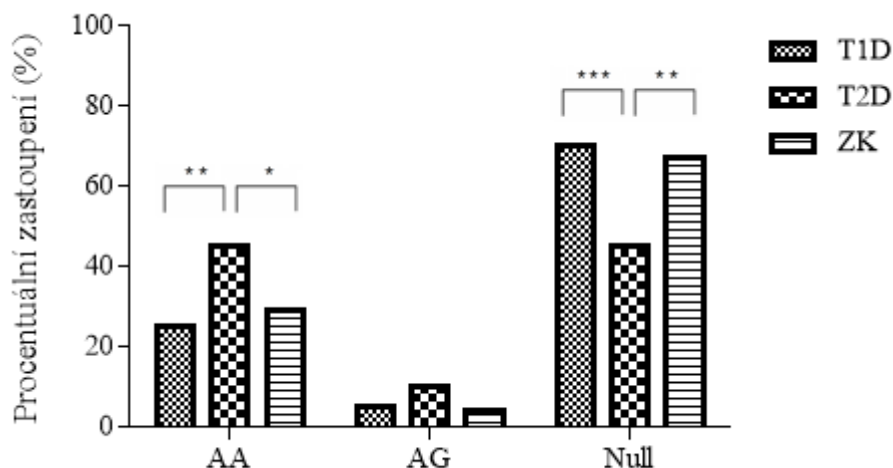
Obr. 15: Genotypizace genu *SOD1* – ověření delece

Výsledek multiplexové PCR náhodně vybraných vzorků jedinců 1 – 5. Pozitivní genotyp *SOD1* byl detekován přítomností fragmentu o délce 569 bp - vzorek v dráze 1. Deleční polymorfismus je detekován nepřítomností fragmentu o délce 569 bp – vzorky v dráze 2, 3, 4, 5. Pozitivní kontrola ve formě β -globinového genu byla detekována jako fragment o velikosti 268 bp. M - marker molekulové hmotnosti (100 bp), NC - negativní kontrola.

Tab. 17: Frekvence pozitivního *SOD1* a null genotypu u pacientů T1D a T2D v porovnání se zdravými kontrolami

<i>SOD1</i>	T1D	T2D	ZK
Genotyp	% (n = 40)	% (n = 40)	% (n = 45)
Pozitivní (AA+AG)	30.00 (12)	55.00 (22)	33.33 (15)
Null	70.00 (28)	45.00 (18)	66.67 (30)
P-value; OR (95%CI)	0.5241; 0.8161	0.0191 ; 2.0030	
(vs. ZK)	(0.4365-1.5260)	(1.1160-3.5950)	
P-value; OR (95%CI)	0.0030 ; 0.4074		
(vs. T2D)	(0.2235-0.7425)		

Null polymorfismus – neznámá delece, T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly, n – počet (vyšetřených jedinců v dané skupině s výsledným genotypem, počet alel). Hodnota P-value udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 % . Zvýrazněné jsou hodnoty statisticky významné.



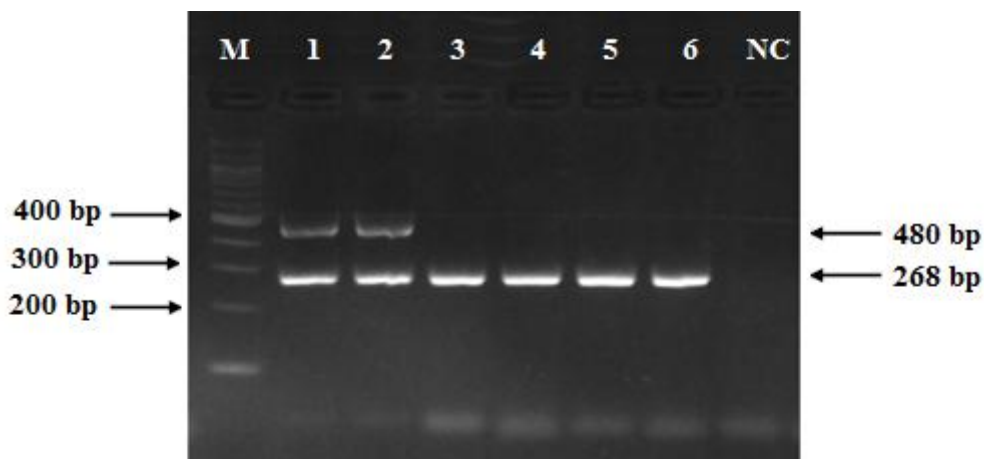
Obr. 16: Porovnání distribuce genotypů genu *SOD1* mezi zkoumanými skupinami

* označuje signifikantní rozdíl na hladině významnosti 0,05, ** vysoký signifikantní rozdíl ($P = 0,0001-0,001$) a *** extrémně signifikantní rozdíl ($P < 0,0001$) dle Fisherova testu.

4.1.6 Genotypizace genu *GSTT1*

Za účelem genotypizace polymorfizmu byla použita sada primerů *GSTT1*-R a *GSTT1*-F, která tvořila očekávaný produkt o délce 480 bp. Současně byla jako pozitivní kontrola použita sada primerů β -globin-R a β -globin-F amplifikující produkt o velikosti 268 bp. V případě výskytu delece byl detekován pouze fragment pozitivní kontroly (viz Obr. 17). Jako negativní kontrola byla do reakce místo DNA přidána voda.

Z celkového počtu 40 pacientů DM 1, 40 pacientů T2D a 45 zdravých jedinců byla genotypizace polymorfizmu úspěšná u všech jedinců. Úspěšnost genotypizace byla 100%. Mezi skupinami pacientů a zdravých jedinců bylo nalezeno následující zastoupení genotypů polymorfizmu – viz tabulka (Tab. 18). Mezi skupinou zdravých jedinců a T1D a T2D byla prokázána statistická významnost.



Obr. 17: Genotypizace polymorfizmu rs 777169989 v genu *GSTT1*

Výsledek multiplexové PCR náhodně vybraných vzorků jedinců 1–6. Pozitivní genotyp *GSTT1*1* byl detekován přítomností fragmentu o délce 480 bp – vzorky v dráze 1 a 2. Deleční polymorfismus *GSTT1*0* je detekován nepřítomností fragmentu o délce 480 bp – vzorky v dráze 3, 4, 5 a 6. Pozitivní kontrola ve formě β -globinového genu byla detekována jako fragment o velikosti 268 bp. M – marker molekulové hmotnosti (100 bp), NC – negativní kontrola.

Tab. 18: Frekvence *GSTT1* wild type a null genotypu (rs 777169989) u pacientů T1D a T2D v porovnání se zdravými kontrolami

<i>GSTT1</i>	T1D	T2D	ZK
Genotyp	% (n = 40)	% (n = 40)	% (n = 45)
Wild type	67.5 (27)	65.00 (26)	73.33 (33)
Null	32.5 (13)	35.00 (14)	26.67 (12)
P-value; OR (95%CI)	0.6364; 0.7552	0.4822; 0.6753	
(vs. ZK)	(0.2964-1.9242)	(0.2673-1.706)	
P-value; OR (95%CI)	1.0000; 1.118		
(vs. T2D)	(0.4423-2.827)		

Null polymorfismus – homozygotní delece, T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly, n – počet (vyšetřených jedinců v dané skupině s výsledným genotypem). Hodnota P-value udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %.

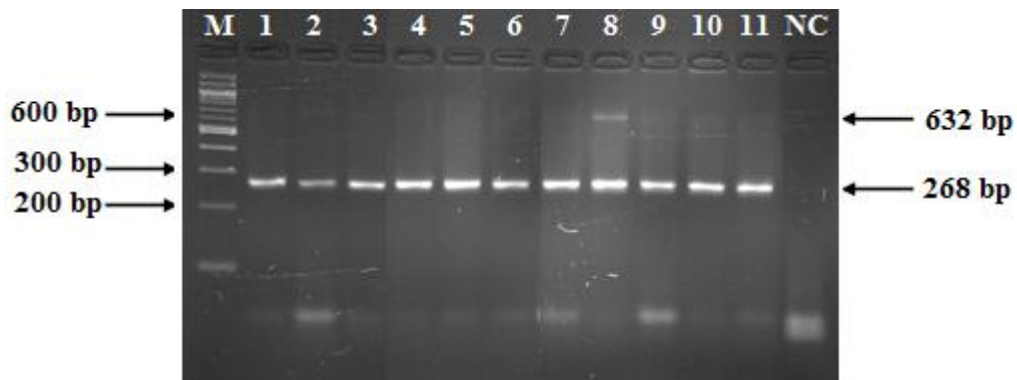
4.1.7 Genotypizace genu *GSTM1*

Za účelem genotypizace polymorfizmu byla použita sada primerů *GSTM1*-R a *GSTM1*-F, která tvořila očekávaný produkt o délce 632 bp. Jako pozitivní kontrola byla použita sada primerů β -globin-R a β -globin-F amplifikující produkt o velikosti 268 bp.

Za přítomnosti delece byl detekován pouze fragment pozitivní kontroly (viz Obr. 18). Jako negativní kontrola byla do reakce přidána místo DNA voda.

Z celkového počtu 40 pacientů DM 1, 40 pacientů DM 2 a 45 zdravých jedinců byla genotypizace polymorfizmu úspěšná u všech jedinců. Úspěšnost genotypizace byla 100%. Mezi skupinami pacientů a zdravých jedinců bylo nalezeno následující zastoupení genotypů polymorfizmu - viz tabulka (Tab. 19). Mezi skupinou zdravých jedinců a T1D a T2D nebyla prokázána statistická významnost.

