

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2016

Bc. Karolína Světlíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Stanovení polymorfismů *NOD2/CARD15* u pacientů
s akutním infarktem myokardu**

Diplomová práce

Bc. Karolína Světlíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: Mgr. Veronika Žižková

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Veroniky Žižkové a uvedla jsem všechny použité prameny a literaturu.

Ve Strážnici, dne 25. 4. 2016

.....

SOUHRN

Jednou z vážných komplikací ischemické choroby srdeční je infarkt myokardu, jenž patří celosvětově mezi nejčastější zdravotní problémy a je také jednou z hlavních příčin úmrtí. Komplexní etiologie tohoto onemocnění je ovlivněna řadou různých rizikových faktorů. V patogenezi infarktu myokardu hrají významnou roli genetické dispozice. Díky asociačním studiím napříč genomem bylo se zvýšeným rizikem vzniku infarktu myokardu úzce spojeno několik chromozomálních lokusů. Jednonukleotidové polymorfismy v těchto lokusech mají zásadní vliv na strukturu a funkci produktů genové exprese. Pro stanovení alelické konstituce v příslušném genovém lokusu existuje několik genotypizačních přístupů, přičemž pro účely této diplomové práce byla zvolena genotypizační technologie MassArray.

Hlavním cílem diplomové práce bylo stanovit pomocí MassArray genotypizace polymorfismy rs2066844 (R702W), rs2066845 (G908R) a rs2066847 (1007InsC) genu *NOD2/CARD15* a rs1800629 (TNF-308) genu *TNF α* u vybraného souboru 158 pacientů s prodělaným akutním infarktem myokardu.

Pro sledované polymorfismy byly stanoveny genotypové a alelické frekvence a dále bylo také zjištěno, že distribuce sledovaných SNP byla v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou. U polymorfismu rs2066847 (1007InsC) byla prokázána asociace s akutním infarktem myokardu. Hodnota relativního rizika 0,46 spolu s převahou nositelů polymorfnní varianty genu *NOD2/CARD15* mezi zdravými kontrolními jedinci poukazuje na možný protektivní charakter alely C rs2066847. Rozdíly ve výskytu dalších dvou testovaných polymorfismů *NOD2/CARD15*, resp. genu *TNF α* mezi sledovaným souborem pacientů a kontrolní skupinou zjištěny nebyly. Tato práce poukazuje na možné ochranné působení polymorfnní varianty rs2066847 *NOD2/CARD15* v patogenezi akutního infarktu myokardu v české populaci. K definitivnímu průkazu tohoto závěru bude třeba tento nález ověřit na dalším, nezávislém souboru pacientů z jiného pracoviště, případně z jiné země.

SUMMARY

One of the serious complications of ischemic heart disease is myocardial infarction, which belongs to the most common health problems worldwide and is also one of the main death causes. Complex etiology of the disease is influenced by a number of different risk factors. An important role in the pathogenesis of myocardial infarction is played by genetic predisposition. Thanks to the genome-wide association studies, the increased risk of myocardial infarction was closely linked to several chromosomal loci. Single nucleotide polymorphisms in these loci have a cardinal influence on the structure and function of the gene expression products. There are several genotyping approaches for the determination of allelic constitutions in the relevant gene locus. For the purpose of this diploma thesis, MassArray technology was chosen.

MassArray genotyping was used in order to achieve the main aim of this diploma thesis, i.e. to determine polymorphisms rs2066844 (R702W), rs2066845 (G908R) and rs2066847 (1007InsC) of gene *NOD2/CARD15* and rs1800629 (TNF-308) of gene *TNF α* in a group of 158 patients who had presented with acute myocardial infarction.

Genotypic and allelic frequencies were determined for the observed polymorphisms. The distribution of genotypes for the single nucleotide polymorphisms tested was in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium. Significant difference in allelic frequencies was observed between the patient group and the control subjects for polymorphism rs2066847 (1007InsC). The value of Odds ratio was 0.46, and together with predominance of carriers of this polymorphic variant of *NOD2/CARD15* gene in the control group, suggested its possible protective character. Thus the association between the studied single nucleotide polymorphisms and the increased risk of acute myocardial infarction was evidenced for rs2066847 and not the other SNPs tested. The protective effect of the C allele of rs2066847 must be replicated in other centres/other ethnicities, otherwise it is considered as preliminary and pertinent for Czech population only.

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala své vedoucí Mgr. Veronice Žižkové za cenné rady, pomoc, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnovala při tvorbě této diplomové práce. Poděkování patří také MUDr. Janě Petřkové, Ph.D. za poskytnutí odborných rad, literatury a klinických dat.

OSNOVA

1	Úvod	9
2	Současný stav řešené problematiky	10
2.1	Akutní infarkt myokardu	10
2.1.1	Etiopatogeneze.....	11
2.1.1.1	Zánět	12
2.1.1.2	Ateroskleróza.....	13
2.1.1.3	Akutní infarkt myokardu a genetika.....	15
2.1.2	Symptomatologie a komplikace doprovázející AIM.....	16
2.1.3	Diagnostika a její možnosti	17
2.1.3.1	Elektrokardiografie	17
2.1.3.2	Biomarkery	19
2.1.4	Terapie	20
2.2	Jednonukleotidový polymorfismus (SNP)	21
2.2.1	Detekce a genotypizace SNP	23
2.2.1.1	Genotypizace technologií MassArray	25
2.3	Charakteristika genů a proteinů NOD2/CARD15 a TNF α	29
3	Cíle práce.....	33
4	Materiál a metodika	34
4.1	Biologický materiál	34
4.2	Chemikálie.....	34
4.3	Vybavení laboratoře	35
4.4	Spotřební materiál	35
4.5	Metody.....	36
4.5.1	Mikroizolace DNA pomocí přístroje Arrow	36
4.5.2	PCR amplifikace DNA	36
4.5.3	SAP reakce	38
4.5.4	iPLEX PCR	38
4.5.5	Vyčištění PCR produktů, příprava mikroarraye, MassArray MS	40
4.6	Statistické vyhodnocení	41
5	Výsledky.....	44
6	Diskuse	50

7	Závěr.....	52
8	Literatura	53
9	Seznam použitých zkratek a symbolů	66

1 ÚVOD

Jednou z akutních a nestabilních forem ischemické choroby srdeční je akutní infarkt myokardu (AIM). Tento akutní, život ohrožující stav je v současné době jedním z nejzávažnějších civilizačních onemocnění, postihující zejména starší jedince. I přes řadu pokroků v prevenci, terapii a moderní medicíně je infarkt myokardu jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých zemích světa. Nejběžnějším patofyziologickým předpokladem pro vznik AIM je ateroskleróza koronárních arterií. Tento složitý dlouhodobý proces vede na základě působení celé řady faktorů k postupnému zužování průsvitu arterie, která může být i zcela uzavřena. Nedostatečný přívod okysličené krve pak vede k trvalému poškození myokardu.

AIM i ateroskleróza jsou polygenní onemocnění, ve kterých hrají klíčovou roli mj. i genetické faktory. K odhalení genetického základu komplexních chorob významně napomáhají genomické asociační studie identifikující kandidátní geny a jejich polymorfní varianty, jež úzce souvisí s daným onemocněním. V současnosti je k dispozici několik nízko i vysokokapacitních genotypizačních technologií, které poskytují o řadě onemocnění cenné a objektivní informace, a to až na molekulární úrovni.

Pro genotypizaci jednonukleotidových polymorfismů genu *NOD2/CARD15* byla v experimentální části této diplomové práce použita technologie MassArray. Jedná se o rychlou, přesnou technologii se střední kapacitou a širokým spektrem využití.

Teoretická část diplomové práce je věnována obecné charakteristice AIM, jeho patogenezi, diagnostice a léčbě. Dále je pozornost věnována jednonukleotidovým polymorfismům, způsobům jejich detekce a bližší charakterizaci genotypizační technologie MassArray. V závěru teoretické části jsou shrnuty obecné poznatky o genu *NOD2/CARD15*, jenž byl v rámci vyšetřovaného souboru pacientů s prodělaným AIM předmětem studia experimentální části této práce.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Akutní infarkt myokardu

Infarkt myokardu (IM) patří v současné době mezi nejčastější zdravotní problémy a je také hlavní příčinou úmrtí a invalidity v rozvinutých zemích světa. I přes značný pokrok v medicíně, modernizaci léčby a významný pokles incidence kardiovaskulárních onemocnění, se v posledních letech jedná o nejčastější typ onemocnění a příčinu úmrtí v ČR (Cífková *et al.*, 2010).

Podle evidence praktických lékařů pro dospělé bylo v ČR za rok 2012 evidováno 85 177 případů akutního infarktu myokardu (AIM). AIM byl pro tentýž rok příčinou úmrtí u 3670 mužů a 2844 žen (Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2013).

Z patofyziologického hlediska jde o akutní ložiskovou ischemickou nekrózu myokardu, vzniklou v důsledku náhlého uzavření nebo progresivního extrémního zúžení koronární tepny, vyživující příslušnou srdeční oblast (Špaček *et* Widimský, 2003). Vzniklá nekróza se většinou dále šíří směrem od endokardu k epikardu, a to od epicentra k okrajům zasažené myokardiální oblasti. Rozsah nekrózy a rychlost jejího postupu jsou ovlivněny několika aspekty, např. mírou přerušení průtoku krve, spotřebou kyslíku myokardem nebo přítomností kolaterálních větví (Davies, 2000).

Klinicky můžeme AIM definovat jako typický vzestup s následným poklesem biochemických markerů nekrózy myokardu za současné přítomnosti alespoň jednoho z těchto kritérií:

1. klinické příznaky ischemie
2. vývoj patologických Q vln na elektrokardiogramu
3. elektrokardiografické změny svědčící pro ischemii (ST elevace či deprese)
4. souvislost s koronární revaskularizací (angioplastika, stent, bypass)
5. průkaz nové regionální poruchy kinetiky nebo nové ztráty viabilního myokardu zobrazovací metodou (Widimský *et al.*, 2002)

2.1.1 Etiopatogeneze

AIM je jednou z akutních forem ischemické choroby srdeční (ICHS) a představuje závažné onemocnění srdečního svalu, které pacienta bezprostředně ohrožuje na životě. Klinicky prokazatelný IM vzniká uzávěrem některého z hlavních epikardiálních kmenů koronárních tepen. Není-li tok krve v zasažené arterii obnoven, dochází v důsledku ischemie k nevratnému poškození kardiomyocytů, po kterém následují procesy buněčné smrti – nekróza, apoptóza, autofagie, a také zánětlivá reakce. Jde o častou a obávanou komplikaci koronární aterosklerózy, jejíž četnost narůstá s věkem, a postihuje tak zejména starší jedince. Pacienti s prodělaným AIM mohou však mít i zdravé, angiograficky normální koronární tepny. Stav koronárních arterií je prognosticky klíčovým faktorem – prognóza pacientů s IM a angiograficky normálními hladkostěnnými koronárními arteriemi je výrazně lepší než u pacientů s IM a stenozující koronární aterosklerózou. Tato skutečnost může úzce souviset s věkem pacienta, kdy mladší pacienti s IM mají ve srovnání se staršími pacienty lepší prognózu. Mortalitu IM ovlivňuje také lokalizace infarktu a rozsah poškození, přidružená onemocnění, hypotenze nebo vysoká srdeční frekvence. Po proděláním IM může být nezávislým ukazatelem morbidity a mortality srdeční remodelace, jež rozhoduje o dalším výkonu a funkci myokardu. Jedná se o dlouhodobý komplexní děj, během kterého dochází k funkčním a velikostním změnám srdečního svalu. K rozvoji AIM přispívá řada exogenních i endogenních činitelů. Rizikovými faktory souvisejícími se vznikem akutních koronárních syndromů, mezi něž patří právě i AIM, jsou např. kouření, metabolický syndrom nebo hypercholesterolemie (Linhart *et al.*, 2012; O'Neal *et al.*, 2012; Zimmerman *et al.*, 1995; Widimský *et al.*, 2009; Frangogiannis *et al.*, 2002; Špaček *et al.*, 2003).

U více než 90 % případů IM je příčinou vzniku koronární ateroskleróza s rupturou intimy koronární arterie následovaná trombózou v místě nestabilního ateromu. Přítomnost trombu nebo rupturovaného ateromu v koronární arterii vede k omezení či přerušení toku krve v srdečním svaly, a tím i přísunu kyslíku a živin, což vede k trvalému nekrotickému poškození myokardu. Zbýlých 5-10 % případů IM má jiný původ, např. koronární spasma, arteriitis, koronární embolie do věnčitých tepen či trombóza v koronární tepně bez aterosklerózy (Widimský *et al.*, 2009; Burke *et al.*, 2007; Mendis *et al.*, 2011).

2.1.1.1 Zánět

Zánětlivá reakce je odpovědí živého organismu na poškození tkáně či porušení integrity organismu, ať už v důsledku mikrobiální infekce, mechanického nebo chemického poškození či ischemie tkáně. Zánět ve vaskularizované tkáni je doprovázen komplexem fyziologických reakcí nespecifické imunity, jež zahrnuje soubor biochemických a imunologických změn vedoucích k eliminaci infekce a zhojení. Zánětlivý proces může mít dvojí charakter – řízená zánětlivá reakce je velmi významnou obrannou reakcí organismu nezbytnou pro přežití. Druhým případem je neregulovaný zánět vyznačující se nadměrnou produkcí volných radikálů a vyčerpáním antioxidantů. Tento typ zánětu může vést ke vzniku různých onemocnění, a má tak pro daný organismus nebezpečný sebedestruktivní charakter.

V závislosti na rozsahu a délce trvání zánětu rozlišujeme zánět lokální a celkový, ale také zánět akutní a chronický. Akutní zánět je krátkodobý fyziologický proces, který bez následků odezní a končí úplným zhojením postižené tkáně, např. absces nebo sepse. Naopak chronický zánět je dlouhodobý patologický jev, při kterém dochází k destrukci postižené tkáně, jejímu nahrazování vazivem, a tím i k trvalému poškození, např. při Crohnově chorobě a ateroskleróze (Hořejší *et* Bartůňková, 2009; McCall *et al.*, 2011; Yazdanyar *et* Nordestgaard, 2010).

