

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zdravotně sociální fakulta

## **Leidenova mutace – význam a způsob vyšetření**

bakalářská práce

Autor práce: Kateřina Fialová  
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Karel Čutka

Datum odevzdání práce: 3. 5. 2013

## **Abstrakt**

Tématem práce je Leidenova mutace význam a způsob vyšetření. Práce se zabývá frekvencí výskytu FV Leidenské mutace ve vzorcích vyšetřovaných v centru laboratorní medicíny BioLab, spol. s. r. o., Klatovy.

Trombofilie (nebo-li hyperkoagulační stav) je vrozená nebo získaná porucha hemostatického mechanismu, která je spjata se zvýšeným rizikem vzniku trombózy. Nejvýznamnějším a také nejčastějším projevem trombofilie je venózní nebo-li žilní tromboembolismus. Tento pojem zahrnuje jak hlubokou žilní trombózu, tak plicní embolii a na jejím vzniku se vždy podílí několik faktorů, získaných či vrozených.

Mutace faktoru V byla popsána roku 1993 jako rezistence na aktivovaný protein C (APC- rezistence). Je nejčastější vrozenou trombofilií bílé rasy a vyskytuje se až u 40% pacientů, u kterých byla diagnostikována tromboembolie. Leidenská mutace v genu pro faktor V je nejčastější genetickou predispozicí k trombózám. Riziko vzniku žilního tromboembolismu se liší podle toho jednali-li se o heterozygotního či homozygotního nosiče. Heterozygotní jedinci mají 7× vyšší riziko vzniku žilní trombózy a homozygoti mají toto riziko vyšší až 80×. Prevalence FV Leidenské mutace se ve světě pohybuje od 0 do 15 %.

APC- rezistence je způsobena bodovou mutací v polynukleotidovém řetězci genu pro faktor V. Zde dojde k záměně v pořadí nukleotidů, a to dusíkaté báze guaninu za adenin na pozici 1691 (G1691A). Takto vzniklý triplet kóduje v pozici 506 na místo aminokyseliny argininu – Arg, R, glutamin – Gln, Q (R506Q) . To způsobí odolnost aktivního faktoru V vůči proteinu C, který ho má inaktivovat. Faktor V tedy zůstává dál prokoagulační a tak roste tvorba trombinu a společně s ním riziko tromboembolické nemoci.

Cílem práce bylo shrnutí současných poznatků na téma FV Leidenské mutace- význam a způsob vyšetření, analyzovat vzorky plné krve pacientů vyšetřovaných na přenašečství Leidenské mutace v centru laboratorní medicíny BioLab, spol. s. r. o. Klatovy a následně vyhodnotit a interpretovat zjištěné výsledky.

Přenašečství FV Leidenské mutace bylo sledováno u souboru pacientů obou pohlaví pocházejících z Plzeňského a Ústeckého kraje za pomoci metody Real-time PCR. Z celkového počtu 169 vyšetřených pacientů bylo získáno 111 vzorků od žen a 58 vzorků od mužů. Mezi ženami bylo nalezeno 21 heterozygotních nosiček (18,9 %) a 1 homozygotní nosička (0,9 %) FV Leidenské mutace. V rámci mužské populace byl zjištěn výskyt 17 heterozygotů (29,3 %). Žádný z mužů nebyl nositelem homozygotního genotypu FV Leidenské mutace. Přestože byli muži dvakrát častějšími nosiči zmíněné mutace, nebyl statistickými analýzami prokázán vliv pohlaví na přenos FV Leidenské mutace ( $P=0,2$ ).

## **Abstract**

The subject of this thesis is Leiden mutation, its signification and methods of examination. This work deals with frequency of occurrence F V Leiden mutation in samples of examinants in the centre of laboratory medicine BioLab, spol. s. r. o., in Klatovy.

Thrombophilia (hypercoagulation) is a genetic or acquired failure of hemostatic mechanistic system, which is connected with increased risk of the occurrence of thrombosis. The most important and the most frequent effect of thrombophilia is the venous thromboembolism. This concept means both deep venous thrombosis and/or pulmonary embolism and their development is always caused by several factors which are genetic or acquired.

Mutation of factor V was described in 1993 as the resistance against activated protein (so called APC-resistance). It occurs most commonly as a genetic thrombophilia of white race where it can be found in 40% of patients with diagnosed thromboembolism. Leiden mutation in a gene for factor V is the most frequent predisposition for thrombosis. The risk of development of venous thromboembolism differs according as the fact if it is a heterozygotic or homozygotic carrier. Heterozygotic individuals are 7 times more riskly as for the development of venous thrombosis while the risk level in homozygotic individuals is 80 times. The rate of prevalence of FV Leiden mutation in the world ranges from 0 to 15 %.

APC- resistance is caused by point mutation in the polynucleotide chain of a gene for factor V. Here it concerns the exchange of the nucleotide sequence respectively nitrogen basis of guanine and adenine for the position 1691 (G1691A). It creates a triplet which codes in position 506 in the place of amino acid arginine -Arg, R, glutamine -Gln, Q(R506Q). It causes resistance of the active factor V against protein C, which is to inactivate it. The factor V stays henceforth pro- coagulative and thus the creation of thrombin increases together with the risk of thromboembolic disease.

The goal of this thesis was summarising of research findings related to the focused theme Leiden mutation, its signification and methods of examination, analyze whole blood samples of patients examined at Leiden mutation carrier status in the center of Laboratory Medicine BioLab, spol. s. r. o. in Klatovy and in consequence and then evaluate and interpret the results of the found out results.

Carrier of FV Leiden mutation was observed in a group of patients of both sexes coming from Plzeň and Ústí nad Labem region using real-time PCR. Of the 169 patients examined 111 samples were obtained from women and 58 samples from men. Among women there were found 21 heterozygous carriers (18.9%) and 1 homozygous carrier of (0.9%) FV Leiden mutation. The male population was observed incidence of 17 heterozygotes (29.3%). None of the men did not hold the homozygous genotype FV Leiden mutation. Although the men were twice as frequent carriers of that mutation was not statistical analyzes demonstrated the effect of gender on the transfer FV Leiden mutation ( $P = 0.2$ ).

## **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

.....

podpis

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce MUDr. Karlu Čutkovi. Dále děkuji Ing. Barboře Kváčové PhD. za její cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnovala. A v neposlední řadě Mgr. Františku Musilovi z Centra laboratorní medicíny BioLab, spol. s r. o., Klatovy.

## **Seznam použitých zkratek**

A – adenin

APC – aktivovaný protein C

Arg – arginin

DNA – deoxyribonukleová kyselina

FI- FXIII – koagulační faktory

FIa- FXIIIa – aktivované koagulační faktory

FRET – fluorescence resonance energy transfer

G – guanin

Gln – glutamin

HMWK – vysokomolekulární kininogen

kDa – kilo Dalton

MTHFR – methylentetrahydrofolátreduktáza

PAI1 – plazminogen aktivátor 1

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PCR- RFLP – polymorfismus délky restričních fragmentů (Restriction fragment length polymorphism)

PLG – plazminogen

PKK – prekalikrein

Q - glutamin

R - arginin

TAF1 – trombinem aktivovatelný inhibitor fibrinolýzy

TEN – tromboembolická nemoc

tPA – tkáňový aktivátor plazminogenu (tissue-type plasminogen activator)

uPa – urokinase-type plasminogen aktivátor

VTE – žilní tromboembolie



## OBSAH:

<b>Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Současný stav</b> .....	<b>8</b>
1.1 Hemostáza.....	8
1.1.1 Hemokoagulace.....	8
1.1.1.1 Koagulační kaskáda.....	11
1.1.1.2 Protein C.....	13
1.1.1.3 Faktor V.....	13
1.1.2 Fybrinolytický systém.....	14
1.2 Trombofilie.....	17
1.2.1 Trombofilie získané.....	17
1.2.2 Trombofilie geneticky podmíněné.....	18
1.2.2.1 FV Leidenská mutace.....	18
1.2.2.1.1 Klinické projevy tromboembolizmu u FV Leidenské mutace.....	20
1.2.2.1.2 Indikace k vyšetření na FV Leidenskou mutaci.....	22
1.3 Molekulárně genetické metody používané k detekci FVL.....	23
1.3.1 PCR- RFLP.....	23
1.3.1.1 PCR- reverzní hybridizace.....	24
1.3.3 Real-time PCR.....	24
1.3.3.1 TagMan sondy.....	25
1.3.3.2 FRET sondy.....	25
<b>2. Cíl práce</b> .....	<b>27</b>
<b>3. Materiál a metodika</b> .....	<b>28</b>
3.1 Bezpečnost práce.....	28
3.2 Odběr biologického materiálu.....	29
3.3 Izolace DNA.....	29
3.4 Real-time PCR.....	31
3.4.1 Vyhodnocení.....	32
3.5 Statistická analýza.....	33

<b>4. Výsledky.....</b>	<b>34</b>
<b>5. Diskuze.....</b>	<b>38</b>
<b>6. Závěr.....</b>	<b>40</b>
<b>7. Seznam použitých zdrojů.....</b>	<b>41</b>
<b>8. Klíčová slova.....</b>	<b>46</b>
<b>9. Přílohy.....</b>	<b>47</b>

## Úvod

Trombofilie je vrozená nebo získaná porucha hemostatického mechanismu, která je spjata se zvýšeným rizikem vzniku trombóz. Nejčastějším projevem trombofilie je žilní tromboembolie (VTE).

Mezi nejvýznamnější a nejčastější vrozené trombofilie se řadí APC (aktivovaný protein C) rezistence, která je způsobena bodovou mutací v polynukleotidovém řetězci genu pro faktor V. Zde dojde k záměně v pořadí nukleotidů, a to dusíkaté báze guaninu za adenin na pozici 1691 (G1691A). Takto vzniklý triplet kóduje v pozici 506 na místo aminokyseliny argininu – Arg, R, glutamin – Gln, Q (R506Q). To způsobí odolnost aktivního faktoru V vůči proteinu C, který ho má inaktivovat. Faktor V tedy zůstává dál prokoagulační a tak roste tvorba trombinu a společně s ním riziko tromboembolické nemoci.

