



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

**Využití metody RFLP PCR, PCR ARMS a reverzní hybridizace pro detekci
nejčastějších trombofilních mutací v české populaci**

Vypracovala: Markéta Matějková
Vedoucí práce: Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D.

České Budějovice 2016

Abstrakt

Pojem trombofilie začíná být v dnešní době velice aktuálním tématem. Jedná se o zvýšenou predispozici k tvorbě trombů a následné komplikace právě v důsledku zvýšeného srážení krve, které mohou být velmi vážné až smrtelné. Včasné stanovení trombofilních mutací pomůže pacientovi předejít mnoha rizikovým situacím (např. v případě operace, těhotenství). V dnešní době existuje nejméně 30 genetických laboratoří v České republice, které trombofilní mutace vyšetřují. Bohužel toto vyšetření je hrazeno pojišťovnou pouze u indikovaných případů podléhajícím přísným selekčním kritériím. Pokud má jedinec zájem o takové vyšetření a není indikován ošetřujícím lékařem, musí vyšetření hradit sám. Několik pojišťoven v rámci svých preventivních programů na tato vyšetření přispívají určitou finanční částkou, jedná se např. o Českou průmyslovou zdravotní pojišťovnu, Zdravotní pojišťovnu ministerstva vnitra ČR či Zdravotní pojišťovnu – Revírní bratrskou pokladnu.

Cílem mé bakalářské práce bylo praktické zvládnutí metody RFLP PCR, metody PCR ARMS a reverzní hybridizace na stripech pro detekci nejčastějších trombofilních mutací v české populaci a vypracování rešerše týkající se dané problematiky.

V teoretické části své bakalářské práce se zaměřuji na popis jednotlivých nejvýznamnějších trombofilních mutací v české populaci a jejich rizika. Dále zde uvádím jednotlivé genetické metody, kterými se vybrané trombofilní mutace v genetických laboratořích vyšetřují.

V praktické části uvádím vlastní výsledky, získané vyšetřením čtyř hlavních trombofilních mutací a polymorfismů. Jedná se o Leidenskou mutaci, mutaci protrombinového genu a polymorfismy MTHFR 1298 a MTHFR 677. Vyšetření jsem prováděla pomocí genetických metod RFLP-PCR, PCR ARMS a reverzní hybridizace na stripech. Veškeré metody jsem prováděla v genetické laboratoři GENLABS v Českých Budějovicích. K vyšetření jsem využila vzorky DNA získané ze své rodiny.

Klíčová slova: mutace – RFLP-PCR – PCR ARMS - trombofilie

Abstract

Recently the term thrombophilia is becoming a current topic. It is an increased precondition for the creation of trombooses and the following complications as the result of increased blood coagulation which could be very serious or even fatal. A timely diagnosis of thrombophilia mutations helps patients to avoid many critical situations (e.g. in case of operations, pregnancy etc.). In these days there are at least 30 genetic laboratories in the Czech Republic which research thrombophilia mutations. Unfortunately this medical examination is covered by insurance companies just in case of indicated symptoms which are under strict criteria. If someone is interested in a medical examination and a doctor does not indicate him with the symptoms, they are forced to pay the examination on their own. There are a few insurance companies which contribute with some amount for these examinations as a part of their preventive programmes (e.g. Česká průmyslová zdravotní pojišťovna, Zdravotní pojišťovna ministerstva vnitra ČR or Zdravotní pojišťovnu – Revírní bratrská pokladna).

The aim of my bachelor thesis was a practical mastery RFLP-PCR method, PCR ARMS method and a reverse hybridization on strips to detect the most common mutations of thrombophilia in the population of the Czech Republic and devolving on the issue.

In the theoretical part, I focus on a description of the most important thrombophilic mutations in the Czech population and their risks. I also describe particular genetic methods by which each of thrombophilia mutations is being examined in genetic laboratories.

My own results of the examination of four major thrombophilia mutations and polymorphs are shown in the practical part. These are the Leiden mutation, prothrombin mutation, MTHFR 1298 and MTHFR 677 polymorphs. For my examinations I used these genetic methods: RFLP-PCR method, PCR ARMS method, reverse hybridization on strips. I made all these methods in the genetic laboratory Genlabs in České Budějovice. For the examinations I used DNA samples of my family.

Keywords: mutation - RFLP-PCR - PCR ARMS - thrombophilia

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2016

.....

Markéta Matějková

Poděkování

Touto cestou bych chtěla velice poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D. za spoustu cenných rad a za věnovaný čas při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě podporovala celý čas mého studia.

Obsah

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1	Současný stav	7
2.2	Hemokoagulace.....	8
2.3	Trombofilie	9
2.3.1	Doposud známé klinicky významné vrozené trombofilie	10
2.3.2	Klinicky významné získané trombofilie:	12
2.3.3	Nejvýznamnější trombofilie smíšeného původu:.....	13
2.3.4	Silné provokující faktory.....	14
2.3.5	Ostatní provokující faktory.....	14
2.4	Klinické manifestace trombofilních stavů	15
2.4.1	Hluboká žilní trombóza (HŽT).....	15
2.4.2	Plicní embolie	15
2.4.3	Infarkt myokardu.....	16
2.4.4	Cévní mozková příhoda (CMP).....	17
2.5	Trombofilní mutace.....	17
2.5.1	Mutace FV Leiden.....	18
2.5.2	Mutace protrombinového genu.....	22
2.5.3	Polymorfismy v genu pro MTHFR.....	22
2.6	Metody detekce	24
2.6.1	Amplifikační metody	24
2.6.2	RFLP – PCR.....	29
2.6.3	Hybridizační metody	30
2.6.4	Real Time – PCR.....	32
2.6.5	Sekvenování DNA	32
3	PRAKLICKÁ ČÁST	34
3.1	Izolace DNA.....	34
3.1.1	Izolace z bukalního stěru.....	34
3.1.2	Plná krev.....	36
3.2	Měření koncentrace DNA	37
3.3	Příprava a provedení gelové elektroforézy	38
3.4	Vlastní metody	39
3.4.1	RFLP PCR.....	40
3.4.2	PCR ARMS.....	47
3.4.3	Reverzní hybridizace	52
4	VÝSLEDKY.....	56
4.1	Metoda RFLP – PCR	56
4.2	Metoda PCR ARMS.....	58
4.3	Reverzní hybridizace na stripech:	60
5	DISKUSE	64
6	ZÁVĚR.....	66
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	67

1 ÚVOD

Téma trombofilních mutací začíná být v dnešní době široké nabídky komerčních genetických testů velice aktuální. Já osobně jsem tomuto tématu nevěnovala nijak zvlášť velkou pozornost, dokud jsem nezačala psát tuto práci. Praktickou část své bakalářské práce jsem vyzkoušela sama na sobě. A co jsem nečekala, bylo to, že mé vyšetření bylo pozitivní pro Leidenskou mutaci. Z tohoto důvodu jsem začala na svou práci nahlížet jinak. Hledání informací pro mě mělo daleko větší význam. Měla jsem svým způsobem štěstí, že o své genetické predispozici vím a mohu předejít mnoha komplikacím. V mnoha případech se na výskyt trombofilních mutací nepříjde a bohužel někdy se na ně přijde příliš pozdě.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Současný stav*

Problematika vyšetřování trombofilních mutací je z genetického hlediska velice aktuální už proto, že kardiovaskulární onemocnění, mezi která patří aterotrombóza, představují nejčastější smrtelnou chorobu současného člověka. Recentní studie se zabývají především epidemiologickými a klinickými stavy asociovanými s žilním tromboembolismem (ŽTE) a zvýšeným výskytem kardiovaskulárních chorob. Vyšetření individuální rizikovosti pomocí molekulárně genetického přístupu může v budoucnu zlepšit diagnostiku i léčebný efekt kardiovaskulárních onemocnění obecně (Kvasnička *et al.*, 2012). Navíc frekvence nejčastěji se vyskytujících trombofilních mutací je ve zdravé české populaci poměrně vysoká, v případě Leidenské mutace je to 4.5 % a v případě mutace protrombinového genu 1.3 % (Kvasnička, 2014). Vyšetření těchto dvou trombofilních mutací je v České republice selektivně doporučováno u rizikových skupin populace na základě konsensu České společnosti pro trombózu a hemostázu ČLS

JEP, Společnosti pro lékařskou genetiku ČLS JEP a České hematologické společnosti ČL JEP (Kvasnička, 2010).

Trombofilní mutace mohou významně ovlivňovat hemokoagulaci a koagulační kaskádu, proto se těmto pojmům věnuji v dalších kapitolách.

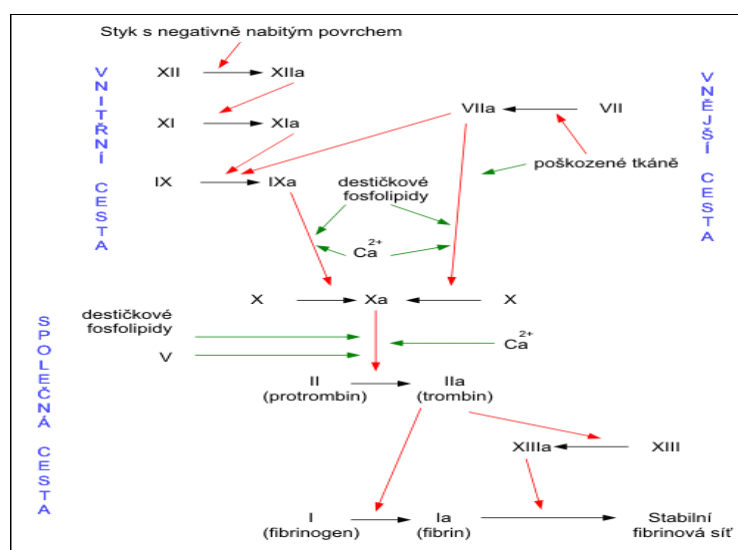
2.2 *Hemokoagulace*

Hemokoagulace neboli proces srážení krve, je součástí hemostázy, tj. procesu, který brání ztrátám krve při poškození krevních cév. Hemokoagulace je způsobena aktivací více koagulačních faktorů (dále budou označovány zkratkou F a příslušným číslem faktoru, u aktivovaného faktoru se přispisuje malé písmeno a). Jedná se o kaskádu enzymatických reakcí, kde nejdůležitější roli hraje přeměna fibrinogenu na fibrin, který pojí volné destičky a vytvoří tak krevní sraženinu neboli trombus. Koagulační kaskáda je založena na existenci dvou cest: vnitřní a vnější, a cesty společné.

Vnější cesta se aktivuje kontaktem tkáňového tromboplastinu s faktorem FVII. Ten se aktivuje na FVIIa a aktivuje FIX. FIXa a FVIIIa aktivují FX, který s FVa zajišťuje přeměnu protrombinu na aktivovaný trombin.

Vnitřní cesta se aktivuje kontaktem s poškozeným povrchem (např. obnažená kolagenní vlákna). Pomocí bílkoviny kalikreinu a vysokomolekulárního kininogenu se aktivují faktory FXII, FXI a FIX. Pomocí FIXa a FVIIIa se opět aktivuje FX, který v přítomnosti trombocytů, vápníku a FVa aktivuje přeměnu protrombinu na trombin (Kvasnička, 2003).

Aktivovaný trombin aktivuje fibrin stabilizující faktor FXIII (obr. 1).



Obrázek 1: Schéma koagulační kaskády.

Zdroj: <http://observatory.cz/news/nizkoteplotni-plazma-zastavuje-krvaceni.html>

2.3 Trombofilie

Trombofilie je stav zvýšené predispozice k tvorbě trombů (Kvasnička, 2003). V principu se jedná o poruchu hemostázy, což má za následek větší náchylnost ke srážení krve.

Z klinické praxe je známo mnoho faktorů, které zvyšují riziko trombózy a pokud jsou přítomny, hovoříme o vrozené nebo získané trombofilii. Nejvýznamnější klinickou manifestací trombofilních stavů je žilní tromboembolismus. Za žilní tromboembolismus je považována hluboká žilní trombóza a možná následná plicní embolie, infarkt myokardu či cévní mozková příhoda (Kessler, 2006). Roční incidence hluboké žilní trombózy a plicní embolie u bílé populace se pohybuje kolem 0,1 – 0,2 %, což představuje asi 1 – 2 případy na 1000 obyvatel. Incidence je stejná u mužů i u žen, ale nižší u Asiatů než u Evropanů nebo Afričanů (Musil, 2009).

Pokud se u jedince vyskytuje rizikový faktor trombózy, neznamená to ještě, že ji musí nutně prodělat. Nad rizikem trombofilního onemocnění uvažujeme, pokud se u pacienta vyskytnou alespoň dva rizikové faktory (Kessler, 2006).

Rizikové faktory související s podezření na trombofilii:

- Žilní trombóza před 40. – 45. rokem nebo tepenná trombóza před 30. – 35. rokem.
- Pozitivní rodinná anamnéza.
- Trombóza arteriální i žilní.
- Trombóza v netypické lokalizaci.
- Opakované ztráty plodu (3 a více následných samovolných potratů před 10. týdnem gravidity, nebo jedno a více úmrtí morfologicky normálního plodu po 10. týdnu gravidity).
- Rizikové těhotenství.
- Porod mrtvého plodu.

Podle etiologie můžeme trombofilie dělit na vrozené, získané a smíšené (Kessler, 2006).

2.3.1 Doposud známé klinicky významné vrozené trombofilie

Vrozené trombofilie neboli vrozené hyperkoagulační stavy jsou stavy charakteristické opakovanými tromboembolickými příhodami před 45 rokem života, trombolitickým onemocněním v rodinné anamnéze či opakovanými potraty (Poul, 2006).

Mezi nejvýznamnější vrozené trombofilie patří:

- APC (aktivovaný protein C) rezistence faktoru V (viz. dále).
- Mutace faktoru V Leiden, faktoru V Cambridge.
- Mutace protrombinového genu 20210A.
- Deficit antikoagulačních faktorů: deficit proteinu C, proteinu S, antitrombinu (Štorková, 2009; Vavrušková, 2010).

Deficit proteinu C byl poprvé publikován v roce 1981 Griffinem. Gen pro protein C označovaný jako PROC je složen z 9 exonů a v současné době je známo více než 160

mutací tohoto genu. Genetická analýza je proto velice komplikovaná a probíhá pouze ve specializovaných centrech (Khor a Van Cott, 2010). Tento deficit je definován poklesem plazmatické aktivity antikoagulačního proteinu C. Heterozygoti mají až 7x vyšší riziko vzniku hluboké žilní trombózy (HŽT). Homozygotní případy byly popsány jen ojediněle (Griffin *et al.*, 1981).

Deficit proteinu S byl poprvé popsán Compem v roce 1984. Jedná se o snížení koncentrace volného proteinu S. Nositelé tohoto defektu mají 10x vyšší riziko vzniku HŽT. Homozygotní forma tohoto deficitu je vzácná (Engesser, 1987).

Deficit antitrombinu byl poprvé publikován Egebergem v roce 1965. Jedinci s heterozygotní formou mají 10x vyšší riziko HŽT. Homozygotní forma tohoto deficitu nebyla zatím popsána.

- Dysfibrinogémie.

Dysfibrinogémie zahrnuje abnormality v molekule fibrinogenu, které narušují jeho funkci.

- Homozygotní homocystinurie.

Jedná se o poruchu metabolismu methioninu a homocysteinu. Jsou známy 3 typy homocystinurie. Nejběžnější je první typ označovaný jako klasická homocystinurie. Ta je spojená s deficitem enzymu cystathioninsyntázy. Důsledkem je zvýšení koncentrace homocysteinu v séru a následné zvýšení přilnavosti trombocytů. U homozygotů se vada začne projevovat kolem 3. roku života jako změna umístění čočky (ektopie čočky), krátkozrakost (myopie), šedý zákal (katarakta) a atrofie celého optického systému oka. Často se také objevují tromboembolické příhody mozku, v ledvinách a v plicích (Štorková, 2009; Vavrušková, 2010).

- Sticky platelet syndrom.

Sticky platelet syndrom neboli syndrom lepivých destiček patří mezi dědičné trombofilie s autozomálně dominantní dědičností (Mammen 1999). Jde o nadměrné shlukování destiček. Příčina není doposud známá. Tento syndrom se často vyskytuje v kombinaci s jinými trombofilními stavy, např. v přítomnosti mutace FV Leiden nebo v kombinaci s hyperhomocysteinémií (Mammen, 1999).

2.3.2 *Klinicky významné získané trombofilie:*

Získané trombofilie vznikají v průběhu života za rizikových situací, jako jsou operace či traumata, nebo jako projev jiného patologického procesu např. hematologického či autoimunitního onemocnění.

Výčet klinicky nejvýznamnějších získaných trombofilií dle Štorková (2009) a Vavrušková (2010):

- Antifosfolipidový syndrom.