Zánět arteriálního endotelu hraje významnou roli v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění. V případě aterosklerózy vede počáteční poškození cévního endotelu k infiltraci zánětlivých buněk a následně zánětlivé reakci. Aktivované buňky cévního endotelu sekretují adhezivní molekuly a chemokiny, které napomáhají interakci leukocytů a monocytů s cévním endotelem a také aktivaci trombocytů. Zánětlivými buňkami obsaženými v aterosklerotických lézích jsou především T-lymfocyty, monocyty a dendritické buňky (Gear *et* Camerini, 2003; Lievens *et* von Hundelshausen, 2011; Koltsova *et* Ley, 2011). Imunitní odpověď a zánětlivý proces mají klíčový význam také u srdečních ischemických poškození, při kterých dochází k produkci heterogenní směsi ochranných, ale i cytotoxických buněk. Na základě vzniklé myokardiální nekrózy je spuštěna zánětlivá reakce, jež vede k eliminaci matrix a odumřelých buněk. Mezitím jsou aktivovány reparační mechanismy potřebné pro tvorbu jizvy, kterou se zasažená tkáň po infarktu hojí. Cytotoxické buňky naopak vedou k likvidaci viabilních kardiomyocytů, a tím i ke zhoršování myokardiálního poškození (Frangogiannis, 2012; Frangogiannis, 2014).

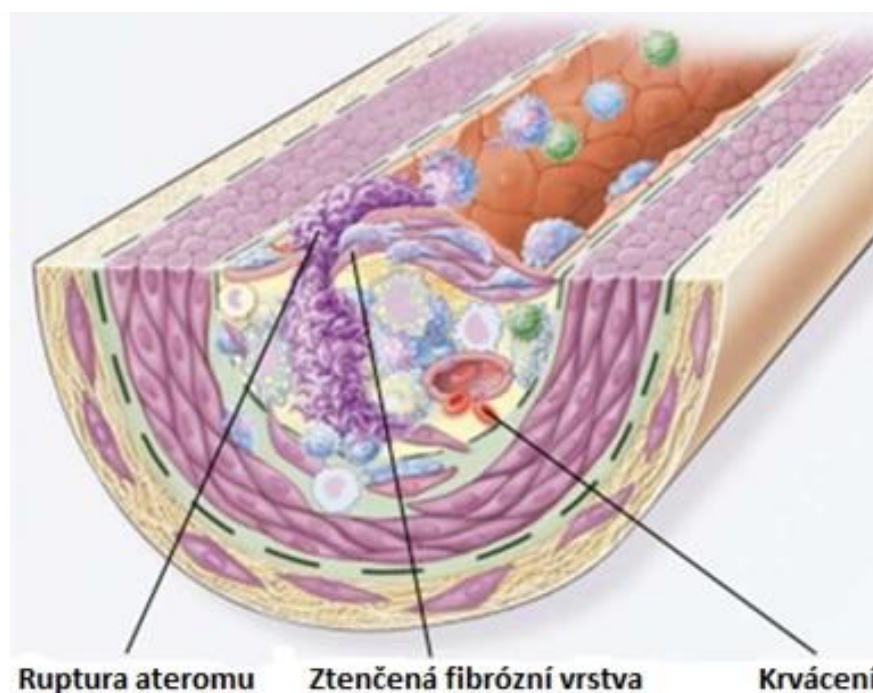
2.1.1.2 Ateroskleróza

Ateroskleróza neboli kornatění tepen je degenerativní stenozující onemocnění středních nebo velkých arterií způsobené postupným ukládáním cholesterolu, krevních elementů a polysacharidů do jejich stěn. Postupně pak dochází k tvorbě fibrózní tkáně a akumulaci sloučenin vápníku. Jedná se o progresivní multifokální, imunožánětlivé onemocnění vznikající již v raném věku, na jehož vzniku se podílí komplexní souhra metabolických drah zodpovědných za ukládání lipidů, žánětlivou a imunitní odpověď vůči oxidovaným lipidům a endoteliální dysfunkce. Aterosklerotické poškození tak zahrnuje celou řadu vysoce specifických buněčných a molekulárních odpovědí souvisejících se žánětlivým onemocněním (Falk, 2006; Nagareddy *et Smyth*, 2013; Ross, 1999).

Rozvoj aterosklerózy podmiňuje řada ovlivnitelných i neovlivnitelných rizikových faktorů, např. nedostatek fyzické aktivity, obezita, kouření, stres, hypertenze, diabetes mellitus, věk, mužské pohlaví, rodinná anamnéza, či produkce žánětlivých markerů, jakými jsou např. cytokiny nebo C-reaktivní protein v důsledku přítomnosti žánětu (Falk, 2006; Mendis *et al.*, 2011). Takovéto reakční žánětlivé složky přítomné v krevním řečišti značí zvýšené riziko cévních příhod a hrají tak významnou roli v jejich patogenezi (Libby *et al.*, 2002). Progrese aterosklerózy je řízena vaskulárním žánětem. Toto onemocnění je asociováno s aktivací receptorů signálních drah vrozené imunity, přičemž NOD2 protein je klíčovým receptorem ovlivňujícím vaskulární žánět a závažnost aterosklerózy. U myši bylo prokázáno, že aktivace NOD2 receptoru je důležitým proaterogenním mechanismem. NOD2 zhoršuje aterosklerózu prostřednictvím vzniklého žánětu cév a podporuje rozšiřování nekrotické zóny bohaté na lipidy. Zvýšená exprese genu *NOD2* přispívá k prožánětlivé odpovědi při ateroskleróze (Johansson *et al.*, 2014). Rizikové faktory přispívající ke vzniku aterosklerózy jsou téměř totožné s těmi pro AIM, avšak není podmínkou, že lidé postižení aterosklerotickým poškozením koronárních tepen tuto komplikaci prodělají (Aschermann *et al.*, 2007).

Ateroskleróza je patologický stav vyvíjející se v průběhu několika let, podmíněný hromaděním cholesterolu obsahujícího tzv. low-density lipoproteiny, jejichž akumulací v intimě cév dochází k funkčnímu poškození endotelu a jeho následné dysfunkci (Hansson *et al.*, 2006). Důsledkem je ztráta pružnosti cév, kalcifikace a vznik aterosklerotických plátů – aterosklerotických plátů, které zužují vnitřní průsvit cévních stěn, přičemž zúžená lumen cév brání snadnému a rovnoměrnému průtoku krve. V případě ruptury aterosklerotického plátu dochází ke vzniku intrakoronárního trombu a následné obstrukci cévy trombem, jehož přítomnost v koronární

arterii může vést až ke vzniku IM (Mendis *et al.*, 2011). Podmínkou pro přítomnost trombu v arterii je zralý aterom – z tohoto důvodu je arteriální trombóza klasifikována jako komplikace aterosklerózy, nikoli jako její součást. Za vznikem aterotrombózy stojí zánětlivé mediátory vytvářené trombocyty a tukovou tkání. Samotná ateroskleróza bez akutní trombózy není fatálním onemocněním. Mechanismem, který je odpovědný za přímou konverzi chronického stabilního onemocnění na život ohrožující stav, je právě ruptura ateromu následovaná trombózou. Riziko ruptury závisí na složení a stupni stenózy ateromu. Ten se obecně skládá z měkkého lipidového trombogenního jádra krytého fibrózním krytem, jenž obsahuje zánětlivé a hladké svalové buňky. Kandidátním objektem ruptury je pak nestabilní pokročilá aterosklerotická léze s velkým lipidovým jádrem a tenkou povrchovou vrstvou, infiltrovaná aktivovanými zánětlivými elementy, jako jsou monocyty, makrofágy a neutrofilové. Aterom inklinuje k ruptuře především v nejslabších místech s velkou biomechanickou a hemodynamickou zátěží (Falk *et al.*, 1995; Packard *et al.*, 2008; Mackay *et al.*, 2012). Ruptura fibrózní vrstvy má rychlou trombogenní progresi. Ztenčování fibrózní vrstvy je způsobeno kontinuálním přílivem a aktivací makrofágů, které zde uvolňují metaloproteinasy a další proteolytické enzymy degradující tkáň. Postupně pak dochází ke krvácení z *vasa vasorum* nebo lumen arterie (Obrázek č. 1), kdy výsledkem je tvorba trombu a uzávěr arterie (Ross, 1999).



Obrázek č. 1: Arterie s rupturou pokročilého nestabilního ateromu (upraveno dle Ross, 1999)

2.1.1.3 Akutní infarkt myokardu a genetika

Genetické faktory hrají v rozvoji aterosklerózy a AIM významnou roli. Tato onemocnění patří stejně jako např. hypertenze, diabetes mellitus či astma k polygenním onemocněním s komplexním genetickým podkladem. Na jejich vzniku se podílí interakce několika genů a také četné vlivy vnějšího prostředí. Genetické faktory mají vliv především u mladých pacientů, vlivy vnějšího prostředí jsou pak významnější u těch starších. V případech polygenní dědičnosti je znak v podstatě výsledkem spolupráce několika nealelních genů, kdy výsledkem je multiplicita účinku jiného genu. Jde tedy o situaci, kdy alelový pár nemá vlastní fenotypový projev, ale modifikuje projev jiného genu, mění intenzitu jeho působení, čímž dochází k ovlivnění zejména kvantitativní charakteristiky znaku. Genové interakce tohoto typu jsou charakteristické zvyšováním počtu fenotypových štěpných tříd, které stejně jako u kvalitativních znaků nemají jasné ohraničení. Zúčastněné geny mohou vést k danému onemocnění několika způsoby – na sobě nezávislou expresí, mohou fungovat jako modifikátory choroby nebo mohou ovlivňovat expresi jiných genů vzájemnou interakcí. U polygenních onemocnění dochází k synergistickému působení několika evolučně starých genových variant, které mají v populaci časté zastoupení, přičemž frekvence vzácné alely je nad 1 %. V dědičnosti takovýchto chorob se mohou uplatňovat také mutace v kódujících sekvencích, intronech, regulačních genových oblastech a o vyšším riziku onemocnění zde rozhodují i specifické haplotypy jednonukleotidových polymorfismů. Z důvodu účasti stovek proteinů kódovaných stovkami genů je potřeba v populaci pacientů pátrat po kandidátních genech, jež modifikují průběh onemocnění – fenotyp pacienta, což je spjato se sledováním polymorfismů v genech kódujících proteiny, které se účastní metabolických drah spojených s příslušným onemocněním. Spektrum kandidátních genů u onemocnění koronárních tepen (CAD) je velmi široké, přičemž klíčové pro rozvoj CAD a IM jsou polymorfismy v genech pro regulaci hladiny plazmatických lipoproteinů, zánětlivé markery a koagulační faktory (Snustad *et Simmons*, 2009; Aschermann *et al.*, 2007; Chaer *et al.*, 2004; Kraus, 2000; Robin *et al.*, 2007).

Pozitivní rodinná anamnéza kardiovaskulárního onemocnění je klíčovým rizikovým faktorem pro jeho rozvoj i v dalších generacích. Má-li onemocnění prokazatelně familiární výskyt, dá se očekávat jistý podíl genetického podkladu na jeho manifestaci (Štejf, 2007). Vývoj moderních molekulárně genetických metod, zejména pak asociačních studií napříč genomem (GWAS), vedl k objevu několika desítek polymorfních genů, které jsou asociovány s metabolismem lipidů a zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění.

Řada genomických studií spojila s rizikem CAD polymorfni lokus na p raménku chromozomu 9 v pozici 21-3 (9p21-3), který se nachází v nekódující oblasti DNA. Riziková alela 9p21 pravděpodobně nepůsobí na kardiovaskulární systém skrze charakteristické rizikové faktory (jen málo genů spojovaných s IM je asociováno s klasickými rizikovými faktory). Polymorfni chromozomální oblast 9p21 redukuje až o 90 % expresi genů *Cdkn2a* a *Cdkn2b* kódujících inhibitory cyklin-dependentních kinas, z čehož vyplývá riziko změny dynamiky proliferace cévních buněk a progresu kardiovaskulárního onemocnění. Dalšími rizikovými lokusy jsou např. 1p13 a 6q26, kódující tvorbu lipoproteinů (Erdmann *et al.*, 2010; Visel *et al.*, 2010; Masopust, 2011; Munir *et al.*, 2014).

2.1.2 Symptomatologie a komplikace doprovázející AIM

Dominantním symptomem AIM vyskytujícím se u převážné většiny pacientů je krutá, intenzivní bolest na hrudi, která je retrosternální, povahou svíravá, palčivá či tlaková, šířící se do levé srdeční krajiny. Bolest obvykle vystřeluje do paží, ramen, krku, dolní čelisti, mezilopatkové oblasti nebo do nadbřišku. Často trvá déle než 20 minut a neodpovídá ani na opakované dávky nitroglycerinu. U postižených jsou časté i doprovodné příznaky, jako strach ze smrti, úzkost, dušnost, zmatenost, ale i vegetativní projevy – bledost, nauzea, zvracení, palpitace, slabost a pocení. V některých případech se infarkt projevuje až komplikacemi, jakými jsou levostranné srdeční selhání nebo syropa. Někdy probíhá AIM i bez příznaků – tehdy mluvíme o němém infarktu, který je odhalen náhodně při elektrokardiografii (Hradec *et Býma*, 2007; Špaček *et Widimský*, 2003; Štejfá, 2007).

Řada případů AIM je spojena s výskytem dalších komplikací, jako jsou arytmie, srdeční selhání, perikarditida nebo mechanické komplikace.

V průběhu AIM se velmi často objevují arytmiické komplikace. Některé nemusí představovat žádné významné riziko, jiné mohou mít fatální důsledky. Supraventrikulární arytmie naznačují rozvoj srdeční insuficience nebo ji v opačném případě mohou způsobit. Tyto arytmiické komplikace mohou také zhoršovat již přítomnou ischemii myokardu. Komorové arytmie jsou v souvislosti s AIM prognosticky velice závažné – až 60 % úmrtí, která se objevují během hodiny od začátku symptomů AIM, mají na svědomí právě maligní komorové arytmie.