Riziko vzniku žilního tromboembolismu se liší podle heterozygotní či homozygotní formy mutace. Heterozygoti mají 7× a homozygoti 80× vyšší riziko vzniku VTE.

Prevalence FV Leidenské mutace se ve světě pohybuje v rozmezí 0-15 %. V České republice se prevalence pohybuje okolo 5 % a je diagnostikována až u 40 % pacientů s VTE. Znalost nositelství FV Leidenské mutace může velmi ovlivnit léčbu a prevenci žilní trombózy, léčbu těhotenských komplikací a rozhodnout o užívání hormonální antikoncepce.

Tato práce se věnuje výskytu FV Leidenské mutace u pacientů z Plzeňského a Ústeckého kraje a vlivu pohlaví na přenašečství FV Leidenské mutace.

# **1. Současný stav**

## ***1.1 Hemostáza***

Hemostáza, nebo-li zástava krvácení, je životně důležitý děj bez jehož existence by při porušení celistvosti cévní stěny došlo ke krevním ztrátám a v konečném důsledku až k orgánovým selháním. Hemostáza je souhra několika dějů a hraje v ní roli celá řada činitelů. Celý proces je možné rozdělit do 4 dějů: vazokonstrikce, činnost krevních destiček, hemokoagulace, fibrinolýza (Kittnar et al. 2011 ,Trojan et al. 2003).

Při vazokonstrikci dochází k zúžení cév, aby se co nejvíce minimalizovala ztráta krve. K zúžení cév dochází jednak mechanicky, útlakem krve opuštějící krevní řečiště a jednak kontrakcí svalové vrstvy cévní stěny, ke které dochází díky uvolnění chemických látek při poškození tkáně (Kittnar et al. 2011).

Činností krevních destiček vzniká v místě poranění tzv. primární krevní zátka. Destičky se váží na kolagen, který se odhalí při poranění cévy, adhezi jsou aktivovány a mění svůj tvar. Vlivem trombinu, který se v malém množství vytvořil srážením krve, dochází k agregaci destiček. Na aktivované destičky se váže fibrinogen a vzniká již zmiňovaná primární krevní zátka. Tato zátka se může ještě rozplynout a odplout krví a tak je nutné, aby se vytvořila definitivní zátka z nerozpustné fibrinové sítě. K tomu dojde rozpadem destiček a uvolněním obsahu jejich granul do okolí. Uvolněné látky nastartují koagulační kaskádu a nastává proces hemokoagulace (Trojan et al. 2003).

### ***1.1.1 Hemokoagulace***

Hemokoagulace je srážení krve, kterého se účastní buněčné i plazmatické systémy, které jsou přítomné v krvi a cévní stěně. Jedná se o mechanismus, který udržuje rovnováhu mezi krvácením a krevní srážlivostí. Cílem hemokoagulace je vytvoření nerozpustné fibrinové sítě, tedy přeměna fibrinogenu na fibrin (Řehák 2011).

Látky účastníci se procesu hemokoagulace jsou nazývány koagulačními faktory (Tabulka 1). Jedná se převážně o glykoproteiny, které během krevního srážení

prodělávají strukturální změny (Pecka 2004). Většina koagulačních faktorů je syntetizována v játrech, u některých faktorů za spolupůsobení vitamínu K. Vyjma tkáňového faktoru, všechny koagulační faktory cirkulují v krevní plazmě v neaktivní formě (proenzymy, zymogeny) a ke své aktivaci vyžadují proteolytické štěpení za vzniku koagulačně aktivního enzymu (Pecka 2004, Šlechtová 2007). Jednotlivé faktory jsou označovány římskými číslicemi, podle časové posloupnosti jak byly objeveny. Současně byla ponechána i některá jejich synonyma. Aktivované formy se dále označují indexem *a* (př. FV → FVa) (Pecka 2004).

Tabulka 1: Přehled hemokoagulačních faktorů, jejich synonyma a funkce

<b>Hemokoagulační faktor</b>	<b>Synonymum</b>	<b>Funkce/aktivuje</b>
fibrinogen	faktor I	krevní koagulum, převod signálů, aktivace trombocytů
protrombin	faktor II	fibrinogen, FV, VIII, XI, XIII, trombocyty, protein C
tkáňový faktor	faktor III, tkáňový tromboplastin	zahajuje koagulační kaskádu
vápenaté ionty	faktor IV	aktivace a stabilizace FV
faktor V	proakcelerin, labilní faktor	kofaktor při aktivaci FII
faktor VII	prokonvertin, stabilní faktor	FX, IX
faktor VIII	antihemofilický faktor A	kofaktor při aktivaci FX
faktor IX	antihemofilický faktor B	FX
faktor X	Stuartův- Prowerův faktor	FII, V, VII
faktor XI	antihemofilický faktor C	FIX, XII, A $\alpha$ řetězec fibrinogenu, HMWK plazminogen
faktor XII	Hagemanův faktor	FXI, HMWK, prekalikrein
faktor XIII	fibrin- stabilizující faktor	stabilizuje fibrin
rekalikrein	Fletcherův faktor	F XII a štěpí HMWK

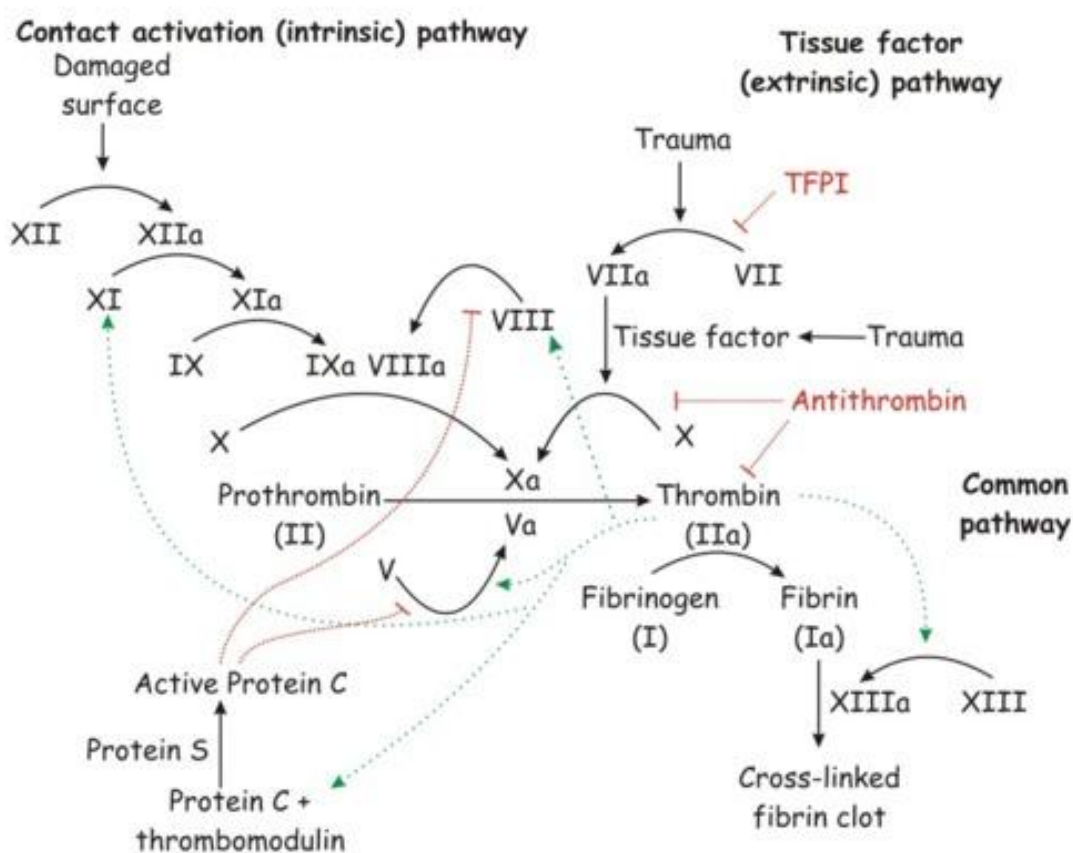
Zdroj: Penka a Tesařová 2011, Kittnar et al. 2011

poznámka: HMWK- vysokomolekulární kininogen, F- faktor

### 1.1.1.1 Koagulační kaskáda

Koagulační kaskáda je kaskádovitě aktivovaný systém, který lze rozdělit na vnější, vnitřní a společný koagulační systém. Tyto systémy se vzájemně prolínají a nelze je proto od sebe striktně oddělit (Penka 2009) (Obrázek 1).

Obrázek 1: Schéma koagulačního systému



Zdroj: <http://www.tumblr.com/tagged/coagulation%20cascade>

#### Vnější koagulační cesta

Vnější koagulační cesta je zahájena kontaktem krevní plazmy s tkáňovým faktorem. Tkáňový faktor se uvolní po porušení cévní stěny (Kittnar et al. 2011). Tento

faktor se vyskytuje na povrchu mimocévních buněk a je to komplex fosfolipidů a lipoproteinů (Řehák 2011). Tkáňový faktor je kofaktorem faktoru VII a aktivuje ho na VIIa. Společně za přítomnosti vápenatých iontů aktivují faktor X. Aktivovaný faktor X (Xa) společně s faktorem V tvoří aktivátor protrombinu a za přítomnosti vápenatých iontů je tento aktivátor schopen zajistit přeměnu protrombinu na trombin. Trombin pak aktivuje další molekuly faktoru V. Va dále podporuje přeměnu faktoru X na Xa a celý proces je takto kvantifikován ( Penka a Tesařová 2011, Kittnar et al. 2011).

#### *Vnitřní koagulační cesta*

Vnitřní koagulační cesta začíná kontaktem negativně nabitého povrchu, jakým je třeba kolagen, s faktorem XII, který je díky tomu aktivován. Kolagen dále vede k odhalení fosfolipidů z trombocytů. Tyto fosfolipidy obsahují komplex, který je nazýván destičkovým faktorem. Působením kalikreinu a prekalikreinu je štěpen faktor XI a tím vzniká jeho aktivní forma XIa. Faktorem XIa je dále aktivován faktor IX a také dochází ke štěpení kininogenu na bradykinin, což je látka s vazodilatačními účinky. Faktor IXa společně s faktorem VIIIa aktivuje faktor X. U faktoru X končí vnitřní i vnější koagulační cesta a začíná zde tzv. společná koagulační cesta (Kittnar et al. 2011, Řehák 2011)

#### *Společná koagulační cesta*

Tato cesta začíná aktivací faktoru X. Faktor Xa společně s faktorem V za účasti vápenatých iontů tvoří již zmiňovaný aktivátor protrombinu. Trombin je stěžejním enzymem celého koagulačního systému (Řehák 2011, Trojan et al. 2003).