Antifosfolipidový syndrom je diagnostikován klinicky i laboratorně a to na základě přítomnosti antifosfolipidových protilátek a současně klinických projevů. Mezi tyto klinické projevy zahrnujeme venózní a arteriální trombózy, cirkulační mikrotrombotizace nebo opakované reprodukční ztráty (Bulíková, Penka, 2005).

- Myeloproliferativní onemocnění a trombocytémie (polycytemia vera, esenciální trombocytémie, primární myelofibróza v proliferální fázi).

Myeloproliferativní onemocnění je klonální hematopoetické onemocnění kmenové buňky. Toto onemocnění je charakterizováno proliferací jedné či více myeloidních linií v kostní dřeni. Mezi myeloproliferativní onemocnění řadíme chronickou myeloidní leukémií, polycytemia vera, esenciální trombocytémií, primární myelofibrózu (Kačírková, Campr, 2007).

- Stav po prodělané trombóze.
- Maligní nádory.

Pacienti s maligními nádory často trpí hyperkoagulačními stavy z důvodu tvorby látek s prokoagulační aktivitou (např. tkáňový faktor). VTE se vyskytuje asi u 5 % těchto pacientů.

- Srdeční nedostatečnost NYHA III a IV.

Pozn.: NYHA (New York Heart Association) je klasifikace dušnosti. NYHA III znamená, že již běžná aktivita je vyčerpávající a NYHA IV znamená dušnost při minimální námaze i v klidu (Špinar, Vítovec, 2001).

- Závažná respirační onemocnění.
- Autoimunitní choroby (Bechcetův syndrom).
- Gravidita a šestinedělí.
- Léčba estrogeny.
- Paroxysmální noční hemoglobinurie.
- Rezistence k aktivovanému proteinu C nezpůsobená mutací faktoru V.
- Nefrotický syndrom.
- Věk nad 60 let.
- Chronický střevní zánět.
- Obezita.
- Kouření.
- Varixy dolních končetin.
- Paréza končetin.

2.3.3 Nejvýznamnější trombofilie smíšeného původu:

- Zvýšená hladina faktoru VIII.

Zvýšená hladina FVIII se vyskytuje pouze u jedinců s jinou krevní skupinou, než je 0. Jedinci s krevní skupinou 0 mají přirozeně nižší hladinu FVIII. FVIII je taktéž protein akutní fáze, tento stav může také způsobit jeho zvýšenou hladinu (Matýšková, Hrachovinová, 1999).

- Hyperhomocysteinémie.

Ta může být podmíněná polymorfismy v genu pro methylenetetrahydrofolát reduktázu - MTHFR C677T nebo A1298C nebo nedostatkem vitamínu B6, B12 či kyseliny listové (Kvasnička, 2003).

- Zvýšená hladina fibrinogenu.

Referenční rozmezí fibrinogenu je 2,0 – 3,5 g/l, přičemž hodnota kolem 4 g/l již představuje mírné trombofilní riziko. Naopak pro hemostázu je důležitá hodnota alespoň 0,6 g/l (Kvasnička, 2003).

- Zvýšená hladina faktoru FIX.

Referenční rozmezí je u osob starších 18 let 50 - 150 %.

Kromě uvedených vrozených či smíšených trombofilií je známá celá řada tzv. provokujících faktorů žilního tromboembolismu. Podle jejich trombofilního potenciálu jsou děleny na silné provokující faktory a ostatní provokující faktory. Níže uvádím rozdělení těchto faktorů dle (Poul, 2006; Štorková, 2009; Vavrušková, 2010).

2.3.4 Silné provokující faktory

- Operace – hlavně ortopedická, cévní, neurochirurgická a onkologická chirurgie.
- Úrazy – zejména polytraumata, poranění dolních končetin a pánve.
- Imobilizace spojená s dalšími faktory jako jsou paréza končetin, trauma, sepse, malignita, srdeční či respirační nedostatečnost.
- Chemoterapeutické režimy.

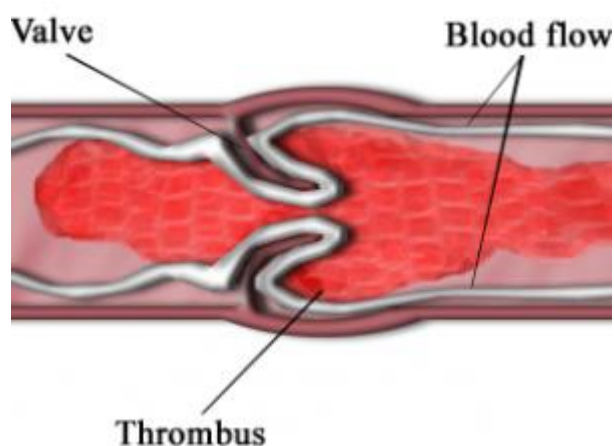
2.3.5 Ostatní provokující faktory

- Sádrové fixace dolních končetin.
- Imobilizace nad 72 hodin.
- Dlouhý let.
- Dlouhodobě zavedený centrální žilní katétr, gravidita a šestinedělí.
- Hormonální antikoncepce.
- Estrogenní substituce.
- Terapie antiestrogeny.
- Terapie kortikoidy.

2.4 *Klinické manifestace trombofilních stavů*

2.4.1 *Hluboká žilní trombóza (HŽT)*

Takto označujeme přítomnost trombu v žilním systému (obr. 2). Tato sraženina se nejčastěji tvoří v žilách dolních končetin, obzvláště pak v oblasti třísel, lýtek a zadní části kolen. Nebezpečným vyústěním HŽT je plicní embolie. Mezi příznaky HŽT patří bolest a otok a snížená citlivost postižené části těla (Musil, 2009).

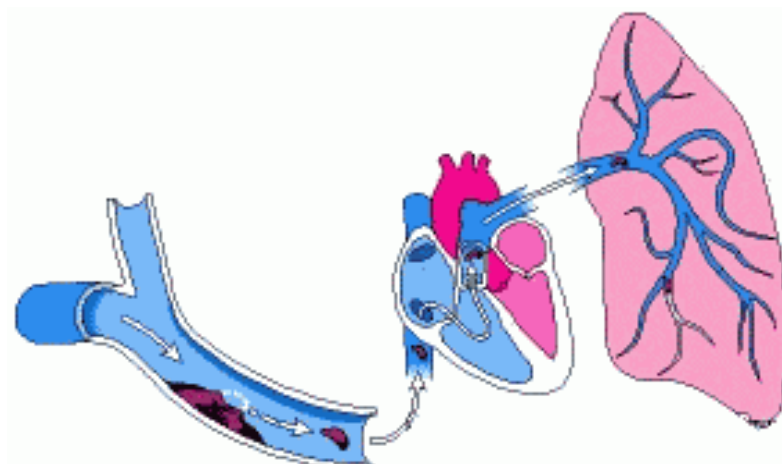


Obrázek 2.: Obrázek krevní sraženiny, převzato z Hildebrandt (2012).

Zdroj: dostupný na <http://sciencenordic.com/stopping-treatment-blood-thinning-drug-can-be-fatal>

2.4.2 *Plicní embolie*

Při plicní embolii dochází k obstrukci plicnice nebo některé její větve především krevní sraženinou. Embolií je nazýván proces uvolnění trombu z místa vzniku a následné přemístění do plicnice (obr. 3). Embolii mohou vzácně způsobit i jiné hmoty jako např. tuk a kostní dřeň při úrazech, plodová voda při porodu či vzduch při potápění. Mezi příznaky plicní embolie patří náhle vzniklá dušnost, bolest na hrudi, modré zbarvení rtů a prstů, krátkodobá ztráta vědomí, oběhová nestabilita a náhlé úmrtí (Mandovec, 2008).

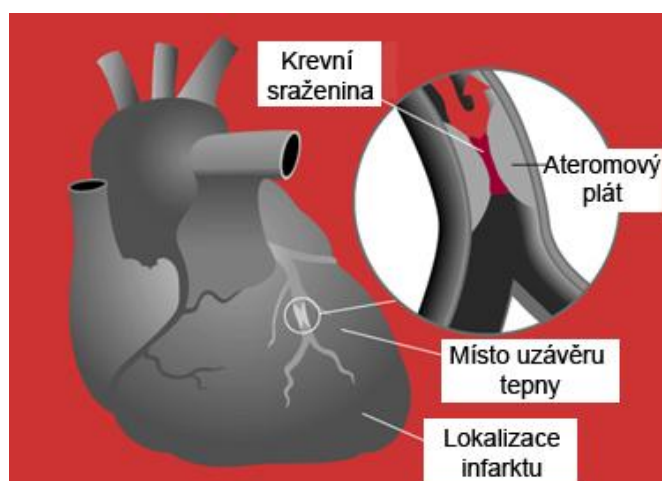


Obrázek 3: Obrázek vzniku plicní embolie.

Zdroj: <http://operativa.cz/embolicke-pooperacni-komplikace/>

2.4.3 *Infarkt myokardu*

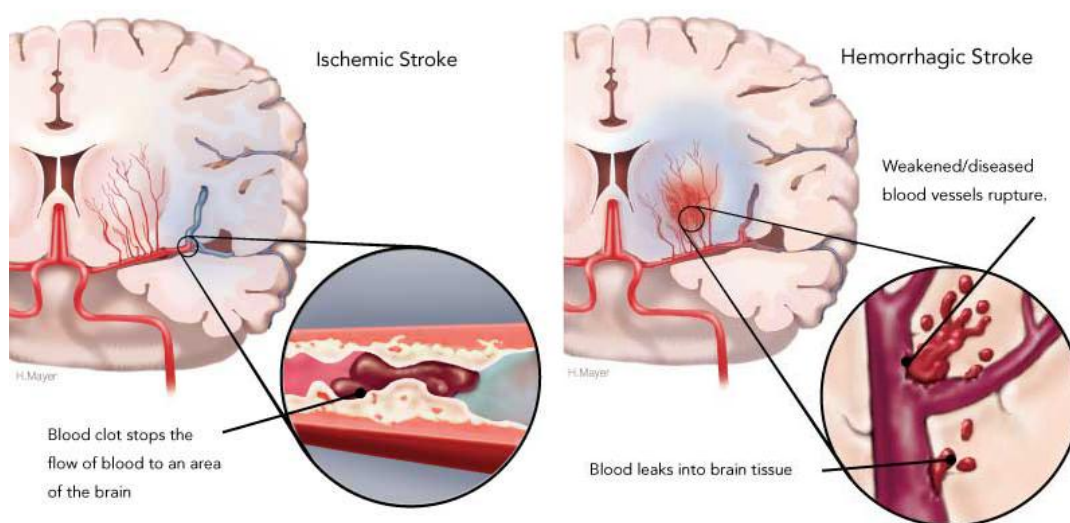
Jedná se o ložiskové odumření části srdečního svalu, ke kterému dochází v důsledku uzávěru nebo zúžení věnčité tepny (obr. 4). Tepnu může akutně uzavřít trombus (v 90 %), embolus, spasmus (stah cévy), aterosklerotický plát nebo ojediněle poranění či zánět koronární tepny (Kelnarová, 2007).



Obrázek 4: Infarkt myokardu, převzato ze Stránky Institutu Klinické a Experimentální Medicíny. Zdroj: <http://www2.ikem.cz/www?docid=1005912>

2.4.4 Cévní mozková příhoda (CMP)

CMP je postižení mozkové tkáně v důsledku nedostatečného prokrvení. Podle mechanismu vzniku CMP je můžeme rozdělit na ischemické CMP a hemoragické CMP (obr. 5). Ischemické CMP vznikají na podkladě trombózy nebo embolie. Hemoragická CMP vzniká v důsledku ruptury mozkové cévy (Seidl, 2008).



Obrázek 5: Tento obrázek popisuje vlevo ischemickou CMP a vpravo hemoragickou CMP. Zdroj: <http://www.heartability.org/what-is-heart-disease-1/>

2.5 Trombofilní mutace

Mezi nejčastější trombofilní mutace zahrnujeme mutaci faktoru V (Leidenská mutace) a mutaci faktoru II (protrombinu). Polymorfismy v genu pro MTHFR, které byly dříve běžně označovány jako trombofilní mutace, nejsou v současné době považovány, vzhledem k jejich povaze, za rizikové z hlediska trombofilních stavů.

Prevalence trombofilních mutací jako je mutace faktoru V a protrombinového genu G20210A se v jednotlivých etnikách liší. U Afričanů a Asiatů se vyskytují jen vzácně, nejčastější jsou v kavkazské populaci. Výskyt některých trombofilních poruch

v kavkazské populaci a u pacientů s tromboembolickou nemocí (TEN) shrnuje tabulka č. 1 (Poul, 2006).

Tabulka 1: Prevalence vybraných trombofilních poruch v kavkazské populaci a u pacientů s TEN.

Trombofilie	Prevalence v kavkazské populaci	Prevalence u pacientů s TEN
Zvýšená hladina faktoru VIII	11 %	25 %
Mutace faktoru V Leiden	4.8 %	18.8 %
Dysfibrinogémie	8 %	15 %
Hyperhomocysteinémie	4.8 %	10 %
Mutace protrombinu 20210A	2.7 %	7.1 %
Deficit proteinu S	0.7 %	2.3 %
Deficit proteinu C	0.3 %	3.7 %
Deficit antitrombinu	0.2 %	3 %

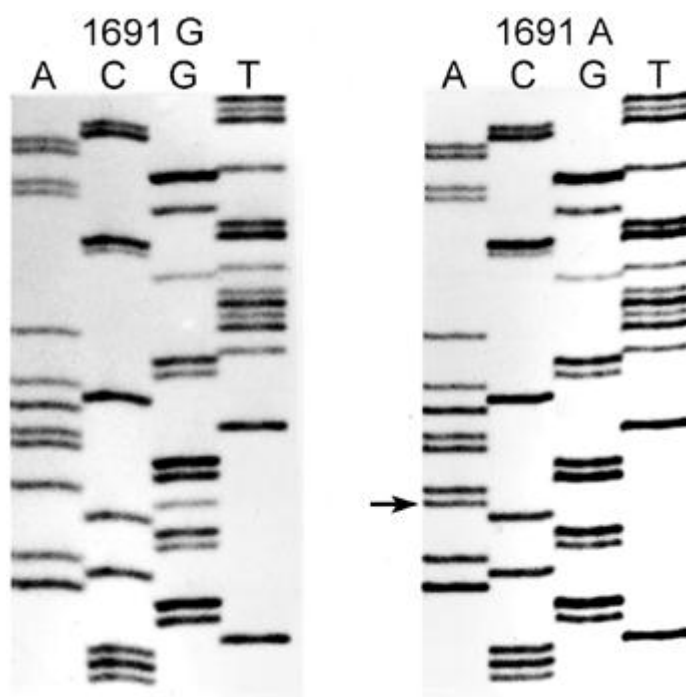
(Poul, 2006)

2.5.1 Mutace FV Leiden

Leidenská mutace je známá od roku 1993. V tomto roce popsal Dahlbäck *et al.* tzv. rezistenci na aktivovaný protein C (APC-R), jejíž nejčastější příčinou je Leidenská mutace. Leidenská mutace je pojmenována podle města Leiden v Nizozemsku, kde byla objevena. Z historického hlediska se tato mutace poprvé objevila v kavkazské populaci asi před 21 000 – 34 000 lety. V té době měla spíše protektivní charakter v případě život ohrožujícího krvácení např. při porodech či traumatech (Zivelin *et al.*, 1997, Bounameaux, 2000).

Leidenská mutace je způsobena bodovou mutací měnící smysl tzv. missense mutací v genu pro koagulační faktor V, který je lokalizován na chromozómu 1q23. Gen pro faktor V má celkem 25 exonů a celkovou délku 70 Kb. Jedná se o bodovou mutaci

v pozici 1691 v exonu 10, kdy dochází k záměně báze guaninu za adenin (FV G1691A), (obr. 6). Následkem této záměny dochází k záměně aminokyseliny argininu za glutamin v peptidickém řetězci na pozici 506. V této pozici se vyskytuje vazebné místo pro aktivovaný protein C. APC je přirozeným inhibátorem aktivovaného faktoru V. Díky mutaci se stává faktor V rezistentní k APC a tudíž dochází k nerovnováze v koagulační kaskádě (Dahlbäck *et al.*, 1993; Penka *et al.*, 2011).