V případě wild type genotypu je nutné specifikovat, zda se jedná o variantu *A (*GSTM1**A) či *B (*GSTM1**B). Další zkoumání bylo však nad rámec této diplomové práce.



Obr. 18 : Genotypizace polymorfizmu rs 72549311 v genu *GSTM1*

Výsledek multiplexové PCR náhodně vybraných vzorků jedinců 1–11. Pozitivní genotyp *GSTM1**1 byl detekován přítomností fragmentu o délce 632 bp – vzorek v dráze 8. Deleční polymorfismus *GSTM1**0 (delece -/C) je detekován nepřítomností fragmentu o délce 632 bp – vzorky v dráze 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 a 11. Pozitivní kontrola ve formě β -globinového genu byla detekována jako fragment o velikosti 268 bp. M – marker molekulové hmotnosti (100 bp), NC – negativní kontrola.

Tab. 19: Frekvence *GSTM1* wild type a null genotypů (rs 72549311) u pacientů T1D a T2D v porovnání se zdravými kontrolami

<i>GSTM1</i>	T1D	T2D	ZK
Genotyp	% (n = 40)	% (n = 40)	% (n = 45)
Wild type	30.00 (12)	52.50 (21)	33.33 (15)
Null	70.00 (28)	47.50 (19)	66.67 (30)
P-value; OR (95%CI) (vs. ZK)	0.8176; 1.167 (0.4661-2.920)	0.0836; 0.4524 (0.1881-1.088)	
P-value; OR (95%CI) (vs. T2D)	0.0685; 0.3878 (0.1548-0.9711)		

Null polymorfismus – homozygotní delece, T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly, n – počet (vyšetřených jedinců v dané skupině s výsledným genotypem, počet alel). Hodnota P-value udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %.

4.1.8 Kombinace genotypů genů *GSTM1* a *GSTT1*

Pro další statistické zpracování byly porovnávány frekvence současného výskytu wild type genotypů a null genotypů genů *GSTM1* a *GSTT1* mezi jednotlivými skupinami jedinců. Pro statistickou analýzu byl využit chí-kvadrát test s hladinou významnosti 0,05. Byla počítána hodnota OR a interval spolehlivosti CI (95 %), který vyjadřuje hodnověrnost tohoto odhadu.

Jednotlivé kombinace jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 20, Tab. 21, Tab. 22). Při porovnání všech možných kombinací genotypů *GSTM1* a *GSTT1* mezi skupinami T1D, T2D a kontrolami byla nalezena jedna kombinace genotypů, která splňuje podmínku $P < 0,05$, a to *GSTM1* wild type a *GSTT1* null mezi pacienty s T2D a zdravými jedinci.

Tab. 20: Kombinace genotypů genů *GSTM1* a *GSTT1* mezi skupinami T1D a ZK

<i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i>	T1D % (n = 40)	ZK % (n = 45)	P-value	OR (95 % CI)
Wild type / Wild type	25.00 (10)	35.56 (16)	0.3497	0.6042 (0.2358-1.5480)
Null / Wild type	42.50 (17)	35.56 (16)	0.6560	1.340 (0.5584-3.2140)
Wild type / Null	5.00 (2)	2.22 (1)	0.5991	2.3160 (0.2018-26.5700)
Null / Null	27.50 (11)	26.67 (12)	1.0000	1.0430 (0.4000-2.7200)

T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, ZK – zdravé kontroly, n – počet (vyšetřených jedinců v dané skupině s výsledným genotypem). Hodnota P-value udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro chí-kvadrát test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %.

Tab. 21: Kombinace genotypů genů *GSTM1* a *GSTT1* mezi skupinami T2D a ZK

<i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i>	T2D % (n = 40)	ZK % (n = 45)	P-value	OR (95 % CI)
Wild type / Wild type	35.00 (14)	35.56 (16)	1.0000	0.9760 (0.4001-2.3810)
Null / Wild type	30.00 (12)	35.56 (16)	0.6481	0.7768 (0.3123-1.9320)
Wild type / Null	17.50 (7)	2.22 (1)	0.0235	9.3330 (1.0940-79.6400)
Null / Null	17.50 (7)	26.67 (12)	0.4349	0.5833 (0.2042-1.6670)

T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly, n – počet (vyšetřených jedinců v dané skupině s výsledným genotypem). Hodnota P-value udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro chí-kvadrát test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %. Zvýrazněné hodnoty jsou statisticky významné.

Tab. 22: Kombinace genotypů genů *GSTM1* a *GSTT1* mezi skupinami T1D a T2D

<i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i>	T1D % (n = 40)	T2D % (n = 40)	P-value	OR (95 % CI)
Wild type / Wild type	25.00 (10)	35.00 (14)	0.4647	0.6190 (0.2354-1.628)
Null / Wild type	42.50 (17)	30.00 (12)	0.3524	1.7250 (0.6857-4.3380)
Wild type / Null	5.00 (2)	17.50 (7)	0.1543	0.2481 (0.04815-1.279)
Null / Null	27.50 (11)	17.50 (7)	0.4225	1.7880 (0.6126-5.2190)

T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, n – počet (vyšetřených jedinců v dané skupině s výsledným genotypem). Hodnota P-value udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro chí-kvadrát test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %.

4.2 Stanovení malondialdehydu

Pro stanovení koncentrace MDA v plazmě byla použita kolona Ascentis Express C18 o rozměrech 100 x 3,0 mm s náplní Fused-Core o velikosti částic 2,7 μm . Částice jsou tvořeny pevným jádrem o průměru 1,7 μm a porézním obalem 0,5 μm .

Krátké kolony bylo využito z důvodu rychlejší analýzy. Podmínky pro toto stanovení byly optimalizovány RNDr. Janou Matějčkovou-Fauknerovou, PhD. na ústavu Biochemie 3. LF UK. Separace probíhala při složení mobilní fáze AcN : voda v poměru 40 : 60 a průtoku mobilní fáze 0,4 ml·min⁻¹. Počet teoretických pater v tomto uspořádání je 5000 ± 600.

Za výše uvedených podmínek a dávkování 5 μl vzorku dochází k úplnému oddělení MDA-DNPH i MeMDA-DNPH od ostatních látek přítomných v modelovém vzorku i ve vzorku krevní plazmy.

4.2.1 Kalibrační závislosti modelového vzorku MDA

Kalibrační závislosti pro modelový vzorek MDA byly naměřeny v rozmezí koncentrací 1–20 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Dále byly naměřeny kalibrační závislosti pro MDA v plazmě

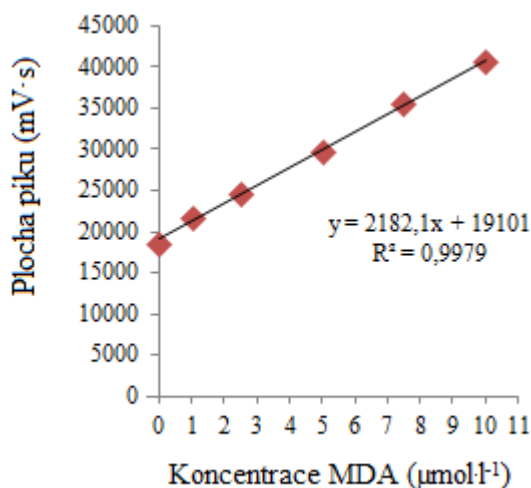
metodou standardního přidavku. Všechny koncentrace použité pro vytvoření kalibrační křivky byly měřeny třikrát a pro vyhodnocení byly použity jejich průměrné hodnoty.

Limit detekce byl vypočítán pro výšku píku odpovídající trojnásobku šumu detektoru. Limit detekce je $0,27 \mu\text{mol l}^{-1}$ ($0,02 \text{ mg l}^{-1}$) a je dostatečně nízký pro stanovování MDA v reálných vzorcích krve.

Naměřené koncentrace MDA byly vyhodnoceny jak z výšky, tak z plochy píku a jejich závislost na koncentraci byla zpracována regresní analýzou. Kalibrační přímku vyhodnocenou z plochy píku pro modelový vzorek MDA vyjadřuje rovnice:

$$S (\text{mV}\cdot\text{s}) = 2182,1 c (\mu\text{mol l}^{-1}) + 19101.$$

Experimentálně změřená kalibrační závislost plochy píku na koncentraci MDA je zobrazena na obrázku (Obr. 19).