Selhání levé srdeční komory v akutní fázi infarktu má velmi špatnou prognózu. Je charakteristické dušností, cvałem a chrůpky na plicních bazích. Základem pro odhalení této komplikace je echokardiografie, rentgenový snímek plic, případně koronarografie.

Infarktová perikarditida je komplikací, která se nejčastěji projevuje v prvních třech dnech IM, a to perikardiálním třecím šelestem, teplotou, leukocytózou a recidivou bolesti za hrudní kostí. Její výskyt koreluje s velikostí infarktového ložiska (Špaček, 2002).

Mechanické komplikace AIM nepatří k těm častým, ale představují život ohrožující problém, jenž si žádá brzké odhalení a adekvátní léčbu. Mezi komplikace tohoto typu řadíme insuficienci nebo rupturu papilárních svalů, rupturu septa komor či volné stěny levé komory (Černá *et al.*, 2005).

2.1.3 Diagnostika a její možnosti

Infarkt myokardu může být definován a diagnostikován na základě několika různých ukazatelů. Mezi klasické klinické přístupy patří elektrokardiografie (EKG), detekce biomarkerů myokardiální nekrózy, neinvazivní zobrazovací techniky, případně pitevní nález u zemřelých (Thygesen *et al.*, 2012).

Nezbytným základem diagnózy IM je zjištění pacientovy anamnézy a fyzikální vyšetření, při kterém je hodnocen celkový stav vědomí, dušnost, tepová frekvence, poruchy srdečního rytmu, krevní tlak, pocení apod. Cílem tohoto vyšetření je vyloučit jiné než kardiologické a neischemické příčiny bolesti, vyhodnocení přítomnosti komplikací daného stavu a stanovení rizika pro pacienta. Pro časnou diagnostiku, která je v případě IM velmi důležitá, je toto vyšetření společně s elektrokardiografií klíčovým (Bělohávek *et Aschermann*, 2008). Doplňujícím a pomocným diagnostickým přístupem u IM je koronarografie, jež potvrzuje a lokalizuje akutní trombotický uzávěr zasažené arterie, a také echokardiografie prokazující regionální poruchu kinetiky levé komory v povodí infarktové arterie (Widimský *et al.*, 2002).

2.1.3.1 Elektrokardiografie

EKG je základní lékařské vyšetření v interní medicíně, při němž je přístrojově snímána elektrická aktivita srdce. Elektrické změny vznikající depolarizací a repolarizací

myokardu jsou detekovány pomocí elektrod připevněných k tělu pacienta a snímány elektrokardiografem. Výstupem měření je tzv. elektrokardiogram – záznam měření v podobě křivek. Každá křivka představuje grafické znázornění změn elektrického napětí mezi dvěma body v závislosti na čase. Depolarizace a repolarizace srdečních síní a komor vyvolává na EKG vznik různých vln (P, T) a kmitů (Q, R, S), na základě kterých může lékař nález zhodnotit z hlediska času, rozsahu poškození a lokalizace. Fáze srdeční aktivity odpovídají na křivce jednotlivým úsekům, kdy vlna P odpovídá depolarizaci síní, komplex kmitů QRS odpovídá depolarizaci komor a vlna T repolarizaci komor. V počátečních fázích AIM může mít EKG křivka fyziologický charakter, protože k jejímu vývoji dochází s rozvojem nekrózy myokardu. Z toho důvodu je při důvodném podezření na AIM potřeba EKG vyšetření opakovat s odstupem několika hodin. Toto základní jednoduché a neinvazivní vyšetření musí být při podezření na AIM provedeno co nejdříve. Prostřednictvím EKG mohou být diagnostikovány také další zdravotní komplikace, jako např. srdeční arytmie, ischemie, srdeční hypertrofie či plicní embolie (Špaček *et* Widimský, 2003; Thygesen *et al.*, 2012).

Na základě EKG vyšetření je IM klasifikován do dvou základních skupin:

1. Infarkt myokardu s elevacemi úseků ST na EKG (STEMI) – situace, kdy ischemická nekróza postihne celou tloušťku srdeční komory a vzniká tak tzv. transmurální infarkt, jenž je obvykle spojen se vznikem patologických kmitů Q na EKG křivce (Q-infarkt).
2. Infarkt myokardu bez elevací úseků ST na EKG (NSTEMI) – situace, kdy ischemická nekróza zůstává omezena pouze na subendokardiální vrstvu myokardu a vzniká tak tzv. netransmurální infarkt, jenž není obvykle doprovázen rozvojem patologických Q vln na EKG křivce (non-Q infarkt). Tento typ infarktu tedy představuje nedokonalý infarkt.

Charakteristickou známkou AIM je buď denivelace úseků ST (elevace nebo deprese) a změny vlny T, nebo vznik patologického kmitu Q alespoň ve dvou svodech dvanáctisvodového EKG (Hradec *et* Býma, 2007).

Pomocí EKG může být stanovena také lokalizace IM. To, zda je infarktem zasažena přední, spodní nebo boční stěna srdeční, je zjištěno na základě EKG změn v definovaných svodech probíhajících kolmo vůči zasaženému místu. Při NSTEMI je však často složité z EKG stanovit lokalizaci infarktu, tzn. lokalizace infarktu je neurčená. Dříve prodělaný

infarkt může být definován pouze průkazem nově vzniklých patologických vln Q na sériových EKG křivkách (Widimský *et al.*, 2002; Widimský *et al.*, 2009).

Kromě výše uvedených kategorií může být IM dělen v závislosti na patologických, klinických a prognostických odlišnostech na další podtypy, s čímž souvisí i různé léčebné strategie (Thygesen *et al.*, 2012).

2.1.3.2 Biomarkery

Biochemické markery (biomarkery) jsou důležitými diagnostickými a prognostickými nástroji pro řadu onemocnění. Klíčovou tkání k detekci biomarkerů je díky své významné roli v imunitní odpovědi, metabolismu a buněčné i mezibuněčné komunikaci, periferní krev, která je snadno dostupná pro nenáročný odběr a minimální invazivitu (Taurino *et al.*, 2010).

Průkaz kardiospecifických markerů je u IM základem definitivní diagnózy. Míra jejich koncentrace závisí na časovém odstupu od vzniku symptomů. V časně fázi IM jsou rutinně stanovovány markery nekrózy myokardu, zánětu, aktivace trombocytů a také neurohormonální aktivity (Horáková *et al.*, 2010).

Standardně využívaným markerem pro diagnostiku IM je troponin, jenž vykazuje vysokou citlivost a specifitu vůči tomuto onemocnění. Společně s troponinem jsou pro přesnou a rychlejší diagnózu IM vyhodnocovány také markery jako je MB-izoenzym kreatinfosfokinasy s celkovou kreatinfosfokinase (CK) a myoglobin. Jiné markery nekrózy myokardu, zánětu a neurohormonální aktivity slouží též jako užitečné diagnostické a prognostické nástroje, ale dominantní postavení má stále troponin (Aldous, 2013; Ahmad *et Sharma*, 2012). Jedná se o protein uvolňovaný myocyty při nevratném poškození myokardu, a je tak vysoce specifický pro srdeční tkáň a zároveň nezbytný pro definitivní diagnostiku AIM. Jeho hladina v krvi stoupá velmi brzy a je zvýšena i s několikadenním odstupem od vzniku myokardiální nekrózy s tím, že pak postupně klesá k normě (Chan *et Ng*, 2010). Současná zvýšená hladina troponinu i CK/CK-MB vypovídá o jisté diagnóze IM. Kromě specifických projevů IM zprostředkovaných látkami uvolňovanými nekrotickou srdeční tkání existují i nespecifické biochemické projevy IM. Na základě těchto projevů, kterými jsou např. leukocytóza, zvýšená sedimentace či přechodná hyperglykemie, však není možné infarkt diagnostikovat (Widimský *et al.*, 2002).

2.1.4 Terapie

Léčba IM je velice komplexní, striktně individuální, a při včasné a správné zásahu často i velmi účinná. Jejími hlavními cíli jsou:

1. prevence úmrtí pacienta
2. obnovit a udržet průchodnost koronární tepny, tzn. zastavit postupující nekrózu
3. minimalizovat subjektivní potíže pacienta
4. léčit vzniklé komplikace
5. na základě komplexních opatření v sekundární prevenci minimalizovat riziko recidivy AIM či následného úmrtí

Klíčovým faktorem při léčbě pacientů s AIM je doba od vzniku myokardiální ischemie do provedení reperfuze. Časové prodlevy v tomto případě významně ovlivňují morbiditu a mortalitu pacientů. Léčba AIM může být rozdělena na fázi přednemocniční, nemocniční a rehabilitační. O osudu pacientů s AIM zásadním způsobem rozhoduje včasná a kvalitní přednemocniční péče. Ta by měla být co nejkratší i proto, že moderní kardiologická léčba může být poskytnuta pouze těm pacientům, kteří se dostanou do nemocnice včas. Faktorem, který zásadně ovlivňuje včasnost zdravotnické péče, je samotná reakce pacienta. Doba od vzniku příznaků do přivolání pomoci má největší podíl na časové prodlevě v akutní fázi IM. Eliminace časových prodlev má nesmírný význam pro snížení mortality pacientů s AIM na maligní arytmiické komplikace, které jsou příčinou smrti většiny pacientů s AIM v přednemocniční péči. Čím dříve je obnoven průtok krve uzavřenou koronární tepnou, tím menší je výsledný rozsah IM. Od toho se následně odvíjí i lepší výsledná funkčnost levé srdeční komory a příznivější dlouhodobá prognóza pacienta. Při důvodném podezření na AIM je nutno okamžitě zavolat zdravotnickou záchrannou službu, jejíž posádka poskytne postiženému nezbytnou první pomoc. Léčebná strategie v této neodkladné fázi zahrnuje pouze postupy proveditelné v daných podmínkách, tzn. zjištění anamnézy, provedení fyzikálního vyšetření, elektrokardiografie a také podání potřebných léků, které pacienta zklidní, ztláší bolest, stabilizují oběh krve a mají antikoagulační účinky. Pacient s AIM je transportován z místa diagnózy přímo na katetrizační sál nejbližšího kardiovaskulárního centra (Dracup *et Moser*, 1991; Widimský *et al.*, 2002; Janský, 2003).

Nemocniční péče je zaměřena především na revaskularizaci infarktové tepny. Zde je velmi důležitá volba reperfuzního přístupu, který se u různých typů IM liší. Pro stanovení přesné lokalizace IM je provedena akutní koronarografie. Poté je na základě nálezu lékařem zvolen další léčebný postup, kterým je buď trombolytická léčba, perkutánní

transluminální koronární angioplastika, nebo v krajním případě kardiochirurgická revaskularizace. Nejlepším léčebným přístupem u AIM je primární koronární angioplastika, jež nejvýznamněji omezuje rozsah nekrózy, míru komplikací a dává pacientovi největší šanci na přežití. I v této léčebné fázi je nezbytná medikamentózní léčba upravující srážlivost krve, podporující správnou srdeční činnost a léčící další vzniklé komplikace. Nejčastěji podávaným farmakoterapeutikem je kyselina acetylosalicylová s antitrombogenním efektem (Fischerová, 2008; Špaček *et* Widimský, 2003).

2.2 Jednonukleotidový polymorfismus (SNP)

Výrazem polymorfismus je v genetice obecně označován výskyt dvou nebo více variant (alel) genu v populaci jedinců, přičemž nejméně dvě z těchto variant se vyskytují s četností vyšší než 1 %. Alely s nižší četností výskytu jsou vzácnými variantami důležitými pro existenci genetické variability. V lidském genomu se vyskytuje mnoho rodin různých typů polymorfismů (Snustad *et* Simmons, 2009).

Nejběžnějšími změnami vyskytujícími se v genomu člověka je substituce jednotlivých nukleotidových párů. Jde o existenci několika přirozených variant (alel) v důsledku substituce jednoho nukleotidu v primární sekvenci DNA za jiný. Aby se jednalo o SNP, musí se tato substituce vyskytovat v populaci s frekvencí vyšší než 1 %. SNP jsou v genomu člověka hojně rozšířeny – více než 10 milionů s přibližnou frekvencí výskytu 3 SNP na 1000 bází DNA. Mohou se vyskytovat jak v kódujících, tak i v nekódujících sekvencích DNA. Většina SNP ale není příčinou mutantních fenotypů, protože se v genech a jejich regulačních sekvencích vyskytuje jen sporadicky. Jelikož jsou SNP zpravidla lokalizovány v blízkosti genů odpovědných za onemocnění, slouží jako genetické markery pro specifikaci oblasti na genomové mapě člověka asociované s danou chorobou. Spojitost mezi konkrétní alelou a chorobou je zjišťována především na základě asociačních studií založených na vysoce denzitních SNP mapách. Tyto mapy umožňují analýzu vazebné nerovnováhy genů ve velkých úsecích genomu až tisíci kandidátními SNP vyskytujícími se v kódujících a promotorových sekvencích. V případech, kdy je SNP vlastním původcem onemocnění, může být odpovědný gen nalezen a izolován. Pokud je identifikován defektní gen zodpovědný za onemocnění, je možno prověřit DNA izolovanou ze souboru zdravých jedinců a pacientů na přítomnost různých SNP a na základě asociační studie identifikovat SNP vzor charakteristický pro dané

onemocnění. Asociační studie se však potýkají s řadou komplikací – jejich výsledky může značně ovlivnit počet analyzovaných vzorků, demografická historie populace, etnikum, přesnost klinického popisu fenotypu, statistická metodika či odchylky nesouvisející s daným onemocněním (Snustad *et Simmons*, 2009; Hafler *et De Jager*, 2005; Štejfa, 2007; O'Brien *et al.*, 2000; Slaný *et al.*, 2008; Nussbaum *et al.*, 2004; Botstein *et Risch.*, 2003).