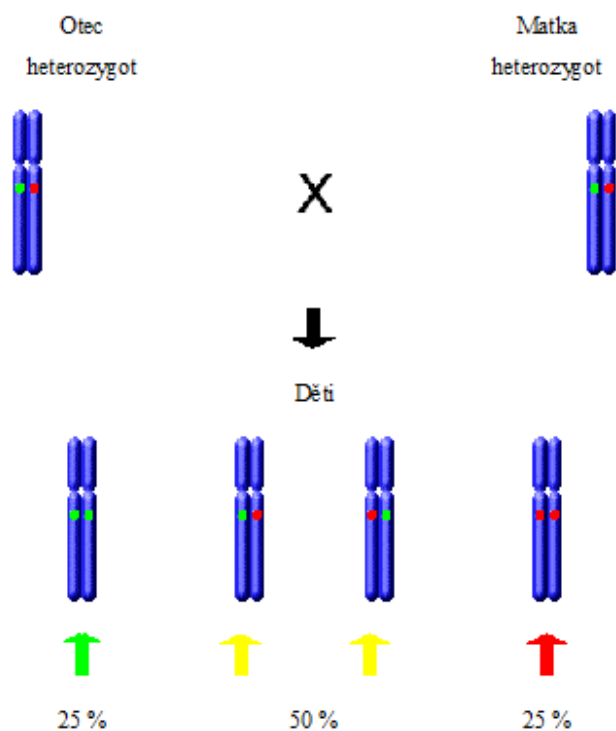
Obrázek 6: Ukázka záměny guaninu za adenin v pozici 1691 v exonu 10.

Zdroj: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Leidenská_mutace

Výskyt Leidenské mutace prokazuje závislost na rase a zeměpisných faktorech. Penka (2001) uvádí, že prevalence této dominantně dědičné mutace se v Evropě a Severní Americe u bílé rasy pohybuje okolo 3-15 % ve zdravé populaci. V ostatních částech světa se vyskytuje spíše výjimečně. Sršeň (2005) popisuje nejvyšší výskyt mutace faktoru V Leiden ve Švédsku a postupně směrem na jih pokles jejího výskytu.

Leidenská mutace je autozomálně intermediární postižení koagulačního faktoru V. Z toho důvodu se vyskytují příznaky jak u heterozygotní tak u homozygotní formy, jen

v jiné intenzitě. U heterozygotů je riziko vzniku trombózy 5-10x vyšší a u homozygotů pak 50-100x vyšší u obou pohlaví ve srovnání s normální populací (Penka *et al.*, 2011). Mezi projevy Leidenské mutace patří zejména trombofilní komplikace jako je vznik trombóz a riziko následné embolie. Mutaci jako takovou nelze léčit, existují ale preventivní opatření, která mohou riziko vzniku trombózy značně snížit. Léčí se pouze její následky, např. trombóza se léčí léky na ředění krve jako je heparin či warfarin. Za preventivní opatření při včasné diagnostice této mutace můžeme považovat např. eliminaci hormonální antikoncepce, snížení váhy u obézních jedinců, nekuřáctví, užívání vhodné profylaxe v období zvýšeného rizika (dlouhý let, těhotenství apod.), (Penka *et al.*, 2011).



➔ Ohrožený homozygot. Pravděpodobnost jeho narození je 25 %. Ve své genetické informaci nenese ani jeden zdravý gen pro FV.

➔ Ohrožený heterozygot. Pravděpodobnost narození 50 %. Ve své genetické informaci nese jeden zdravý gen pro FV.

➔ Zdravý homozygot. Pravděpodobnost narození 25 %. Oba geny pro FV jsou normální, nepřenáší onemocnění na potomstvo.

Obrázek 7: Princip autozomálně dominantní dědičnosti, který je společný pro Leidenskou mutaci, mutaci protrombinového genu a oba polymorfismy v genu pro MTHFR. Převzato z Genetický brevíř sanatoria Repromeda.

Zdroj: http://www.repromeda.cz/genetika/cs/index.php?localpage=loc_leiden.php

2.5.2 Mutace protrombinového genu

Gen pro protrombin byl identifikován Poortem v roce 1996 na chromozómu 11p11.2 a je složen ze 14 exonů a jeho velikost je 12 Kb (Davie, Degen 1987). Mutace protrombinového genu je druhým nejčastějším rizikovým genetickým faktorem pro vznik žilní trombózy. Nejčastěji se jedná o nekódující bodovou mutaci v tomto genu, kdy v důsledku substituce guaninu za adenin v poloze 20210 (G20210A) dochází ke zvýšené hladině protrombinu. Tato mutace se nachází ve 3' konci genu a to v oblasti, která není dále translatována. Patří mezi tzv. gain-of-function mutace (mutace zisku funkce), které zvyšují efektivitu štěpení pre-mRNA a vedou k následné akumulaci mRNA a její translaci do podoby koagulačního proteinu. Z tohoto důvodu neexistují dostatečně specifická funkční koagulační vyšetření (Raušová *et al.*, 2005; Penka *et al.*, 2011).

Četnost této mutace je v normální populaci v severní Evropě 1 % a v jižní Evropě 3 %. Mezi africkými a asijskými obyvateli se vyskytuje velice vzácně (Rosendaal *et al.*, 1998).

2.5.3 Polymorfismy v genu pro MTHFR

MTHFR neboli enzym methylenetetrahydrofolátreduktáza má význam zejména v metabolismu homocysteinu. Homocystein patří mezi neesenciální aminokyseliny a vzniká jako vedlejší produkt metabolismu esenciální kyseliny methioninu. Pokud není porušen metabolismus v buňce, vznikající homocystein se přeměňuje v dále využitelné a pro tělo neškodné látky. Pokud však dojde ke změně v genu pro MTHFR, může dojít v důsledku snížené aktivity enzymu MTHFR k hyperhomocysteinémii neboli zvýšené hladině homocysteinu v krevní plazmě. Zvýšenou hladinu homocysteinu však může způsobit i nedostatek vitamínu B6, B12 nebo kyseliny listové v potravě. Homocystein má cytotoxické účinky na endoteliální buňky, inhibuje buněčnou proliferaci a inhibuje expresi trombomodulinu na endotelu a tím i aktivaci proteinu C. Také podporuje protrombotickou aktivitu v cévní stěně.

Zvýšená hladina homocysteinu může být tedy brána jako rizikový faktor pro žilní tromboembolismus, aterosklerózu, mozkovou mrtvici, infarkt myokardu, sklerotické a trombotické onemocnění periferních žil (Dekker *et al.*, 1995; Goyette *et al.*, 1998; Den Heijer *et al.*, 2005; Penka *et al.*, 2011).

Lidský gen pro MTHFR je umístěn na chromozomu 1p36.6 a skládá se ze 12 exonů. V literatuře jsou popisovány dva nejčastější polymorfismy genu MTHFR snižující jeho aktivitu. Jedná se o polymorfismus 677C/T a 1298A/C (Dekker *et al.*, 1995; Goyette *et al.*, 1998; Den Heijer *et al.*, 2005; Penka *et al.*, 2011).

2.5.3.1 MTHFR 677

Polymorfismus MTHFR 677C/T je způsoben substitucí cytosinu za tymin v pozici 677 nukleotidového řetězce. Tato substituce má za následek záměnu alaninu za valin v pozici 222 v aminokyselinovém řetězci, čímž dojde ke snížení katalytické aktivity enzymu a následnému zvýšení hladiny homocysteinu v krevním séru až o 20 %. Dědičnost tohoto polymorfismu je autozomálně recesivní. V Evropské populaci je zastoupeno 12 % homozygotů TT, 43 % heterozygotů CT a 45 % zdravých homozygotů CC s tímto polymorfismem (Prinz-Langenohi *et al.*, 2009).

2.5.3.2 MTHFR 1298

Polymorfismus MTHFR A1298C je způsoben substitucí adeninu za cytosin v pozici 1298 nukleotidového řetězce. Tato substituce má za následek záměnu glutamátu za alanin v aminokyselinovém řetězci v pozici 429. To vede opět ke snížení katalytické aktivity MTHFR. Nedochozí zde však ke zvýšení hladiny homocysteinu. Z tohoto důvodu nemá tak vysoce negativní účinky jako polymorfismus MTHFR 677. Nicméně kombinace těchto dvou polymorfismů (677C/T i 1298A/C) může vést k řadě abnormalit. Například u nositelů některých polymorfních variant (677TT/1298AC

nebo 677CT/1298CC) bylo zjištěno vyšší procento spontánních potratů a varianta 677TT/1298CC je považována za nonviabilní (Van Der Put *et al.*, 1998).

2.6 Metody detekce

Cílem molekulárně genetického vyšetření je potvrzení genetického rizika pro chorobu, která je podmíněna genovou mutací nebo zjištění určitých predispozic ke vzniku takového onemocnění v postižených rodinách.

Mezi základní molekulárně genetické metody řadíme izolaci DNA, fragmentaci DNA, hybridizační techniky, analýzu nukleových kyselin v gelu, amplifikaci nukleových kyselin a metody sekvenování DNA (Křemen *et al.*, 1998).

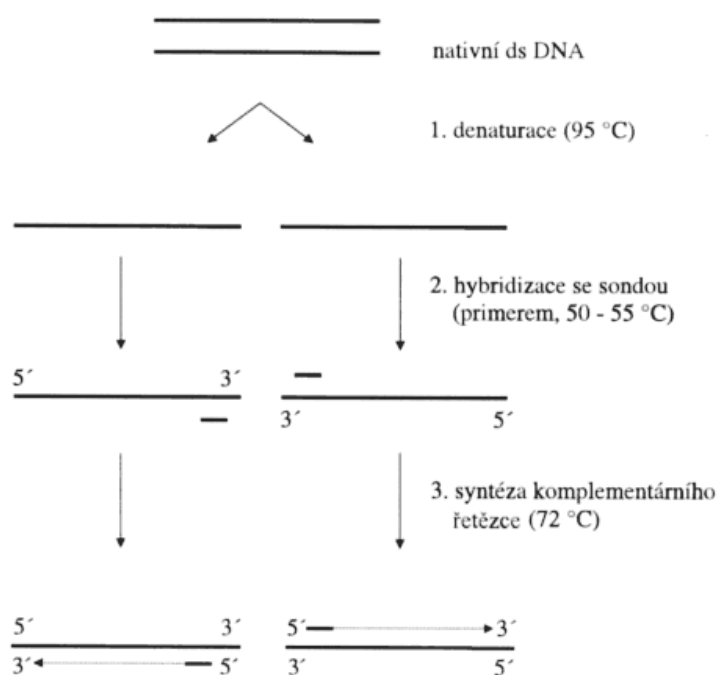
2.6.1 Amplifikační metody

Mezi základní amplifikační metody patří polymerázová řetězová reakce (PCR). Tato metoda je široce využívána a má mnoho modifikací jako např. PCR – RFLP (polymerázová řetězová reakce - polymorfismus délky restrikčních fragmentů), AS – PCR (alelově specifická polymerázová řetězová reakce), real – time PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase) a další (Zima, 2007).

2.6.1.1 Polymerázová řetězová reakce – PCR (polymerase chain reaction)

Jedná se o enzymatickou amplifikaci DNA v *in vitro* podmínkách. Tato metoda umožňuje namnožení pouze určitého úseku DNA z celkové genomové DNA. Principem reakce je opakovaná syntéza vybraného úseku genomové DNA ohraničené specifickými krátkými oligonukleotidy zvanými primery. Dvouvláknová DNA je nejprve denaturována na dvě jednovláknové molekuly, na které pak na základě komplementarity bází specificky nasednou vybrané primery. Ty udávají počátek a konec, a tedy délku amplifikovaného fragmentu. Během reakce dochází k opakované enzymové syntéze

nových řetězců vybrané sekvence DNA ve směru 5' → 3' za účasti DNA polymerázy a specifických primerů. Prvním krokem je tepelná denaturace DNA při 95 °C. Na vzniklé jednovláknové DNA molekuly následně hybridizují primery při teplotě 50 – 55 °C. Napojením těchto primerů je zajištěna syntéza komplementárních vláken DNA při 65 – 75 °C, kterou zajišťuje termostabilní enzym nejčastěji *Taq* polymeráza. Tato polymeráza pochází z bakterie *Thermus aquaticus* žijící v teplých pramenech, a tudíž není inaktivována při vyšších teplotách v průběhu PCR (obr. 8). Po ukončení tohoto cyklu je replikovaný úsek DNA zdvojnásoben. Celý proces se opakuje 30 - 35x. Reakce probíhá v přístroji zvaném termocykler. Tento přístroj je schopný dostatečně rychle měnit teploty tak, aby byly dodrženy tepelné a časové podmínky pro jednotlivé kroky PCR reakce (Zima, 2007).



Obrázek 8: Princip polymerázové řetězové reakce (tři kroky 1. cyklu).

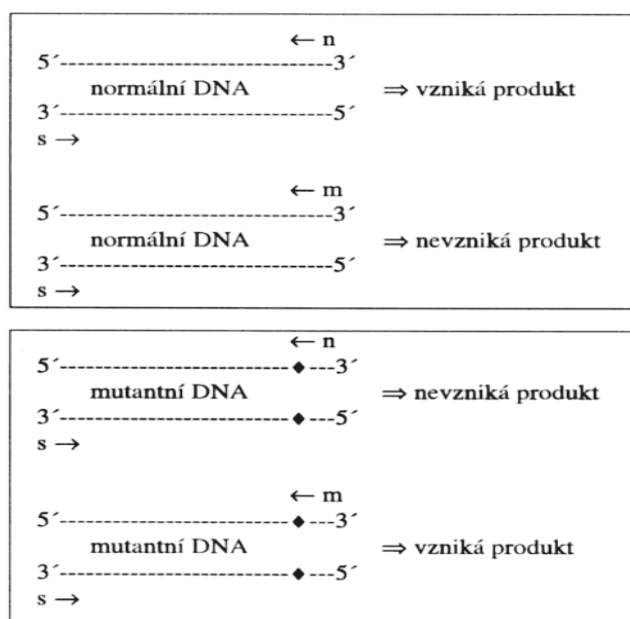
Zdroj: (Zima, 2007)

2.6.1.2 AS – PCR

AS – PCR neboli alelově specifická PCR byla poprvé použita Olerupem *et al.* (1991) pro detekci subtypů HLA (human leukocyte antigens), což je hlavní histokompatibilní systém člověka, který má významnou funkci v imunitním systému člověka (Penka *et al.*, 2012). AS-PCR je jednoduchá, spolehlivá a jasně rozliší heterozygota od homozygotů pro jednu nebo druhou alelu (Ferrie *et al.*, 1992). Tato metoda se často využívá pro detekci malých delecí a bodových mutací. Principem je využití tří různých alelově specifických oligonukleotidů, tedy primerů, které jsou speciálně vybrány na základě sekvenční komplementarity s mutovanou, nemutovanou či variantní alelou. Tyto primery tedy hybridizují k mutované nebo standartní alele, přičemž jeden primer je vždy společný pro obě alely. Nejčastěji používanou variantou AS-PCR je PCR ARMS (amplification refractory mutacion detection system neboli amplifikační refrakční mutační systém (Zima, 2007).

PCR ARMS

Základním principem PCR ARMS je přesná komplementarita bází na 3' konci primeru. Tato komplementarita je základem pro správnou amplifikaci. Pokud nedojde ke komplementaritě, nedojde ke specifické amplifikaci, což je základním principem AS-PCR. Důležité je proto použití vnitřní kontroly reakce, která odliší, zda jde o specifické chybění amplifikace nebo o nespecifickou poruchu PCR reakce. Samotný test PCR ARMS je založen na dvou samostatných reakcích. Jedna reakce je specifická pro normální DNA sekvenci a druhá reakce je specifická pro mutovanou nebo variantní sekvenci DNA (obr. 9), (Zima, 2007).



Obrázek 9: Princip reakce ARMS a AS – PCR, převzato ze Zima, 2007.

Tabulka 1: Princip hodnocení PCR ARMS a AS – PCR podle typu produktu reakce.

Genotyp	Oligonukleotidy	Produkt reakce
homozygot normální	s +n	ano
	s +m	ne
heterozygot	s +n	ano
	s +m	ano
homozygot mutantní	s +n	ne
	s +m	ano

s – společný, n – normální, m – mutantní primer

Pokud je testovaný jedinec nemutovaný homozygot, vytvoří se PCR produkt pouze při použití společného primeru a primeru navrženého pro nemutovanou formu genu. Pokud se jedná o mutovaného homozygota, dochází naopak k vytvoření PCR produktu v amplifikační reakci obsahující společný primer a primer komplementární k mutované nebo variantní alele daného genotypu. V případě kdy dojde ke vzniku produktu v obou

amplifikačních reakcích, obsahujících společný a „nemutovaný“ primer i společný a „mutovaný“ primer, jedná se vždy o heterozygota (tab. 1), (Zima, 2007).

Tato metoda byla úspěšně aplikována např. pro detekci mutací v genu pro cystickou fibrózu (Ferrie et al., 1992).

2.6.1.3 Další příklady amplifikačních metod

Multiplex PCR

Principem této reakce je přidání více primerových párů do jediné amplifikační reakce, čímž je dosaženo paralelní amplifikace dvou a více lokusů (podle počtu primerových párů) v rámci jedné PCR. Je zde nutné řádně optimalizovat podmínky této multiplex PCR tak, aby jednotlivé primery v rámci primerových párů spolu netvořily nežádoucí produkty. Tato metoda se využívá k paralelní analýze několika mutací či polymorfismů a pro přípravu specifických produktů, které jsou využívány dále pro jiné molekulárně-biologické metody (např. reverzní hybridizace na stripech), (Henegariu *et al.*, 1997).