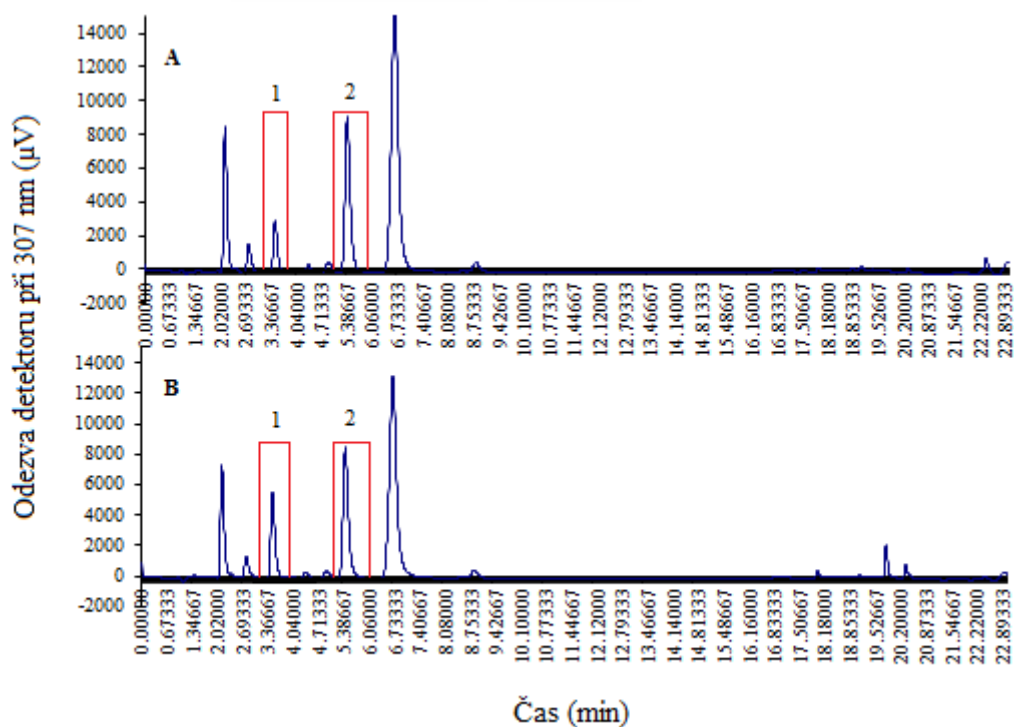


Obr. 19: Kalibrační přímka pro stanovení MDA v modelovém vzorku vyhodnocená z ploch píků na koloně Ascentis Express C18.

MDA – malondialdehyd, R^2 - koeficient determinace.

4.2.2 Hladina MDA u pacientů s diabetes mellitus 1. a 2. typu

Hladina MDA v plazmě byla naměřena u 23 pacientů s T1D, 28 pacientů s T2D a u 40 zdravých kontrol. Grafické znázornění koncentrace MDA u diabetiků a kontrol je na obrázku (Obr. 20).



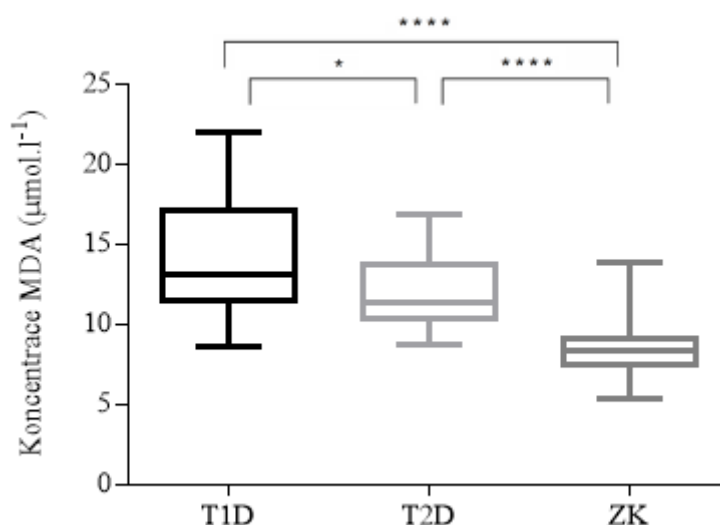
Obr. 20: Ukázkový chromatogram stanovení MDA v krevní plazmě. Chromatogram A – plazma s nízkou koncentrací MDA, chromatogram B – plazma s vysokou koncentrací MDA. MF – AcN : voda (40 : 60, v/v, přídavek 3,6 ml kyseliny octové na 930 ml vody), průtok 0,4 ml·min⁻¹, kolona Ascentis Express C18, objem nadávkovaného vzorku plazmy 5 µl, 100 x 3mm. Identifikace píků: 1 – MDA, 2 – MeMDA; nespecifikované píky v chromatogramu vzorku krevní plazmy odpovídají vedlejším produktům derivatizační reakce.

Měřením bylo prokázáno, že průměrná hladina MDA u pacientů s T1D je o 64 % a pacientů s T2D je o 44 % vyšší než hladina MDA u kontrolní skupiny zdravých jedinců. Hodnoty koncentrace MDA v plazmě u diabetických pacientů a zdravých kontrol jsou uvedeny v tabulce (Tab. 23). Byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi skupinami T1D a zdravými jedinci ($P < 0,0001$), mezi skupinami T2D a zdravými jedinci ($P < 0,0001$) a mezi skupinami T1D a T2D ($P = 0,0333$). Statisticky významné rozdíly jsou znázorněny na obrázku (Obr. 21).

Tab. 23: Koncentrace MDA v plazmě u pacientů s T1D, T2D a zdravých kontrol.

Parametr	T1D	T2D	ZK
Počet jedinců	23	28	45
Průměrný věk (roky)	44,0 ± 14,9	64,9 ± 11,3	36 ± 14,2
Průměrná koncentrace MDA (μM)	13,8 ± 0,5	12,1 ± 0,4	8,4 ± 0,3
Koncentrační rozmezí MDA (μM)	8,6 - 22,1	8,7 - 16,9	5,4 - 13,8

MDA – malondialdehyd, T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, T2D - pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly.



Obr. 21: Koncentrace MDA v plazmě u pacientů s T1D a T2D v porovnání se zdravými kontrolami.

* označuje signifikantní rozdíl na hladině významnosti 0,05 a **** extrémně signifikantní rozdíl ($P < 0,0001$) dle t-testu. MDA – malondialdehyd, T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly.

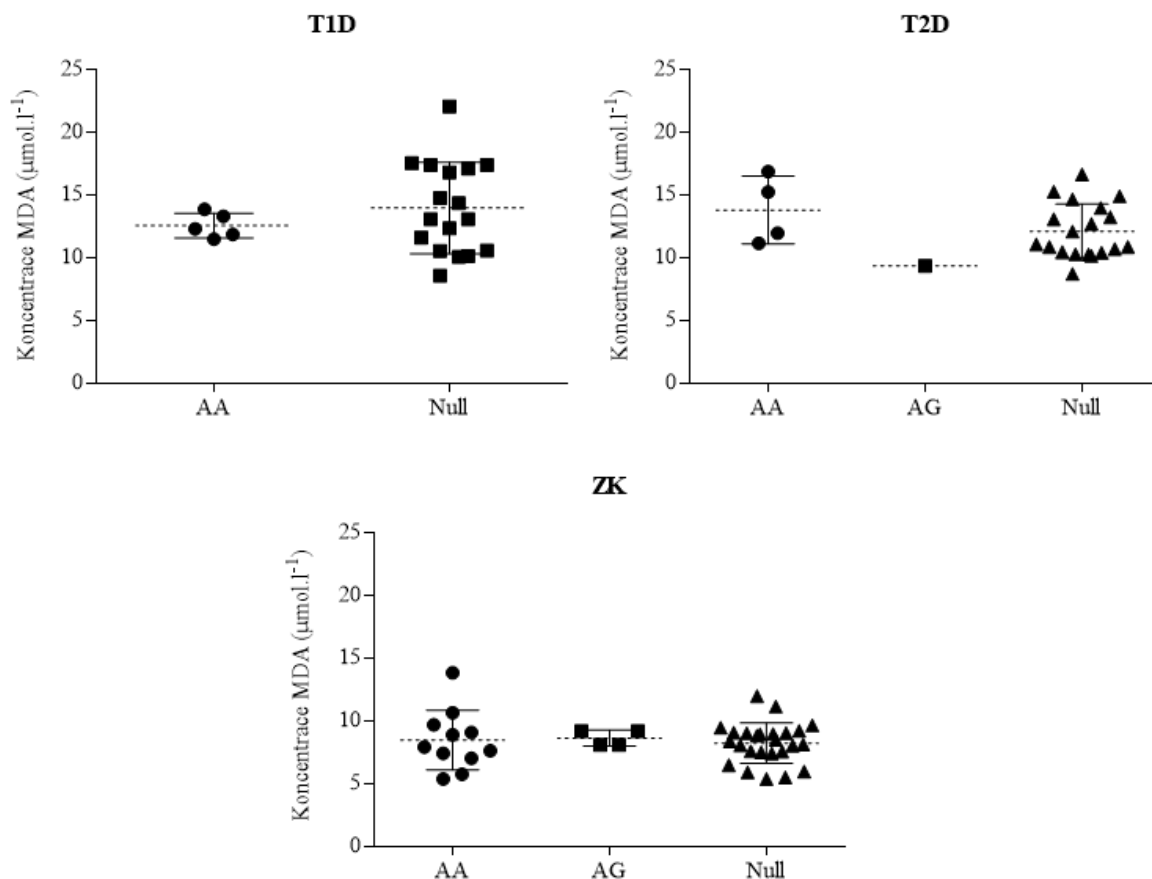
4.3 Korelace mezi hladinou MDA v krevní plazmě a vybranými genotypy

Pro korelaci hladiny MDA v krevní plazmě byly vybrány pouze genotypy a jejich kombinace, které se jeví jako statisticky významné na základě výše uvedených statistických testování.