Trombin přeměňuje fibrinogen na fibrin a také aktivuje faktor V, VIII a XIII. Váže se na protein trombomodulin na membráně endotelových buněk a tak umožňuje aktivovat hlavní antikoagulační protein C (Trojan et al. 2003).



### ***1.1.1.2 Protein C (PC)***

Protein C je glykoprotein, který je závislý na vitamínu K a je tvořen v játrech (Penka a Tesařová 2011, Malý 2004). Jeho hlavní funkcí je inaktivace aktivovaných faktorů V a VIII. Inhibitory jsou alfa1- antitrypsin a inhibitor aktivovaného proteinu C.

Společně s proteinem S, trombomodulinem, inhibitorem aktivovaného proteinu C a receptorem pro protein C na endotelu tvoří tzv. systém proteinu C (Penka a Tesařová 2011). Protein C je aktivován na aktivovaný protein C (APC) trombomodulinem, který je navázán na trombinu. Účinek trombinu se po navázání trombomodulinu stává antitrombotickým (Malý 2004). Celý tento systém má za úkol inaktivovat Va a VIIIa štěpením jejich peptidových vazeb. Faktor Va je štěpen v místech Arg 306, Arg 506 a Arg 679 a faktor VIIIa je štěpen v místech Arg 336 a Arg 562 (Dahlback 2008). Systém C je rovněž zapojený do zánětlivé reakce (Penka a Tesařová 2011).

### ***1.1.1.3 Faktor V***

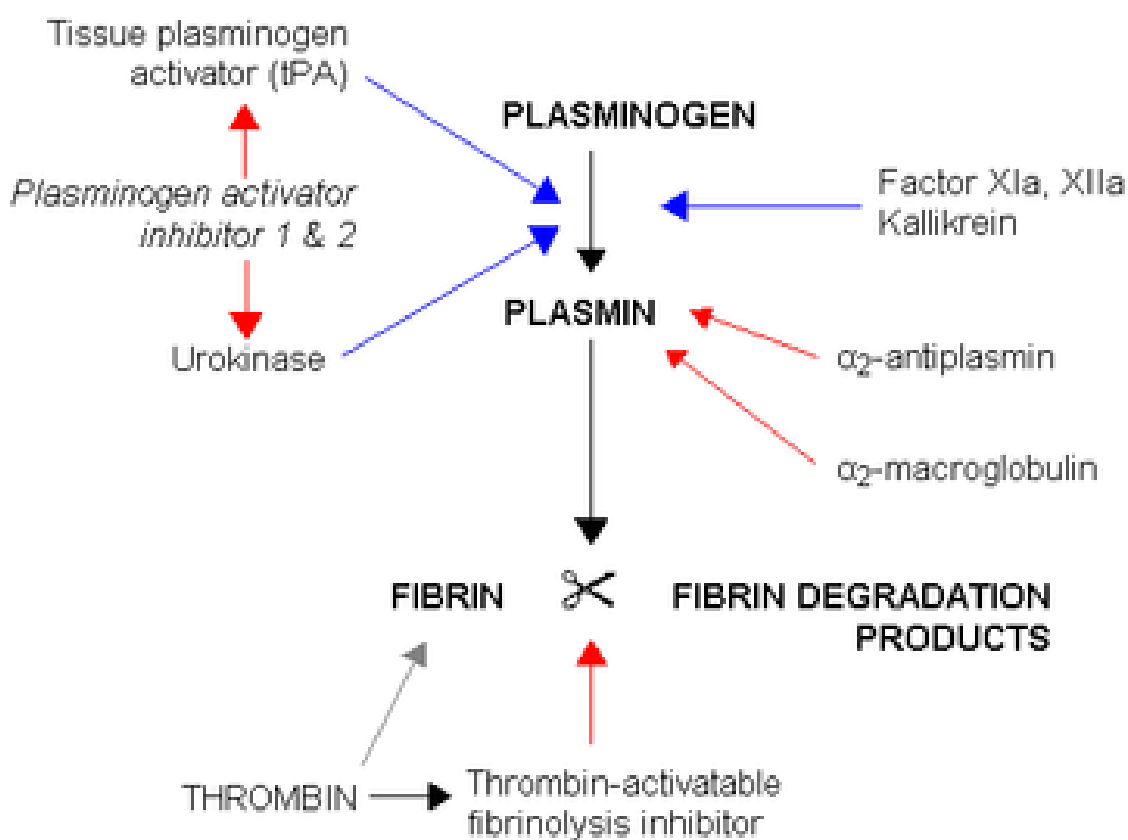
Faktor V (proakcelerin) byl objeven ve 40. letech 20. století, jeho aktivní forma byla nejprve označena jako faktor VI, později byla přejmenována na Va (Malý 2004). Je to protein o vysoké molekulové hmotnosti (330 kDa) (Dahlback 2008). 80% tohoto faktoru cirkuluje v plazmě a zbylých 20% je v krevních destičkách (Duckers et al. 2009). Minimální aktivita nezbytná k zástavě krvácení je 10-15%. Pro jeho aktivaci jsou nezbytné ionty vápníku, které jej zároveň stabilizují (Pecka 2004).

Skládá se ze tří A domén, z jedné dlouhé B domény a ze dvou C domén, které se nachází v tomto uspořádání: A1- A2- A3- B- C1- C2. Při aktivaci koagulační kaskády je faktor V štěpen v místech Arg709, Arg1018 a Arg1545, v těchto místech se odstraní B doména a uvolní se faktor Va, který se skládá z těžkého A1- A2 (105 kDa) řetězce a z lehkého řetězce A3- C1- C2 (71-74 kDa) (Duckers et al. 2009).

### 1.1.2 Fibrinolytický systém

Fibrinolýza je v dynamické rovnováze s koagulačním systémem (Marek et al. 2010). Fibrinolýza je fyziologická, vysoce kontrolovaná odpověď organismu na tvorbu fibrinových sraženin (Penka a Tesařová 2011). Jejím úkolem je zabránit nadměrnému hromadění fibrinu v krevním řečišti (Colman et al. 2006) (Obrázek 2).

Obrázek 2: Schéma fibrinolýzy



Zdroj <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Fibrinolysis.png>:

Jedná se o složitou síť aktivátorů a inhibitorů propojenou sérií pozitivních a negativních vazeb (Penka 2009). Ústředním faktorem fibrinolýzy je zymogen plazminogen, který je syntetizován v játrech a je štěpen na plazmin, pomocí aktivátorů

plazminu. Hlavními aktivátory plazminu jsou: tPA (tissue-type plasminogen activator) v cévním řečišti, uvolněný ze stresového endotelu a uPA (urokinase-type plasminogen activator) extravaskulárně, která se aktivuje z proenzymu prourokinázy (Marek et al. 2010, Penka 2009, Waisman et al. 2003). Plazminogen může být také aktivován vnitřní cestou přes koagulační faktor XII společně s vysokomolekulárním kininogenem a prekalikreinem (Penka 2009).

Fibrinolýza má stejně jako hemokoagulace své inhibitory, které brání nadbytečné proteolytické aktivitě plazminu. Hlavními inhibitory fibrinolýzy jsou: PAI-1,  $\alpha_2$ -antiplazmin a TAFI (Marek et al. 2010)

Tabulka 2: Přehled aktivátorů a inhibitorů fibrinolýzy

<b>Název</b>	<b>Zkratky</b>	<b>Funkce</b>
plazminogen	PLG	hlavní fibrinolytický proenzym
$\alpha_2$ -antiplazmin	$\alpha_2$ AP (PI)	hlavní inhibitor plazminogenu
tkáňový aktivátor plazminogenu	tPA(tissue-type plasminogen activator)	hlavní aktivátor PLG v extravaskulárním prostoru
urokináza	uPA (urokinase-type plasminogen activator)	hlavní aktivátor PLG v extracelulárním prostoru
plasminogen aktivátor 1	PAI-1	hlavní inhibitor tPA a u
trombinem aktivovatelný infibitor fibrinolýzy	TAFI	odštěpuje z fibrinu molekuly Lysin a Arginin, tím blokuje vazbu tPA i PLG na fibrin
faktor XII+ vysokomolekulární kininogen+ prekalikrein	FXII, HMWK, PKK	aktivátory PLG vnitřní cestou

Zdroj: Penka a Tesařová 2011

## ***1.2 Trombofilie***

Trombofilie (nebo-li hyperkoagulační stav) je vrozená nebo získaná porucha hemostatického mechanismu, která je spjata se zvýšeným rizikem vzniku trombóz (Kessler 2006, Penka et al. 2009). Je to zvýšená náchylnost ke tvorbě trombů, nebo-li krevních sraženin, v žilách nebo arteriích (Kvasnička 2003). Tento sklon k tvorbě krevních sraženin může být geneticky podmíněn nebo získán během života. Nejvýznamnějším a také nejčastějším projevem trombofilie je venózní nebo-li žilní tromboembolismus. Tento pojem zahrnuje jak hlubokou žilní trombózu, tak plicní embolii (Kessler 2006). Na vzniku tromboembolické nemoci (TEN) se vždy podílí několik faktorů, získaných či vrozených. V roce 1856 Virchow přišel se třemi základními faktory ovlivňujícími vznik tromboembolické nemoci, dnes nazývány jako Virchowova triáda (Dahlback 2008). Jsou to: poškození cévní stěny, hyperkoagulační stav a stáza, nebo-li zpomalení, toku krve (O' rourke et al. 2010).

Riziko TEN je různé pro dané trombofilní stavy. U homozygotních mutací je riziko vyšší než u heterozygotních. Kombinací více faktorů se relativní riziko TEN samozřejmě zvyšuje. Relativní riziko se vypočítává a vychází z rodinných a populačních studií. Riziko první tromboembolické nemoci je poměrně dobře zmapováno na rozdíl od rekurence TEN po antikoagulační léčbě. Riziko první tromboembolické nemoci je 2-3 z 1000 ročně u západní populace (Poul 2006).