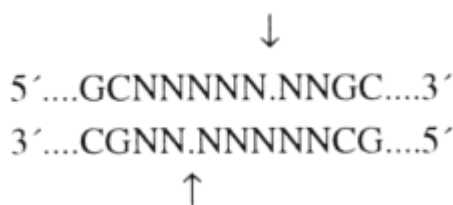
ASO PCR

Alelově specifické oligonukleotidy (ASO) jsou určeny k detekci známých bodových mutací. ASO představují jakési próby, ke kterým se na základě komplementarity váže testovaná DNA. Před samotnou hybridizací s ASO proběhne elektroforetické dělení PCR produktů na agarózovém gelu. Poté proběhne denaturace a dvojité blotování gelu. Gel musí být umístěn mezi dvě nylonové membrány. K tomu, aby došlo k přenosu, zde slouží denaturační roztok. Fixace DNA k membráně je zajištěná pomocí UV záření. Následuje hybridizace testované DNA s ASO (normálními a mutantními), za použití vhodného detekčního systému. Pokud je sekvence mezi sondou a analyzovanou DNA bezchybně komplementární, dojde k hybridizaci

a vizualizaci testované DNA (Zima, 2007). Pouze krátké ASO specificky detekují jednonukleotidové změny v sekvenci DNA (Nussbaum *et al.*, c2007).

2.6.2 RFLP – PCR

PCR – RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragmen lenght polymorphism, polymerázová řetězová reakce – polymorfismus délky restričních fragmentů) je metodou, která využívá PCR amplifikace pro vybrané oblasti genomové DNA, které jsou následně specificky štěpeny pomocí bakteriálních endonukleáz (tzv. restriktáz). Těchto endonukleáz je známo veliké množství (asi 1500) a liší se schopností rozpoznat různě dlouhé sekvence nukleotidů a štěpit je na libovolně dlouhé fragmenty na základě jejich sekvenční specifity. Místa rozpoznávané endonukleázami jsou většinou palindromické sekvence. To jsou takové sekvence, které mají stejné pořadí nukleotidů na komplementárních vláknkách DNA ve směru od 5' konce (obr. 10), (Kosinová, 2007; Zima, 2007). Během restričního štěpení může docházet ke štěpení nukleotidů, které neleží naproti sobě. Potom vznikají nestejně dlouhé konce rozštěpené dvoušroubovice. To jsou tzv. kohezní neboli lepivé konce. Nebo může docházet ke štěpení protilehlých nukleotidů. Pak vznikají stejně dlouhé neboli tupé konce (Kosinová, 2007; Zima, 2007).



Obrázek 10: Příklad sekvence se stejným pořadím nukleotidů ve směru od 5' konce.

Převzato z Multimediální učebnice DNA diagnostiky.

Zdroj: <http://stary.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa.htm>

2.6.3 Hybridizační metody

2.6.3.1 Reverzní hybridizace

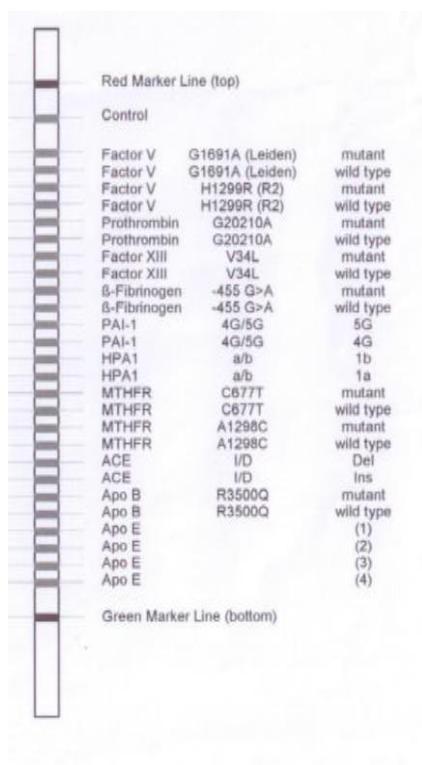
Slouží k detekci bodových mutací a SNP polymorfismů. Při této metodě dochází k hybridizaci jednovláknových molekul nukleových kyselin na základě jejich sekvenční komplementarity za vzniku dvouvláknové molekuly. Přičemž jedno vlákno představuje vyšetřovaná DNA a druhé vlákno je referenční úsek DNA se známou sekvenční specificitou. Postup reverzní hybridizace se skládá ze tří kroků. Z izolace DNA, amplifikace analyzovaných genových sekvencí a jejich hybridizace k referenčním sekvenčně specifickým sondám imobilizovaným na pevném podkladě.

Pro vizualizaci úspěšné hybridizace testované DNA s imobilizovanou sondou se používá několik přístupů. Mezi nejstarší z nich patří radioaktivní značení založené na výměně neradioaktivních nukleotidů za nukleotidy s navázaným radioizotopem. Toto značení se dnes z bezpečnostních a hygienických důvodů pro rutinní diagnostiku nepoužívá. Radioaktivní značení bylo postupně nahrazeno neradioaktivním značením, kdy se využívají fluorescenční nebo nefluorescenční molekuly vážící se na nukleové kyseliny. Ty jsou inkorporovány do nukleotidového vlákna přímo např. během PCR, nebo reverzní transkripce, anebo jsou do nově vznikajícího vlákna začleňovány nukleotidy obsahující vazebný protein, ten se následně během detekce váže s partnerskou molekulou (protilátkou, ligandem, jiným proteinem) s vysokou afinitou. Tato partnerská molekula je pak konjugována s fluorescenčním barvivem nebo s enzymem např. alkalickou fosfatázou, která pak zprostředkuje chemiluminiscenci. Jiným přístupem detekce je tzv. ABC (avidin-biotin complex) metoda, technika avidin-biotin komplexu nebo SABC (streptavidin-biotin komplex) metoda. Principem je označení sekundární protilátky biotinem, na který se následně naváže (strep)avidin-biotinový komplex označený křenovou peroxidázou. Na základě její enzymatické aktivity dojde k zviditelnění hybridizace komplementárních genomových sekvencí, tento přístup je dostatečně citlivý a velice rozšířený (Zima, 2007).

Mezi hybridizační metody na pevných nosičích zahrnujeme dot-blot a slot-blot hybridizaci, Southernův nebo Northernův přenos, hybridizaci DNA či RNA na stripech, microarrays apod., hybridizaci *in situ* apod.

2.6.3.2 Reverzní hybridizace na stripech

Reverzní hybridizace na stripech využívá jako pevný nosič např. nitrocelulóznou membránu ve tvaru proužku nazývaného strip (obr. 12). Sondy jsou na stripech imobilizovány jako paralelní linky. Každá sonda obsahuje běžnou nebo mutovanou sekvenci DNA. Hybridizovaný PCR produkt je během PCR naznačen biotinem. Pokud není PCR produkt hybridizován na strip, dochází k jeho vymytí. Po přidání alkalické fosfatázy konjugované se streptavidinem a příslušného chromogenního substrátu dojde k fialovému zabarvení nahybridizovaných PCR produktů. Výslednou reakci lze odečítat pouhým okem (Matýšková, Čech, 2009).



Obrázek 12: Ukázka stripu pro detekci trombofilních mutací, zdroj: CVD Strip-Assay

2.6.4 Real Time – PCR

RT – PCR (Real – time polymerázová řetězová reakce) je další variantou PCR. Tato metoda slouží k přímé kvantifikaci PCR produktu během amplifikačního procesu. Principem je přesné a rychlé zaznamenávání množství vznikajícího PCR produktu, a to v jednotlivých cyklech PCR. Detekce PCR je umožněna pomocí různých systémů, které pracují na principu změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace. Tato detekce je umožněna přítomností fluorescenčního substrátu, který je inkorporován do nově vznikajících DNA molekul. Po navázání substrátu na DNA dojde k vyzáření fluorescence. Hladina fluorescence je přímo úměrná množství přítomné DNA (Zima, 2007).

2.6.5 Sekvenování DNA

Sekvenování patří již řadu let ke standardním postupům v molekulárně-genetických výzkumech. Tato metoda je založena na principu detekce jednotlivého pořadí nukleových bází v sekvencích DNA.

První pokusy o sekvenování započaly již v 60. letech minulého století za pomoci elektronového mikroskopu. Významný posun v oblasti sekvenování přinesla laboratoř F. Sangera. Jeho metoda využívala procesu replikace DNA. Do replikující DNA se začleňuje dideoxynukleotid, který zastaví elongaci řetězce. V reakci jsou využívány čtyři typy dideoxynukleotidů odpovídající jednotlivým nukleotidům. Každá nově vznikající sekvence je tak po přidání konkrétního dideoxynukleotidu do PCR reakce uměle ukončena v určité délce, přičemž jsou v reakci zastoupeny všechny délky fragmentů zakončené konkrétním nukleotidem A, T, C nebo G. Fragmenty jsou následně přeneseny na polyakrylamidový gel a podrobeny elektroforéze.

Další metodu DNA sekvenování zavedli v roce 1977 Maxam a Gilbert. Při této metodě je konec sekvence označen radioaktivním fosforem a následně podroben chemickému štěpení. Metoda opět probíhá ve čtyřech reakcích, kdy je DNA specificky štěpena v konkrétních místech a tak dochází k rozeznání koncového nukleotidu.

Následně je opět podrobena elektroforéze na polyakrylamidovém gelu a poté vystavena γ -záření.

Zpočátku byly sekvenační metody schopny v jednom běhu přečíst pouze 100 bazí. Nyní je v jednom běhu přečteno kolem 1000 bazí. Radioaktivní značení nukleotidů a enzymatické štěpení bylo nahrazeno fluorescenčním značením, přičemž sekvenační metody nadále využívají Sangerův princip sekvenace. Lidský genom byl osekvenován v únoru 2001 (Pospíšilová *et al.*, 2009).

3 PRAKLICKÁ ČÁST

Praktická část mé bakalářské práce se skládá z několika částí První část je věnována izolaci DNA, druhá část pak vlastní analýze sledovaných mutací či polymorfismů v genech pro faktor V, protrombinový gen a gen MTHFR, a to pomocí tří různých molekulárně-genetických přístupů. Pro detekci Leidenské mutace a polymorfismu MTHFR A1298C byla použita metoda RFLP-PCR. Pro vyšetření mutace v protrombinovém genu a polymorfismu MTHFR C677T pak metoda PCR ARMS. Všechny čtyři mutace či polymorfismy byly vyšetřeny ještě další nezávislou metodou. Jednalo se o reverzní hybridizaci na stripech, která umožňuje paralelní detekci všech sledovaných mutací či polymorfismů v rámci jednoho experimentu.

K jednotlivým metodám bylo nutné využití těchto přístrojů: chladnička pro laboratorní použití, termostat, chlazená centrifuga, stolní minicentrifuga/vortex, mikrovlnná trouba, sada pipet, teplotní cycler, Fluorometr, laminární box, elektroforetický systém, iluminátor na pozorování elektroforézy a detekční systém na focení gelu.

3.1 *Izolace DNA*

Pro každou PCR reakci a jinou molekulárně biologickou metodu vyžadující DNA, je nutná její izolace. Izolace DNA se nejčastěji provádí z bukalního stěru nebo z lymfocytů periferní krve pacienta.

3.1.1 *Izolace z bukalního stěru*

K izolaci genomové DNA z bukalního stěru byl využit DNA Isohelix DNA Isolation kit: DDK-3 /DDK-50 dle doporučení výrobce.

Reagencie:
Lysis buffer – LS
Proteinase K – PK
Capture buffer – CT
Re-hydration buffer – TE

Postup:

Před zahájením samotné izolace byly pro jeden vzorek připraveny tři 1,5 ml mikrozkušavky. Suchá lázeň byla nastavena na 60 °C a PK se po vyndání z mrazáku nechala rozmraznout při pokojové teplotě.

Do zkumavky s tamponem bukalního stěru bylo napipetováno 500 µl LS a 20 µl PK. Tato směs byla krátce zvortexována, zcentrifugována a následně uložena k inkubaci do suché lázně při 60 °C po dobu jedné hodiny. Po inkubaci došlo opět ke krátkému zvortexování a zcentrifugování směsi. Poté bylo přepipetováno 400 µl vzorku do 1,5 ml mikrozkušavky. Po odebrání vzorku byl tampon ve zkumavce otočen tak, aby se tyčka tamponu opírala o dno zkumavky. Následovala opět centrifugace a odpipetování supernatantu k již odebraným 400 µl vzorku. K vzorku bylo přidáno 500 µl CT a zkumavka byla zcentrifugována při 13 tis. ot/min. po dobu 7 minut. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant tak, aby nedošlo k narušení vzniklé pelety DNA. Po odebrání byla zkumavka opět krátce zcentrifugována a byl odebrán zbylý supernatant. K peletě DNA a proteinů bylo přidáno 30 – 150 µl TE (podle potřebné koncentrace DNA) a následovala inkubace 5 minut při pokojové teplotě. Po skončení inkubace došlo ke zvortexování a zcentrifugování zkumavky při 13 tis. ot/min. po dobu 2 minut a následnému odebrání supernatantu obsahujícího izolovanou DNA do nové 1,5 ml mikrozkušavky. Takto izolovaná DNA byla uložena do mrazicího boxu a skladována při -20 °C.

3.1.2 Plná krev

K izolaci genomové DNA z plné krve byl využit Genomic DNA mini Kit dle doporučení výrobce.

Reagencie:
96% ethanol
GT Buffer
W1 Buffer
Wash Buffer
Elution Buffer
RBC Lysis Buffer

Postup:

Do 1,5 ml mikrozkušavky bylo napipetováno 300 µl plné krve a 900 µl RBC Lysis Buffer. Tato směs byla promíchána převrácením v ruce a inkubována 10 minut při pokojové teplotě. Následovala centrifugace při 3 tis. ot/min. po dobu 5 minut. Supernatant byl ze zkumavky odebrán a peleta ponechána. Ta byla resuspendována za pomoci 100 µl RBC Lysis Buffer. Následně bylo přidáno 200 µl GB Buffer. Celá směs byla krátce zvortexována, stočena a inkubována 10 – 15 minut v termostatu při 60 °C. Během inkubace bylo nutné zkumavku každé 3 minuty převracet. Po ukončení inkubace bylo přidáno 200 µl 96 % ethanolu, zvortexováno 10 sekund a krátce zcentrifugováno. Poté byl veškerý lyzát přepipetován na kolonku (GD Column), která byla vložena do čisté sběrné zkumavky (2 ml Collection Tube) a centrifugována při 14 – 16 tis. ot/min. po dobu 5 minut. Po centrifugaci byla kolonka vložena do nové sběrné zkumavky a použitá sběrná zkumavka obsahující supernatant byla vyhozena. Na kolonku s navázanou DNA bylo napipetováno 400 µl W1 Buffer a opět byla centrifugována při 14 – 16 tis ot/min. po dobu 30 sekund. Ze sběrné zkumavky byl odstraněn supernatant a následně bylo napipetováno na kolonku 600 µl Wash Buffer. Sběrná zkumavka byla opět po centrifugaci slita a po vrácení kolonky proběhla centrifugace při 14 – 16 tis.

ot/min. po dobu 3 minut nasucho. Tato centrifugace probíhala, dokud nebyla kolonka zcela suchá. Suchá kolonka byla přesunuta do čisté 1,5 ml zkumavky. Přímo na filtr kolonky bylo přidáno 50 μ l Elution Buffer vytemperovaného na 60 °C, inkubována byla nejméně 3 minuty při pokojové teplotě a centrifugována při 14 – 16 tis. ot/min. po dobu 30 sekund. Následně byla DNA uložena do mrazicího boxu a skladována při teplotě -20°C.

3.2 Měření koncentrace DNA

Měření koncentrace DNA testovaných vzorků bylo provedeno na přístroji Qubit® 2.0 Fluorometer. Hodnoty koncentrace DNA jsou uvedeny v tabulce níže a jsou vyjádřeny v ng/ μ l.