Jedinci v lidské populaci se v sekvenci DNA z 99,9 % shodují, přičemž až za 90 % zbývajících genomové variability člověka jsou zodpovědné právě SNP. Tento typ polymorfismu má dědičný charakter – pravděpodobnost crossing-overu mezi SNP v těsné vazbě je malá. Takové SNP, které mají sklony ke společnému dělení, tvoří genetickou jednotku, tzv. haplotyp. Díky hojné četnosti, relativně rovnoměrné distribuci v lidském genomu a své stabilitě se SNP staly důležitými genetickými markery poskytujícími cenné informace o evoluci člověka, vztazích mezi rozdílnými etnickými skupinami, ale jsou také významnými pomocníky v identifikaci genů, které hrají roli ve vnímavosti k různým onemocněním (Snustad *et Simmons*, 2009).

Jedním z hlavních cílů identifikace a studia SNP je porozumět genetickým odchylkám lidského fenotypu, ale hlavně genetickému základu komplexních onemocnění. SNP jsou podle svého efektu rozděleny na synonymní a nesynonymní. Přítomnost synonymního SNP v sekvenci DNA znamená změnu kodonu pro konkrétní aminokyselinu v jiný kodon stejného smyslu – tzn., že ve výsledném proteinu nedochází ke změně aminokyselinového složení. Nesynonymní SNP (nsSNP) mají naopak zásadní vliv na strukturu a funkci vznikajícího proteinu. nsSNP přítomný v kódující sekvenci genu může způsobit substituci aminokyseliny v proteinovém produktu, tj. vzniká nefunkční forma proteinu. nsSNP mají společně se SNP v regulačních genových oblastech největší vliv na výsledný fenotyp. Tento typ SNP představuje více než 50 % mutací, které jsou spojovány s lidskými dědičnými chorobami (Ramensky *et al.*, 2002; Krawczak *et al.*, 2000).

2.2.1 Detekce a genotypizace SNP

Pro objevování SNP existuje řada sekvenčně specifických i nespecifických přístupů. Základem pro objev polymorfismu v DNA jsou sekvenčně nespecifické metody založené na tvorbě heteroduplexů DNA a jejich specifických vlastnostech a metody založené na detekci heterozygotů v rámci konkrétní populace.

Metody zabývající se vlastnostmi heteroduplexní DNA jsou zaměřeny na specifické cílové lokusy, v rámci kterých sledujeme přítomnost/nepřítomnost polymorfismu v dané populaci. Princip těchto analýz spočívá v denaturaci a renaturaci komplementárních vláken DNA heterozygotních jedinců s jednou normální a druhou mutantní alelou. Vzniklé duplexy jsou separovány v gelu za vzrůstajících denaturačních podmínek, přičemž heteroduplexy denaturují rychleji než homoduplexy. Důsledkem je zpomalená migrace heteroduplexní DNA gelem. Fragmenty DNA o stejné velikosti jsou tedy separovány podle odlišné migrační rychlosti. Nukleotidová záměna je v analyzovaném úseku DNA potvrzena, je-li detekována přítomnost více než jednoho fragmentu. Z konkrétních metod lze využít denaturační gradientovou gelovou elektroforézu, denaturační vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii a teplotní gradientovou gelovou elektroforézu (Gojová *et* Kozák, 2006). Další možností je cíleně indukovaná lokální léze v genomech, tzv. EcoTILLING (z angl. Ecotype Target Induced Local Lesions In Genomes), jež je založena na schopnosti nukleas specifických pro jenořetězce DNA štěpit heteroduplexy – v oblasti heteroduplexu, kde vlákna DNA nejsou 100% komplementární, dojde k rozštěpení. Po závěrečné analýze na gelu je heteroduplex detekován ve formě dvou fragmentů (Barkley *et* Wang, 2008).

Na detekci heterozygotů je založena analýza konformačního polymorfismu jednořetězcové DNA (SSCP). Na základě této metody je detekována přítomnost mutované a nemutované alely v DNA jednotlivců. Oblast zájmu DNA je nejprve naamplifikována a poté zdenaturována. Konformace jednovláknových DNA fragmentů s mutací a bez mutace bude odlišná. Fragmenty se po aplikaci na nedenaturační gel pohybují v závislosti na své konformaci rozdílnou rychlostí. Při vizualizaci je u zdravého jedince patrný jeden fragment, tj. překrývající se produkty dvou přirozených alel, a u jedince s mutací pak obraz dvou fragmentů – jednoho s přirozenou variantou a druhého s mutací (Cibula *et* Petruželka, 2009; Kwok *et* Chen, 2003).

Ačkoli jsou tyto způsoby detekce základem pro objevování polymorfismů, nejsou na rozdíl od sekvenčně specifických přístupů pro řadu aplikací vhodným a spolehlivým nástrojem. Sekvenčně specifická detekce je založena na čtyřech spolehlivých obecných

mechanismech, kterými jsou alelově specifická hybridizace, alelově specifické prodlužování primeru, alelově specifická ligace oligonukleotidů a alelově specifické invazivní štěpení (Kwok, 2000).

Podstatou genotypizace SNP je určení alelické konstituce v příslušném SNP lokusu. V současné době je k dispozici několik různých genotypizačních technik, které jsou často odvozeny od klasických molekulárně-biologických metod, založených na enzymatických nebo hybridizačních technologiích (Slaný *et al.*, 2008). Ideální genotypizační přístup by měl být jednoduchý, rychlý, levný, flexibilní, přesný, robustní, snadno automatizovatelný a měl by přinášet spolehlivé výsledky (Kwok, 2001). Nejčastějším způsobem detekce polymorfismů je sekvenování cílových oblastí genomu, tzv. genotyping by sequencing, kdy pomocí sekvenačních technologií nové generace můžeme získat informace o genotypu v tisících polymorfních lokusů. K analýze alelické konstituce u velkého souboru SNP dnes existuje několik genotypizačních platform využívajících mikročipy, kdy jsou na sekvenčně specifické DNA sondy ukotvené na povrchu mikročipu nahybridizovány cílové sekvence fragmentované genomické DNA. Sond specifických vůči různým segmentům DNA může být na mikročipu přítomno až několik stovek tisíc, což umožňuje analýzu širokého spektra mutací najednou za současné úspory času, vstupního biologického materiálu i finančních prostředků. Často se jedná o komercializované vysokokapacitní metody, jež jsou prováděny kompetentní firmou (Illumina, Affymetrix) v podobě servisu (Kubistova *et al.*, 2009).

Vysokokapacitní genomické technologie, jakými jsou sekvenování nové generace a mikročipové analýzy, umožňují hlubší pochopení etiologie řady onemocnění na molekulární úrovni. Platformy využívající mikročipy je však výhodné použít pro genomické analýzy u již známých polymorfismů asociovaných s chorobou. Před aplikací čipové analýzy je nutno vybrat skupinu polymorfismů s prediktivními vlastnostmi, k čemuž slouží nízkokapacitní metody pro detekci SNP, např. sekvenace nebo Real-time PCR (Slaný *et al.*, 2008).

2.2.1.1 Genotypizace technologií MassArray

V současné době je na trhu k dispozici celá řada vysoce výkonných genotypizačních technologií, jež nabízí bezprecedentní přístup ke genetické informaci. Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS) založená na platformě MassArray je integrovaný vysoce účinný analytický systém pro identifikaci, validaci a analýzu genů s uplatněním v medicíně, molekulárně biologických studiích či farmakogenomice. Jedná se o flexibilní technologii s řadou aplikací, známou především pro svou schopnost přesné SNP analýzy. MassArray technologie je dále využitelná např. pro odhad alelických frekvencí ve vzorku DNA, kvantitativní analýzu genové exprese, objevování SNP či asociační studie. Své uplatnění má také v genotypizaci, alelově specifických expresních studiích, analýze somatických mutací, genové exprese či stavu methylocí CpG ostrovů (Jurinke *et al.*, 2005).

Podstatou MassArray technologie je kombinace molekulárně biologických technik, jako je polymerasová řetězová reakce (PCR) s hmotnostní spektrometrií, tedy technikou separační. Principem je analýza specifických PCR amplikonů studované DNA na základě pokročilé, citlivé a vysoce specifické MALDI-TOF MS, která umožňuje v jediné reakci detekovat až 36 různých alel zároveň. PCR produkty lišící se v jediném nukleotidu jsou rozlišeny na základě rozdílné molekulové hmotnosti. Pomocí této výkonné technologie je možné denně analyzovat desítky až stovky tisíc vzorků. Jedná se o moderní, citlivou, přesnou a rychlou platformu, která je výhodná nejen časově a ekonomicky, ale i z hlediska minimální spotřeby biologického materiálu.

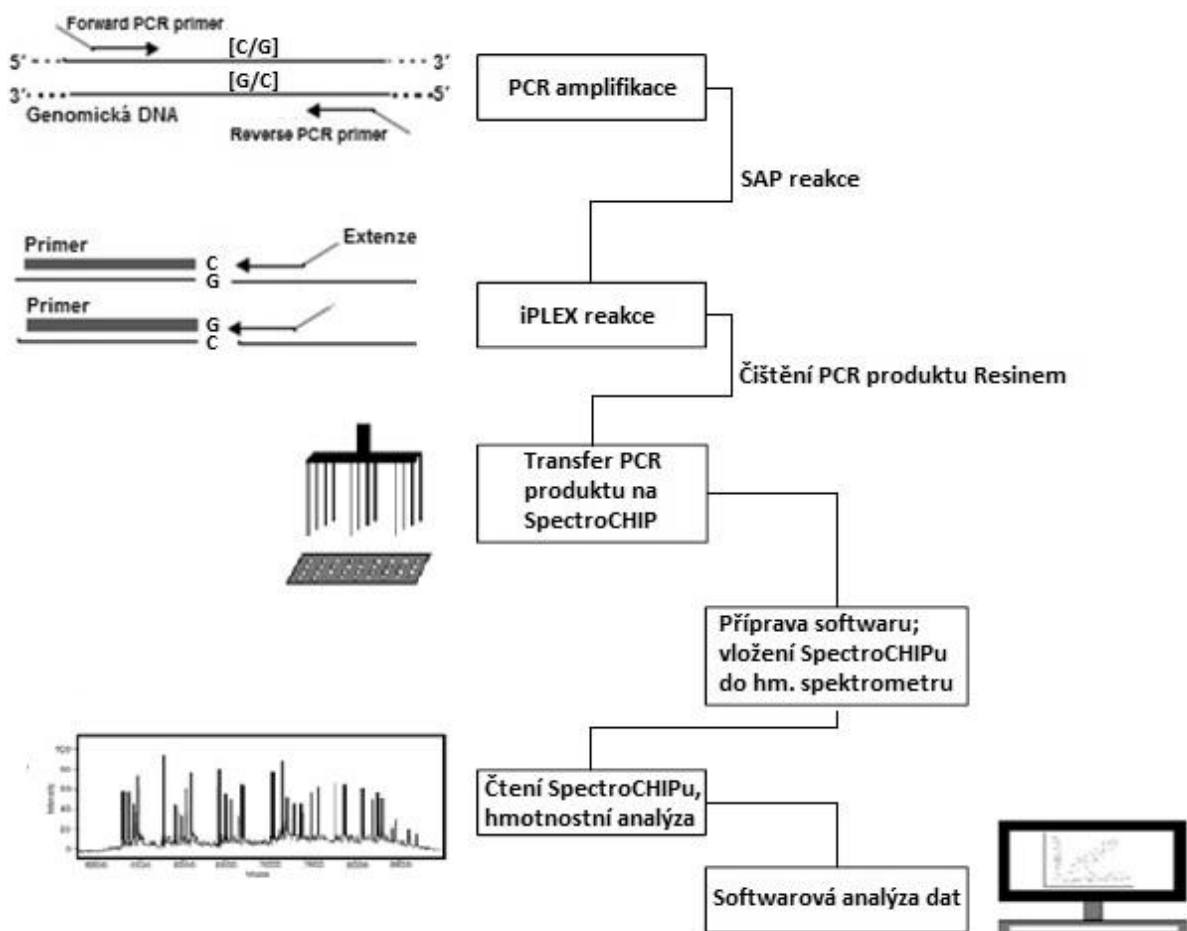
Proces MassArray genotypizace lze rozdělit do několika základních kroků (Obrázek č. 2). Pomocí PCR je nejprve naamplifikována požadovaná oblast DNA, která zahrnuje studovaný SNP. Pro amplifikaci takovýchto úseků DNA je použito specifických primerů navržených tak, aby po hybridizaci na templátový řetězec DNA ohraničily tu oblast molekuly, zahrnující daný SNP. Optimální velikost amplikonu zahrnujícího polymorfni oblast je mezi 80-120 bp. Pro získání objektivního výsledku je důležité, aby se amplifikační primery svou molekulovou hmotností dostatečně lišily od primerů extenčních. Z tohoto důvodu je k 5' koncům amplifikačních primerů přidávána dekamerní značka o známé sekvenci i molekulové hmotnosti.

Během následující enzymatické reakce, je PCR produkt inkubován s alkalickou fosfatase (shrimp alkaline phosphatase – SAP), která defosforylací inhibuje nezainkorporované deoxyribonukleotidy z předchozí reakce, čímž je zamezeno jejich

působení v dalším kroku. V následující PCR je využito extenčních primerů, které těsně přiléhají k polymorfnímu místu. Molekulová hmotnost extenčních primerů je předem známa a měla by se pohybovat v rozmezí 4500-9000 Da. V průběhu PCR reakce je extenční primer prodloužen o jeden hmotnostně modifikovaný terminační dideoxyribonukleotid o známé molekulové hmotnosti. Metoda představuje univerzální způsob detekce inzercí, delecí, substitucí a dalších polymorfismů v amplifikované DNA.