### ***1.2.1 Získané trombofilie***

Mezi získané nebo-li sekundární rizikové faktory způsobující trombofilii patří věk, imobilizace, chirurgický výkon, trauma, stav po prodělané trombóze, obezita, paréza končetin, malignita, kouření, varixy dolních končetin, orální kontracepce, léčba estrogény, těhotenství i šestinedělí (Urbánková et al. 2002). Další z těchto rizikových faktorů je antifosfolipidový syndrom, autoimunitní choroby, závažné respirační onemocnění, chronické střevní záněty, nefrotický syndrom, sekundární trombocytóza,

paroxysmální oční hemoglobinurie, myeloproliferativní onemocnění, srdeční nedostatečnost NYHA III a IV (Poul 2006, Kessler 2006).

### ***1.2.2 Geneticky podmíněné trombofilie***

Mezi nejvýznamnější a nejčastější vrozené trombofilie se řadí APC rezistence, která je způsobena mutací faktoru V (FV Leiden nebo FV Cambridge). Dále mutace protrombinu 20210A, deficit proteinu C nebo S a antitrombinu, dysfibrinogenemie, homozygotní homocystinurie, sticky platelet syndrom, srpkovitá anemie (Kvasnička 2003, Kessler 2006).

Některé trombofilie nelze jednoznačně zařadit ani do jedné z těchto dvou skupin, a proto se označují jako smíšené. Do této skupiny se řadí zvýšená hladina faktoru VIII, která je podmíněna familiárně a jedinec musí mít jinou krevní skupinu než 0, nebo vyskytuje-li se FVIII jako protein akutní fáze. Dále sem patří hyperhomocysteinemie, která je podmíněna mutací MTHFR (methylentetrahydrofolátreduktáza) C677T nebo A1298C, nedostatkem vitamínu B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> nebo kyseliny listové. Dále se do této skupiny řadí zvýšená hladina fibrinogenu a faktoru IX. (Poul 2006)

#### ***1.2.2.1 FV Leidenská mutace***

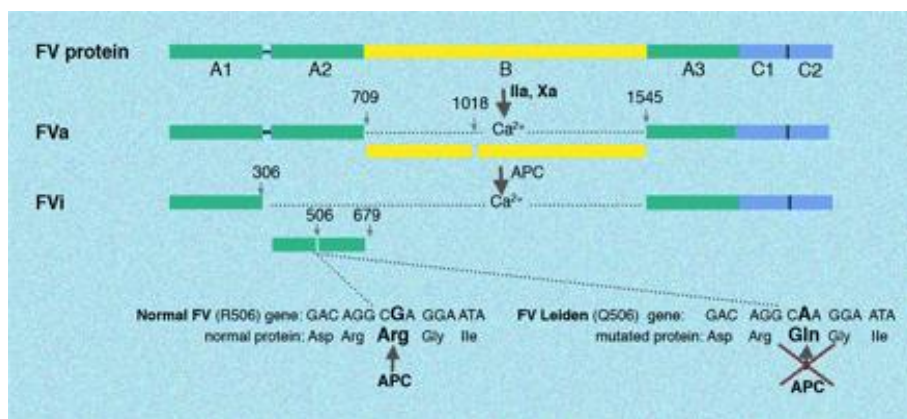
V roce 1993 Dahlback a kolektiv popsal rezistenci na aktivovaný protein C (APC rezistence), která je způsobena bodovou mutací v polynukleotidovém řetězci genu pro faktor V (Raušová et al. 2005). Název Leidenská mutace je odvozen od místa jeho objevu, nizozemského města Leiden (Penka a Tesařová 2011). Leidenská mutace v genu pro faktor V je nejčastější genetickou predispozicí k trombózám (Kreidy 2012).

Gen pro faktor V je lokalizován na prvním chromozomu 1q21- q25 a zahrnuje 25 exonů a 24 intronů (Penka a Tesařová 2011, Duckers et al. 2009). Dochází zde k záměně guaninu za adenin na pozici 1691. To vede k záměně aminokyseliny v štěpném

místě pro protein C Arg 506. Aminokyselina arginin je zaměněna za glutamin (R506Q) (Raušová et al. 2005).

Tato záměna způsobí ztrátu štěpného místa Arg 506 v aktivovaném faktoru V a tím zkomplikuje i následná štěpení v místech 306 a 679 (Penka a Tesařová 2011) (Obrázek 3). Dále je také narušena jeho funkce jako kofaktoru aktivovaného proteinu C při štěpení faktoru VIIIa (Penka 2009). To znamená, že faktor V se stává odolnější vůči proteinu C, který ho má inaktivovat a jeho rozpad je až 10× pomalejší (Penka a Tesařová 2011). Tím pádem pokračuje tvorba trombinu a dochází ke zvýšení rizika vzniku tromboembolismu (Penka 2009).

Obrázek 3: Aktivace a degradace FV a FV Leiden



Zdroj: Dahlback 2008

Riziko vzniku žilního tromboembolismu se liší podle toho jednali-li se o heterozygotního či homozygotního nosiče (Hrachovinová). Heterozygoti mají 7× vyšší riziko vzniku žilní trombózy a homozygoti mají toto riziko až 80× vyšší (Urbánková et al. 2002). Dodnes byly popsány ještě některé mutace vedoucí k APC rezistenci a to faktor V Cambridge a faktor V Hong Kong (Penka 2009).

Leidenská mutace je společně s mutací faktoru II G20210A nejčastější vrozenou trombofilií u bělochů (Alfirevic et al. 2010) a je diagnostikována až u 40 % pacientů, u kterých se vyskytla tromboembolie (Wilmer, Stocker and Kolde 2004). Výskyt Leidenské mutace ve světě se pohybuje od 0 % do 15 % (Kreidy 2012). U Afričanů, Asiatů, Eskymáků a bělochů jižní Evropy se tato mutace nevyskytuje téměř vůbec. Nejvyšší výskyt je ve východním středomoří a to v Řecku (13,4 %), Sýrii (13,6 %) a Jordánsku (12,3 %). V Turecku je výskyt také poměrně vysoký a to 7,4 % (Noha et al. 2000, Kreidy 2012). Naprosto nejvyšší prevalence Leidenské mutace byla zjištěna v Libanonu 14,4 % (Kreidy 2012). Podle studie Noha et al. (2000) mohla Leidenská mutace vzniknout právě ve východní Evropě. V ČR je prevalence kolem 5 % (Poul 2006).

#### ***1.2.2.1.1 Klinické projevy tromboembolismu u FV Leidenské mutace***

U mnoha jedinců s mutací FV Leiden se trombóza nikdy neobjeví. Její klinické projevy jsou ovlivněny řadou faktorů:

##### *1) počet alel FVLeiden (heterozygot, homozygot)*

Riziko vzniku tromboembolie je u heterozygotních nosičů 7× vyšší než u zdravých jedinců. U homozygotních nosičů FV Leidenské mutace je riziko vyšší až 80×. U homozygotních nosičů je riziko tromboembolismu vyšší u pacientů mladšího věku (Kujovich 2010).

##### *2) koexistence genetických abnormalit*

Riziko tromboembolie je vyšší vyskytnou-li se společně s mutací faktoru V Leiden další vrozené trombofilie. Dle studie Emmerich et al. (2001) heterozygot FV Leiden + heterozygot protrombin 20210A, patřící mezi nejčastější mutace, zvyšuje



riziko vzniku trombózy 20-ti násobně. To dokládá multiplikační efekt více faktorů na celkové riziko vzniku trombózy (Kujovich 2010).

Riziko VTE je trojnásobně vyšší u pacientů s FV Leidenskou mutací v jejichž rodině se vyskytla trombóza. Pětinásobně vyšší u pacientů v jejichž rodině se vyskytla trombóza před dosažením 50-ti let. Osmnáctinásobně vyšší u těch v jejichž rodině se vyskytla trombóza u dvou a více příbuzných (Kujovich 2010).

### 3) získané trombofilní poruchy

Získaných predispozic k trombofilii ve spojitosti s FV Leidenskou mutací je celá řada. Hormonální antikoncepce a těhotenství patří mezi ty nejčastější.

#### *Hormonální antikoncepce*

Užívání hormonální antikoncepce zvyšuje riziko TEN 4 násobně přidá-li se k tomu heterozygotní forma FV Leidenské mutace je toto riziko 30-ti násobné (Grody 2007). U homozygotů je riziko až 100 násobné. Žilní tromboembolie se vyskytuje u 20-60 % nosiček heterozygotní formy Leidenské mutace užívajících hormonální antikoncepci. Riziko vzniku trombózy také záleží na složení antikoncepce (Kujovich 2010).

#### *Těhotenství a šestinedělí*

Těhotenství a šestinedělí patří mezi získané rizikové faktory vzniku trombózy. V době těhotenství se výrazně zvýší hladina některých koagulačních faktorů a to: faktoru II, VII, VIII, X a XII a fibrinogenu. Hladina faktoru V a faktoru IX zůstává stejná. Od 2. trimestru je pozorována snížená hladina proteinu S a také proteinu C, která se nazývá získanou rezistencí k proteinu C ((Procházka et al. 2004). Tlak zvětšené dělohy na pánevní žíly vede ke zpomalení toku krve. V těhotenství nastává žilní hypertenze, a to vede ke špatné funkci cévní stěny v pánevním řečišti (Poul 2006).

Tímto jsou splněny všechny tři Virchowovy faktory pro vznik tromboembolické nemoci.

Plicní embolie je nejčastější příčinou úmrtí v těhotenství a žilní tromboembolie postihuje 1 ženu z 1000 těhotných. Riziko vzniku tromboembolie je u těhotných 6x až 10x vyšší než u netěhotných žen a po porodu se toto riziko ještě mírně zvyšuje (Poul 2006). Pokud se k tomu vyskytne ještě další rizikový faktor, vznik tromboembolické příhody se dále navyšuje.

Trombotická příhoda však často komplikuje průběh těhotenství, a to těmito obtížemi: rekurentními těhotenskými ztrátami, předčasným porodem, časným rozvojem preeklampsie, abrupcí placenty či placentární insuficiencí a růstovou retardací plodu, včetně nitroděložní smrti plodu (Carp et al. 2002, Kupferminc 2003).