4.3.1 Závislost koncentrace MDA na genotypech genu *SOD1*

S využitím Mann-Whitneyho testu na hladině statistické významnosti 0,05 byly porovnány hodnoty koncentrace MDA v plazmě v závislosti na genotypech genu *SOD1* u jednotlivých skupin. U skupiny T1D nebyl přítomen heterozygotní genotyp. Nebyla

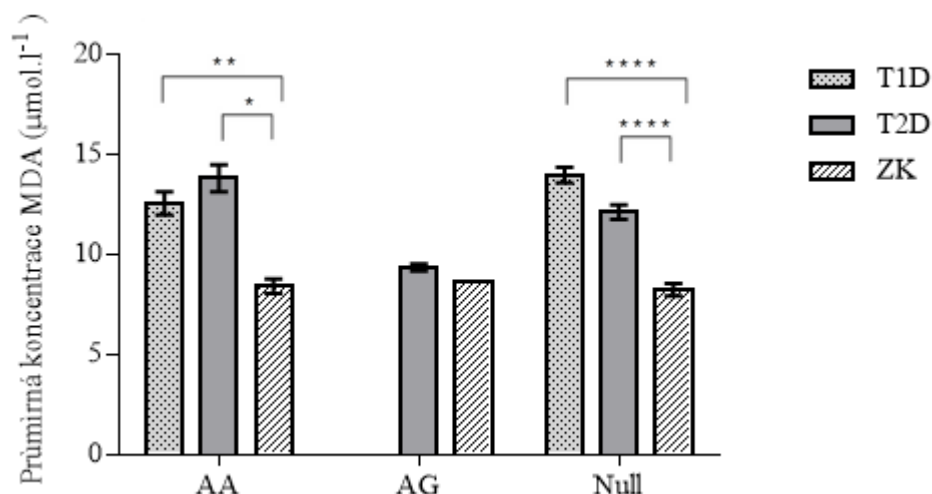
prokázána souvislost mezi koncentrací MDA a genotypy. Grafické znázornění je zobrazeno na obrázku (Obr. 22).



Obr. 22: Korelace mezi genotypy genu *SOD1* a naměřenými hodnotami koncentrace MDA v plazmě u jednotlivých skupin jedinců

MDA – malondialdehyd, T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly.

S využitím Mann-Whitney testu ($P < 0,05$) byly následně porovnány hodnoty koncentrace MDA v plazmě s genotypy napříč skupinami. Statisticky významné rozdíly byly prokázány u genotypu AG mezi skupinou T1D a zdravými jedinci ($P = 0,0079$), T2D a zdravými jedinci ($P = 0,0159$) a u null genotypu mezi skupinou zdravých jedinců a T1D ($P < 0,0001$) a T2D ($P < 0,0001$). Korelace mezi genotypy a skupinami je graficky znázorněna na obrázku (Obr. 23).

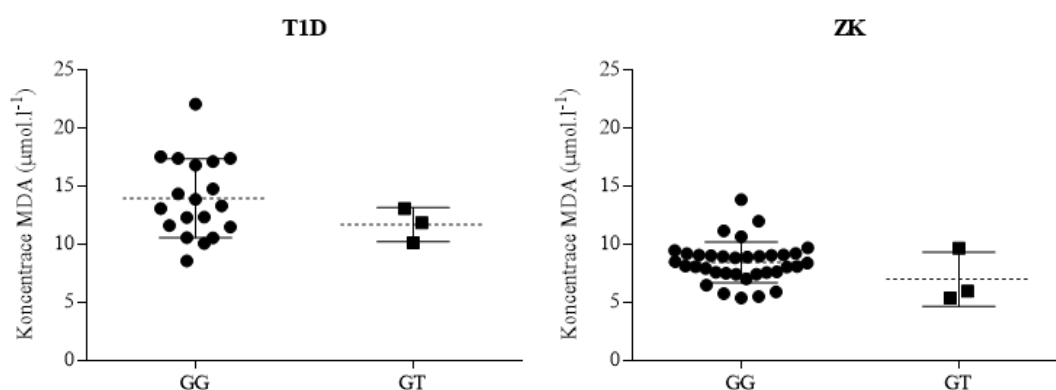


Obr. 23: Korelace mezi naměřenými hodnotami koncentrace MDA a genotypy genu *SOD1* mezi jednotlivými skupinami

* označuje signifikantní rozdíl, ** vysoce signifikantní rozdíl, **** extrémně signifikantní rozdíl mezi skupinami na hladině statistické významnosti 0,05 s využitím Mann-Whitneyho testu. MDA – malondialdehyd, T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly.

4.3.2 Závislost koncentrace MDA na genotypech genu *SOD3*

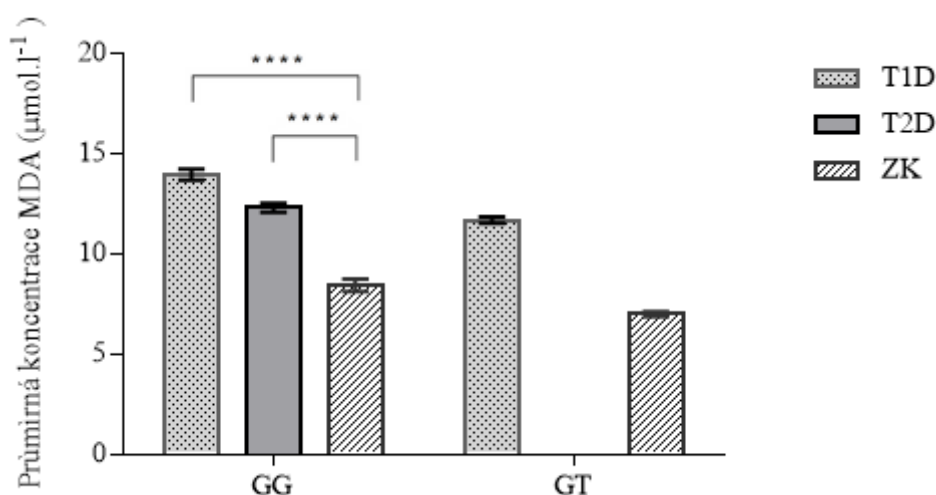
S využitím Mann-Whitneyho testu na hladině statistické významnosti 0,05 byly porovnány hodnoty koncentrace MDA v plazmě s genotypy genu *SOD3* u jednotlivých skupin. Statisticky významné rozdíly nebyly prokázány u žádného genotypu u jednotlivých skupin ($P > 0,5$). U pacientů T2D s naměřenou koncentrací MDA byl přítomen pouze genotyp GG, a proto nebyl statisticky zpracován. Grafické znázornění je zobrazeno na obrázku (Obr. 24).



Obr. 24: Korelace mezi genotypy genu *SOD3* a naměřenými hodnotami koncentrace MDA v plazmě u jednotlivých skupin jedinců.

MDA – malondialdehyd, T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, ZK – zdravé kontroly.

Hodnoty koncentrace MDA v plazmě byla také porovnána s genotypy genu *SOD3* a mezi skupinami jedinců s využitím Mann-Whitney testu na hladině statistické významnosti 0,05. Statisticky významné rozdíly byly prokázány u genotypu GG mezi skupinou T1D a zdravými jedinci ($P < 0,0001$) a T2D a zdravými jedinci ($P < 0,0001$). Korelace mezi genotypy a skupinami je graficky znázorněna na obrázku (Obr. 25).

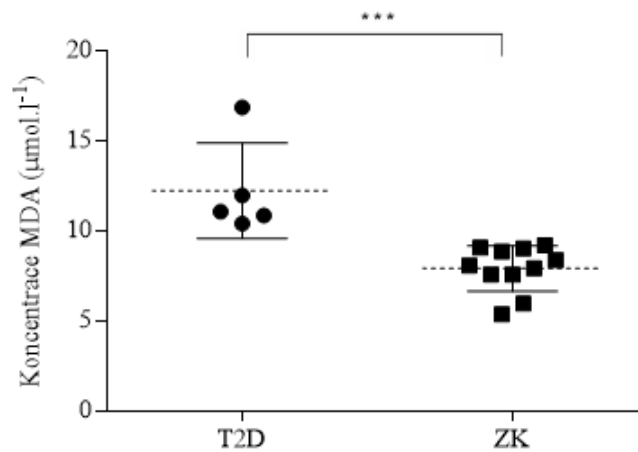


Obr. 25: Korelace mezi naměřenými hodnotami koncentrace MDA a genotypy genu *SOD3* mezi jednotlivými skupinami

**** označuje statisticky vysoce významné rozdíly mezi skupinami na hladině statistické významnosti 0,05 s využitím Mann-Whitneyho testu. MDA – malondialdehyd, T1D – pacienti s diabetes mellitus 1. typu, T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly.

4.3.3 Závislost koncentrace MDA na kombinaci genotypů genů *GSTM1* a *GSTT1*

S využitím Mann-Whitneyho testu na hladině statistické významnosti 0,05 byly porovnány hodnoty koncentrace MDA v plazmě s null genotypem genu *GSTT1* a wild type genotypu genu *GSTM1* mezi skupinou T2D a zdravými jedinci. Byl prokázán statisticky extrémně vysoký (***) rozdíl ($P = 0,0005$). Grafické znázornění této závislosti je zobrazeno na obrázku (Obr. 26).



Obr. 26: Korelace mezi kombinací genotypů *GSTT1* null a *GSTM1* wild type a naměřenými hodnotami koncentrace MDA v plazmě mezi skupinou T2D a zdravými jedinci.

*** označují extrémní statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 0,05 dle t-testu. MDA – malondialdehyd, T2D – pacienti s diabetes mellitus 2. typu, ZK – zdravé kontroly.

4.4 Závislost koncentrace MDA v plazmě na věku

S využitím metody lineární regrese byla testována závislost koncentrace MDA v plazmě na věku u jednotlivých skupin. Nebyla však prokázána žádná závislost ($R^2 < 0,5$).