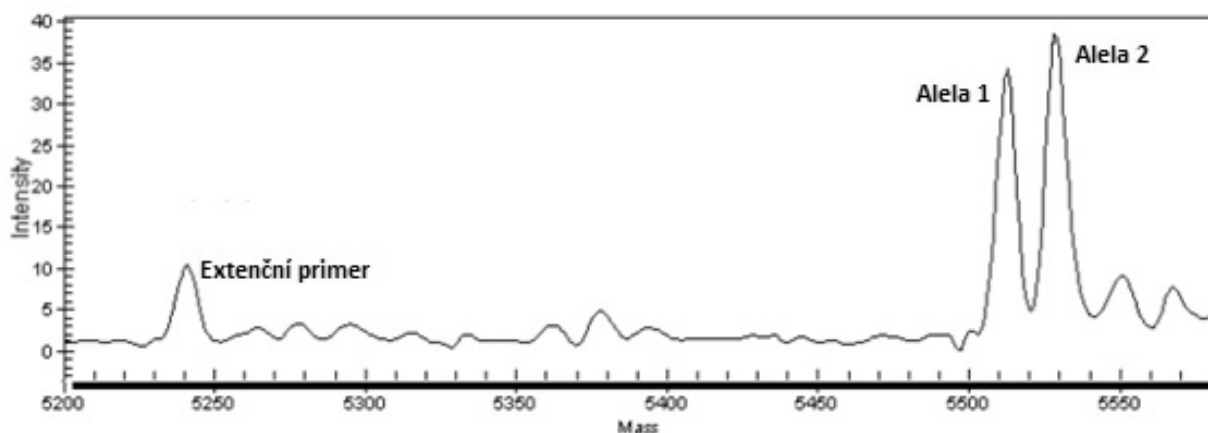
V analyzovaných vzorcích mohou být přítomny zbytky nežádoucích solí z předchozích kroků. Jejich přítomnost by vedla ke vzniku vysokého šumu na pozadí hmotnostních spekter, a je proto zapotřebí se jejich obsahu zbavit. Součástí kitu je proto kationový Clean Resin, po jehož aplikaci dojde ve vzorcích k eliminaci Na^+ , K^+ a Mg^{2+} iontů ze směsi. Toto přečištění je významným optimalizačním krokem pro následující detekci.

Samotné analýze studované DNA předchází příprava SpectroCHIPu. Na povrchu chipu z oxidu křemičitého je přítomna matrice pro MALDI-TOF MS, přičemž pro analýzu oligonukleotidů je běžně používanou MALDI matricí kyselina 3-hydroxypikolinová. Vzorky jsou pomocí MassARRAY Nanodispenseru transferovány na chip. Po styku vzorku s matricí dojde na chipu ke krytalizaci, při které se supernatant odpaří. SpectroCHIP je následně vložen do hmotnostního spektrometru, kde proběhne analýza a detekce studovaných vzorků v reálném čase. Získaná hmotnostní spektra jsou dále vyhodnocena pomocí softwarové analýzy dat. Software MassARRAY® TYPER 4.0 – Typer analyzer poskytuje uživateli vizualizaci všech výsledků zároveň, ale také i jednotlivých analýz. Software umožňuje uživateli také manuální korekci výsledků (Gabriel *et al.*, 2002; Gabriel *et al.*, 2009; Sequenom®, 2006; Orgogozo *et Rockman*, 2011).



Obrázek č. 2: Schéma průběhu MassArray genotypizace (upraveno dle Orgogozo et Rockman, 2011)

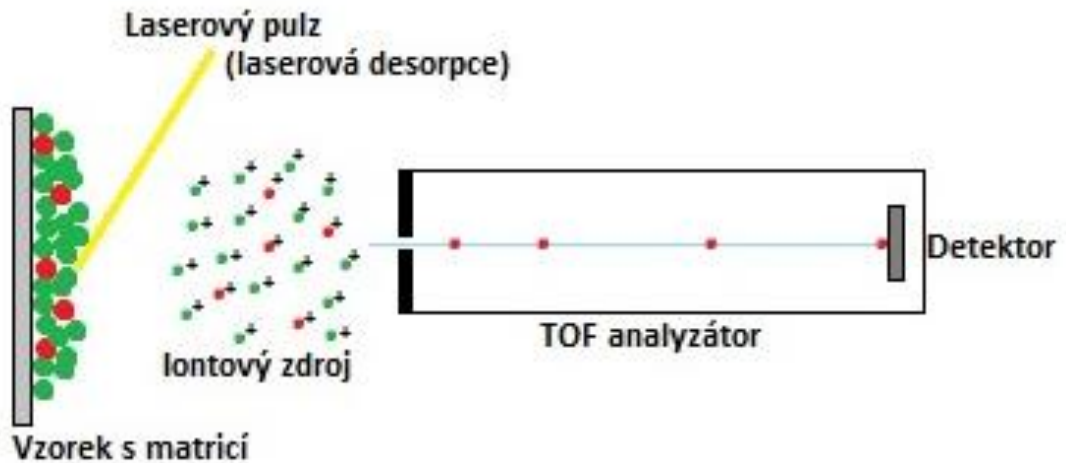
Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická technika měřící poměr hmotnosti a náboje m/z vzniklých iontů v závislosti na jejich pohybu v magnetickém či elektrickém poli. Jde o separaci nabitých částic na základě poměru m/z , přičemž výsledkem je hmotnostní spektrum (Obrázek č. 3). Jedná se o destruktivní techniku, která je vysoce citlivá, specifická a rychlá. Přístroj pro přípravu, analýzu a detekci elektricky nabitých částic v plynném stavu se nazývá hmotnostní spektrometr. Nezbytnou součástí tohoto přístroje je iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. MS je charakteristická několika základními procesy. Nejprve je vzorek převeden laserovým pulzem do plynné fáze a nabit v iontovém zdroji. Vzniklé ionty jsou dále v hmotnostním analyzátoru za přítomnosti vakua rozděleny podle měrného náboje. Takto separované ionty dopadají na detektor a signály zachycené detektorem jsou dále převedeny na hmotnostní spektrum, které je grafem závislosti relativní intenzity detekovaných pseudomolekulárních iontů na měrné hmotnosti iontů (m/z).



Obrázek č. 3: Schéma MS spektra odpovídající heterozygotnímu jedinci pro alelu 1 a 2 (upraveno dle Sequenom[®], 2006)

Při MALDI-TOF MS dochází k ionizaci vzorku laserem za přítomnosti matrice, která je nezbytnou součástí – slouží k převedení vzorku do plynného stavu a zároveň k jeho nabití. Matricí je malá organická molekula s konjugovanými chemickými vazbami, které jsou při určité vlnové délce laseru schopny absorbovat energii. Nejčastěji se jedná o aromatické karboxylové kyseliny netěkavého charakteru. Ionizace analytu je zajištěna díky hydroxylovým skupinám matrice. Po smíchání vzorku s matricí dojde ke kokystalizaci. Matrice je v důsledku působení laserového pulzu odpařena, čímž s sebou strhává i analyt, který je nasáván do analyzátoru (Obrázek č. 4). Absorpcí energie laserového paprsku matricí dojde k přenosu protonu, který ionizuje analyt v plynné fázi, přičemž ionizací získávají všechny analyzované ionty přibližně stejnou energii – převážně jednonásobný náboj. Důležitou součástí hmotnostního spektrometru spojeného s MALDI ionizací je vakuum, ve kterém je MALDI ionizace realizována – čím větší je vakuum, tím je analýza citlivější a ionty setrvávají déle v plynné fázi (Marvin *et al.*, 2003; Ragoussis *et al.*, 2006).

Hmotnostní analyzátor doby letu (TOF analyzátor) je pulzní analyzátor, který měří dobu letu iontů (řádově v ns- μ s) potřebnou pro překonání určité vzdálenosti, z níž je následně vypočítána hodnota m/z . Ionty jsou z iontového zdroje urychleny napěťovým pulzem do TOF analyzátoru, kde se v závislosti na poměru jejich hmotnosti a náboje m/z pohybují různou rychlostí. Ionty pak dopadají na detektor v různém čase – ty s menší hodnotou m/z a o stejné kinetické energii mají větší rychlost, a proto dopadají na detektor dříve, než ionty s větší hodnotou m/z . Výhodou průletového TOF analyzátoru je velmi rychlé měření spekter a teoreticky neomezený hmotnostní rozsah ($m/z < 1000000$).



Obrázek č. 4: Schéma MALDI-TOF MS

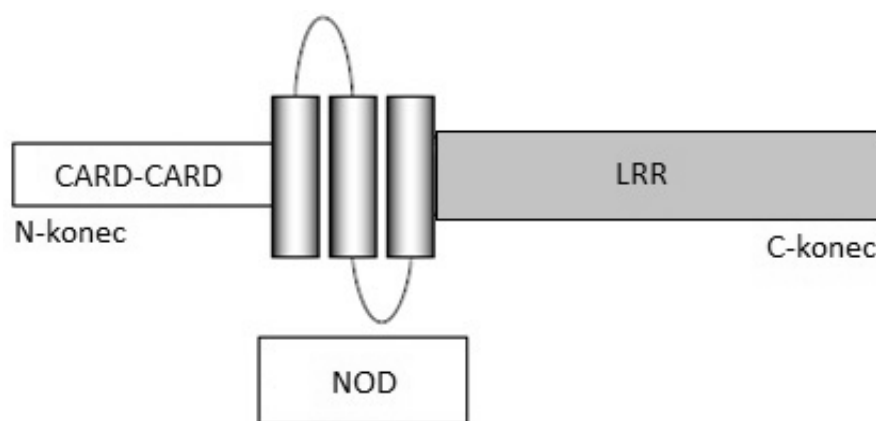
2.3 Charakteristika genů a proteinů NOD2/CARD15 a TNF α

V roce 1996 byl na základě vazebných studií identifikován genový lokus IBD1 na chromozomu 16 (Hugot *et al.*, 1996). Na začátku roku 2001 byl v témže lokusu na základě asociačního mapování identifikován gen *NOD2/CARD15*, jakožto první vnímavý faktor pro Crohnovu chorobu (CD) (Hugot *et al.*, 2001). Gen *NOD2/CARD15* je lokalizován v pericentromerické oblasti chromozomu 16 a je součástí sítě genů, která se podílí na imunitní odpovědi a regulaci apoptózy (Ogura *et al.*, 2001; Inohara *et al.*, 2001). Kóduje intracelulární protein NOD2/CARD15, jenž je preferenčně exprimován myeloidními imunitními buňkami, jako jsou monocyty, makrofágy, dendritické buňky, Panethovy buňky, ale i střevní epitelální buňky a T-lymfocyty. Tento protein je vnitrobuněčným cytoplazmatickým receptorem pro muramyl dipeptid (MDP), který je součástí peptidoglykanu tvořícího buněčnou stěnu gram-pozitivních i gram-negativních bakterií (Lala *et al.*, 2003; Hrnčířová *et al.*, 2014; Di Sabatino *et al.*, 2013).

Protein NOD2/CARD15 je členem různorodé rodiny tzv. NOD-like receptorů (NLR), tj. receptorů s oligomerizační doménou vážící nukleotid. NLR náleží do skupiny receptorů rozpoznávajících patogeny. Jsou centrálními regulátory imunitní a zánětlivé odpovědi při zánětlivých onemocněních, včetně aterosklerózy, která je asociována se zvýšenou expresí *NOD2/CARD15* (Chen *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013). Studie na myších dokládají zvýšenou expresi genu *NOD2/CARD15* v ateromech (Zong *et al.*, 2013) a interakci proteinu

NOD2/CARD15 s bakteriálními složkami v endoteliálních buňkách a kardiomyocytech (Fillon *et al.*, 2006).

Protein NOD2/CARD15 se strukturně skládá ze tří segmentů (Obrázek č. 5). N-konec zahrnuje dvě tandemové kaspasové aktivační domény CARD1 a CARD2 nezbytné pro signalizaci a regulaci apoptózy. Centrální část proteinu tvoří nukleotid-vázající oligomerizační doména NOD. C-konec je tvořen regionem bohatým na leucin (LRR), jenž má funkci receptoru a je zároveň zodpovědný za asociaci NOD2/CARD15 s buněčnou membránou (Lakatos *et al.*, 2006; Hrnčířová *et al.*, 2014).



Obrázek č. 5: Struktura proteinu NOD2/CARD15 (upraveno dle Lakatos *et al.*, 2006)

Interakce receptoru s ligandem ústí v oligomerizaci CARD domén. Tato konformační změna vede k signalizaci zprostředkované serin/threonin kinasou RIP2, jež je nezbytná pro aktivaci NF- κ B signální dráhy a mitogenně aktivované protein-kinasové dráhy MAPK. Aktivovaný transkripční faktor NF- κ B indukuje genovou expresi zánětlivých cytokinů, chemokinů a adhezivních molekul. Těmito látkami jsou např. tumor nekrotizující faktor α (TNF- α), interleukin 1 β , 6 a 8 (IL-1 β , IL-6, IL-8) nebo membránový kofaktorový protein 1, důležité pro stimulaci dalších efektorových buněk během obranné reakce hostitele (Abraham *et Cho*, 2006; Chen *et al.*, 2009).

Proteiny NOD1 a NOD2 regulují aktivaci jaderného faktoru κ B (NF- κ B) v lidských fibroblastech a aortálních endoteliálních buněčných liniích. Jedná se o formu odpovědi těchto buněk na přítomnost bakterií, např. *Chlamydia pneumoniae*, která představuje jeden z nejčastěji detekovaných bakteriálních druhů v aterosklerotických placích (El Mokhtari *et al.*, 2007).

V genu *NOD2/CARD15* bylo doposud identifikováno několik mutací. SNP tohoto genu byly jako první asociovány se zánětlivým onemocněním střev (Holler *et al.*, 2004). Polymorfismy v tomto genu vedou ke snížené schopnosti buněk rozpoznávat MDP nebo její úplné ztrátě, s čímž dále souvisí porucha regulace podřízených signálních drah.

U několika etnických skupin byly SNP v *NOD2/CARD15* asociovány s CD. Za nejvíce rizikové jsou považovány genové varianty v LRR oblasti genu *NOD2/CARD15*. Konkrétně se jedná o SNP R702W, G908R a Leu1007insC. Až polovina pacientů s CD v rámci bělošské populace je nositelem alespoň jednoho z uvedených SNP. Polymorfnní varianty genu *NOD2/CARD15* jsou kromě CD asociovány také s několika dalšími onemocněními, např. astmatem, atopickým ekzémem, Blauovým syndromem, ale i v tzv. nemoci štěpu proti hostiteli (graft versus host disease) (Hampe *et al.*, 2001; Serbati, *et al.*, 2014; Kabesch *et al.*, 2003; Weidinger *et al.*, 2005; Mitrovič *et Potočnik*, 2011; Kanaan *et al.*, 2012; Holler *et al.*, 2004; Miceli-Richard *et al.*, 2001).