#### ***1.2.2.1.2 Indikace k vyšetření přenašečství FV Leidenské mutace***

Vyšetření na FV Leidenskou mutaci se doporučuje v těchto případech:

- každá žilní trombóza ve věku pod 50 let
- žilní trombóza v nezvyklých místech ( jaterní, mezenterické, mozkové cévy )
- trombóza u těhotných žen nebo u žen užívající hormonální antikoncepci
- žilní trombóza a silná rodinná anamnéza trombotického onemocnění
- příbuzní osob s žilní trombózou pod 50 let věku
- infarkt myokardu u žen kuřáků pod 50 let věku

Některé indikace by měly být zváženy specialistou:

- žilní trombóza ve věku nad 50 let, mimo případů kdy je přítomno maligní onemocnění
- příbuzní osob, u kterých je známa přítomnost FV Leidenské mutace plánují-li těhotenství či užívání hormonální antikoncepce
- ženy s opakující se potraty, s nevysvětlitelnou těžkou preeklampsií, abrupcí placenty, nitroděložním zpomalením růstu nebo narozením mrtvého dítěte

(Grody et al. 2007)

### ***1.3 Molekulárně genetické metody používané k detekci přenašečství Leidenské mutace***

K detekci mutace FV Leiden jsou používány metody založené na polymerázové řetězové reakci (Hrachovinová). Polymerázová řetězová reakce umožňuje namnožení specifického úseku DNA (Penka a Tesařová 2011).

#### ***1.3.1 PCR- RFLP***

PCR- RFLP nebo-li polymorfismus délky restrikčních fragmentů je metoda používaná pro typizaci úseku cílové DNA. Tato metoda je závislá na volbě primerů. V její závislosti pak může být provedena analýza jakéhokoliv genu. Úsek DNA se zmnoží za určitých podmínek pomocí primerů, které se připojují ke koncovým oblastem. Výsledkem jsou namnožené úseky o stejné délce, které se určují pomocí elektroforézy. Ty jsou štěpeny restrikční endonukleázou a znovu elektroforeticky analyzovány. Vzorky jsou pak rozděleny na základě podobnosti spekter fragmentů namnožené DNA

(Šmarda et al. 2005). Do nedávné doby byla detekce FV Leidenské mutace založena na této metodice.

### ***1.3.2 PCR- reverzní hybridizace***

Při použití této metody je nejprve provedena klasická PCR, při které je namnožen úsek DNA, ve kterém je předpokládaná mutace. Následuje hybridizace DNA se sondou, která je imobilizována na nitrocelulóзовé membráně a dojde k vazbě mezi vzorkem a sondou. Na stripech je sonda jak pro wild type alelu, tak pro mutovanou alelu, aby bylo možné rozlišit zdravého jedince, heterozygota nebo homozygota. Na tuto metodu jsou většinou používány komerčně vyráběné kity (Horák et al. 2010).

### ***1.3.3 Real-time PCR***

Tato metoda se stává v laboratořích oblíbenou vzhledem k dostupnosti komerčně vyráběných kitů, jejichž použití je komfortnější, rychlejší a finančně ne tolik náročné.

Real time PCR je založena na sledování průběhu reakce. Umožňuje kvantifikaci sekvence nově vzniklé DNA, a proto je řazena mezi kvantitativní metodu polymerázové řetězové reakce (Q-PCR). K jejímu zjišťování se využívají barviva, které mají zvýšenou schopnost vmezeření se do dvouřetězcové DNA. K tomuto se používá například barvivo SYBR Green. Častěji se však využívají fluorescenčně značené jednořetězcové oligonukleotidové sondy. Sondy hydrolizační nebo-li TagMan sondy a FRET sondy. Tyto sondy se navážou na analyzovanou sekvenci namnožené DNA ohraničené primery (Penka a Tesařová 2011, Dorak 2006).

Sondy se používají k rozlišení mezi mutantní alelou a takzvanou wild- type alelou, což je alela zdravá, bez přítomnosti mutace. Jestliže je nárůst fluorescence v kanálu identifikující wild type alelu, ale v kanálu pro mutantní alelu není, je vzorek označen jako wild-type. Pokud je nárůst fluorescence v kanálu identifikující mutantní

alelu, ale v kanálu pro alelu wild-type není, je tento vzorek označen jako mutantní. Jestliže je nárůst fluorescence v obou kanálech je tento vzorek označen jako heterozygotní (Bustin 2005).

### ***1.3.3.1 TagMan sondy***

Jsou to oligonukleotidy, které jsou delší než primery a mají přibližně o 10° C vyšší teplotu tání. Jsou značeny dvěma různými fluoresceiny. Jeden je navázán na 5' konci. Ten se nazývá „reportér“ a na 3' konci je navázán tzv. „zhášeč“, nebo-li tlumič (Šmarda et al. 2005). Reportér, po ozáření, vyzařuje energii s kratší vlnovou délkou. Naopak zhášeč vyzařuje energii s delší vlnovou délkou. Taq DNA polymeráza, která provádí prodlužování řetězce od primeru k sondě, a díky schopnosti odbourávat řetězce nukleových kyselin od 5' konce, postupně štěpí navázanou sondu. Tak se fluoresceiny dostanou do kontaktu a zhášeč přestane pohlcovat energii excitovanou reportérem. Tím dojde k nárůstu fluorescence, která odpovídá vyzářenému světlu rozštěpené sondy (Penka a Tesařová 2011, Bustin 2005).

### ***1.3.3.2 FRET sondy***

Tyto sondy využívají přenos energie fluorescenční rezonancí mezi sondami. Jsou používány ve dvojici a každá z nich je komplementární k určité sekvenci cílové DNA v těsné blízkosti, obvykle s dvounukleotidovou mezerou. Jedna sonda má na svém 3' konci navázaný donorový fluorofor a druhá má na svém 5' konci navázaný akceptorový fluorofor. Donor po vybuzení přenáší energii na akceptor druhé sondy a ta emituje fluorescenci, která je zaznamenávána přístrojem (Pavlík 2004).

Pro tyto metody byly vyvinuty speciální přístroje tzv. termocyklery, které sledují amplifikaci v průběhu celé reakce. Přístroj po každém cyklu změří velikost vyzářeného světla fluorescenčními barvivami. Množství fluorescence odpovídá množství produktu. Termocykler ukazuje množství fluorescence v reálném čase. Kvantifikace se provádí

pomocí amplifikační křivky vynesení naměřené fluorescence oproti příslušnému cyklu PCR. Tyto křivky jsou vyhodnocovány a stanoví se hodnota  $C_t$ , což je tzv. threshold. Treshold udává počet cyklů, ve kterém došlo k významnému nárůstu fluorescence. U detekce genové mutace se provádí relativní kvantifikace, kde jsou změny vyjádřeny poměrem ke kontrolnímu vzorku (Penka a Tesařová 2011).

## **2. Cíl práce**

Cílem práce bylo shrnout současné poznatky na téma Leidenská mutace-význam a způsob vyšetření, analyzovat vzorky plné krve pacientů vyšetřovaných na přenašečství Leidenské mutace v centru laboratorní medicíny BioLab, spol. s. r. o. Klatovy a následně vyhodnotit a interpretovat zjištěné výsledky.

### **3. Materiál a metody**

Laboratorní část mé bakalářské práce probíhala v centru laboratorní medicíny BioLab, spol. s r. o., Klatovy. Výzkum probíhal od prosince 2011 do března 2012. V průběhu těchto čtyř měsíců bylo na FV Leidenskou mutaci v centru zanalyzováno 169 vzorků. Z toho bylo 111 žen a 58 mužů. Vzorky pacientů pocházeli z Ústeckého a Plzeňského kraje.

Ke každému vzorku byl získán informovaný souhlas pacienta s genetickým laboratorním vyšetřením. (Příloha 1)

#### ***3.1 Bezpečnost práce a správná laboratorní praxe***

Při práci s biologickým materiálem musí každý pracovník v oblasti vyšetření dodržovat bezpečnostní pokyny a dodržovat zásady správné laboratorní praxe. Zpracovávaný materiál je považován za potenciálně infekční.



Bezpečnostní opatření:

1. V laboratoři je nepřipustné jíst, pít, kouřit a uchovávat jídlo.
2. Při práci je nutné používat ochranné pracovní pomůcky.
3. S materiálem je třeba zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem.
4. Dodržovat postupy, které jsou uvedené v Bezpečnostních listech roztoků a chemikálií.
5. Veškeré kroky je nutné provádět za zvýšené opatrnosti a respektovat pokyny Bezpečnosti práce s karcinogenními a teratogenními látkami. (zdroj: Laboratoř Centra lékařské genetiky s.r.o.)

Při převzetí vzorku laboratoří je nutné řádně zkontrolovat označení odběrových zkumavek se žádankou o vyšetření. Vzorek musí být řádně označen a zaevidován do databáze DNA.

### ***3.2 Odběr biologického materiálu***

Plná krev byla pacientům odebírána v různých ambulancích v množství cca 3ml do odběrové soupravy. Ihned po odběru byla sanitním vozem dovezena do laboratoře centra laboratorní medicíny BioLab, spol. s. r. o., Klatovy. Po převzetí laboratoří byla krev zkontrolována a zaevidována. Plná krev byla uchovávána v chladničce při teplotě 4°C a po zpracování byla zlikvidována v souladu s předpisy.

### ***3.3 Izolace DNA***

K izolaci genomické DNA z plné krve byl použit QuickGene DNA whole blood kit S od společnosti FUJIFILM.

## Reagencie

- proteáza (EDB)
- lyzační pufr (LDB)
- promývací pufr (WDB)
- eluční pufr (CDB)
- 96% etanol
- destilovaná voda

## Spotřební a pomocný materiál

- mikrozkušavky (1,5 ml)
- sběrné zkumavky
- kolonky se silikagelem

## Vybavení

- přístroj QuickGene
- mikropipeta + špičky
- vortex
- stojánek na zkumavky
- termoblok
- centrifuga

Do mikroskopické zkumavky bylo napipetováno 30  $\mu$ l proteázy a k tomu bylo přidáno 200  $\mu$ l krve. Poté bylo přidáno 250  $\mu$ l lyzačního pufru. Díky proteáze a lyzačnímu pufru dojde k lýze buněk. Celý obsah zkumavky byl cca 20 s vortexován a poté zcentrifugován. Dalším krokem byla inkubace mikroskopické zkumavky v termobloku, který byl zahřátý na 56°C, po dobu 2 min. Po vyjmutí z termobloku bylo přidáno 250  $\mu$ l 96% etanolu, který vysráží DNA. Zkumavka byla ještě jednou zvortexována.