Typ vzorku a jeho koncentrace DNA v ng/ μ l:

Vzorek	Typ vzorku	Koncentrace DNA v ng/μl
3 /15	Periferní krev	34
7 /15	Bukální stěr	44
8 /15	Bukální stěr	23.6
9 /15	Bukální stěr	94.4

3.3 Příprava a provedení gelové elektroforézy

Reagencie:
Crystal 10xTBE Buffer – prášek
10x TBE – roztok připravený z 10xTBE Buffer
Pracovní roztok 1x TBE – 50 ml 10x TBE a 450 ml destilované vody
Agarózový prášek
DNA Loading Buffer Blue
Midori Green Advanced DNA Stain a 100bp DNA LADDER H3RTU které jsou součástí kitu: FastGene®Electrophoresis Reagent Kit (dodávané Elisabeth Pharmacon)

Postup:

Příslušné množství agarózy bylo naváženo do plastové kádinky o objemu 100 ml (0,5 g/50 ml = 1 % gel, 1 g/50 ml = 2 % gel, atd.). Bylo přidáno 50/100 ml 1x TBE pufru podle velikosti gelu. Roztok TBE pufru a agarózy byl tepelně zahříván v mikrovlnné troubě. Zahřívání proběhlo minimálně dvakrát na maximální ohřev po dobu 3 minut, až vznikl průhledný gelový roztok bez bublin. Do něj bylo přidáno 12 µl barvičky Midori Green Advanced DNA Stain, promícháno a necháno krátce zchladnout. Mezi tím byla připravena elektroforetická podložka, do které byly vloženy hřebeny. Ta určovala tvar agarózového gelu a hřebeny pak počet a velikost jednotlivých jamek. Gelový roztok byl nalit na elektroforetickou podložku. Po 10 – 15 minutách bylo možné ze ztuhlého gelu vyndat hřebeny a gel byl vložen do elektroforetické vany s 1x TBE puftrem, přičemž gel musel být zcela ponořen. Hladina TBE pufru by měla být minimálně 3 milimetry nad gelem.

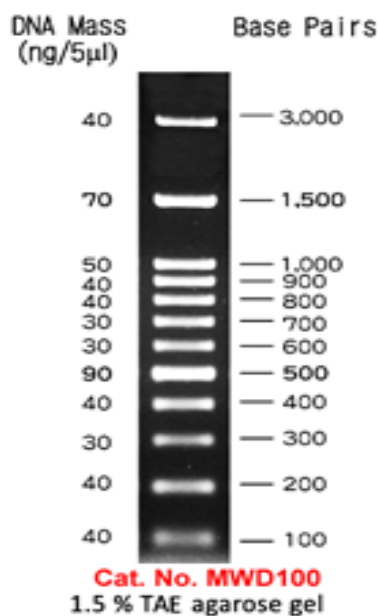
Do první či poslední jamky bylo napipetováno 5 µl markeru 100 bp DNA LADDER H3RTU, pro kontrolu velikosti PCR produktů (obr. 13).

Elektroforéza probíhala při 100 – 135 V po dobu 10 – 15 minut. Průběh celé elektroforézy bylo možno sledovat pomocí speciálního iluminátoru Mupid™LED Illuminator díky použité barvě v gelu. Po ukončené elektroforéze byl gen přenesen na

deteční systém na focení gelu FastGene® GelPic LED Box. Tento systém nám umožní vyfocení gelu a pomocí datového nosiče lze fotografii přenést do počítače k dalšímu vyhodnocení.

Princip elektroforézy:

Principem gelové elektroforézy je pohyb záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě. U nukleových kyselin jsou hlavním nositelem náboje fosfátové skupiny. Pomocí gelové elektroforézy lze oddělovat molekuly DNA na základě jejich velikosti a tedy rozdílné pohyblivosti v gelu, nezávisle na celkovém množství DNA v naneseném vzorku.



Obrázek 13: Ukázka použitého primeru pro kontrolu velikosti PCR fragmentů na agarózovém gelu. Zdroj: <http://www.nippongenetics.eu>

3.4 Vlastní metody

Pro všechny PCR reakce provedené v rámci této práce byl použit kit MyTaq Red DNA Polymerase dle doporučení výrobce kombinovaného s optimalizací jednotlivých analýz. Jako facilitátor PCR reakce byl použit dimethylsulfoxid (DMSO), který se

používá pro zvýšení výtěžku a specifity amplifikační reakce, zejména v případě amplifikace náročných genomových oblastí.

3.4.1 RFLP PCR

3.4.1.1 Leidenská mutace

Reagencie:
MyTaq Polymerase
Mytaq Red Reaction Buffer
Primer LEI_for
Primer LEI_rev
H₂O Aqua pro injectione
DMSO

Sekvence primerů:

FVL for: 5'-GGA ACA ACA CCA TGA TCA GAG CA-3'

FVL rev: 5'-TAG CCA GGA GAC CTA ACA TGT TC-3'

Postup při přípravě PCR reakce:

Celá PCR reakce byla z důvodů zabránění kontaminace použitých chemikálií i vlastní PCR reakce prováděna v dekontaminovaném laminárním boxu.

Do chladicího stojánku bylo připraveno množství PCR mikrozkušavek (0,2 ml) odpovídající počtu vzorků. Dále jedna PCR mikrozkušavka pro pozitivní kontrolu, jedna PCR mikrozkušavka pro negativní kontrolu a jedna 1,5 ml mikrozkušavka pro přípravu společného master mixu. Zkušavky byly řádně popsány číslem vzorku či PCR reakce. Do této 1,5 ml mikrozkušavky byly napipetovány jednotlivé reagencie společné pro všechny reakce. Poté byly rozpipetovány po 48 µl do jednotlivých PCR mikrozkušavek a do každé byly přidány 2 µl DNA izolátu testovaných vzorků a DNA

pozitivní kontroly. V případě negativní kontroly byly přidány místo DNA 2 μl H_2O (tab. 2).

Tabulka 2: Reakční PCR mix pro vyšetření Leidenské mutace:

	Pro 1 reakci	Pro 5 reakcí
H₂O	33,3 μl	166,5 μl
5x MyTaq Red Reaction Buffer	10 μl	50 μl
MyTaq polymerase (1U/μl)	0,2 μl	1 μl
DMSO 5%	2,5 μl	12,5 μl
Primer F +R (20 pmol/μl)	1 μl + 1 μl	5 μl + 5 μl
Celkem	48 μl	240 μl
DNA	2 μl	

Po napipetování všech reagensů byly mikrozkušavky uzavřeny, zvortexovány a krátce stočeny. Poté byly vloženy do termocycleru a byl spuštěn příslušný reakční program (tab. 3).

Tabulka 3: PCR reakční protokol pro vyšetření Leidenské mutace:

<u>1 cyklus</u>	Čas	Teplota
Počáteční denaturace	5 min	95 °C
<u>35 cyklů</u>		
Denaturace	15 s	95 °C
Anealing	15 s	55 °C
Extenze	10 s	72 °C
1 cyklus		
Terminální extenze	5 min	72 °C

Po ukončení amplifikační reakce byla provedena kontrola PCR produktů na 2 % agarózovém gelu. Na gel bylo napipetováno 5 μl z každého vzorku, pozitivní i negativní

kontroly a hmotnostního markeru. Poté byla spuštěna elektroforéza na dobu 10 minut při napětí 135 V. Následně byl gel přenesen na detekční systém a vyfocen.

Výsledkem byl PCR produkt o velikosti 287 bp (viz obr. 15 kapitola výsledky).

Přečištění PCR produktu před restrikčním štěpením:

Reagencie:
96% ethanol
70% ethanol
H₂O

K PCR produktu bylo přidáno 250 μ l 96 % ethanolu a PCR produkt byl inkubován 2 hodiny při pokojové teplotě. Následovala centrifugace 30 minut při 13500 ot/min. Po centrifugaci byl odpipetován ethanol tak, aby nedošlo ke ztrátě nebo narušení pelety. Bylo přidáno 100 μ l 70 % ethanolu a následovala opět centrifugace 5 minut při 13500 ot/min. Následně byl ethanol opatrně odpipetován, peleta byla vysušena při pokojové teplotě a následně rozpuštěna v 10 – 20 μ l H₂O.

Restrikční štěpení:

Reagencie:
Restrikční enzym Mnl I (5U/μl)
Restrikční pufr 10x NE Buffer

Pro restrikční štěpení byly připraveny nové PCR mikrozkušavky, do kterých bylo napipetováno 8 μ l přečištěného PCR produktu, dále restrikční reakce obsahovala 1x restrikční pufr a 5U restrikčního enzymu Mnl I. Tato směs byla inkubována 45 minut – 1 hodinu při 37 °C v termostatu.

Na 4 % agarózový gel byl napipetován stejný vzorek vždy do dvou sousedních jamek. Nejprve jeho neštěpený PCR produkt, a poté PCR produkt po restrikčním štěpení. V první jamce, byl přítomen PCR produkt o velikosti 287 bp. V druhé jamce,

kde byl již PCR produkt po restričním štěpení. Odpovídající velikosti restričních fragmentů byly 150, 130, 93 nebo 37 bp podle toho, zda byla příslušná mutace přítomna či ne (tab. 4). Pro nanášení produktů restričního štěpení na gel bylo nutné použití 2 μ l vkládací barvičky DNA Loading Buffer Blue.

Tabulka 4: Referenční hodnoty pro analýzu Leidenské mutace.

PCR produkt	PCR produkt po RŠ	Výsledný genotyp
287 bp	157+130+93+37 bp	Heterozygot
287 bp	157+93+37 bp	Nemutovaný homozygot
287 bp	157+130 bp	Mutovaný homozygot

3.4.1.2 MTHFR 1298

Reagencie:
MyTag polymerase
MyTag Red Reaction Buffer
Primer MTHFR 1298_for
Primer MTHFR 1298_rev
H₂O Aqua pro injectione
DMSO

Sekvence primerů:

MTHFR 1298F 5' - ATG TGG GGG GAG GAG CTG AC - 3'

MTHFR 1298R 5' - GTC TCC CAA CTT ACC CTT CTC CC 3'

Postup při přípravě PCR reakce:

Pro každý vzorek a pozitivní i negativní kontrolu byla připravena jedna označené PCR mikrozkušavka a jedna 1,5 ml mikrozkušavka pro společný master mix. Společný master mix (tab. 5) byl rozpipetován do jednotlivých mikrozkušavek po 48

μl a následně byly přidány 2 μl DNA od každého vzorku. Do negativní kontroly byly místo DNA přidány 2 μl H_2O .

Tabulka 5: Reakční mix pro vyšetření polymorfismu MTHFR A1298C.

	Pro 1 reakci	Pro 6 reakcí
H₂O	33,3 μl	200 μl
5x MyTaq Red Reaction Buffer	10 μl	60 μl
MyTaq polymerase (1U/μl)	0,2 μl	1,2 μl
DMSO 5%	2,5 μl	15 μl
Primery F +R (20 pmol/μl)	1 μl + 1 μl	6 μl + 6 μl
Celkem	48 μl	288,2 μl
DNA	2 μl	

Po napipetování všech reagensů byly mikrozkušavky uzavřeny, zvortexovány a krátce stočeny. Poté byly vloženy do termocycleru a byl spuštěn příslušný reakční protokol (tab. 6).

Tabulka 6: PCR reakční protokol pro vyšetření polymorfismu MTHFR A1298C.

1 cyklus	Čas	Teplota
Počáteční denaturace	5 min	95 °C
35 cyklů		
Denaturace	30 s	95 °C
Anealing	30 s	61 °C
Extenze	30 s	72 °C
1 cyklus		
Terminální extenze	20 min	72 °C

Po ukončení amplifikace byla provedena kontrola PCR produktu na 2 % agarózovém gelu. Na gel bylo naneseno 5 μl z každého vzorku, pozitivní i negativní kontroly a hmotnostního markeru. Poté byla spuštěna elektroforéza po dobu 10 minut a napětí 135 V. Následně byl gel přenesen na detekční systém a vyfocen.

Výsledkem PCR byl v prvních 5 jamkách produkt o velikosti 241 bp, do šesté jamky byla napipetována negativní kontrola a tudíž zde žádný produkt nevznikl (viz obr. 17 kapitola výsledky).

Přečištění produktu před restrikčním štěpením:

Reagencie:
96% ethanol
70% ethanol
H₂O

K PCR produktu bylo přidáno 250 μ l 96 % ethanolu a inkubace s ethanolem probíhala 2 hodiny při pokojové teplotě. Následně byl produkt centrifugován 30 minut při 13500 ot/min. Po centrifugaci byl odpipetován ethanol tak, aby nedošlo k narušení pelety. Bylo přidáno 100 μ l 70 % ethanolu a opět následovala centrifugace 5 minut při 13500 ot/min. Poté byl opatrně odstraněn všechny ethanol, peleta byla vysušena při pokojové teplotě a rozpuštěna v 10 – 20 μ l H₂O.

Restrikční štěpení:

Reagencie:
Restrikční enzym Mbo II (5U/μl)
Restrikční pufr 10x NE Buffer

Pro restrikční štěpení se připravily nové PCR mikrozkušavky, do kterých bylo napipetováno 8 μ l PCR produktu, dále restrikční reakce obsahovala 1x restrikční pufr a 5U Mbo II. Tato směs byla inkubována 45 minut až 1 hodinu při 37 °C.

Na 4 % agarózový gel byl napipetován stejný vzorek vždy do dvou jamek. Nejprve výsledný PCR produkt jako kontrola restrikčního štěpení, a poté PCR produkt po restrikčním štěpení. V první jamce byl přítomen produkt o velikosti 241 bp. V druhé

jamce byly přítomny restriční fragmenty o velikosti 241, 204 či 37 bp vždy podle přítomnosti variantních alel (tab. 7).

Tabulka 7: Tabulka s referenčními hodnotami pro analýzu polymorfismu MTHFR 1298.

PCR produkt	PCR produkt po RŠ	Výsledný genotyp
241 bp	241+204+37 bp	Heterozygot MTHFR1298 AC
241 bp	204+37 bp	varianta MTHFR1298 AA
241 bp	241 bp	varianta MTHFR1298 CC

3.4.2 PCR ARMS

3.4.2.1 mutace Protrombinu

Reagencie:
MyTaq Polymerase
MyTaq Red Reaction Buffer
Primer FII pS
Primer FII pN nebo FII pM
H₂O Aqua pro injectione
DMSO

Sekvence primerů:

FII pS 5 _-TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3 _ (19889–19908)

FII (G) pN 5 _-CACTGGGAGCATTGAGGATC-3 _ (20229–20210)

FII (A) pM 5 _-CACTGGGAGCATTGAGGATT-3 _ (20229–20210)

Postup:

PCR reakce byla připravena v dekontaminovaném laminárním boxu, aby nedošlo ke kontaminaci použitých chemikálií a PCR reakcí.

Do chladícího stojánu byly připraveny dvě PCR mikrozkušavky (0,2 ml) pro každý vzorek a dvě 1,5 ml mikrozkušavky pro společné master mixy pro mutovanou a nemutovanou formu genu. Do každé z těchto dvou zkumavek bylo napipetováno stejné množství H₂O, MyTaq Polymerase, 10x MyTaq Red Reaction Buffer, DMSO a primeru pS, který je společný pro obě reakce. Poté byl do jednoho mixu přidán primer pN pro nemutovanou formu a do druhého primer pM pro mutovanou formu genu (tab. 8).

Každý master mix byl rozpipetován do jednotlivých popsaných PCR mikrozkušavek připravených pro každý vzorek po 48 µl. Do každého reakčního mixu byly přidány 2 µl DNA vzorku nebo pozitivní kontroly. Do negativní kontroly byly přidány místo DNA 2 µl H₂O.

Tabulka 8: Reakční PCR mix pro vyšetření mutace protrombinového genu.

	Pro 1 reakci	Pro 5 +5 reakcí
H₂O	30 µl	150 µl
5x MyTaq Red Reaction Buffer	10 µl	50 µl
MyTaq polymerase (1U/µl)	0,4 µl	2 µl
DMSO 5%	2,5 µl	12,5 µl
Primery pS + pN nebo pM (20 pmol/µl)	2,5 µl + 2,5 µl	12,5 µl + 12,5 µl
Celkem	48 µl	240 + 240 µl
DNA	2 µl	

Po napipetování všech reagensů byly mikrozkušavky uzavřeny, zvortexovány a krátce stočeny. Poté byly mikrozkušavky vloženy do termocycleru, následně byl spuštěn příslušný reakční protokol (tab. 9).

Tabulka 9: PCR reakční protokol pro vyšetření protrombinového genu.

<u>1 cyklus</u>	Čas	Teplota
Počáteční denaturace	5 min	95 °C
<u>35 cyklů</u>		
Denaturace	30 s	95 °C
Anealing	30 s	61 °C
Extenze	30 s	72 °C
1 cyklus		
Terminální extenze	5 min	72 °C

Po ukončení amplifikační reakce byla provedena kontrola PCR produktu na 2 % agarózovém gelu. Na gel bylo napipetováno 20 µl PCR produktu každého vzorku. Poté byla spuštěna elektroforéza po dobu 10 minut a napětí 135 V. Následně byl gel přenesen na detekční systém a vyfocen.