5 Diskuze

Oxidativní stres může být způsobován nerovnováhou mezi antioxidanty a ROS vlivem poškozením genů, exprimujících antioxidantní enzymy. Tyto geny vykazují polymorfní charakter a byla u nich nalezena a popsána řada polymorfizmů. Z mnoha známých genů oxidativního stresu jsme se u kavkazské populace zaměřili celkem na sedm polymorfizmů: rs 2070424 (substituce A/G v intronu mezi exonem 3 a 4 genu *SOD1*), rs 8192287 (substituce G/T v promotorové oblasti genu *SOD3*), rs 1800668 (substituce G/A v exonu 1 genu *GPXI*), rs 1001179 (substituce C/T v promotoru genu *CAT*), rs 375176458 (delece -/C v intronu mezi exonem 3 a exonem 4 genu *GSTM1*), rs 777169989 (delece -/G v intronu mezi exonem 1 a exonem 2 genu *GSTT1*) a rs 1695 (substituce A/G v exonu 5 genu *GSTP1*).

Polymorfizmy byly vybrány na základě několika studií v různých populacích, v nichž byly studovány vztahy jednotlivých polymorfizmů a diabetes mellitus či jeho komplikacemi.

Testovali jsme, zda se konkrétní polymorfizmy v rámci jednotlivých skupin (T1D, T2D a ZK) vyskytují s rozdílnou četností. Statisticky významné rozdíly frekvencí genotypů jsme prokázali u dvou genů – *SOD1* (null vs. wild type genotyp) a *SOD3* (rs 8192287). Toto zjištění podporuje teorii, že genetická variabilita antioxidantních enzymů může vést ke snížení antioxidantní kapacity, a tím k rozvoji diabetes mellitus a jeho komplikací. Rozdíl jsme prokázali při společném porovnání frekvencí genotypů polymorfizmu rs 2070424 a null polymorfizmu *SOD1*. V případě porovnání frekvencí jednotlivých genotypů polymorfizmu rs 2070424 jsme mezi skupinami neprokázali statisticky významné rozdíly. Ve zkoumaném souboru – 125 jedinců – se tento polymorfizmus vyskytoval pouze ve 49 případech (AA – 41 případů, AG – 8 případů). V případě, že jsme porovnali společně (zkoumaný soubor tedy zahrnoval 125 jedinců) null a pozitivní polymorfizmus rs 2070424 (AA + AG), jsme prokázali statisticky významné rozdíly ve frekvencích mezi zdravými jedinci a pacienty s T2D a mezi skupinami diabetiků. AA genotyp se vyskytuje s vyšší četností u pacientů s T2D oproti zdravým jedincům ($P = 0,0191$) a pacientům s T1D ($P = 0,0030$). Zároveň u pacientů s T2D se null polymorfizmus vyskytuje méně často než u zdravých jedinců a pacientů s T1D. Polymorfizmus rs 2070424 byl středem zájmu Haldara a spolupracovníků (Haldar *et al.* 2015). Autoři prokázali v indické populaci statistickou významnost tohoto polymorfizmu u pacientů s diabetes mellitus. Ke stejnému závěru jsme dospěli i my po

společném vyhodnocení delečního a pozitivního genotypu. Mezi další studie zmiňující asociace mezi ROS a diabetes mellitus patří studie Zhang *et al.*, jež zkoumala tentýž polymorfismus v souvislosti s diabetickou komplikací katarakty. Prokázali, že frekvence genotypu GG byla vyšší u diabetických pacientů s kataraktou, naproti tomu genotyp AA má protektivní charakter. Tudíž alela G představuje riziko pro rozvoj katarakty u diabetických pacientů (Zhang *et al.* 2011). V průběhu měření této diplomové práce jsme však nenalezli žádného pacienta s genotypem GG a zároveň ani jeden z pacientů T1D a T2D netrpěl tímto onemocněním.

Při zkoumání polymorfizmu rs 8192287 (genu *SOD3*) jsme prokázali statisticky významný rozdíl ve frekvencích genotypů i alel mezi skupinami diabetiků. U pacientů s T1D ve srovnání se skupinou T2D se s vyšší frekvencí vyskytuje genotyp GT ($P = 0,0109$), zároveň alela T se častěji vyskytuje u diabetiků 1. typu. U diabetiků dosud vztah mezi rs 8192287 a onemocněním popsán nebyl, doposud byla popsána pouze asociace s dýchacími obtížemi u předčasně narozených dětí (Giusti *et al.* 2012), kdy se jako riziková jeví alela T.

Při vyšetřování polymorfizmů rs 777169989 genu *GSTT1* a rs 72549311 genu *GSTM1* jsme prokázali jediný statisticky významný rozdíl mezi frekvencemi kombinovaných genotypů *GSTT1* null a *GSTM1* wild type mezi pacienty s T2D a zdravými jedinci ($P = 0,0235$). Napříč zkoumanými skupinami se u jednotlivých genotypů *GSTT1* častěji vyskytoval wild type polymorfismus, avšak statisticky významný rozdíl ve frekvenci nalezen nebyl. Null polymorfismus genu *GSTM1* se častěji vyskytoval u skupiny T1D a zdravých jedinců, u skupiny T2D se naopak s vyšší četností vyskytoval wild type polymorfismus. Dabdinpour a spolupracovníci vyšetřovali vztah polymorfizmů genů *GSTM1* a *GSTT1*. Jejich studie potvrdila, že mezi null polymorfizmem genu *GSTM1* a pacienty T2D s diabetickou retinopatií je statistická významnost. Naproti tomu statistická významnost nebyla prokázána mezi null polymorfizmem genu *GTTT1* a diabetickou nefropatií (Dabdinpour *et al.* 2013). Pinheiro a spolupracovníci prokázali vztah null polymorfizmu genu *GSTT1* k diabetes mellitus – a to zvýšené riziko diabetických komplikací (Pinheiro *et al.* 2013), u null polymorfizmu genu *GSTM1* však žádná asociace s diabetes mellitus prokázána nebyla. Z důvodu nízkého počtu pacientů s komplikacemi v našem souboru nebyl korelován vztah mezi těmito genotypy a diabetickými komplikacemi.

Ve studii Zaki *et al.* autoři popsali vztah polymorfizmu *GSTP1* (rs 1695) k rozvoji diabetických komplikací – frekvence heterozygotního genotypu AG mezi diabetiky byla statisticky významná u pacientů s komplikacemi, než u pacientů bez komplikací a v porovnání se zdravými jedinci ($P = 0,023$) (Zaki *et al.* 2014). My jsme tuto asociaci nepotvrdili.

Enzymy CAT a GPX1 hrají důležitou roli v odpovědi na oxidativní stres, ale asociace mezi polymorfizmy těchto genů s diabetes mellitus nebyla v naší studii potvrzena. Vysvětlením chybějícího vztahu mezi těmito dvěma polymorfizmy (rs 1001179 – *CAT*, rs 1800668 – *GPXI*) a diabetes mellitus může být multifaktoriální charakter onemocnění a jeho velmi komplikovaná patogeneze. Může to být způsobeno expozicí mnoha fyziologickým signálům, které mohou vyvolat oxidativní stres, jako jsou ROS či UV záření, jež poškozují buňky a buněčné komponenty.

Role polymorfizmu genu *CAT*, rs 1001179, je stále nejasná. Ve studii Pask *et al.* nebyla prokázána asociace mezi tímto polymorfizmem a diabetes mellitus (Pask *et al.* 2006), naproti tomu další dvě studie uvádí, že u pacientů s diabetes mellitus 1. i 2. typu, u kterých byla přítomna alela C, je zvýšené riziko výskytu diabetické neuropatie. Alela T je tedy protektivního charakteru (Zotova *et al.* 2004; Chistiakov *et al.* 2006). Další studie uvádí, že homozygotní genotyp TT se častěji vyskytuje u diabetiků 1. typu, naopak u diabetiků 2. typu se častěji vyskytují genotypy CC a CT, jež mohou být zodpovědné za sníženou aktivitu enzymu a zvýšenou hladinu glukózy v krvi (Góth *et al.* 2012). Najafi a spolupracovníci studovali vztah polymorfizmu genu *GPXI*, rs 1800668, s diabetes mellitus. Prokázali, že jedinci s genotypem CC vykazují vyšší aktivitu GPX1 v porovnání s genotypy CT a TT. Nicméně tento polymorfizmus nemění strukturu proteinu, tudíž rozdíly v aktivitě mohou být asociovány s transkripční regulací, neboť polymorfizmus se nachází v promotorové oblasti (Najafi *et al.* 2012).

Druhá část diplomové práce byla zaměřena na měření hladiny malondialdehydu v krevní plazmě jakožto markeru oxidativního stresu. V naší studii byla prokázána zvýšená hladina MDA u pacientů s T1D a T2D oproti zdravým kontrolám, přičemž pacienti s T1D mají hladiny MDA vyšší než pacienti s T2D. Soliman popsal zvýšenou hladinu MDA u pacientů s T2D oproti zdravým jedincům v důsledku zvýšené peroxidace lipidů (Soliman 2008). Naproti tomu ve studii Pácal *et al.* nebyl rozdíl v koncentraci MDA u pacientů s T2D a zdravými jedinci nalezen. Tato studie pouze potvrdila zvýšenou hladinu MDA u pacientů s T1D oproti zdravým kontrolám (Pácal *et al.* 2011). V naší

studii hladina MDA u pacientů s diabetes mellitus 1. typu byla zvýšena jak proti zdravé populaci, tak proti pacientům s diabetes mellitus 2. typu.

Statisticky významné rozdíly v koncentracích mezi skupinami diabetiků naznačují, že oxidativní stres u pacientů s T1D a T2D probíhá odlišným mechanismem a odlišným mechanismem probíhá i rozvoj komplikací.

Mezi pacienty s T1D a T2D se vyskytly rozdíly v závislosti koncentraci MDA na genotypech genů *SOD1* a *SOD3*. U pacientů s T1D se vyskytovaly vyšší hladiny MDA v případě genotypu GG i GT (rs 8192287) než u diabetiků 2. typu (pro GG genotyp) a zdravých kontrol.