Lyzát byl poté celý přepipetován do kolonky se silikagelem a vložen do přístroje Quick- Gene Mini80. Po zapnutí přístroje byl lyzát pod tlakem přesán přes membránu se silikagelem. Dále bylo do kolonky napipetováno 750  $\mu$ l promývacího roztoku a pomocí přístroje opět přesáto. Tento postup byl ještě dvakrát zopakován. Po promytí byla kolonka na přístroji přendána do eluční pozice, kde musí být umístěna nová mikroskopická zkumavka. Do kolonky bylo napipetováno 100  $\mu$ l elučního pufru a opět pod tlakem přesáto do mikroskopické zkumavky. V mikroskopické zkumavce byla obsažena genomická DNA. DNA byla zamrazena na -20°C. Po nahromadění 15- 20 vzorků byla provedena real-time PCR.

### **3.4 Real-time PCR**

Reagencie

- mastermix GeneProof V Leiden PCR kit od společnosti GeneProof

Spotřební materiál

- mikroskopické zkumavky (1, 5 ml)

## Vybavení

- sterilní box
- mikropipeta+ špičky
- Termocykler RotorGene 3000
- chladicí blok

Mikrozkumavky byly nejprve vloženy do chladicího bloku. Dále bylo do mikrozkumavek napipetováno 18  $\mu$ l mastermixu a k tomu 2  $\mu$ l DNA. Do každého běhu musela být také zařazena negativní a pozitivní kontrola. Jako negativní kontrola se použila destilovaná voda místo DNA. Pro pozitivní kontrolu byl použit vzorek, u kterého již byl detekován FV Leidenská mutace. Po napipetování všech vzorků, byly mikrozkumavky přendány do kotouče vyjmutého z termocycleru, pokud nebyl kotouč celý zaplněn mikrozkumavkami se vzorky, musel být doplněn prázdnými, kvůli vyvážení. Poté byly mikrozkumavky zajištěny prstencem. Dalším krokem bylo přendání kotouče do termocycleru. Po zajištění kotouče v termocycleru byla spuštěna samotná analýza.

Amplifikace probíhala 82 minut v tomto teplotním profilu:

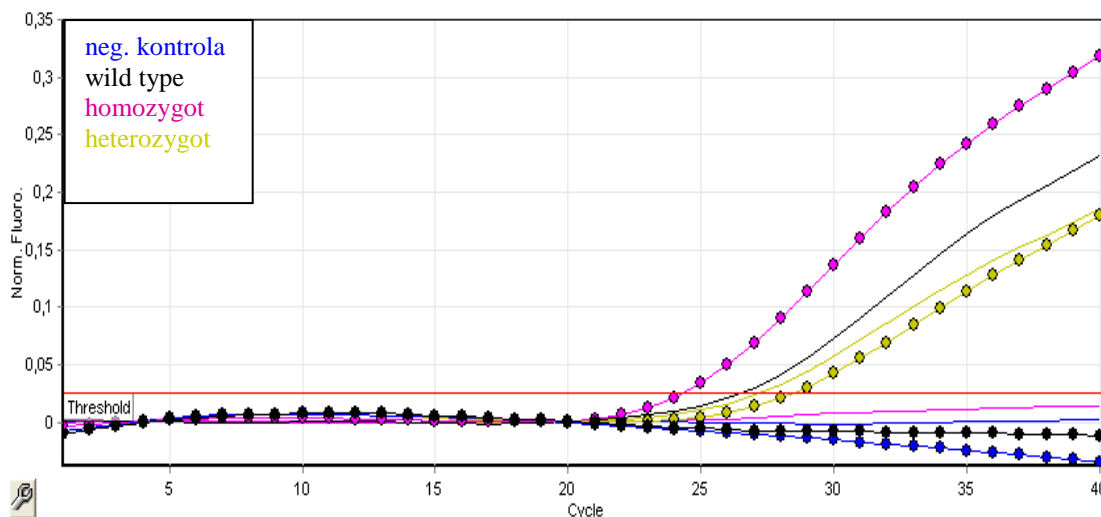
- počáteční denaturace na 95°C 10 min
- 40 cyklů ve 3 krocích:
  - denaturace 95° C 10 s
  - annealing 64° C 20 s
  - elongace 72° C 20 s

### ***3.4.1 Vyhodnocení***

Výstupem analýzy byla amplifikační křivka, která uvádí závislost fluorescence na počtu cyklů. Vyhodnocení vzorků bylo provedeno softwarem Rotor-Gene 6. Odečet

fluorescence byl prováděn při 530 nm v kanálu JOE, pro mutovanou alelu a při 470 nm v kanálu FAM, pro zdravou alelu (Obrázek 4).

Obrázek 4: Graf závislosti fluorescence na počtu cyklů



Zdroj: BioLab Klatovy spol. s. r. o.

Při záchytu homozygotního nosiče byl proveden nový kontrolní odběr krve a následná analýza DNA.

### 3.5 Statistická analýza

Vztahy mezi výskytem heterozygotní a homozygotní formy FV Leidenské mutace v závislosti na pohlaví byly analyzovány pomocí programu Epi Info (TM) 7.1.1.14 (Centers for Disease Control and Prevention, USA). Pro vyhodnocení jednotlivých proměnných byl použit chí-kvadrát test.

#### 4. Výsledky

Pro praktickou část bakalářské práce bylo analyzováno 169 vzorků. Z toho bylo 111 vzorků od žen a 58 vzorků od mužů. 50% vzorků pocházelo z Ústeckého kraje a 50% z Plzeňského kraje.

Mezi ženami byl nejčastější výskyt heterozygotní formy FV Leidenské mutace u žen ve věku 54-63 let a u žen starších 74 let. Z 15 žen ve věku 54-63 let byla u 1/3 zjištěna tato forma mutace. Ze tří žen, starších 74 let, byla tato forma zjištěna u 2/3. Homozygotní forma FV Leidenské mutace byla zaznamenána jedna, a to u 40- ti leté ženy (Tabulka 1).

Tabulka 1: Výskyt heterozygotní a homozygotní formy FV Leidenské mutace u žen v závislosti na věku pacientky

Věk (roky)	Wild type	Heterozygot	Homozygot
14-23	16	4	0
24-33	19	2	0
34-43	17	3	1
44-53	19	4	0
54-63	10	5	0
64-73	7	1	0
74≤	1	2	0
<b>Celkem</b>	<b>89</b>	<b>21</b>	<b>1</b>

U mužů nebyla zaznamenána homozygotní forma FV Leidenské mutace. Heterozygotní forma byla nejčastěji prokázána u mužů mladého věku od 14- ti do 23 let, téměř 1/2 vyšetřovaných měla tuto mutaci. Naopak nulový výskyt byl u mužů středního věku. (Tabulka 2)

Tabulka 2: Výskyt heterozygotní a homozygotní formy FV Leidenské mutace u žen v závislosti na věku pacienta

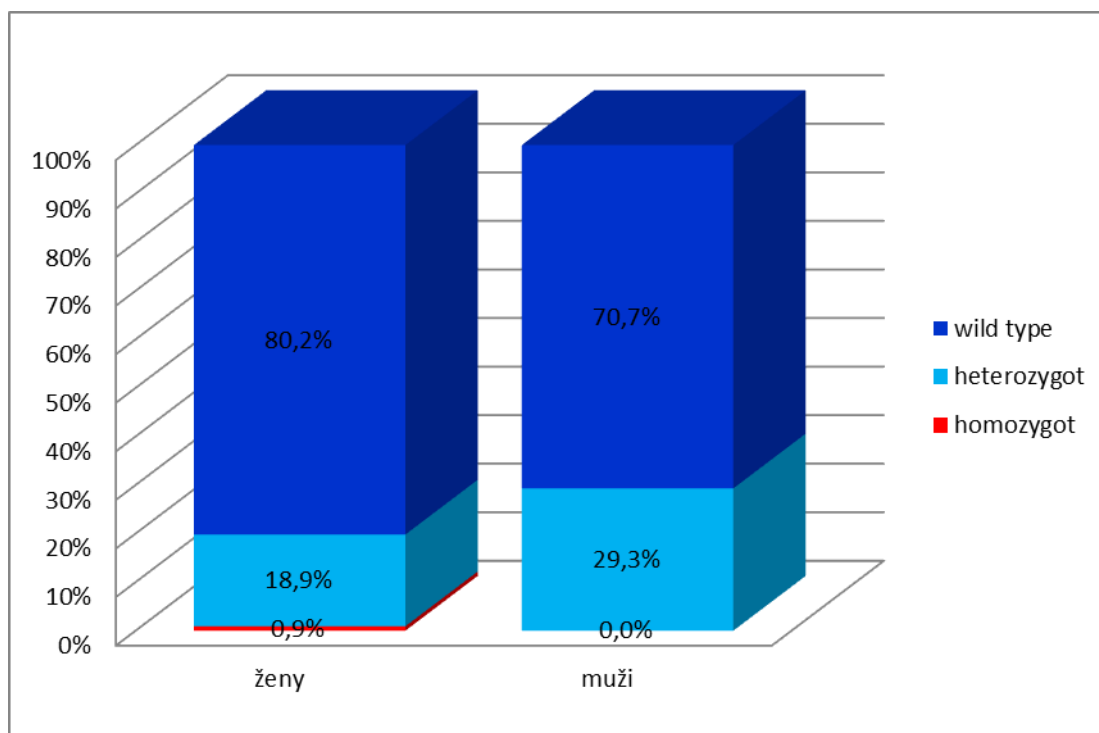
<b>Věk (roky)</b>	<b>Wild type</b>	<b>Heterozygot</b>	<b>Homozygot</b>
14-23	7	6	0
24-33	6	2	0
34-43	5	2	0
44-53	6	0	0
54-63	7	3	0
64-73	6	4	0
74≤	4	0	0
<b>Celkem</b>	<b>41</b>	<b>17</b>	<b>0</b>

Ze 111 vzorků od žen bylo zaznamenáno 21 heterozygotních nositelek, což odpovídá 18,9 % a 1 homozygotní nositelka (0,9 %).