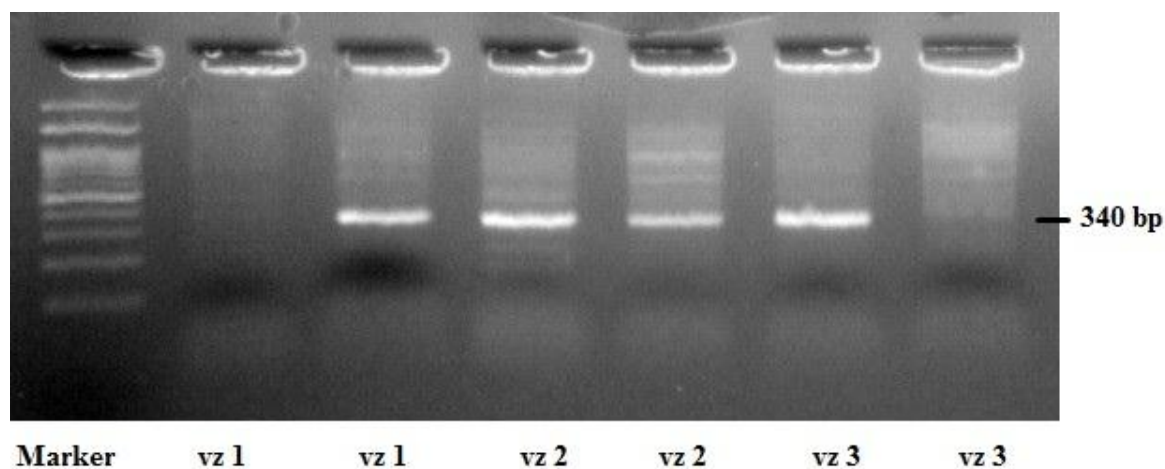
Na gel byl napipetován vždy vzorek nejprve s primerem pN pro nemutovanou formu a poté s primerem pM pro mutovanou formu protrombinového genu. Výsledkem

PCR je produkt o velikosti 340 bp nebo žádný produkt a to na základě toho, zda je mutace přítomna či ne (tab. 10), (viz obr. 19 kapitola výsledky).

Tabulka 10: Tabulka s referenčními hodnotami pro analýzu mutace protrombinu.

PCR produkt pS+pN	PCR produkt pS+pM	Výsledný genotyp
340 bp	340 bp	Heterozygot
340 bp	Bez produktu	Nemutovaný homozygot
Bez produktu	340 bp	Mutovaný homozygot

Pokud vznikne PCR produkt v jamce s primerem pN i v jamce s primerem pM jedná se o heterozygota. Pokud vznikne produkt pouze v jamce s primerem pN, jedná se o nemutovaného homozygota. Produkt vzniklý pouze v jamce s primerem pM pak vypovídá o přítomnosti mutovaného homozygota (obr. 14).



Obrázek 14: Ukázka výsledných genotypů získaných analýzou protrombinového genu pomocí metody PCR-ARMS; vz1 mutovaný homozygot, vz2 heterozygot, vz3 nemutovaný homozygot.

3.4.2.2 MTHFR 677

Reagencie:
MyTaq Polymerase
10x MyTaq Red Reaction Buffer
Primer MTHFR 677F pS
Primer MTHFR 677R pN nebo MTHFR 677R pM
H₂O Aqua pro injectione
DMSO

Sekvence primerů:

MTHFR 677F - pS 5' - AAG ACG GTG CGG TGA GAG TG - 3'

MTHFR 677R - pN 5' - GAG AAG GTG TCT GCG GGA TC - 3'

MTHFR 677RM - pM 5' - GAG AAG GTG TCT GCG GGA TT - 3'

Postup:

Postup přípravy a provedení PCR reakce byl obdobný jako u PCR ARMS pro mutaci protrombinového genu. Rozdílné byly pouze použité primery (tab. 11).

Tabulka 11: Reakční PCR mix pro vyšetření polymorfismu MTHFR 677.

	Pro 1 reakci	Pro 5 +5 reakcí
H₂O	33,1 µl	165,5 µl
5x MyTaq Red Reaction Buffer	10 µl	50 µl
MyTaq polymerase (1U/µl)	0,4 µl	2 µl
DMSO 5%	2,5 µl	12,5 µl
Primery pS + pN nebo pM (20 pmol/µl)	1 µl + 1 µl	5 µl + 5 µl
Celkem	48 µl	240 + 240 µl
DNA	2 µl	

Po napipetování všech reagentů byly mikrokumavky uzavřeny, zvortexovány a krátce stočeny. Poté byly vloženy do termocycleru s příslušným reakčním protokolem (tab. 12).

Tabulka 12: Reakční protokol pro vyšetření polymorfismu MTHFR 677.

<u>1 cyklus</u>	Čas	Teplota
Počáteční denaturace	5 min	95 °C
<u>35 cyklů</u>		
Denaturace	30 s	95 °C
Anealing	30 s	61 °C
Extenze	30 s	72 °C
<u>1 cyklus</u>		
Terminální extenze	5 min	72 °C

Po ukončení byla provedena kontrola PCR produktu na 2 % agarózovém gelu. Na gel bylo nanášeno 20 µl z každého PCR produktu. Poté byla spuštěna elektroforéza po dobu 10 minut o napětí 135 V. Následně byl gel přenesen na detekční systém a vyfocen.

Na gel byl napipetován vždy vzorek nejprve s primerem pN pro nemutovanou formu a poté s primerem pM pro mutovanou formu. Výsledkem byl produkt o velikosti 200 bp nebo žádný produkt na základě toho, které variantní alely byly u analyzovaného jedince přítomny (tab. 13), (viz obr. 20 kapitola výsledky).

Tabulka 13: Tabulka s referenčními hodnotami pro analýzu polymorfismu MTHFR 677.

PCR produkt pS+pN	PCR produkt pS+pM	Výsledný genotyp
200 bp	200 bp	Heterozygot
200 bp	Bez produktu	Nemutovaný homozygot
Bez produktu	200 bp	Mutovaný homozygot

Pokud vznikne PCR produkt v jamce s primerem pN i v jamce s primerem pM jedná se o heterozygota. Pokud vznikne produkt pouze v jamce s primerem pN, jedná se o nemutovaného homozygota. Produkt vzniklý pouze v jamce s primerem pM pak vypovídá o přítomnosti mutovaného homozygota (obr. 14).

3.4.3 Reverzní hybridizace

Metoda byla provedena pomocí kitu CVD Strip Assay podle příslušného protokolu dodaného výrobcem kitu. Principem metody je reverzní hybridizace biotinylovaného PCR produktu získaného v rámci dvou nezávislých multiplex PCR, ve kterých jsou použity biotinylované primery, za vzniku barevných proužků na stripu podlena základě přítomnosti dané mutace či polymorfismu u testovaného jedince. Specifická hybridizace biotinylovaných sekvencí získaných v rámci PCR k oligonukleotidovým proubám imobilizovaným na stripu je pak detekována pomocí streptavidin-alkalické fosfatázy a barevného substrátu.

CVD Strip Assay je schopen zachytit varianty v genech pro FV Leiden, FV R2 haplotyp, F II (protrombin), FXIII, beta-Fibrinogen, inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (PAI-1), lidský destičkový antigen (HPA-1), MTHFR 677, MTHFR 1298, angiotensin-konvertující enzym (ACE), apolipoprotein B (Apo B) a apolipoprotein E (Apo E).

Reagencie
Taq DNA polymerase
Taq Dilution Buffer
Amplification Mix 2x (žluté a zelené víčko)
Hybridizacion Buffer
Wash Solutin A
DNAT
Conjugate Solutin
Wash Solution B
Color Developer

Postup:

Před vlastní reverzní hybridizací bylo nutné provést PCR reakci. Pro reakci bylo nutné naředit *Taq* DNA polymerasu na potřebnou koncentraci 0,2 U/μl. Podle počtu

vzorku (v mém případě 4) bylo naředěno 1,6 μl *Taq* DNA polymerase s 38,4 μl *Taq* Dilution Buffer, aby výsledný objem byl 40 μl .

Poté byly připraveny do chladícího stojánku dvě PCR mikrozkušavky pro každý vzorek. Do jedné zkumavky bylo napipetováno vždy 15 μl Amplification Mix se žlutým víčkem (Mix 1), 5 μl naředěné *Taq* DNA polymerázy a 5 μl příslušné DNA (tab. 14). Do druhé mikrozkušavky bylo napipetováno 15 μl Amplifikacion Mix se zeleným víčkem (Mix 2), 5 μl naředěné *Taq* DNA polymerázy a 5 μl příslušné DNA (tab. 15).

Tabulka 14: Reakční směs pro Mix 1.

1 . Reakce pro 1 vzorek	
Amplification Mix (žluté víčko)	15 μl
Naředěná <i>Taq</i> DNA polymerase	5 μl
DNA	5 μl

Tabulka 15: Reakční směs pro Mix 2.

2 . reakce pro 1 vzorek	
Amplification Mix (zelené víčko)	15 μl
Naředěná <i>Taq</i> DNA polymerase	5 μl
DNA	5 μl

Po napipetování všech reagentů byly mikrozkušavky uzavřeny, zvortexovány a krátce stočeny. Poté byly vloženy do termocycleru a byl spuštěn příslušný reakční protokol (tab. 16).

Tabulka 16: Reakční protokol pro metodu reverzní hybridizace na stripech.

<u>1 cyklus</u>	Čas	Teplota
Počáteční denaturace	2 min	94 °C
<u>35 cyklů</u>		
Denaturace	15 s	94 °C
Anealing	30 s	58 °C
Extenze	30 s	72 °C
<u>1 cyklus</u>		
Terminální extenze	3 min	72 °C

Po ukončení byla provedena kontrola PCR produktů na 4 % agarózovém gelu. Na gel bylo napipetováno 5 µl z každého vzorku. Poté byla spuštěna elektroforéza po dobu 10 minut o napětí 135 V. Následně byl gel přenesen na detekční systém a vyfocen.

Nejprve byly na gel napipetovány vzorky z první reakce a poté vzorky z druhé reakce. Na poslední pozici byl napipetován marker (viz obr. 21 kapitola výsledky).

Po kontrole na agarózovém gelu bylo nutné předeřhřát lázeň na 45 °C. Na tuto teplotu byl v lázni předem vytemperován Hybridization Buffer a Wash Solution A.

Do spodní části promývacího korýtka bylo vždy napipetováno 10 µl DNAT, 10 µl PCR produktu 1. reakce a 2. reakce téhož vzorku. Tato směs byla 5 minut inkubována při pokojové teplotě. Následně byl přidán 1ml Hybridizacion Buffer a testovací strip čárkami nahoru. Promývací korýtka se stripy bylo vloženo do vyhřáté lázně s třepačkou na dobu 30 minut.

Poté přišlo na řadu promývání. Z jamek byl odpipetován všechn roztok a přidán 1 ml Wash Solution A. Poté byl opět všechn roztok odpipetován a znovu napipetován 1 ml Wash Solution A. Následovala inkubace ve vyhřáté lázni po dobu 15 minut. Tento postup byl zopakován ještě jednou.

Následně byl z jamek odpipetován všechn Wash Solutin A a přidán 1 ml Conjugate Solution. Inkubace probíhala 15 minut při pokojové teplotě za stálého míchání. Po inkubaci byl konjugát odpipetován a stripy byly krátce opláchnuty pomocí Wash Solutin B. Po oplachu byl do každé jamky přidán 1 ml tohoto roztoku na dobu

5 minut. Tato inkubace za pomoci Wash Solution B byla zopakována. Následně byla veškerá tekutina odpipetována a byl přidán 1 ml Color Developer. Inkubace probíhala 15 minut ve tmě. Poté byly testovací stripy omyty destilovanou vodou a osušeny.

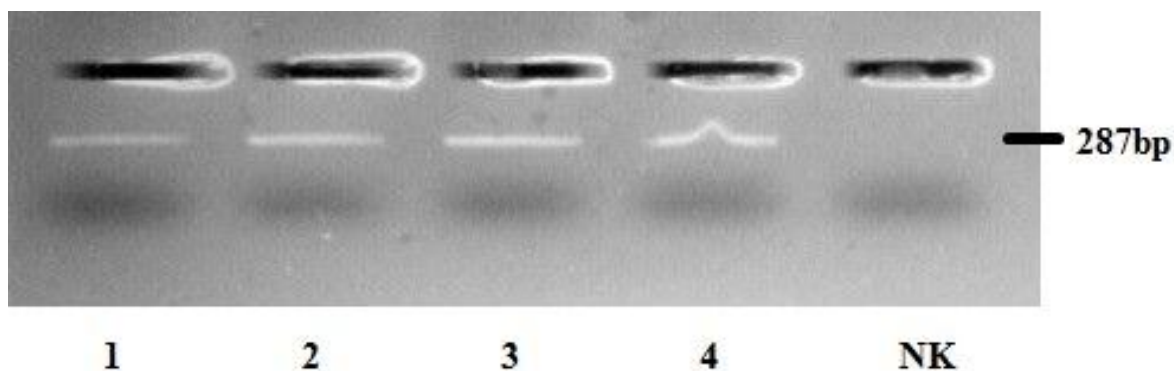
Testovací stripy byly přiloženy vedle šablony, aby bylo možno odečítat výsledky reverzní hybridizace. Pokud došlo k hybridizaci k příslušné cílové sondě ukotvené na hybridizačním stripu, byla tato pozitivní reakce opticky viditelná (viz obr. 22 kapitola výsledky.).

4 VÝSLEDKY

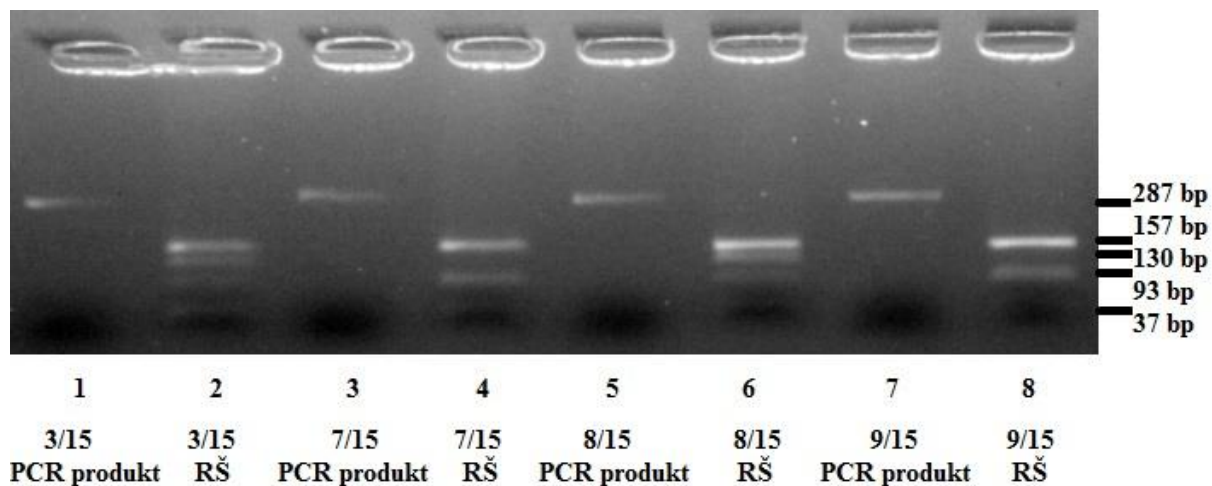
4.1 Metoda RFLP – PCR

Touto metodou jsem vyšetřovala Leidenskou mutaci (mutace FV) a polymorfismus MTHFR A1298C.

Leidenská mutace:



Obrázek 15: Kontrola PCR produktu na 2 % agarózovém gelu, RFLP-PCR, Leidenská mutace.



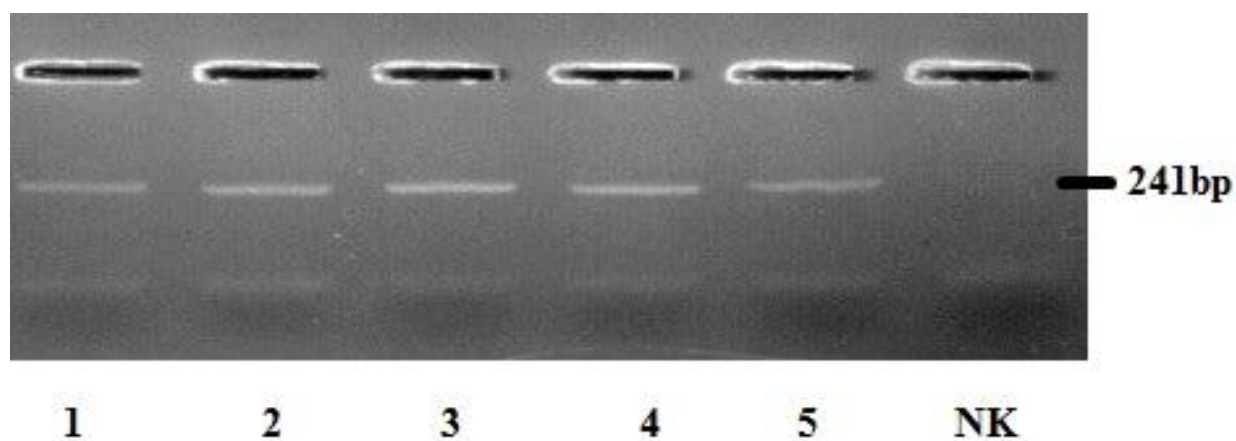
Obrázek 16: Kontrola restričního štěpení na 4 % agarózovém gelu, RFLP-PCR, Leidenská mutace.