U pacientů s T2D, kteří měli genotyp AA (rs 2070424), se vyskytovaly vyšší hladiny MDA než u pacientů T1D. V případě null genotypu nejvyšší koncentrace MDA byla u pacientů s T1D.

Tyto výsledky tedy naznačují, že null genotyp *SOD1* a alela T genu *SOD3* mohou být vůči oxidativnímu stresu a tvorbě malondialdehydu rizikovější než pozitivní genotyp *SOD1* a alela G genu *SOD3*.

Vzhledem k předpokladu, že oxidativní stres spíše ovlivňuje vznik komplikací než samotného diabetu, bude nutné pro další studie soubor pacientů rozšířit. Je otázkou, zda by bylo možné metody stanovení MDA standardně využívat pro stanovení rozvoje diabetu a komplikací u rizikových skupin.

6 Závěr

V rámci mé diplomové práce jsme u tří skupin (T1D, T2D a ZK) vyšetřovali vybrané polymorfizmy genů *SOD1*, *SOD3*, *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1*, *GPX1* a *CAT*. Následně jsme u jednotlivých skupin stanovili hladinu malondialdehydu. Získaná data jsme porovnali mezi sebou a dospěli jsme k těmto závěrům:

- Byl prokázán statisticky významný rozdíl ($P = 0,0235$) mezi frekvencemi genotypů *GSTT1* null a *GSTM1* wild type mezi zdravými jedinci a pacienty s T2D.
- Byly prokázány statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi frekvencemi genotypů genů *SOD3* a *SOD1* (pozitivní vs. null) mezi skupinami diabetiků.
- Byly prokázány statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi hladinami malondialdehydu mezi jednotlivými testovanými skupinami. Nejvyšší hodnoty vykazují pacienti s T1D, naopak nejnižší hodnoty vykazují zdraví jedinci.
- Byly prokázány statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi genotypy genů *SOD3* a *SOD1* (pozitivní vs. null) a naměřenými hladinami malondialdehydu mezi skupinami diabetiků.
- Byl prokázán statisticky významný rozdíl ($P = 0,0005$) mezi kombinací genotypů *GSTM1* wild type a *GSTT1* null a naměřenými hladinami malondialdehydu mezi pacienty s T2D a zdravými jedinci.

7 Seznam použité literatury

Al-Kateb H., Boright A.P., Mirea L., Xie X., Sutradhar R., Mowjoodi A., Bharaj B., Liu M., Bucksa J.M., Arends V.L., Steffes M.W., Cleary P.A., Sun W., Lachin J.M., Thorner P.S., Ho M., McKnight A.J., Maxwell A.P., Savage D.A., Kidd K.K., Kidd J.R., Speed W.C., Orchard T.J., Miller R.G., Sun L., Bull S.B., Paterson A.D. (2008): Multiple superoxide dismutase 1/splicing factor serine alanine 15 variants are associated with the development and progression of diabetic nephropathy. *Diabetes*, **57**(1), 218-228.

Ali-Osman F., Akande O., Antoun G., Mao J.X., Buolamwini J. (1997): Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 10004-10012.

Allocati N., Federici L., Masulli M., Di Ilio C. (2009): Glutathione transferases in bacteria. *FEBS Journal*, **276**, 58-75.

Amer M.A., Ghattas M.H., Abo-Elmatty D.M., Abou-El-Ela S.H. (2011): Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on type 2 diabetes mellitus risk. *Genetics and Molecular Research*, **10**, 3722-3730.

American Diabetes Association (2007): Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 30 (Suppl 1): 47.

Atkinson H.J., Babbitt P.C. (2009): Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemical Journal*, **488**(1), 11108-11116.

Babčák a kol. (2008). Stručná história a súčasnosť diabetes mellitus. 5. vyd. Prešov: Grafotlač, 9-11 s. ISBN 80-8068-480-4.

Baynes J.W. (1991): Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, **40**, 405-412.

Baynes J.W., Thorpe S.R. (1999): Perspectives in diabetes. Role of Oxidative Stress in Diabetic complications. A New Perspective on an Old Paradigm. *Diabetes*, **48**, 1-9.

Board P.G., Webb G.C., Coggan M. (1989): Isolation of a cDNA clone and Localization of the human glutathione-S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. *Annals of Human Genetics*, **53** (Pt 3), 205-213.

Brownlee M. (2005): The Pathobiology of Diabetic Complications. A Unifying Mechanism. *Diabetes*, **54**, 1615-1625.

Campo S., Sardo A.M., Campo G.M., D'Ascola A., Avenoso A., Castaldo M., Saitta C., Lania A., Saitta A., Calatroni A. (2005): Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) gene mutations screening in a sample of Mediterranean population. *Mutation Research*, **578**, 143-148.

- Capoluongo E., Almadori G., Concolino P., Bussu F., Santonocito C., Vendittelli F., Galli J., Zuppi C., Ameglio F., Paludetti G., Giardina B. (2006): *GSTT1* and *GSTM1* allelic polymorphisms in head and neck cancer patients from Italian Lazio Region. *Clinica Chimica Acta*, **376**(1-2), 174-178.
- Carlsten C., Dybuncio A., Becker A., Chan-Yeung M., Brauer M. (2011): Traffic-related air pollution and incident asthma in a high-risk birth cohort. *Occupational and Environmental Medicine*, **68**(4), 291-295.
- Cheeseman K.H., Slater T.F. (1993): An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, **49**(3), 481-493.
- Chen J., Cao Q., Qin C., Shao P., Wu Y., Wang M., Zhang Z., Yin C. (2011): GPx-1 polymorphism (rs1050450) contributes to tumor susceptibility: evidence from meta-analysis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **137**, 1553-1561.
- Cheng H.Y., You H.Y., Zhou T. B. (2012): Relationship between *GSTM1/GSTT1* null genotypes and renal cell carcinoma risk: a meta-analysis. *Renal failure*, **34** (8), 1052-1057.
- Dabdinpour A., Sheikhha M.H., Darbouy M., Afkhami-Ardekani M. (2013): Investigating *GSTT1* and *GSTM1* null genotype as the risk factor of diabetes type 2 retinopathy. *Journal of Diabetes a Metabolic Disorders*, **12**, 48.
- Delmastro M.M. & Piganelli J.D. (2011): Oxidative stress and redox modulation potential in type 1 diabetes. *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 1.
- Doney A.S., Lee S., Leese G.P., Morris A.D., Palmer C.N. (2005): Increased cardiovascular morbidity and mortality in type 2 diabetes is associated with the glutathione S transferase theta-null genotype: a Go-DARTS study. *Circulation*, **111**, 2927-2934.
- Droge W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. **82**(1), 47-95. ISSN 0031-9333.
- Ďuračková Z. (1998): Voľné radikály a antioxidy v medicíne. [Definícia, rozdelenie a biologický význam voľných radikálov a antioxidy]. 1. vyd. Bratislava: Slovak Academic Press, 285 s. ISBN 80-88908-11-6.
- Ďuračková Z., Bergendi L., Čársky J. (1999): Voľné radikály a antioxidy v medicíne. (Význam voľných radikálov v etiológii niektorých ochorení). 1. vyd. Bratislava: Slovak Academic Press, 315 s. ISBN 80-88908-46-9.
- Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, **11**(1), 81-128. ISSN 0891-5849.
- Fang Y.Z., Yang S., Wu G. (2002): Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, **18**, 872-879.

Filippova I.N., Khrunin A.V., Limborska S.A. (2012): Analysis of DNA variations in *GSTA* and *GSTM* gene clusters based on the results of genome-wide data from three Russian populations taken as an example. *BMC Genetics*, **13**, 89.

Finkel T., Holbrook N.J. (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**, 239-247.

Fisher A.B., Zhang Q.Â.Â., Geoffrey J.L., Steven D.S. (2006). NADPH and NADPH oxidase. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, Oxford, Academic Press, **77**.

Flekač M., Škrha J., Hilgertová J., Lacinová Z., Jarolímková M. (2008): Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC Medical Genetics*, **9**, 30.

Forsberg L., de Faire U., Marklund S.L., Andersson P.M. Stegmayr, B., Morgenstern, R. (2000): Phenotype determination of a common Pro-Leu polymorphism in human glutathione peroxidase 1. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, **26**, 423-426.

Frei B., Stocker R., England L., Ames B.N. (1990). Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **264**, 155-163.

Gabbay K. H. (1973): The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *The New England Journal of Medicine*, **288**, 831-836.

Giusti B., Vestrini A., Poggi C., Magi A., Pasquini E., Abbate R., Dani C. (2012): Genetic polymorphisms of antioxidant enzymes as risk factors for oxidative stress-associated complications in preterm infants. *Free Radical Research*, **46**(9), 1130-1139.

Góth L., Nagy T., Kósa Z., Fejes Z., Bhattoa H.P., Paragh G., Káplár M. (2012): Effect of rs769217 and rs1001179 polymorphism of catalase gene on blood catalase, carbohydrate and lipid biomarkers in diabetes mellitus. *Free radical Research*, **46**(10), 1249-1257.

Grotto D., Maria L.S., Valentini, J., Paniz C., Schmitt G., Garcia S.C., Pomblum V.J., Rocha J.B.T., Farina M. (2009): Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova*, **32**(1), 169-174. ISSN 0100-4042.

Haldar S.R., Chakrabarty A., Chowdhury S., Haldar A., Sengupta S., Bhattacharyya M. (2015): Oxidative stress-related genes in type 2 diabetes: association analysis and their clinical impact. *Biochemical Genetics*, **53**(4-6), 93-119.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999): *Free radicals in biology and medicine*, 3rd edition. Oxford, UK: Clarendon Press.