Gen *TNF α* je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 6 uvnitř hlavního histokompatibilního komplexu a kóduje protein s názvem tumor nekrotizující faktor alfa (*TNF α*). Jedná se o prozánětlivý cytokin vyskytující se v organismu v transmembránové a volné – solubilní formě. Jeho produkce je zajištěna především makrofágy a monocyty, ale je syntetizován i různými krevními elementy, endoteliálními buňkami, buňkami hladkého svalstva nebo kardiomyocyty (Rink *et Kirchner*, 1996; González *et al.* 2007; Tsukamoto *et al.*, 1998).

TNF α signalizaci zprostředkovávají dva specifické receptory TNFR1 a TNFR2, které stimulují dvě odlišné intracelulární dráhy. TNFR1 je na rozdíl od TNFR2 exprimován téměř ve všech buňkách. Exprese TNFR2 je omezena na specifické typy buněk, kterými jsou např. T-lymfocyty, endoteliální buňky nebo oligodendrocyty. Také struktura obou receptorů je odlišná. Zatímco extracelulární části těchto receptorů jsou podobné, jejich cytoplazmatické části se značně liší. Cytoplazmatická část receptoru TNFR1 obsahuje tzv. domény smrti, které interagují s proteiny s podobnými doménami, např. TRADD, FADD. Tento strukturální rozdíl v cytoplazmatických částech obou receptorů, odrážející se v interakci s odlišnými proteiny, vede k různé buněčné odpovědi. Funkce a signalizace *TNF α* však nezávisí pouze na interakci s receptory. Zásadní roli v této buněčné signalizaci hrají vyšší oligomerní struktury proteinu – *TNF α* je funkční v podobě homotrimeru, přičemž každý z dílčích

monomerů interaguje s receptorem TNFR1 nebo TNFR2 (Güven-Maiorov *et al.*, 2014; Wajant *et al.* 2003).

Tento důležitý pleiotropní cytokin se podílí na širokém spektru biologických procesů zahrnujících buněčnou proliferaci, diferenciaci, apoptózu, lipidový metabolismus, koagulaci, fibrinolýzu a ovlivňuje i inzulínovou rezistenci nebo endoteliální funkce. Poruchy exprese genu *TNFα* jsou zahrnuty do patogeneze celé řady lidských onemocnění, potransplantačních komplikací a jeho polymorfismy jsou asociovány s autoimunitními a zánětlivými onemocněními (Wajant *et al.* 2003; Rink *et al.* 1996; González *et al.* 2007).

Biologické funkce *TNFα* jsou složité a rozmanité – na jedné straně poskytuje bariéru vůči vzniku onemocnění, na straně druhé způsobuje patologické komplikace. V akutních fázích je lokální produkce *TNFα* nezbytná – stimuluje produkci cytokinů a funguje jako kostimulátor aktivace T-lymfocytů. Aby mohly být imunitní buňky (neutrofilů a makrofágů) transportovány do míst poškození tkáně a infekce, dochází prostřednictvím *TNFα* ke zvýšení exprese adhezivních molekul v cévním endotelu. Snížená produkce a aktivita proteinu *TNFα* nebo dokonce jeho úplná absence může vést k selhání obranných mechanismů organismu a snížení imunitní odpovědi vůči patogenům. Na druhou stranu dlouhodobé působení *TNFα* může mít vážný nepříznivý dopad. Vysoká hladina *TNFα* v krvi je spojena s toxickým šokem vyvolaným bakteriálními endotoxiny. Jeho zvýšená hladina byla zaznamenána i u pacientů s nestabilní anginou pectoris, revmatoidní artritidou a autoimunitními poruchami. Nadměrná exprese genu *TNFα* také přispívá např. k dysfunkci levé srdeční komory, kardiomyopatii nebo plicnímu edému (Elahi *et al.*, 2009; Kaplan *et al.* 1996; Kubistova *et al.*, 2009; Barbara *et al.*, 1996). *TNFα* je přítomen i v periferní krvi pacientů s chronickou ICHS a akutním koronárním syndromem. Zvýšená hladina cytokinu *TNFα* byla společně s interleukiny 1 a 6 detekována také u pacientů s AIM, kdy během akutní myokardiální ischemie je v myokardu zahájena jeho syntéza (Guillen *et al.*, 1995). V případě srdečního selhání byl prokázán i negativní inotropní účinek tohoto proteinu (González *et al.* 2007).

Polymorfismy v lidském genu *TNFα* hrají významnou roli v citlivosti vůči některým chorobám a jejich závažnosti (jako například u autoimunitních a zánětlivých onemocnění). Největší dopad na fenotyp mají zejména SNP v promotorové oblasti tohoto genu. Přítomnost SNP v této specifické funkční sekvenci DNA může vést ke zvýšené transkripční aktivitě, a tím i k nadprodukci proteinu *TNFα* (Rink *et al.* 1996; Elahi *et al.*, 2009).

3 CÍLE PRÁCE

Cíle diplomové práce je možno shrnout do těchto pěti bodů:

1. Vypracování literární rešerše na téma: Stanovení polymorfismů *NOD2/CARD15* u pacientů s akutním infarktem myokardu.
2. Izolace DNA z periferní krve pacientů s akutním infarktem myokardu pomocí izolátoru DNA Arrow.
3. MassArray genotypizace polymorfismů rs2066844 (R702W), rs2066845 (G908R) a rs2066847 (1007InsC) genu *NOD2/CARD15* a dále rs1800629 (TNF-308) genu *TNF α* u vybraného souboru pacientů.
4. Statistické vyhodnocení alelických a genotypových frekvencí, analýza Hardy-Weinbergovy rovnováhy.
5. Ověření genetické asociace studovaných polymorfismů se zvýšeným rizikem výskytu akutního infarktu myokardu u vybraného souboru pacientů.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Biologický materiál

Jako biologický materiál pro praktickou část diplomové práce byla použita periferní krev 158 pacientů, kteří prodělali akutní infarkt myokardu (Tabulka č. 1), a jsou léčeni na 1. Interní klinice kardiologické Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc. Kontrolní skupinu tvořily vzorky periferní krve 93 zdravých anonymních dárců. Jako referenční DNA byla použita komerčně dostupná DNA NA17252 Human variation panel – Caucasian panel of 100 (Coriell Institute, New Jersey, USA).

Tabulka č. 1: Charakteristika vybraného souboru 158 pacientů s AIM

	Počet	Věkové rozmezí	<50	≥50	Věkový průměr
Muži	112	29-85	25	87	57,9
Ženy	46	47-87	2	44	64,1

4.2 Chemikálie

96% ethanol (FAGRON a.s., Česká republika)

50% ethanol (FAGRON a.s., Česká republika)

Arrow Blood DNA 500 Extraction Kit (DiaSorin, Ireland)

iPLEX Gold Reagent Kit (Sequenom[®], USA)

- Calibrator
- Clean Resin
- dNTP mix
- iPLEX Buffer
- iPLEX Enzyme
- iPLEX Termination mix
- MgCl₂
- PCR Buffer (10x)
- SAP enzyme

– TS Buffer

PCR enzym – HotStar <i>Taq</i>	(Roche, Germany)
PCR voda na ředění vzorků	(5 PRIME, Germany)
Primery	(Integrated DNA technologies, USA)
Sterilní deionizovaná voda	

4.3 Vybavení laboratoře

V rámci praktické části diplomové práce byly v laboratoři využívány tyto přístroje:

Centrifuga Z300	(Hermle)
Chladnička	(Liebherr)
Izolátor DNA Arrow	(NORDIAG)
Laboratorní mraznička	(Liebherr)
LabRoller Rotator	(Labnet)
Laminární box	(BIOAIR)
MassARRAY Analyzer Compact	(Sequenom [®])
MassARRAY Nanodispenser	(Sequenom [®])
Mikropipety (0,1-1000 µl)	(Eppendorf)
Minicentrifuga Soectrafufe C1301	(Labnet)
Multikanálová pipeta	(Eppendorf)
Nanodrop 2000 spectrophotometer	(Thermo Scientific)
Pracovní stanice HP XW4600	
Termocyklér AG 6325	(Eppendorf)
Vortex mixer	(Labnet)

4.4 Spotřební materiál

Krycí PCR fólie	(Eppendorf)
Mikrotitrační destičky (formát 96)	(Eppendorf)
Mikrozkumavky (1,5 ml, 2 ml)	(Eppendorf)
Pipetovací špičky s filtrem/bez filtru	(Eppendorf)
SpectroCHIP arraye	(Sequenom [®])
Zamrazovací mikrozkumavky (1,5 ml)	(Eppendorf)

4.5 Metody

4.5.1 Mikroizolace DNA pomocí přístroje Arrow

Vzorky periferní krve (5-10 ml) odebrané do zkumavek s antikoagulačním činidlem K2-EDTA byly nejprve jemným několikanásobným převrácením zkumavky řádně promíchány.

Následně bylo z každé zkumavky pipetou odebráno 500 μ l krve do 1,5 ml zkumavky, ze které byla provedena automatizovaná izolace DNA pomocí Arrow Blood DNA 500 Extraction Kitu (DiaSorin, Ireland) přístrojem Arrow. Získaná DNA byla na konec rozpuštěna v 400 μ l elučního pufru.

Po izolaci byla spektrofotometrickým měřením pomocí přístroje Nanodrop změřena čistota a koncentrace vyizolované DNA.

4.5.2 PCR amplifikace DNA

Před zahájením PCR amplifikace DNA bylo potřeba každý vzorek DNA naředit adekvátním objemem deionizované vody na koncentraci 10 ng/ μ l a také připravit směs primerů odpovídajících hledaným SNP. Příslušné lyofilizované primery byly naředěny deionizovanou vodou v zásobní roztoky o koncentraci 100 pmol/ μ l. Ze zásobního roztoku každého primeru bylo následně odebráno 10 μ l, které byly doplněny 90 μ l deionizované vody na pracovní roztok o koncentraci 10 pmol/ μ l. Smícháním pracovních roztoků jednotlivých primerů vznikla směs primerů potřebná pro PCR amplifikaci DNA. Sekvence použitých reverse a forward primerů jsou uvedeny v Tabulce č. 2.

Poté byl připraven PCR mix obsahující tyto komponenty: deionizovaná voda, PCR Buffer, MgCl₂, dNTP mix, primer mix, HotStarTaq[®]. Objemy a koncentrace výše uvedených komponent pro přípravu PCR mixu na 1 vzorek jsou uvedeny v Tabulce č. 3. Připravený PCR mix byl dále rozpipetován po 4 μ l do jamek mikrotitrační destičky. Dále byl do první jamky mikrotitrační destičky napipetován 1 μ l deionizované vody (negativní kontrola) a vertikálně do druhé jamky 1 μ l referenční komerčně dostupné DNA NA17252 Human variation panel – Caucasian panel of 100 (Coriell Institute, New Jersey, USA) – pozitivní kontrola. Do každé zbývající jamky byl poté přidán 1 μ l příslušné naředěné DNA. Následně byla mikrotitrační destička přelepena krycí PCR fólií a po dobu 35 s centrifugována při 2750 rpm. Na konec

byla destička vložena do termocykléru, kde proběhla PCR amplifikace dle podmínek uvedených v Tabulce č. 4.

Tabulka č. 2: Sekvence použitých primerů pro sledované SNP

SNP	5'-3' sekvence reverse primeru	5'-3' sekvence forward primeru
rs1800629	ACGTTGGATGGGTCCCCAAAAGAAATGGAG	ACGTTGGATGGATTTGTGTGTAGGACCCTG
rs2066844	ACGTTGGATGATGGAGTGGAAAGTGCTTGCG	ACGTTGGATGAGTGCCAGACATCTGAGAAG
rs2066845	ACGTTGGATGCTGACACTGTCTGTTGACTC	ACGTTGGATGGTGATCACCCAAGGCTTCAG
rs2066847	ACGTTGGATGCTTCCAGGATGGTGTCATTC	ACGTTGGATGCCAGGTTGTCCAATAACTGC

Tabulka č. 3: Složení PCR mixu pro 1 vzorek

Chemikálie	Objem [μ l]
H ₂ O	2,40
PCR Buffer (10x)	0,50
MgCl ₂ (25 mM)	0,40
dNTP mix (25 mM)	0,10
Primer mix (1 μ M)	0,50
HotStarTaq [®] (5 U/ μ l)	0,10
Celkový objem	4,00

Tabulka č. 4: Cyklizační schéma PCR amplifikace

Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
95	2	
95	0,5	45
56	0,5	
72	1	
72	5	
4	∞	

4.5.3 SAP reakce

Tato enzymatická reakce je nezbytná pro inaktivaci volných deoxyribonukleotidů, k níž dochází pomocí enzymu SAP. Po PCR amplifikaci byla destička 35 s centrifugována při 2750 rpm. Do jednotlivých jamek byly přidány 2 μl SAP mixu, který byl složen z následujících komponent: deionizovaná voda, SAP Buffer, SAP enzyme. Objemy a koncentrace jednotlivých komponent mixu jsou uvedeny v Tabulce č. 5. Následně byla destička přelepena krycí PCR fólií, centrifugována po dobu 35 s při 2750 rpm a vložena do termocykléru, kde došlo k enzymatické reakci za podmínek uvedených v Tabulce č. 6.

Tabulka č. 5: Složení SAP mixu pro 1 vzorek

Chemikálie	Objem [μl]
H ₂ O	1,53
SAP Buffer (10x)	0,17
SAP enzyme (1,7 U/ μl)	0,30
Celkový objem	2,00

Tabulka č. 6: Schéma enzymatické reakce SAP

Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas [min]
37	40
85	5
4	∞

4.5.4 iPLEX PCR

Jedná se o PCR, při níž jsou použity extenční primery o známé molekulové hmotnosti specifické pro studovaný SNP. Primery v lyofilizovaném stavu o různé koncentraci byly nejprve na základě svých rozdílných molekulových hmotností rozděleny do skupin a naředěny odpovídajícím objemem deionizované vody na koncentraci 400 pmol/ μl . Poté byl

ze zásobních roztoků extenčních primerů připraven primer mix. Sekvence a molekulové hmotnosti použitých extenčních primerů jsou uvedeny v Tabulce č. 7.