Tabulka č 17: Výsledky RFLP PCR pro vyšetření Leidenské mutace.

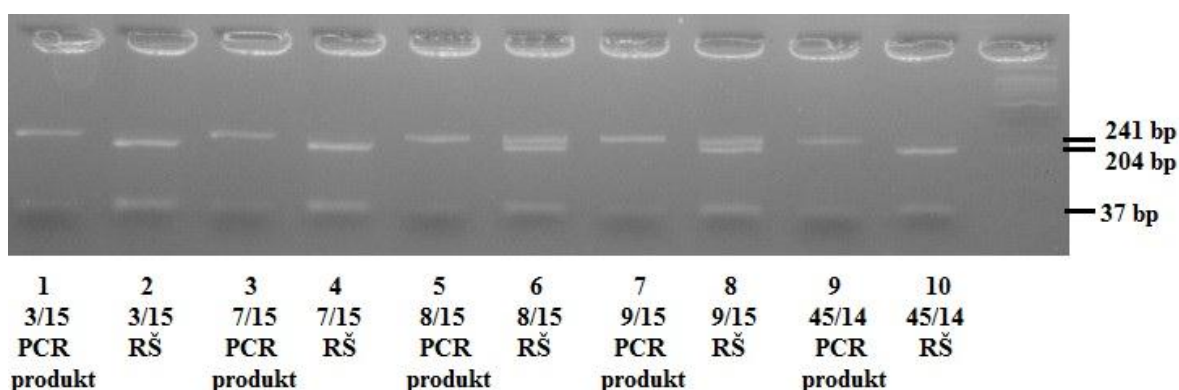
Číslo	Č. vzorku	Výsledek PCR	Výsledek RŠ	Výsledný genotyp
2	3 /15	287 bp	157+130+93+37 bp	Heterozygot
4	7 /15	287 bp	157+93+37 bp	Nemutovaný homozygot
6	8 /15	287 bp	157+130+93+37 bp	Heterozygot
8	9 /15	287 bp	157+93+37 bp	Nemutovaný homozygot

Pozn. čísla v tabulce odpovídají pozici daného vzorku na gelu (obr. 16).

Polymorfismus MTHFR A1298C:



Obrázek 17: Kontrola PCR produktu na 2 % agarózovém gelu, RFLP-PCR, polymorfismus MTHFR A1298C.



Obrázek 18: Kontrola restričního štěpení na 4 % agarózovém gelu, RFLP-PCR, polymorfismus MTHFR A1298C.

Tabulka 18: Výsledky RFLP PCR pro vyšetření polymorfismu MTHFR A1298C.

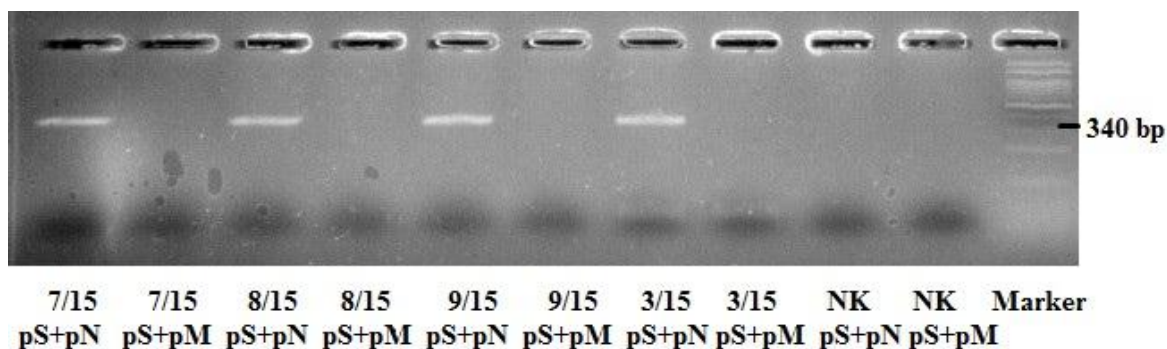
Číslo	Č. vzorku	Výsledek PCR	Výsledek RŠ	Výsledný genotyp
2	3 /15	241 bp	204+37 bp	Nemutovaný homozygot
4	7 /15	241 bp	204+37 bp	Nemutovaný homozygot
6	8 /15	241 bp	241+204+37 bp	Heterozygot
8	9 /15	241 bp	241+204+37 bp	Heterozygot
10	45/14	241 bp	204+37 bp	Nemutovaný homozygot

Pozn. čísla v tabulce odpovídají poloze vzorku na gelu (obr. 18).

4.2 Metoda PCR ARMS

Touto metodou jsem vyšetřovala mutaci Protrombinu (Mutace FII) a polymorfismus MTHFR C677T.

Mutace protrombinového genu:



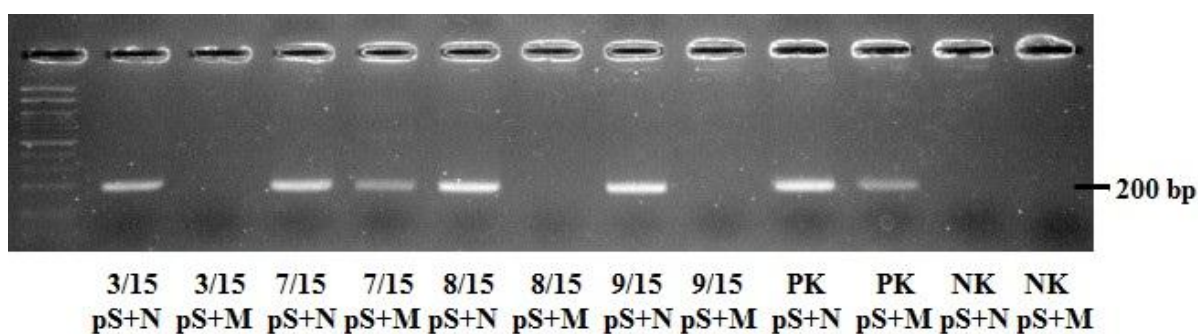
Obrázek 19: Kontrola výsledků PCR na 2 % agarózovém gelu, PCR ARMS, mutace protrombinového genu.

Tabulka 19: Výsledky PCR ARMS pro vyšetření mutace protrombinového genu.

Číslo	Vzorek	PCR produkt pS+pN	PCR produkt pS+pM	Výsledný genotyp
1 / 2	7 / 15	340 bp	Bez produktu	Nemutovaný homozygot
3 / 4	8 / 15	340 bp	Bez produktu	Nemutovaný homozygot
5 / 6	9 / 15	340 bp	Bez produktu	Nemutovaný homozygot
7 / 8	3 / 15	340 bp	Bez produktu	Nemutovaný homozygot
9 / 10	NK	Bez produktu	Bez produktu	

Pozn. čísla v tabulce odpovídají poloze vzorku na gelu (obr. 19).

Polymorfismus MTHFR C677T:



Obrázek 20: Kontrola PCR produktů na 2 % agarózovém gelu, PCR-ARMS, polymorfismus MTHFR C677T.

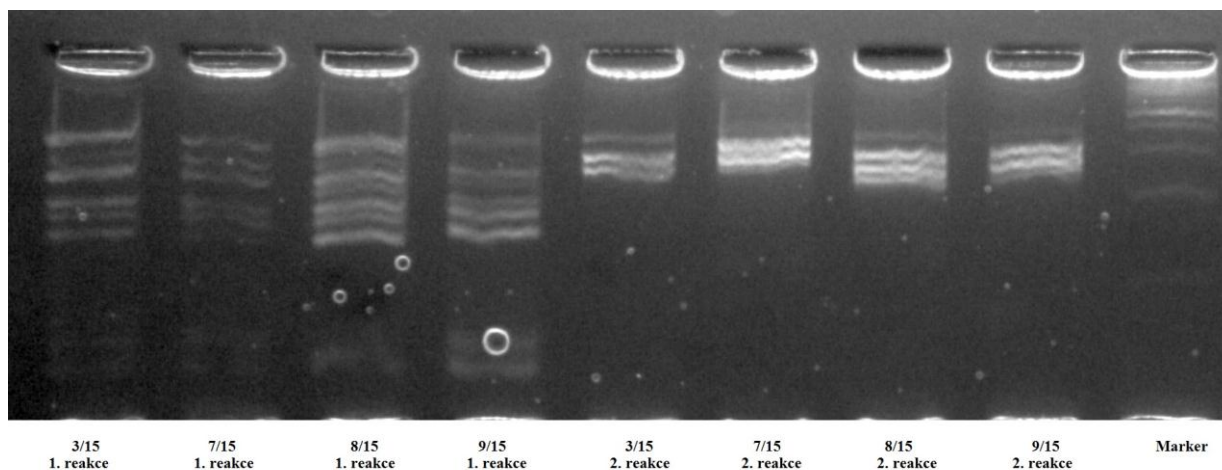
Tabulka 20: Výsledky PCR ARMS pro vyšetření polymorfismu MTHFR 677.

Číslo	Vzorek	PCR produkt pS+pN	PCR produkt pS+pM	Výsledný genotyp
1	3 /15	200 bp	Bez produktu	Nemutovaný homozygot
2	7 /15	200 bp	200 bp	Heterozygot
3	8 /15	200 bp	Bez produktu	Nemutovaný homozygot
4	9 /15	200 bp	Bez produktu	Nemutovaný homozygot
5	PK	200 bp	200 bp	Heterozygot
6	NK	Bez produktu	Bez produktu	

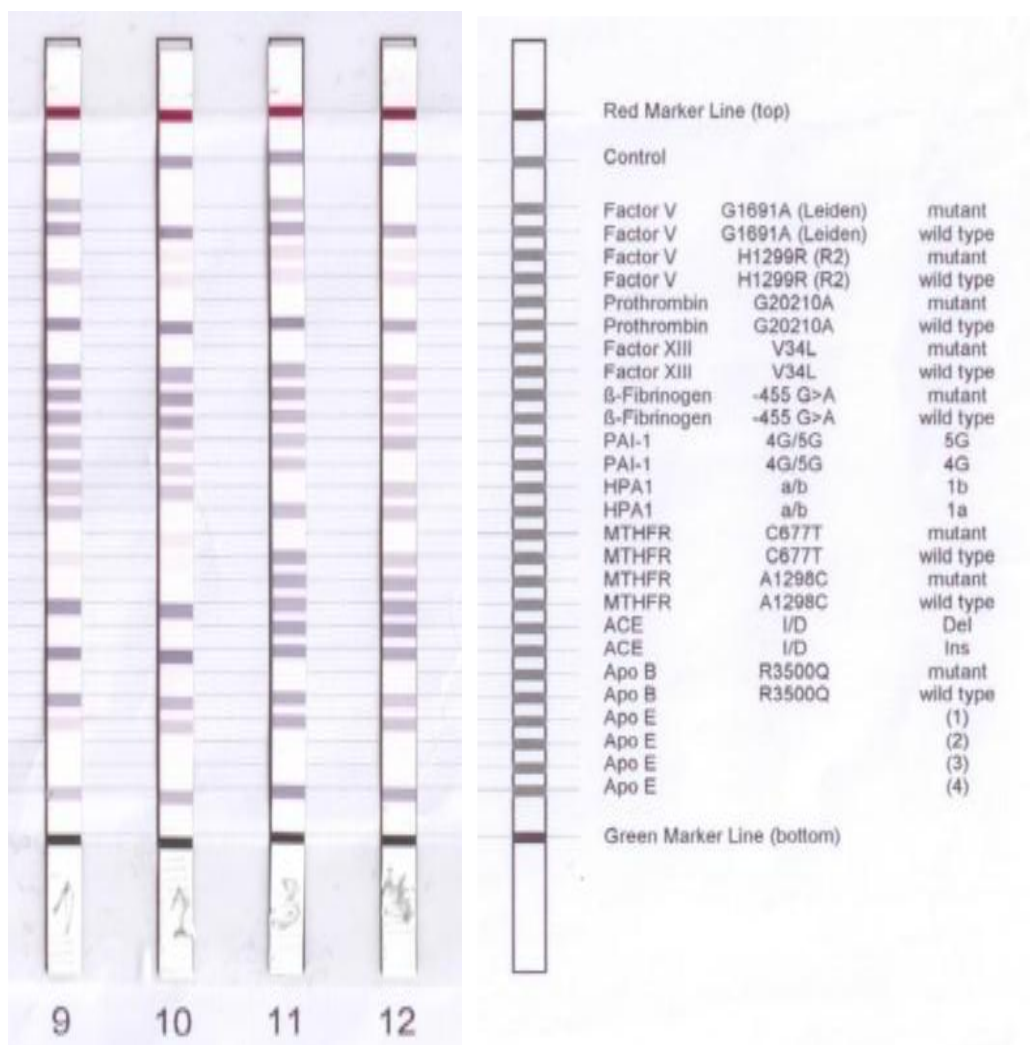
Pozn. čísla v tabulce odpovídají poloze vzorku na gelu (obr. 20).

4.3 Reverzní hybridizace na stripech:

Touto metodou jsem vyšetřila všechny čtyři mutace a polymorfismy současně.



Obrázek 21: Kontrola PCR produktů na 4 % agarózovém gelu. V rámci 1. amplifikační reakce (Mix 1) vznikly PCR produkty o velikosti: 134, 156, 173, 202, 223, 254, 297, 324 bp a v rámci 2. amplifikační reakce (Mix 2) vznikly PCR produkty o velikosti: 225, 248, 283, 346 bp.



Obrázek 22: Výsledky reverzní hybridizace na stripech.

Na obrázku č. 22 lze vidět testované stripy vedle šablony s vyznačenými názvy mutací a polymorfismů. Podle zbarvených pruhů lze odečítat genotypy testovaných jedinců.

Tabulka 21: Výsledky reverzní hybridizace pro sledované mutace a polymorfismy.

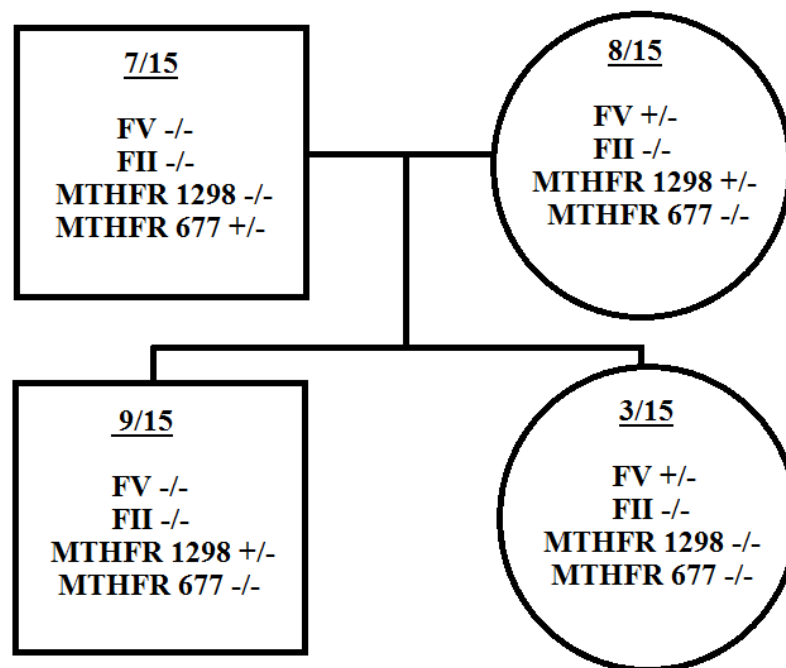
Číslo stripu	9	10	11	12
Vzorek	3 /15	7 /15	8 /15	9 /15
Faktor V	Heterozygot	Nemutovaný homozygot	Heterozygot	Nemutovaný homozygot
Protrombin	Nemutovaný homozygot	Nemutovaný homozygot	Nemutovaný homozygot	Nemutovaný homozygot
MTHFR C677T	Nemutovaná homozygot	Heterozygot	Nemutovaný homozygot	Nemutovaný homozygot
MTHFR A1298C	Nemutovaný homozygot	Nemutovaný homozygot	Heterozygot	Heterozygot

Pozn. čísla v tabulce odpovídají číslům stripů na obr. 20.

Metodou RFLP – PCR jsem vyšetřila Leidenskou mutaci a polymorfismus MTHFR A1298C. Výsledkem analýzy Leidenské mutace u vzorku 8/15 (matka) a 3/15 (dcera) byl heterozygotní genotyp a u vzorku 7/15 (otec) a 9/15 (syn) nemutovaný homozygotní genotyp. Výsledkem restrikční analýzy polymorfismu MTHFR A1298C byl u vzorku 8/15 (matka) a 9/15 (syn) heterozygotní genotyp a u vzorku 7/15 a 3/15 jako genotyp MTHFR 1298AA.