Hamanishi T., Furuta H., Kato H., Doi A., Tamai M., Shimomura H., Sakagashira S., Nishi M., Sasaki H., Sanke T., Nanjo K. (2004): Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (*GPx-1*) gene are associated with increased intima-media thickness of

carotid arteries and risk of macrovascular diseases in japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes*, **53**, 2455-2460.

Harris S.E., Fox H., Wright A.F., Hayward C., Starr J.M., Whalley L.J., Deary I.J. (2007): A genetic association analysis of cognitive ability and cognitive ageing using 325 markers for 109 genes associated with oxidative stress or cognition. *BMC Genetics*, **8**, 43.

Hayes J.D., Strange R.C. (2000): Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences. *Pharmacology*, **61**, 154-166.

Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. (2005): Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **45**, 51-88.

Hunt J.V., Smith C.C.T., Wolff S.P. (1990): Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes*, **39**, 1420-1424.

Chistiakov D.A., Zotova E.V., Savost'anov K.V., Bursa T.R., Galeev I.V., Stokov I.A., Nosikov V.V. (2006): The 262T>C promoter polymorphism of the catalase gene is associated with diabetic neuropathy in type 1 diabetic Russian patients. *Diabetes & Metabolism*, **32**, 63-68.

Ishii H., Koya D., King G.L. (1998): Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Journal of Molecular Medicine*, **76**(1), 21-31.

Ishida K., Morino T., Takagi K., Sukenaga Y. (1987): Nucleotide sequence of human gene for glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Research*, **15**(23), 10051.

Jiao L., Bondy M.L., Hassan M.M., Chang D.Z., Abbruzzese J.L., Evans D.B., Smolensky M.H., Donghui L. (2007): Glutathione-S-transferase gene polymorphisms and risk and survival of pancreatic cancer. *Cancer*, **109**(5), 840-848.

Johansen J. S., Harris A. K., Rychly D. J., Ergul A. (2005): Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*, **4**(1), 5.

Joseph P.D. (2010): Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Human Genomics and Proteomics*, 876940.

Kaiser N., Sasson S., Feener E.P., Boukobza-Vardi N., Higashi S., Moller D.E., Davidheiser S., Przybylski R.J., King G.L. (1993): Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes*, **42**, 80-89.

Kand'ár R., Mužáková V., Čegan A. (2002): Highly specific, simple and rapid method for the determination of malondialdehyde in blood using high-performance liquid

chromatography. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **40**(10),1032-1035. ISSN 1434-6621.

Kesavalu M.M., Rao B.K., Giri R., Vijaya J., Subramanyam G., Apparao C. (2001): Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **53**(1), 33-39. ISSN 0168-8227.

Leahy J.L., Hirsch I.B., Peterson K.A., Schneider D. (2010): Targeting beta-cell function early in the course of therapy for type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **95**(9), 4206-4216.

Liwei L., Wei Z., Ruifa H., Chunyu L. (2012): Association between genetics variants in glutathione peroxidase 1 gene and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, **39**(9), 8615-8619..

Manohar S.M., Vaikasuvu S.R., Sachan D.K.A., Narasimha S.R.P.V. (2013): An association of hyperglycemia with plasma malondialdehyde and atherogenic lipid risk factors in newly diagnosed Type 2 diabetic patients. *Journal of Research in Medical Sciences*, **18**(2), 89-93. ISSN 1735-1995.

Marklund S.L. (1984): Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochemical Journal*, **222**, 649-655.

Marnett, L.J. (1999): Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, **424**(1-2), 83-95. ISSN 0027-5107.

Marshall S., Bacote V., Traxinger R.R. (1991): Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 4706-4712.

Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C. (2005): Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **16**, 577-586.

Masopust J. (2003): Patobiochemie buňky. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta,. 344 s. ISBN 80-239-1011-6.

Masopust J. (2005): Reaktivní formy kyslíku (volné kyslíkové radikály) [online]. *Klinická biochemie*, [cit. 2015-05-14]. Dostupné z: lekarny.zdravcentra.cz

Mates J.M., Perez-Gomez C., De Castro I.N. (1999): Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, **32**, 595-603.

McIlwain C.C., Townsend D.M., Tew K.D. (2006): Glutathione S-transferase polymorphisms: Cancer incidence and therapy. *Oncogene*, **25**, 1639-1648.

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, **16**, 1215.

Mohammedi K., Maimaitiming S., Emery N., Bellili-Muñoz N., Roussel R., Fumeron F., Hadjadj S., Marre M., Velho G. (2011): Allelic variations in superoxide dismutase-1 (SOD1) gene are associated with increased risk of diabetic nephropathy in type 1 diabetic subjects. *Molecular Genetics and Metabolism*, **104**(4), 654-60.

Mohammedi K., Bellili-Muñoz N., Marklund S.L., Driss F., Le Nagard H., Patente T.A., Fumeron F., Roussel R., Hadjadj S., Marre M., Velho G. (2015): Plasma extracellular superoxide dismutase concentration, allelic variations in the SOD3 gene and risk of myocardial infarction and all-cause mortality in people with type 1 and type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology*, **14**, 845.

Morrow C.S., Cowan K.H., Goldsmith M.E. (1989): Structure of the human genomic glutathione-S-transferase-pi gene. *Gene*, **75**(1), 3-11.

Najafi M., Ghasemi H., Roustazadeh A., Alipoor B. (2012): Phenotype and genotype relationship of glutathione peroxidase1 (*GPx1*) and rs 1800668 variant: the homozygote effect on kinetic parameters. *Gene*, **505**(1), 19-22.

NCBI [online] 2015. [cit. 3. 3. 2015] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6649>

Nejentsev S., Howson J.M.M., Walker N.M., Szeszeko J., Field S.F., Stevens H.E., Reynolds P., Hardy M., King E., Masters J., Hulme J., Maier L.M., Smyth D., Bailey R., Cooper J.D., Ribas G., Campbell R.D., The Wellcome Trust Case Control Consortium, Clayton D.G., Todd J.A. (2007): Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes *HLA-B* and *HLA-A*. *Nature*, **450**, 887-892.

Nemoto M., Nishimura R., Sasaki T., Hiki Y., Miyashita Y., Nishioka M., Fujimoto K., Sakuma T., Ohashi T., Fukuda K., Eto Y., Tajima N. (2007): Genetic association of glutathione peroxidase-1 with coronary artery calcification in type 2 diabetes: a case control study with multi-slice computedtomography. *Cardiovascular Diabetology*, **6**, 23.

Nessar A. (2005): Advanced glycation endproducts- role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practise*, **67**, 3-21.

Nielsen F., Mikkelsen B.B., Nielsen J.B., Andersen H.R., Grandjean P. (1997): Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*, **43**(7), 1209-1214. ISSN 0009-9147.

Noble J.A., Valdez A.E., Cook M., Klitz W., Thomson G., Erlich H.A. (1996): The Role of HLA Class II Genes in Insulin-Dependent Diabetes. *American Journal of Human Genetics* **59**, 1134-1148.

Oakley A. (2011): Glutathione transferases: A structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*, **43**(2), 138-151.

- Pácal L., Varvařovská J., Rušavý Z., Lacigová S., Štětina R., Racek J., Pomahačová R., Tanhäuserová V., Kaňková K. (2011): Parameters of oxidative stress, DNA damage and DNA repair in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Archives of Physiology and Biochemistry*, **117**(4), 222-230. ISSN 1381-3455.
- Pan Z.J., Huang W.J., Zou Z.H., Gao X.C. (2012): The *GSTT1* null genotype contributes to increased risk of prostate cancer in Asians: a meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **13**(6), 2635-2638.
- Panduru N.M., Mota E., Mota M., Cimponeriu D., Serafinceanu C., Cheta D.M. (2010): Polymorphism of catalase gene promoter in Romanian patients with diabetic kidney disease and type 1 diabetes. *Romanian Journal of Internal Medicine*, **48**, 81–88.
- Pask R., Cooper J.D., Walker N.M., Nutland S., Hutchings J., Dunger D.B., Nejentsev S., Todd J.A. (2006): No evidence for a major effect of two common polymorphisms of the catalase gene in type 1 diabetes susceptibility. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, **22**, 356-360.
- Pelikánová T. (2003): Klasifikace a patogeneze diabetu. In: Bartoš V., Pelikánová T. (eds.): *Praktická diabetologie*. 3. vyd. Praha: Maxdorf, 47-53.
- Pemble S., Schroeder K.R., Spencer S.R., Meyer D.J., Hallier E., Bolt H.M., Ketterer B., Taylor J.B. (1994): Human glutathione-S-transferase theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochemical Journal*, **300**(1), 271-276.
- Permutt M. A., Wasson J., Cox N. (2005): Genetic epidemiology of diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, **115**(6), 1431-1439.
- Pinheiro D.S., Filho C.R.R., Mundim C.A., de Marco P., Ulhoa C.J., Reis A.A.S., Ghedini P.C. (2013): Evaluation of glutathione S-transferase *GSTM1* and *GSTT1* deletion polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk. *PLoS One*, **8**(10), e76262.
- Pitřhová P. (2006): Akutní komplikace Diabetes mellitus. *Interní medicína pro praxi*. č. 12, 523-525 s. ISSN 1212-7299.
- Pitřhová P. (2008): Syndrom diabetické nohy – závažná komplikace diabetes mellitus. *Medicína pro praxi*, č. 3., 15-18 s.
- Racek J. (2003): *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. 1. vyd. Praha: Galén, 89 s. Repetitorium; sv. 6. ISBN 80-7262-231-5.
- Ross V.L., Board P.G., Webb G.C. (1993): Chromosomal mapping of the human Mu class glutathione S-transferases to 1p13. *Genomics*, **18**, 87-91.
- Roxborough H.E., Mercer C., McMaster D., Maxwell A.P., Young I.S. (1999): Plasma glutathioneperoxidase activity is reduced in haemodialysis patients. *Nephron*, **81**, 278-283.