Mezi 58 muži bylo zaznamenáno 17 heterozygotních nosičů, což odpovídá 29,3 % a žádný homozygot.

Statistická analýza neprokázala vliv pohlaví na přenašečství FV Leidenské mutace ( $\chi^2 = 1,44$ ;  $d.f. = 1$ ;  $p = 0,23$ ), přestože v populaci mužů byl zjištěn 2× častější výskyt heterozygotů (graf 1).

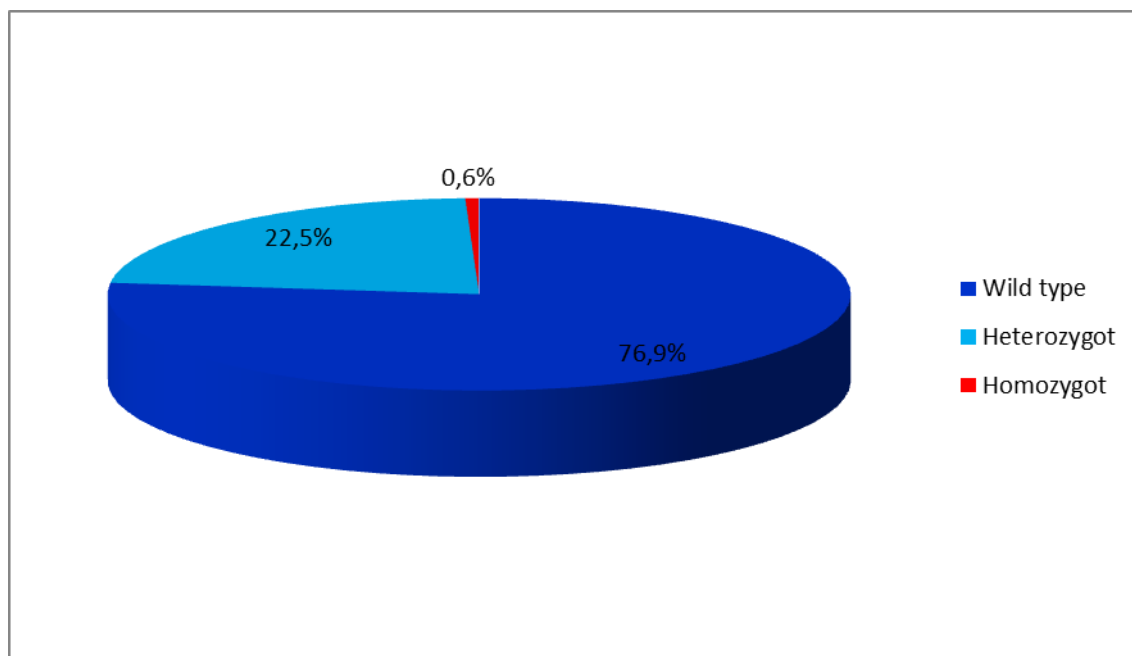
Graf 1: Frekvence genotypů FL Leidenské mutace v závislosti na pohlaví



Výskyt heterozygotů dohromady u všech vyšetřovaných byl 22,5 % a výskyt homozygotů 0,6 % (graf 2)



Graf 2: Procentuální vyjádření genotypizace všech analyzovaných vzorků



## 5. Diskuze

FV Leidenská mutace patří mezi nejčastější vrozené trombofilie u bílé rasy a znalost nositelství této mutace může velmi ovlivnit léčbu a prevenci žilní trombózy, léčbu těhotenských komplikací a rozhodnout o užívání hormonální antikoncepce (Grody et al. 2007). K detekci FV Leidenské mutace se běžně užívají molekulárně-biologické metody založené na amplifikaci DNA. Dle studie Loew et al. (2005) může být FV Leidenská mutace získána transplantací jater. V případě podezření je pak nutné provést molekulárně-biologický test u dárce tkáně. Na pracovišti centra laboratorní medicíny BioLab, spol. s r. o., Klatovy se využívá metoda Real-time PCR.

Názory na provádění testů se značně liší. Podle Grody et al. (2007) by bylo užitečné provádět testy u všech pacientů se zvýšeným rizikem recidivy. Simioni et al. (1997) a Ridker et al. (1995) uvádějí zvýšené riziko u heterozygotních nosičů FV Leidenské mutace. Naopak Eichinger et al. (1997) a Hyers et al. (1998) nezjistili žádnou souvislost mezi rizikem recidivy trombózy a nosičstvím heterozygotní formy mutace. Podle Hyers et al. (1998) by měla být u pacientů s recidivující trombózou zahájena celoživotní antikoagulační terapie, bez ohledu na genetické predispozice. Celoživotní antikoagulační terapie by měla být také zahájena u všech homozygotních nosičů FV Leidenské mutace (Bauer 1995). Před zahájením antikoagulační profylaxe je však nutné zvážit riziko možného krvácení (Gitter et al. 1995). Znalost nositelství FV Leidenské mutace může být velmi užitečná v období těhotenství, když dochází k opakovaným ztrátám plodu a dalším nevysvětlitelným komplikacím. Přesto se rutinní screening u těhotných žen nedoporučuje. Testování by měly být podrobeny pouze ženy s opakovanými ztrátami plodu a ženy s anamnézou tromboembolizmu v rodině (Grody et al. 2007). Zahájení správné antikoagulační terapie, může těmto ženám umožnit donošení plodu bez větších komplikací (Ridker et al. 1998).

Někteří lékaři jsou pro zavedení vyšetření na přenašečství FV Leidenské mutace u žen, které zvažují hormonální antikoncepci. Na druhé straně je však velká nákladovost vyšetření u tak velké populace. Nehledě na to, že ženy s FV Leidenskou mutací by se musely spolehnout na jiné formy antikoncepce, většinou méně účinné, tím by se zvýšil

počet těhotenství a následných možných těhotenských komplikací (Grody 2007). Aby se zabránilo jednomu úmrtí na základě tromboembolie spojené s užíváním hormonální antikoncepce u nosiček FV Leidenské mutace musely by být podle Vandembroucke (1996) vyšetřeny až 2 000 000 žen.

Dle studie Kreidy (2012) se FV Leidenská mutace nejčastěji vyskytuje u obyvatel Libanonu, tedy na východu Evropy, a to ve 14,4%. Naopak Schroder et al. (1996) uvádí výskyt u německé populace, tedy ve střední Evropě kam se řadí také Česká Republika, kolem 6 %. Obdobné výsledky, 4,5 % prevalenci FV Leidenské mutace v české populaci, uvádí ve své studii Kvasnička et al. (2012). Ve srovnání s uvedenými studiemi jsme prokázali několikanásobně vyšší výskyt (22,5 %) FV Leidenské mutace u testované skupiny pacientů. Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben odlišnou skupinou vyšetřovaných vzorků. Kvasnička a Schroder zkoumali prevalenci u zdravé populace, kdežto v této práci byla použita skupina pacientů s podezřením na FV Leidenskou mutaci. Podle některých studií je u pacientů s trombózou výskyt kolem 16-29 % (Alfirevic 2009, Honzák 1999). Což by odpovídalo mým hodnotám.

Dle studie Aryurachai et al. (2012) je přenašečství FV Leidenské mutace závislé na mužském pohlaví. Statistická analýza výsledků zjištěných v této studii neprokázala vliv pohlaví na přenašečství FV Leidenské mutace ( $\chi^2 = 1,44$ ; *d.f.* = 1; *p* = 0,23), přestože v populaci mužů byl zjištěn 2× častější výskyt heterozygotů. Ke stejnému závěru došel ve své studii Noha et al. (2000). Noha et al. (2000) prokázal četnost výskytu homozygotní formy FV Leidenské mutace 0,6 % v Libanonu. Výsledky této práce prokázaly 1 homozygotního nosiče FV Leidenské mutace, tedy 0,6% výskyt z testované skupiny. Přestože údaje o výskytu homozygotních nosičů se nápadně shodují, nelze na základě jediného zachyceného případu konstatovat žádné hlubší závěry. Navíc Kvasnička et al. (2012) prokázal pouze 0,07% výskyt homozygotních nosičů FV Leidenské mutace v České republice. Jeho analýza však probíhala u zdravé populace.

## **6. Závěr**

I. V průběhu zpracování této práce jsem se seznámila s postupy a metodami využívanými k analýze FV Leidenské mutace.

II. Mezi muži byl nejčastější výskyt FV Leidenské mutace u pacientů ve věku 14-43 let.

III. Mezi ženami byl nejčastější výskyt FV Leidenské mutace zaznamenán u pacientek ve věku 54-63 let a u starších 74 let.

IV. Nebyl prokázán vliv pohlaví na přenašečství FV Leidenské mutace ve sledované skupině pacientů.

V. Celková prevalence FV Leidenské mutace v testované skupině byla výrazně vyšší, než je republikový průměr.

## **7. Seznam použitých zdrojů**

ALFIREVIC, Z., et al. (2010) Frequency of factor II G20210A, factor V Leiden, MTHFR C677T and PAI-1 5G/4G polymorphism in patients with venous thromboembolism: Croatian case control study. *Biochemia Medica.*, 20, 2: 229-35

ARYURACHAI, K., et al. (2012) Prevalence of factor V Leiden (G1691A) and prothrombin gene mutation (G20210A) among different ethnic groups in Thai hospitals. *Journal of Hematology and Transfusion Medicine* 22, 2: 115- 120

BAUER, K. A. (1995) Management of patients with hereditary defects predisposing to thrombosis including pregnant women. *Thromb Haemost.* 74:94-100.

BUSTIN, S. A. (2005) Real-time PCR. *Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics*, 10: 1117-1125.

CARP, H., et al. (2002): Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction.* 17(6): 1633-1637

COLMAN, W. R., et al. (2006) *Hemostasis And Thrombosis: Basic Principles And Clinical Practise.* 5<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams and Wilkins. 1827 p.

DAHLBÄCK, B. (2008) Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood*, 112.1: 19-27.