Po ukončení SAP reakce byla destička 35 s centrifugována při 2750 rpm. Byl připraven iPLEX mix sestávající z těchto komponent: deionizovaná voda, iPLEX Buffer Plus, iPLEX Termination mix, Primer mix, iPLEX enzyme. Objemy a koncentrace jednotlivých komponent mixu jsou uvedeny v Tabulce č. 8. Do každé jamky destičky byly přidány 2 µl iPLEX mixu, destička byla poté přelepena krycí PCR fólií, centrifugována 35 s při 2750 rpm a vložena do termocykléru, kde proběhla PCR reakce, jejíž podmínky jsou uvedeny v Tabulce č. 9.

Tabulka č. 7: Sekvence použitých extenčních primerů pro sledované SNP a jejich molekulová hmotnost

SNP	5'-3' sekvence primeru	Molekulová hmotnost (Da)
rs1800629	CTGGAGGCTGAACCCCGTCC	6079,0
rs2066844	TCTGAGAAGGCCCTGCTC	5475,6
rs2066845	CGTCACCCACTCTGTTGC	5386,5
rs2066847	AGCCCTCCTGCAGGCC	5092,3

Tabulka č. 8: Složení iPLEX mixu pro 1 vzorek

Chemikálie	Objem [µl]
H ₂ O	0,739
iPLEX Buffer Plus (10x)	0,200
iPLEX Termination mix	0,100
Primer mix	0,940
iPLEX enzyme	0,021
Celkový objem	2,000

Tabulka č. 9: Cyklizační schéma iPLEX PCR

Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů	
94	30		
94	5	5	40
52	5		
80	5		
72	180		
4	∞		

4.5.5 Vycištění PCR produktů, příprava mikroarraye, MassArray MS

Po skončení iPLEX PCR byla mikrotitrační destička s PCR produkty 35 s centrifugována při 2750 rpm. Pro odstranění nežádoucích solí přítomných ve vzorcích z předchozích kroků bylo následně ke každému PCR produktu v mikrotitrační destičce přidáno 41 μ l deionizované vody a 6 mg Resinu. Destička byla dále přelepena krycí fólií a upevněna na rotátor, kde 30 min probíhalo čištění. Poté následovala centrifugace – 5 min při 2750 rpm.

Poté byl pomocí MassArray Nanodispenseru proveden transfer malého množství PCR produktů (4-20 nl) na SpectroCHIP.

Dalším krokem byla MassArray analýza vzorků hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF v reálném čase. Získaná experimentální data byla vyhodnocena softwarem MassARRAY[®] TYPER 4.0 – Typer analyzer, který umožňuje jak vizualizaci všech výsledků zároveň, tak i podrobné analýzy jednotlivých vzorků.

4.6 Statistické vyhodnocení

Hardy-Weinbergův zákon

Jde o matematický vztah, jenž charakterizuje vzájemné četnosti alel a alelových kombinací. Umožňuje z alelových četností v populaci předpovědět její genotypové četnosti. Na základě chování skutečné a ideální panmiktické populace umožňuje hodnotit genofond a tím i rovnováhu a možný genetický vývoj a rizika skutečné populace.

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$$p + q = 1$$

p^2 ...frekvence dominantního homozygota

$2pq$...frekvence heterozygota

q^2 ...frekvence recesivního homozygota

p ...frekvence dominantní alely

q ...frekvence recesivní alely

χ^2 test (chí-kvadrát test)

Statistická metoda, pro stanovení shody nebo neshody mezi ideální a skutečnou populací na základě porovnání zjištěných a vypočtených počtů jedinců s konkrétním fenotypem. Jde o testování shody mezi pozorovanými a očekávanými počty.

$$\chi_N^2 = \sum (x_i - e_i)^2 / e_i$$

x_i ...zjištěné hodnoty

e_i ...očekávané hodnoty

N ...počet stupňů volnosti ($N = n - 1$)

n ...počet fenotypových tříd

Porovnáním vypočítané hodnoty s kritickou tabulkovou hodnotou χ^2 testu odpovídající zvolené hladině významnosti (nejčastěji 5 %) při daném počtu stupňů volnosti zjistíme, zda je vypočítaná hodnota nižší či vyšší. Pokud jde o nižší hodnotu, můžeme říci, že analyzovaná populace je ve shodě s teoretickým předpokladem, čili je v rovnováze, je stabilní.

Genotypová frekvence – vyjádření relativní četnosti daného genotypu v souboru všech genotypů v populaci.

$$f_g = n_x/n_c$$

f_g ...genotypová frekvence

n_x ...počet jedinců pro daný genotyp

n_c ...celkový počet genotypizovaných jedinců

Alelická frekvence – vyjádření podílu zastoupení dané alely vůči celkovému počtu alel v populaci.

$$f_a = (2n_x + n_y)/2n_c$$

f_a ...alelická frekvence

n_x ...počet homozygotních jedinců pro danou alelu

n_y ...počet heterozygotních jedinců

n_c ...celkový počet genotypizovaných alel

Fenotypová frekvence (nosičství) – vyjádření podílu nositelů dané alely vůči celkovému počtu jedinců.

$$f_f = (n_x + n_y)/n_c$$

f_f ...fenotypová frekvence

n_x ...počet homozygotních jedinců pro danou alelu

n_y ...počet heterozygotních jedinců

n_c ...celkový počet genotypizovaných jedinců

Statistická významnost (p) – hodnota vypovídající o významnosti výsledku testu na základě intervalu spolehlivosti. Je-li p-hodnota menší nežli zvolená hladina významnosti (tj. 0,05), pak je výsledek statisticky významný – signifikantní.

Relativní riziko (RR) – umožňuje srovnat pravděpodobnost výskytu sledovaného znaku ve dvou různých populacích. Určuje míru asociace, přičemž sledovaný znak je považován za rizikový faktor vnímavosti k dané nemoci, je-li $RR > 1,00$; naopak je-li hodnota $RR < 1,00$, pak se jedná o faktor protektivní.

$$RR = P_1/P_0 = \frac{\frac{a}{a+b}}{\frac{c}{c+d}}$$

P_1 ...pravděpodobnost výskytu sledovaného znaku v experimentální populaci

P_0 ...pravděpodobnost výskytu sledovaného znaku v kontrolní populaci

a...počet jedinců se sledovaným znakem v experimentální populaci

b...počet jedinců bez sledovaného znaku v experimentální populaci

c...počet jedinců se sledovaným znakem v kontrolní populaci

d...počet jedinců bez sledovaného znaku v kontrolní populaci

5 VÝSLEDKY

Pro praktickou část diplomové práce bylo vyizolováno 158 vzorků DNA z periferní krve pacientů s prodělaným AIM a 93 vzorků DNA z periferní krve potencionálně zdravých nepříbuzných dárců. Oba soubory vyšetřovaných jedinců byly značně heterogenní – počet jedinců, pohlaví, věk, kouření apod.

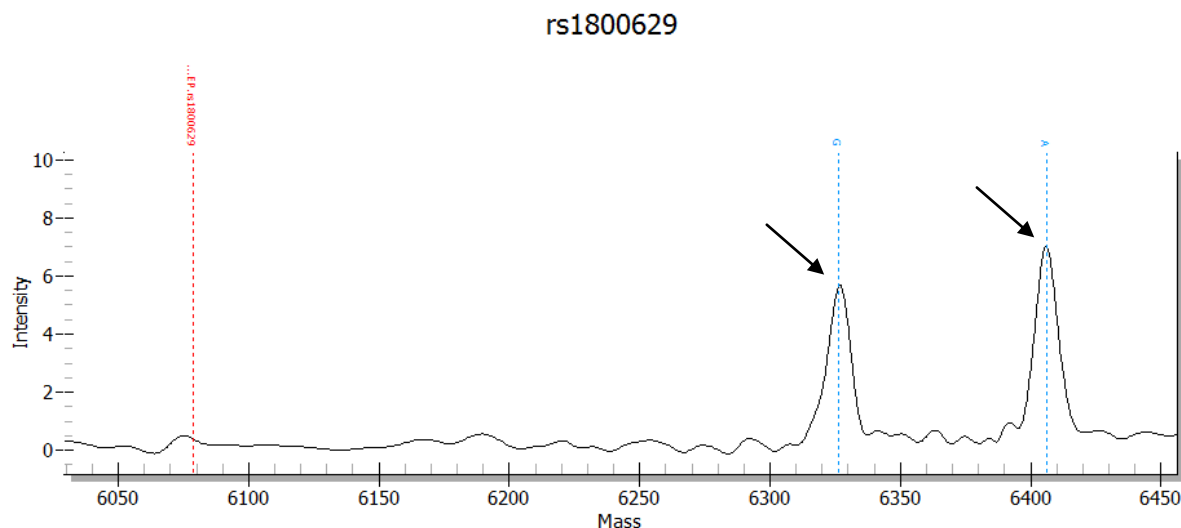
V rámci diplomové práce byly sledovány 4 různé SNP, a to: rs1800629 (TNF-308) genu *TNF α* ; rs2066844 (R702W), rs2066845 (G908R) a rs2066847 (1007InsC) genu *NOD2/CARD15*.

Genotypizací byla ve sledovaném souboru 158 pacientů s AIM stanovena přítomnost 65 nositelů (41,1 %) alespoň jednoho sledovaného SNP, v kontrolní skupině pak 41 nositelů (44,7 %). Na základě statistického vyhodnocení experimentálně získaných dat bylo zjištěno, že distribuce sledovaných SNP byla v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou.

rs1800629 (TNF-308) genu *TNF α*

V souboru pacientů se vyskytoval genotyp GG v 76 % případů, genotyp GA ve 21 % a AA ve 3 % případů. V souboru kontrolních jedinců se vyskytoval genotyp GG v 72 % případů, genotyp GA ve 26 % a AA ve 2 % případů.

Genotypizací byla v souboru pacientů zjištěna přítomnost 38 nositelů (24 %) rizikové alely A. V kontrolní skupině bylo přítomno 26 nositelů (28 %) této alely. Mezi sledovaným souborem pacientů a jedinci z kontrolní skupiny nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v genotypových a alelických frekvencích, kdy $p > 0,05$ (Tabulka č. 10). Schéma MS spektra odpovídající heterozygotnímu jedinci pro genotyp GA je uvedeno na Obrázku č. 6.

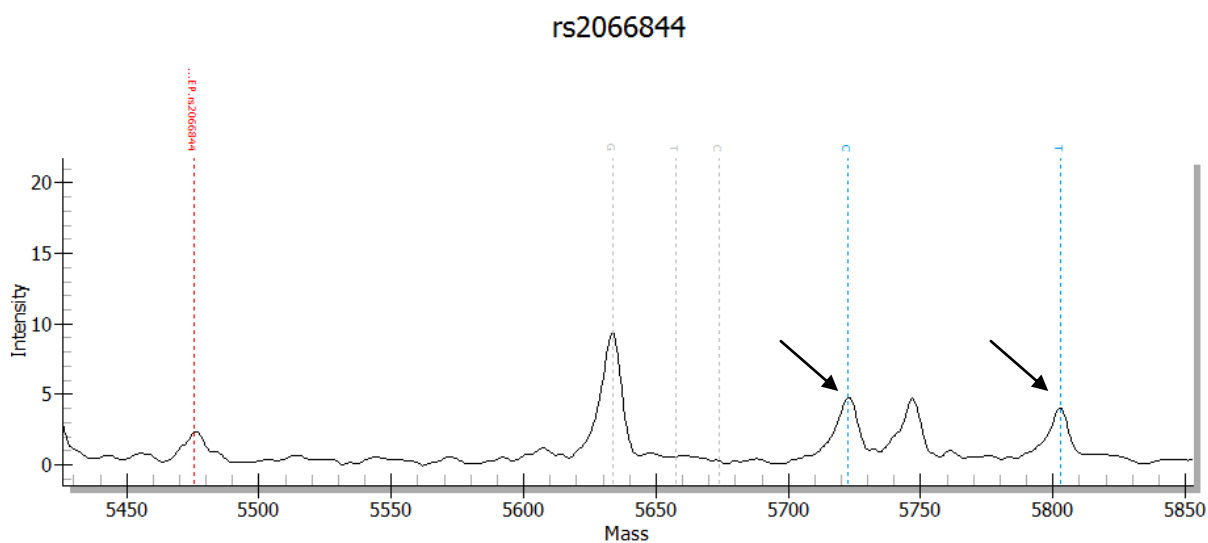


Obrázek č. 6: Hmotnostní spektrogram heterozygota (genotyp GA) u rs1800629 (TNF-308)

rs2066844 (R702W) genu *NOD2/CARD15*

V souboru pacientů se vyskytoval genotyp CC v 89 % případů, genotyp CT v 11 % a TT v žádném z případů. V souboru kontrolních jedinců se vyskytoval genotyp CC v 95 % případů, genotyp CT v 5 % a TT v žádném z případů.

Genotypizací byla v souboru pacientů zjištěna přítomnost 18 nositelů (11 %) rizikové alely T. V kontrolní skupině bylo přítomno 5 nositelů (5 %) této alely. Mezi sledovaným souborem pacientů a jedinci z kontrolní skupiny nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v genotypových a alelických frekvencích, kdy $p > 0,05$ (Tabulka č. 10). Schéma MS spektra odpovídající heterozygotnímu jedinci pro genotyp CT je uvedeno na Obrázku č. 7.