Ruiz-Cosano J., Conesa-Zamora P., Gonzalez-Conejero R., Perez-Ceballos E., Martinez-Frances A., Vicente V., Perez-Guillermo M. (2012): Role of *GSTT1* and *MI* null genotypes as risk factors for B-cell lymphoma: influence of geographical factors and occupational exposure. *Molecular Carcinogenesis*, **51**(6) 508-513.

Rybka J. (2007): Diabetes mellitus – komplikace a přidružená onemocnění. Diagnostické a léčebné postupy. Praha: Grada Publishing, 317 s. ISBN 978-80-247-1671-8.

Santamaria P. (2010): The long and winding road to understanding and conquering type 1 diabetes. *Immunity*, **32**, 437-45.

Siedlinski M., van Diemen C.C., Postma D.S., Vonk J.M., Boezen H.M. (2009): Superoxide dismutases, lung function and bronchial responsiveness in a general population. *European Respiratory Journal*, **33**, 986-992.

Soliman G.Z.A. (2008): Blood lipid peroxidation (superoxide dismutase, malondialdehyde, glutathione) levels in Egyptian type 2 diabetic patients. *Singapore Medical Journal*, **49**(2), 129-136. ISSN 0037-5675.

Sosna T. (2009): Diabetická retinopatie. *Medicína pro praxi* [online], roč. 6, č. 5, s. 270-275. [citace 18. 6. 2015]. ISSN: 1214-8687. Dostupné z: <http://www.medvik.cz/bmc/view.do?gid=703431&>

Su Y., Liu X.M., Sun Y.M., Jin H.B., Fu R., Wang Y.Y., Luan Y. (2008): The relationship between endothelial dysfunction and oxidative stress in diabetes and prediabetes. *International Journal of Clinical Practice*, **62**(6), 877-882. ISSN 1368-5031.

Škrha J. (2009): Biochemie a patofyziologie. In: Škrha J, et al. Diabetologie. Praha: Galén, 33-75.

Šmardová L. (2011): *Reaktivní sloučeniny kyslíku, fyziologické a patologické aspekty*. Brno, Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Petr Zbořil.

Štípek S. a kol. (2000): Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. 1. vyd. Praha: Grada, 314 s. ISBN 80-7169-704-4.

Taverne Y.J., Bogers A.J., Duncker D.J., Merkus D. (2013): Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Art.ID 862423. ISSN 1942-0900.

TEDDY [online] 2014. [cit. 1. 2. 2015] <http://teddy.epi.usf.edu/>

Tesfamariam B., Cohen R.A. (1992): Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *American Journal of Physiology*, **263**, 321-326.

Udomsinprasert R., Pongjaroenkit S., Wongsantichon J., Oakley A.J., Prapanthadara L., Wilce M.C.J., Ketterman A.J. (2005): Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme. *Biochemical Journal*, **388**, 763-771.

- Wang G., Zhang L., Li Q. (2006): Genetic polymorphisms of *GSTT1*, *GSTM1*, and *NQO1* genes and diabetes mellitus risk in Chinese population. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **341**, 310-313.
- Webb G., Vaska V., Coggan M., Board P. (1996): Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (*GSST1*). *Genomics*, **33**, 121-123.
- Weir G.C., Laybutt D.R., Kaneto H., Bonner-Weir, S., Sharma, A. (2001). Betacell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes*, **50**(1), 154-159.
- Wenzlau J.M., Juhl K., Yu L., Moua O., Sarkar S.A., Gottlieb P., Rewers M., Eisenbarth G.S., Jensen J., Davidson H.W., Hutton J. (2007): The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 1704-17045.
- Whitin J.C., Tham D.M., Bhamre .S, Ornt D.B., Scandling J.D., Tune B.M., Salvatierra O., Avissar N., Cohen H.J. (1998): Plasma glutathione peroxidase and its relationship to renalproximal tubule function. *Molecular Genetics and Metabolism*, **65**, 238-245.
- Widersten M., Pearson W.R., Engström A. and Mannervik B. (1991): Heterologous expression of the allelic variant μ -class glutathione transferases μ and ψ . *Biochemical Journal*, **276**, 519-524.
- Williamson J. R., Chang K., Frangos M , Hasan K.S., Ido Y., Kawamura T., Nyengaard J.R., van den Enden M., Kilo C., Tilton R.G. (1993): Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*, **42**, 801-813.
- World Health Organisation (1999): Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complication. Report of a WHO Consultation, Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva: World Health Organisation.
- Wu X., Yuan B., López E., Bai C., Wang X. (2013): Gene polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **18**, 15-26.
- Xu C., Chen S., Gao H., Zhao K., You X., Zhang Y., Zhang X., Li Y. (2014): Quantitative assessment of the influence of glutathione S-transferase M1 null variant on ovarian cancer risk. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, **10**, 201-205.
- Yalin S., Hatungil R., Tamer L., Ates N.A., Dogruer N., Yildirim H., Karakas S., Atik U. (2007): Glutathione-S-transferase gene polymorphisms in Turkish patients with diabetes mellitus. *Cell Biochemistry and Function*, **25**(5), 509-513.
- Yildirim O., Ateş N.A., Tamer .L, Oz O., Yilmaz A., Atik U., Camdeviren H.(2005): May glutathione S-transferase M1 positive genotype afford protection against primary open-angle glaucoma? *Graefe's Archives for Clinical and Experimental Ophthalmology*, **243**(4), 327-33.
- Yung L.M., Leung F.P., Yao X., Chen Z.Y., Huang Y. (2006): Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets*, **6**, 1-19.

Zaki M.A., Moghazy T.F., El-Deeb M.M.K., Mohamed A.H., Mohamed N.A. A. (2014): Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 gene polymorphisms and the risk of developing type 2 diabetes mellitus in Egyptian diabetic patients with and without diabetic vascular complications. *Alexandria Journal of Medicine*, **51**, 73-82.

Zhang Y., Zhang L., Sun D., Li Z., Wang L., Liu P. (2011): Genetic polymorphisms of superoxide dismutases, catalase, and glutathione peroxidase in age-related cataract. *Molecular Vision*, **17**, 2325-2332.

Ziyadeh F.N., Sharma K., Ericksen M., Wolf G. (1994): Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *Journal of Clinical Investigation*, **9**, 536-542.

Zotova E.V., Chistyakov D.A., Savost'yanov E.V., Bursa T.R., Galeev I.V., Strokov I.A., Nosikov V.V. (2003): Association of the SOD2 Ala(-9)Val and SOD3 Arg213Gly polymorphisms with diabetic polyneuropathy in diabetes mellitus Type 1. *Volume*, **37**, Issue 3, 345-348.

Zotova E.V., Savost'yanov K.V., Chistiakov D.A., Bursa T.R., Galeev I.V., Strokov I.A., Nosikov V.V. (2004): Search for the association of polymorphic markers for genes coding for antioxidant defense enzymes, with development of diabetic polyneuropathies in patients with type 1 diabetes mellitus. *Molecular Biology*, **38**, 244-249.

8 Seznam použitých zkratk

3' UTR	3' nepřekládaná oblast genu
4-HNE	4-hydroxynonenal
5' UTR	5' nepřekládaná oblast genu
A	adenin
ACN	acetonitril
ADP	adenosindifosfát
C	cytosin
CAT	kataláza
dATP	2'- deoxyadenosin- 5' - trifosfát
dCTP	2'- deoxycytidin- 5' - trifosfát
dGTP	2'- deoxyguanosin- 5' - trifosfát
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
dTTP	2'- deoxythymidin- 5' - trifosfát
DAG	diacylglycerol
DM	diabetes mellitus
DNA	2 - deoxyribonukleová kyselina
DNP	2,4-dinitrofenylhydrazin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplazmatické retikulum
FADH ₂	flavinadenindinukleotid
G	guanin
GAD 65	dekarboxyláza kyseliny glutamové
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
GLUT4	glukózový transportér 4
GPX	glutathionperoxidáza
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfid
GST	glutathion-S-transferáza
GSTM	glutathion-S-transferáza třídy mu
GSTP	glutathion-S-transferáza třídy pí
GSTT	glutathion-S-transferáza třídy theta

HLA	lidský leukocytární antigen
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LADA	latentní autoimunitní diabetes dospělých
MDA	malondialdehyd
MeMDA	methylnalondialdehyd
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaný)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
Obr. č.	obrázek číslo
PARP	polymeráza ADP-ribózy
pH	potenciál vodíku
PCR	polymerázová řetězová reakce
PKC	proteinkináza C
RER	drsne endoplazmatické retikulum
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RCLB	červené krvinky lyzující pufr
ROS	reaktivní kyslíkové formy
SDS	dodecylsulfát sodný
SER	hladké endoplazmatické retikulum
SOD	superoxiddismutáza
T	thymin
T1D	diabetes mellitus 1. typu
T2D	diabetes mellitus 2. typu
Tab. č.	tabulka číslo
Taq-pol	Taq-polymeráza
TBE	tris-borát EDTA
UV	ultrafialové záření
WCLB	bílé krvinky lyzující pufr
ZnT8	zinkový transportér