DORAK, M. T. (2006) *Real-time PCR.* Taylor & Francis, 331 p.

DUCKERS, C., et al. (2009) Advances in understanding the bleeding diathesis in factor V deficiency. *British journal of haematology*, 146.1: 17-26.

EICHINGER, S. et al. (1997) The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with and without factor V Leiden. *Thromb Haemost.* 77:624-628.

EMMERICH, J., et al. (2001) Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism--pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost.* 86(3):809-16.

GITTER, M. J. et al., (1995) Bleeding and thromboembolism during anticoagulant therapy: a population-based study in Rochester. *Mayo Clin Proc.* 70: 725-733.

GRODY, W. W., et al. (2007) American College of Medical Genetics Consensus Statement on Factor V Leiden Mutation Testing. [online] [cit. 2013-04-1] Dostupné z: <http://www.acmg.net/resources/policies/pol-009.asp>

HORÁK, J., a kol. (2010) Hemochromatóza. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 232 s. + 16 s. barevné přílohy

HONZÁK, R. (1999) Factor V Leiden and the Slovak Population. *Prakt. Léč.* 12: 845-850

HRACHOVINOVÁ, I. Návrh směrnice pro správnou laboratorní praxi vyšetření mutace FV Leiden v genu pro koagulační faktor V. [online] [cit. 2013-04-19] Dostupné z: [www.slg.cz/system/files/blp-fII-20210a-hrachovinova.pdf](http://www.slg.cz/system/files/blp-fII-20210a-hrachovinova.pdf)

HYERS, T. M. et al. (1998) Antithrombotic therapy for venous thromboembolism. *Chest* . 114(Suppl):531S-560S.

KESSLER, P. (2006) Trombofilní stavy. *Interní Med.* 9: 374–379

KITTNAR, O. et al. (2011) Lékařská fyziologie. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 800 s.

KREIDY, R. (2012) Factor V Leiden Mutation: A Common Risk Factor for Venous Thrombosis among Lebanese Patients. *Thrombosis*, 2012, 4 p.

KVASNIČKA, J. (2003) Žilní a tepenná trombofilie. *Interv Akut Kardiol.* 2:23–29

KVASNIČKA, J., et al. (2012) 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. *Čas Lek Česk.* 151(2):76-82.

KUPFERMINC, M. (2003): Trombophilia and pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*, I, 111.

LOEW, A., et al. (2005) Resistance to activated protein C caused by factor V Leiden mutation and orthotopic liver transplantation. *Transplantation.* 27; 79(10): 1422-1427

MALÝ, M., VOJÁČEK, J., a kol. (2004) Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi. Praha: Grada Publishing, a. s., 276 s.

MAREK, J., et al. (2010) Farmakoterapie vnitřních nemocí. 4. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 808 s.

NOHA, I. H., et al. (2000) High Prevalence of Factor V Mutation (Leiden) in the Eastern Mediterranean. *Clinical Chemistry.*, 46, 1: 134- 136

O'ROURKE, R. A., et al.(2010) Kardiologie-Hurstův manuál pro praxi, překlad 12. vydání. Grada Publishing a.s. 800 s.

PAVLÍK, E. (1999) Molekulární biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část Praha: Labor aktuell CS, 2: 22-25.

PAVLÍK, E. (2004) Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 11

PECKA, M. (2004) Laboratorní hematologie v přehledu. Fyziologie a patologie hemostázy. FINIDR, 234 s.

PENKA, M., a kol. (2009) Neonkologická hematologie 2.,2. vydání. Praha: Grada publishing a. s., 248 s.

PENKA, M., TESAŘOVÁ, E., a kol.(2011) Hematologie a transfuzní lékařství. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 424 s. + 64 s. barevné přílohy

POUL, H., (2006) Trombofilní stavy významné v patogenezi žilní tromboembolické nemoci. Vnitřní lékařství 12: 17- 25

PROCHÁZKA, M., a kol.(2004)Trombofilní stavy v porodnictví - I. část. Prakt. Gyn., 4: 12-17.

RAUŠOVÁ, E., HADAČOVÁ, I., MACEK, M. (2005) Hereditární trombofilie- jeden z modelů molekulární medicíny. Klin. Biochem. Metab., 13(34), 2: 68- 76

RIDKER, P. M. et al.,(1995) Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently health men. N Engl J Med, 332: 912-917



ŘEHÁK, J., ŘEHÁK, M. (2011) Venózní okluze sítnice. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 144 s.

SCHRODER, W., et al. (1996) Large- scale screening for factor V Leiden mutation in north- eastern German population. Haemostasis. 26: 223- 226

SIMIONI, P. et al. (1997) The risk of recurrent thromboembolism in patients with an Arg506-Gln mutation in the gene for Factor V (Factor V Leiden). N Engl J Med. 336:399-403.

ŠMARDA, J., et al. (2005) Metody molekulární biologie. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 188 s.

ŠLECHTOVÁ, J. (2007) Hemostáza – jak ji možná neznáte. Klin. Biochem. Metab., 15 (36), 2: 97-101

TROJAN, S., et al. (2003) Lékařská fyziologie. 4. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 772 s.

URBÁNKOVÁ, J., et el. (2002) Hyperkoagulační stav a hluboká žilní trombóza. Kardiologická revue, 282- 285

VANDENBROUCKE, J. P., et al. (1996) Factor V Leiden. Should we screen oral contraceptive users and pregnant women? BMJ 313:1127-1130.

WAISMAN, D. M., (2003) Plasminogen: Structure, Activation, and Regulation. 1st edition. 293 p.

## **8. Klíčová slova**

trombofilie

FV Leidenská mutace

tromboembolismus

Real-time PCR

## **Key words:**

thrombophilia

FV Leiden mutation

thromboembolism

Real-time PCR

## **9. Přílohy**

Příloha 1: Souhlas vyšetřované/ho (zákonného zástupce) s genetickým laboratorním vyšetřením

**Souhlas vyšetřované/ho (zákonného zástupce) s genetickým laboratorním vyšetřením**

(Pro potřeby laboratoře se poskytuje lékařem potvrzená kopie tohoto dokumentu)

<b>JMÉNO</b>	<b>RČ</b>	<b>ZP</b>
<b>ÚČEL GENETICKÉHO LABORATORNÍHO VYŠETŘENÍ (viz přehled zadní strana)</b>		<b>Dg</b>
Ověření/potvrzení diagnózy nemoci <input type="checkbox"/>	Zjištění predispozice pro nemoc <input type="checkbox"/>	Zjištění přenašečství pro nemoc <input type="checkbox"/>
Zjištění nemoci u plodu <input type="checkbox"/>	Jiný důvod:	

**A. Prohlášení lékaře**

- Prohlašuji, že jsem vyšetřované/ho (zákonnému zástupci vyšetřovaného) jasně a srozumitelně vysvětlil/a účel, povahu, předpokládaný prospěch, následky i možná rizika výše uvedeného genetického laboratorního vyšetření.
- Rovněž jsem vyšetřovanou osobu seznámil/a s možnými výsledky a s důsledky toho, že by vyšetření nebylo možno za výše uvedeným účelem provést (nezdařilo by se) nebo by nemělo potřebnou vypovídací schopnost pro naplnění sledovaného účelu.
- Seznámil/a jsem vyšetřovanou osobu (zákonného zástupce) i s možnými riziky a důsledky v případě odmítnutí tohoto vyšetření.
- Výsledky laboratorního vyšetření budou důvěrné a nebudou bez souhlasu vyšetřované osoby/zákonného zástupce sdělovány třetí straně, pokud platné právní předpisy neurčují jinak.

Jméno lékaře : .....

Razítko zdravotnického zařízení + podpis

Datum : .....

**B. Prohlášení vyšetřované osoby**

- Potvřuji, že mi bylo poskytnuto genetické poradenství ke genetickému laboratornímu vyšetření za účelem jak uvedeno shora. Vše mi bylo sděleno a vysvětleno jasně a srozumitelně.
- Měl/a jsem možnost vše si řádně, v klidu a v dostatečně poskytnutém čase zvážit, měl/a jsem možnost se lékařem zeptat na vše, co jsem považoval/a za pro mne podstatné a potřebné vědět a probrat s ním vše, čemu jsem nerozuměl/a. Na ty to mé dotazy jsem dostal/a jasnou a srozumitelnou odpověď.

**Za účelem výše uvedeným souhlasím s odběrem dále uvedeného vzorku krve a s provedením molekulárně genetických vyšetření (zjištění přítomnosti mutace či polymorfismu) pro chorobu:**

Faktor V. (Leiden) <input type="checkbox"/>	Faktor II (20210) <input type="checkbox"/>	MTHFR (677,1298) <input type="checkbox"/>	Cystická fibróza (delF508) <input type="checkbox"/>
Gilbertův syn. <input type="checkbox"/>	H. hemochromatóza (282, 63) <input type="checkbox"/>	Metabolismus warfarinu (CYP2C9, VKORC1) <input type="checkbox"/>	

**Dále si přeji následující:**

Abych s výsledky byl(a)  nebyl(a)  seznámen(a) (vybranou variantu označte)

Aby o výsledku byly informovány následující osoby: .....

**Rozhodl (a) jsem, že se vzorkem DNA bude po ukončení testování naloženo takto:**

- Vzorek bude skladován (max. 1 rok). Nové analýzy mohou být provedeny pouze po mém novém souhlasu.
- Vzorek bude ihned zlikvidován s tím rizikem, že nebude již možné daný výsledek ověřit ani provést další nová vyšetření ku prospěchu mému či mé rodiny.

**Na základě tohoto poučení prohlašuji, že souhlasím s odběrem příslušného vzorku krve a s provedením výše popsaného genetického laboratorního vyšetření s podmínkami jak uvedeny výše a jsem si vědom, že svůj souhlas mohu kdykoliv odvolat.**

Podpis vyšetřované osoby (zákonného zástupce) ..... V ..... Dne .....

Jméno zákonného zástupce: ..... Rodné číslo: ...../.....

Vztah k vyšetřované osobě: .....

*Tento informovaný souhlas je vyhotoven ve dvou stejnopísech, z nichž jeden obdrží vyšetřovaná osoba (zákonný zástupce) a druhý informující lékař.*