Za pomoci metody PCR ARMS jsem vyšetřila mutaci protrombinového genu a polymorfismus MTHFR C677T. Výsledkem analýzy mutace protrombinového genu u všech sledovaných vzorků (3/15, 7/15, 8/15 a 9/15) byl nemutovaný homozygotní genotyp. Výsledkem analýzy polymorfismu MTHFR C677T byl u vzorku 7/15 heterozygotní genotyp MTHFR 677CT a u vzorku 3/15, 8/15 a 9/15 genotyp MTHFR 677CC.

Za pomoci metody reverzní hybridizace na stripech jsem vyšetřila u všech členů rodiny vybrané mutace a polymorfismy současně. Touto metodou jsem si potvrdila správnost výsledků získaných pomocí RFLP – PCR a PCR ARMS.



Obrázek 23: Ukázka autozomální dědičnosti jednotlivých mutací a polymorfismů na vzorku mé rodiny.

5 DISKUSE

V Evropských zemích je každé 10 úmrtí spojováno s trombolickou komplikací. Jedná se tedy o třetí nejčastější příčinu způsobenou kardiovaskulárním onemocněním a to hned po infarktu myokardu a ischemické cévní mozkové příhodě.

Vyšetřením základních trombofilních mutací a polymorfismů se v České republice v roce 2015 zabývalo celkem 32 laboratoří, které jsou pravidelně podrobovány externí kontrole kvality. Tyto laboratoře používají rozdílné detekční přístupy pro analýzu trombofilních mutací a polymorfismů. Je zde zastoupena alelická diskriminace s fluorescenční detekcí (36 %), alelově specifická PCR s různou detekcí (27 %), klasická RFLP – PCR (20 %), real-time PCR (13 %), HRM analýza (5,5 %) a hybridizační metoda na membráně (3 %).

V mé práci jsem za pomoci různých genetických metod (RFLP – PCR, PCR ARMS a reverzní hybridizace na stripech) vyšetřila čtyři nejčastěji zastoupené trombofilní mutace a polymorfismy v české populaci, mezi které patří Leidenská mutace, mutace protrombinového genu a polymorfismy MTHFR C677T a MTHFR A1298C. Těmto vyšetření jsem podrobila svou rodinu. Jednalo se o rodiče a jejich dvě děti. Metodou RFLP – PCR jsem vyšetřila Leidenskou mutaci a polymorfismus MTHFR A1298C. Za pomoci metody PCR ARMS jsem vyšetřila mutaci protrombinového genu a polymorfismus MTHFR C677T. Metodou reverzní hybridizace na stripech jsem vyšetřila u všech členů rodiny vybrané mutace a polymorfismy současně. Touto metodou jsem si potvrdila správnost výsledků získaných pomocí RFLP – PCR a PCR ARMS.

Výsledky genetických testů jsem znázornila ve tvaru rodokmenu na obr. 23, kde můžeme vidět autozomálně dominantní způsob dědičnosti z rodiče na potomka. Leidenská mutace pocházela tedy v rámci testované rodiny z mateřské větve a byla předána pouze dceři. Polymorfismus MTHFR C677T byl identifikován v otcovské větvi a varianta MTHFR 677T nebyla na potomky přenesena. V případě polymorfismu MTHFR A1298C byl nalezen stejný heterozygotní genotyp MTHFR 1298AC u matky a syna.

Metody, které byly v mé práci použity, jsou rozdílné v časové i finanční náročnosti. Nejméně časově i finančně náročná je metoda PCR ARMS, kdy probíhá pouze jedna PCR reakce a jedna kontrola PCR produktů na agarózovém gelu, jde o tzv. end-point PCR přístup. Metoda RFLP – PCR je zdlouhavější z důvodu kombinace metody PCR a následného restričního štěpení vzniklého PCR produktu na gelu, který je ještě přečišťován alkoholovým srážením. Z hlediska interpretace výsledků je ale tato metoda nejvíce specifická a přesná. Během PCR-ARMS může totiž dojít k nedostatečnému nebo nepřesnému nasednutí primerů, následná elongace amplifikované sekvence neproběhne, PCR produkt tedy nevznikne a mohou být odečteny falešně negativní či pozitivní výsledky. V případě PCR-ARMS bez použití vnitřní kontroly může dále dojít k chybě pipetování, kdy není do reakce omylem přidána DNA, opět pak dochází k získání nesprávných výsledků. K vyšetření všech trombofilních mutací a polymorfismů najednou je vhodná použitá reverzní hybridizace na stripech. Zde získáme výsledky všech čtyř reakcí v rámci jednoho experimentu. Bohužel metoda je poměrně pracná a nejvíce finančně náročná.

6 ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo sepsání rešerše na téma nejčastější trombofilní mutace v české populaci v rámci teoretické části. Praktická část byla zaměřena na laboratorní praxi a zvládnutí vybraných molekulárně-biologických diagnostických přístupů těchto mutací rutinně používaných v genetické laboratoři.

V teoretické části jsem se zabývala problematikou trombofilních stavů a čtyř nejčastějších mutací a polymorfismů a to Leidenské mutace, mutace protrombinového genu a polymorfismů MTHFR C677T a A1298C. Následně jsem se zaměřila na popis některých molekulárních metod vhodných pro detekci testovaných mutací a polymorfismů.

V rámci praktické části jsem si osvojila metodu PCR ARMS, RFLP – PCR a reverzní hybridizaci na stripech, stejně tak i izolaci DNA z periferní krve i bukalního stěru, přípravu PCR reakcí, elektroforetickou separaci PCR produktů na agarózovém gelu a restriční štěpení. Výše zmíněnými metodami jsem vyšetřila všechny čtyři mutace a polymorfismy a výsledky jednotlivých metod jsem mezi sebou porovnávala.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. BULÍKOVÁ, Alena a Miroslav PENKA. Antifosfolipidový syndrom – diagnostika a léčba. *Vnitřní lékařství*. 2005, **91**(7), 809-817.
2. DAHLBÄCK, B.; CARLSSON, Magnus; SVENSSON, Peter J. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C : prediction of a cofactor to activated protein C . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90.3 : 1004-1008.
3. DEKKER, G . A ., J . I . DE VRIES, P . M . DOELITZSCH, P . C . HUIJGENS, B . M . VON BLOMBERG, C . JAKOBS a H . P . VAN GEIJN. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J. Obstet. Gynecol.* 1995, **173**(4), 1042-1048.
4. DEN HEIJER, M ., S . LEWINGTON a R . CLARKE. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005, **3** (2), 292-299. DOI: 10.1111/j .1538-7836.2005.01141.x . ISSN 1538-7933. Dostupné také z : <http://doi.wiley.com/10.1111/j .1538-7836.2005.01141.x>
5. ENGESSER, Luzia. Hereditary Protein S Deficiency: Clinical Manifestations. *Annals of Internal Medicine*. 1987, **106**(5), 677-. DOI: 10.7326/0003-4819-106-5 -677. ISSN 0003-4819. Dostupné také z : <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-106-5 -677>
6. FERRIE, R . M ., M . J . SCHWARZ, N . H . ROBERTSON, S . VAUDIN, M . SUPER, G . MALONE a S . LITTLE. Development, multiplexing, and application

- of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. *Am. J. Hum. Genet.* 1992, **51**(2), 251-262.
7. GOYETTE, Philippe, Pai ADITYA, Renate MILOS, Phyllis FROSST, Pamela TRAN, Zhoutao CHEN, Manuel CHAN a Rima ROZEN. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome.* 1998, **9** (8), 652-656.
 8. GRIFFIN, J H , B EVATT, T S ZIMMERMAN, A J KLEISS a C WIDEMAN. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *Journal of Clinical Investigation.* 1981-11-1 , **68**(5), 1370-1373. DOI: 10.1172/JCI110385. ISSN 0021-9738. Dostupné také z : <http://www.jci.org/articles/view/110385>
 9. HENEGARIU, O ., N . A . HEEREMA, S . R . DLOUHY, G . H . VANCE a P . H . VOGT. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques.* 1997,**23**(3), 504-511.
 10. KAČÍRKOVÁ, Petra a Vít CAMPR. *Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně.* 1 . vyd. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1853-8 .
 11. KELNAROVÁ, Jarmila. *První pomoc II: pro studenty zdravotnických oborů.* Vyd. 1 . Praha: Grada, 2007. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-2183-5 .
 12. KESSLER, Petr. Trombofilní stavy. *Interní Medicína pro praxi.* 2006, **9** , 374-379.
 13. KOSINOVÁ, Eva. *Expresí strukturálních proteinů živočišných virů v eukaryotních systémech.* Brno, 2007. Disertační práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Doc. RNDr. Miroslav Němec, CSc.

14. KŘEMEN, Jaromír, Jana STRÍBRNÁ a Petr POHLREICH. *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*. 1 . vyd. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-718-4525-6 .
15. KVASNIČKA, Jan. *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*. Vyd. 1 . Praha: Grada, 2003. ISBN 80-716-9993-4 .
16. MAMMEN, Eberhard. Sticky Platelet Syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 1999, **25**(04), 361-365. DOI: 10.1055/s -2007-994939. ISSN 0094-6176. Dostupné také z : <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s -2007-994939>
17. MANDOVEC, Antonín. *Kardiovaskulární choroby u žen*. 1 . vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2807-0 .
18. MATÝŠKOVÁ, M . a Z.ČECH. Warfarin a farmakogenetika. *Klin. Biochem. Metab.* 2009, **17**(38), 215-219.
19. MATÝŠKOVÁ, Miloslava a Ingrid HRACHOVINOVÁ. *Hematologie pro zdravotní laboranty*. Vyd. 1 . Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1999. ISBN 80-701-3278-7 .
20. MUSIL, Dalibor. Hluboká žilní trombóza – minimum pro praktické lékaře. *Med. Pro Praxi*. 2009, **6** (5), 231-234.
21. NUSSBAUM, Robert L , Roderic R . MCINNES, Huntington F . WILLARD, Margaret W . THOMPSON a Ada HAMOSH. Thompson 7th ed. /. Philadelphia:Saunders/Elsevier, c2007. ISBN 978-141-6030-805.

22. OLERUP, O . a H . ZETTERQUIST. HLA-DRB1*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: a sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens*. 1991, **37**(5), 197-204.
23. PAUN, Ovidiu a Peter SCHÖNSWETTER. Amplified Fragment Length Polymorphism: An Invaluable Fingerprinting Technique for Genomic, Transcriptomic, and Epigenetic Studies. *Methods Mol Biol*. 2012, (862), 75-87. DOI: 10.1007/978-1-61779-609-8_7 . Dostupné také z : http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-609-8_7
24. PENKA, Miroslav, Eva TESAŘOVÁ, Jan BLATNÝ, et al. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1 . vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0 .
25. POSPÍŠILOVÁ, Š ., B . TICHÝ a J . MAYER. Sekvenování lidského genomu – technologie nové generace aneb budeme rutinnû sekvenovat lidské genomy? *Časopis lékařů českých*. 2009, **148**(7), 296-302.
26. POUL, H . Trombofilní stavy významné v patogenezi žilní tromboembolické nemoci. *Vnitřní lékařství: časopis České internistické společnosti a Slovenskej internistickej spoločnosti*. Praha, 2006, **52**(S1), 17-25. ISSN 0042-773X.
27. PRINZ-LANGENOHL, R , S BRÄMSWIG, O TOBOLSKI, YM SMULDERS, DEC SMITH, PM FINGLAS a K PIETRZIK. [6S]-5 -methyltetrahydrofolate increases plasma folate more effectively than folic acid in women with the homozygous or wild-type 677C→T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase. *British Journal of Pharmacology*. 2009, **158**(8), 2014-2021. DOI: 10.1111/j .1476-5381.2009.00492.x . ISSN 00071188. Dostupné také z : <http://doi.wiley.com/10.1111/j .1476-5381.2009.00492.x>

28. RAUŠOVÁ, E ., I. HADAČOVÁ a M. MACEK. Hereditární trombofilie - jeden z modelů molekulární medicíny. *Klinická· biochemie a metabolismus*. 2005, **2** (13 (34), 68-76.
29. ROSENDAAL, F. R ., C. J. DOGGEN, A. ZIVELIN, et al. Geographic distribution of the 20210 G to a prothrombin variant. *Thromb Haemost.* 1998, **79**(4), 706-708.
30. SEIDL, Zdeněk. *Neurologie pro nelékařské zdravotnické obory*. 1 . vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2733-2 .
31. SRŠEŇ, Štefan a Klára SRŠŇOVÁ. *Základy klinické genetiky a jej molekulárna podstata*. 4 ., přepr. a rozš. vyd. Martin: Osveta, 2005. ISBN 80-806-3185-9 .
32. ŠPINAR, Jindřich a Jiří VÍTOVEC. Diagnostika a léčba chronického srdečního selhání. *Interní medicína pro praxi*. 2001, **2** , 55-60.
33. ŠTORKOVÁ, Marie. *Trombofilní genové mutace a jejich zdravotně sociální komplikace*. České Budějovice, 2009. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta. Vedoucí práce Prof. Ing. Václav Řehout, CSc.
34. VAN DER PUT, Nathalie M .J ., Fons GABREËLS, Erik M .B . STEVENS, Jan A .M . SMEITINK, Frans J .M . TRIJBELS, Tom K .A .B . ESKES, Lambert P . VAN DEN HEUVEL a Henk J . BLOM. A Second Common Mutation in the Methylene-tetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects? *The American Journal of Human Genetics*. 1998, **62**(5), 1044-1051. DOI: 10.1086/301825. ISSN 00029297. Dostupné také z : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707615249>

35. VAVRUŠKOVÁ, Klára. *Význam trombofilních mutací v klinické genetice*. Praha, 2010. Diplomová práce. Karlova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce MUDr. Miloslav Kuklík, CSc.
36. ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. Druhé, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-372-3 .
37. EGEBERG, O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh*. 1965, **15**(13), 516-530.
38. KHOR, Bernard a Elizabeth M. VAN COTT. Laboratory tests for antithrombin deficiency. *American Journal of Hematology*. 2010, **85**(12), 947-950. DOI: 10.1002/ajh.21893. ISSN 03618609. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajh.21893>
39. POORT, S. R., F. R. ROSENDAAL, P. H. REITSMA a R. M. BERTINA. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996, **88**(10), 3698-3703.
40. DEGEN, S. J. a E. W. DAVIE. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry*. 1987, **26**(19), 6165-6177.
41. BOUNAMEUAUX, H. Factor V Leiden paradox: risk of deep-vein thrombosis but not of pulmonary embolism. *Lancet*. 2000, **356**(9225), 182-183.
42. COMP, P. C., R. R. NIXON, M. R. COOPER a C. T. ESMON. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest*. 1984, **74**(6), 2082-2088.

43. KVASNIČKA, T. The Association of atherothrombosis and thrombophilias - genetic aspects. *Vnitřní Lékařství*. 2014, **60**(10), 880-884.
44. KVASNIČKA, J., J. HÁJKOVÁ, P. BOBCÍKOVÁ, T. KVASNIČKA, D. DUSKOVÁ, S. POLETÍNOVÁ a V. KIEFEROVÁ. [Prevalence of thrombophilic mutations of FV Leiden, prothrombin G20210A and PAI-1 4G/5G and their combinations in a group of 1450 healthy middle-aged individuals in the Prague and Central Bohemian regions (results of FRET real-time PCR assay)]. *Cas Lek Cesk*. 2012, **151**(2), 76-82.
45. KVASNIČKA, J. Hereditary thrombophilias--recommendations for genetic testing in the clinical praxis. *Cas Lek Cesk*. 2010, **149**(10), 468-471.
46. ZIVELIN, A., J. H. GRIFFIN, X. XU, et al. A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood*. 1997, **89**(2), 397-402.
47. PENKA, Miroslav. *Hematologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2001. ISBN 80-247-0023-9.
48. Příbalová informace kitu CVD Strip Assay

Internetové zdroje:

1. Stopping treatment with blood-thinning drug can be fatal. *Science nordic* [online]. 2012 [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: <http://sciencenordic.com/stopping-treatment-blood-thinning-drug-can-be-fatal>
2. *Embolicke pooperační komplikace* [online]. [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: <http://operativa.cz/embolicke-pooperačni-komplikace/>
3. *Infarkt myokardu* [online]. [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: <http://www2.ikem.cz/www?docid=1005912>

4. Leidenská mutace. *Wikiskripta* [online]. [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Leidenská_mutace
5. *Genetický breviř sanatoria Repromeda* [online]. [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: http://www.repromeda.cz/genetika/cs/index.php?localpage=loc_leiden.php
6. Převzato z Multimediální učebnice DNA diagnostiky.
7. Zdroj: <http://stary.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa.htm>
8. CVD Strip-Assay, informace získané od výrobce příslušného kitu.
9. *Nippon genetics* [online]. [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: <http://www.nippongenetics.eu/products/dnarna-electrophoresis/dna-ladder-molecular-weight-marker/>
10. *Štefánikova hvězdárna* [online]. [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: <http://observatory.cz/news/nizkoteplotni-plazma-zastavuje-krvaceni.html>