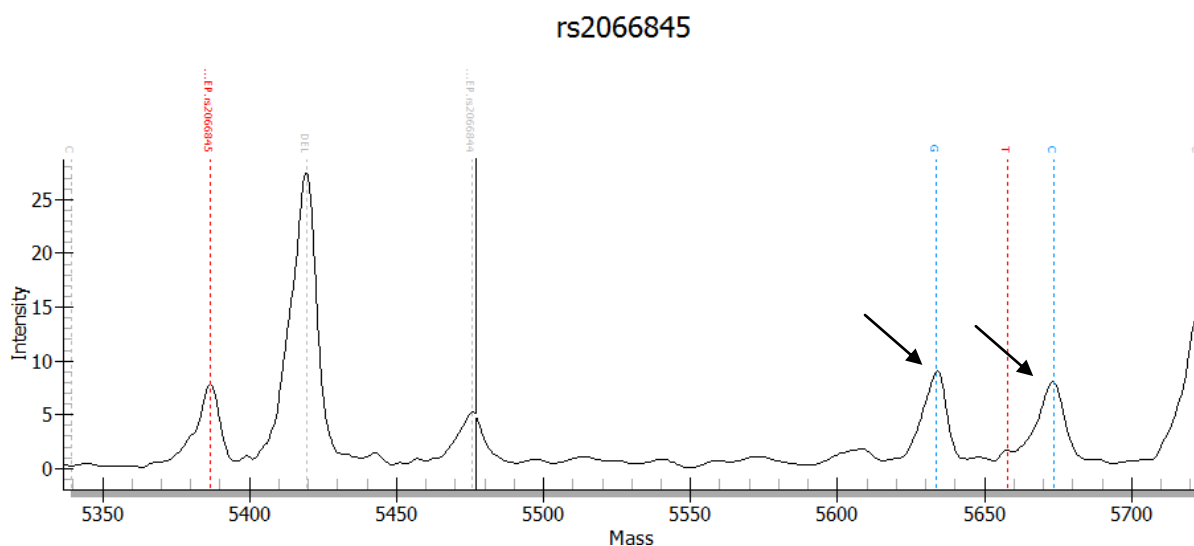


Obrázek č. 7: Hmotnostní spektrogram heterozygota (genotyp CT) u rs2066844 (R702W)

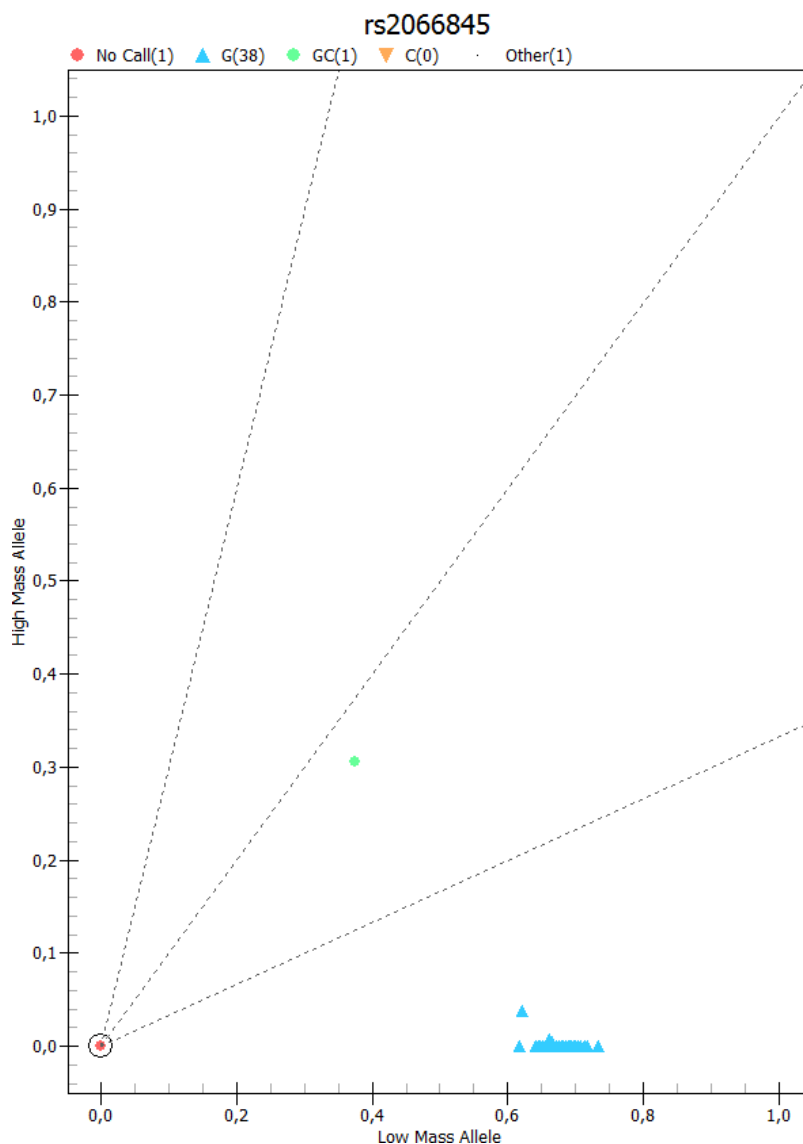
rs2066845 (G908R) genu *NOD2/CARD15*

V souboru pacientů se vyskytoval genotyp GG v 98 % případů, genotyp GC ve 2 % a CC v žádném z případů. V souboru kontrolních jedinců se vyskytoval genotyp GG v 99 % případů, genotyp GC v 1 % a CC v žádném z případů.

Genotypizací byla v souboru pacientů zjištěna přítomnost 3 nositelů (2 %) rizikové alely C. V kontrolní skupině byl přítomen 1 nositel (1 %) této alely. Mezi sledovaným souborem pacientů a jedinci z kontrolní skupiny nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v genotypových a alelických frekvencích, kdy $p > 0,05$ (Tabulka č. 10). Schéma MS spektra odpovídající heterozygotnímu jedinci pro genotyp GC je uvedeno na Obrázku č. 8. Obrázek č. 9 představuje diagram zastoupení jednotlivých genotypů pro rs2066845 (G908R) u 39 pacientů s AIM.



Obrázek č. 8: Hmotnostní spektrogram heterozygota (genotyp GC) u rs2066845 (G908R)



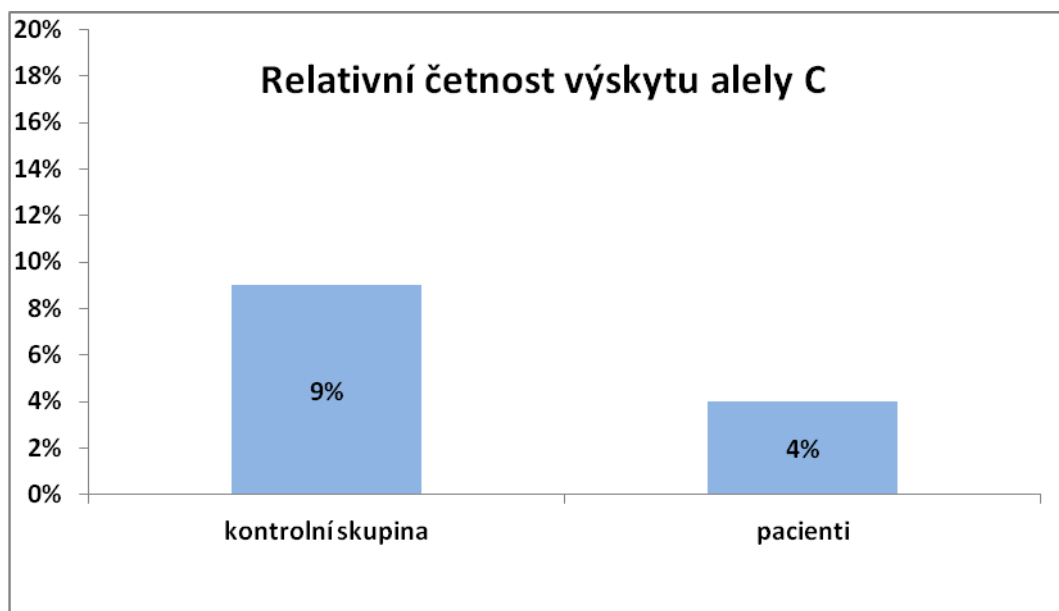
Obrázek č. 9: Diagram zastoupení genotypů pro rs2066845 (G908R); reprezentativní příklad. Modrý symbol značí genotyp GG, zelený genotyp GC, žlutý symbol má reprezentovat genotyp CC (zde není detekován). Červený symbol pak odpovídá negativní kontrole.

rs2066847 (1007InsC) genu *NOD2/CARD15*

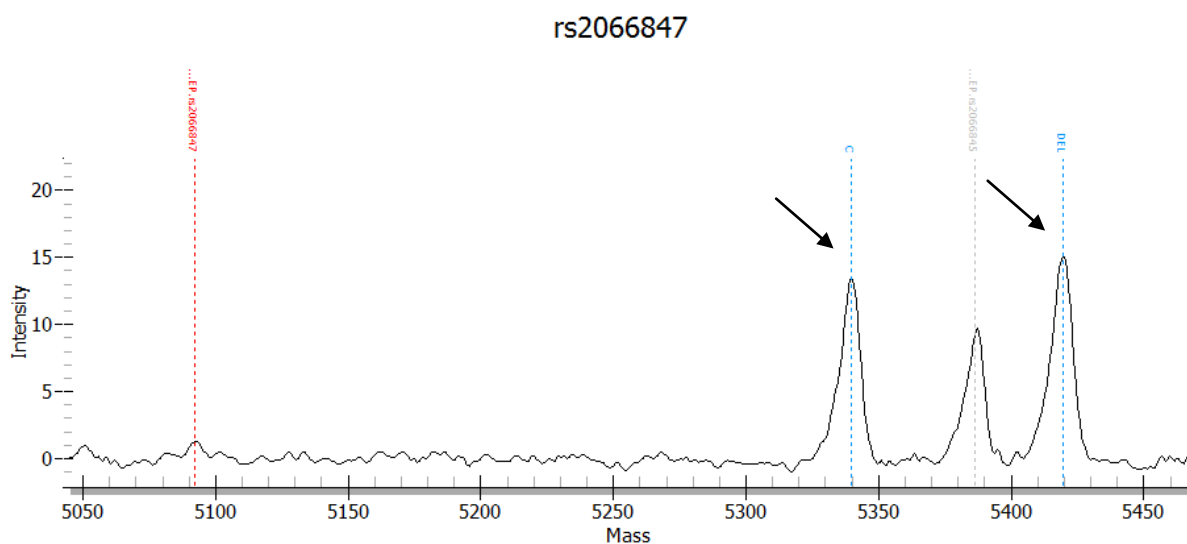
V souboru pacientů se vyskytoval genotyp DELDEL v 92 % případů, genotyp C.DEL v 7 % a CC v 1 % případů. V souboru kontrolních jedinců se vyskytoval genotyp DELDEL v 83 % případů, genotyp C.DEL v 16 % a CC v 1 % případů.

Genotypizací byla v souboru pacientů zjištěna přítomnost 13 nositelů (8 %) rizikové alely C. V kontrolní skupině bylo přítomno 16 nositelů (17 %) této alely. Relativní četnost výskytu alely C v obou skupinách znázorňuje Graf č. 1. Mezi sledovaným souborem pacientů a jedinci z kontrolní skupiny byl zjištěn signifikantní rozdíl v alelických frekvencích,

kdy $p = 0,04$ (Tabulka č. 10). Hodnota relativního rizika činila 0,46. Rozdíl v zastoupení nositelů alely C v obou skupinách těsně nedosáhl signifikance ($p = 0,06$). Schéma MS spektra odpovídající heterozygotnímu jedinci pro genotyp C.DEL je uvedeno na Obrázku č. 10.



Graf č. 1: Relativní četnost (%) výskytu alely C polymorfismu rs2066847 v kontrolní skupině zdravých jedinců a sledovaném souboru pacientů s AIM; $p = 0,04$.



Obrázek č. 10: Hmotnostní spektrogram heterozygota (genotyp C.DEL) u rs2066847 (1007InsC)

Tabulka č. 10: Porovnání kontrolní skupiny a pacientů s AIM z hlediska distribuce genotypů/alel u sledovaných SNPs, zhodnocení statistické významnosti/signifikance (p)

SNP	genotypová frekvence			alelická frekvence		p	nosičství		p
	GG	GA	AA	G	A		G	A	
rs1800629 (TNF-308)									
kontrolní skupina (n=93)	0,72 (67)	0,26 (24)	0,02 (2)	0,85 (158)	0,15 (28)	0,64	0,98 (91)	0,28 (26)	0,62
soubor pacientů (n=158)	0,76 (120)	0,21 (33)	0,03 (5)	0,86 (273)	0,14 (43)		0,96 (153)	0,24 (38)	
rs2066844 (NOD2 R7002W)									
kontrolní skupina (n=93)	0,95 (88)	0,05 (5)	0,00 (0)	0,97 (181)	0,03 (5)	0,14	1,00 (93)	0,05 (5)	0,17
soubor pacientů (n=158)	0,89 (140)	0,11 (18)	0,00 (0)	0,94 (298)	0,06 (18)		1,00 (158)	0,11 (18)	
rs2066845 (NOD2 G908R)									
kontrolní skupina (n=93)	0,99 (92)	0,01 (1)	0,00 (0)	0,99 (185)	0,01 (1)	0,74	1,00 (93)	0,01 (1)	0,74
soubor pacientů (n=158)	0,98 (155)	0,02 (3)	0,00 (0)	0,99 (313)	0,01 (3)		1,00 (158)	0,02 (3)	
rs2066847 (NOD2 1007 InsC)									
kontrolní skupina (n=93)	0,83 (77)	0,16 (15)	0,01 (1)	0,91 (169)	0,09 (17)	0,04	0,99 (92)	0,17 (16)	0,06
soubor pacientů (n=158)	0,92 (145)	0,07 (12)	0,01 (1)	0,96 (302)	0,04 (14)		0,99 (157)	0,08 (13)	

6 DISKUSE

AIM je polygenně podmíněné onemocnění, na jehož vzniku se podílí celá řada rizikových faktorů, zejména pak zánětlivé systémové onemocnění cév – ateroskleróza. Geny *NOD2/CARD15* a *TNF α* kódují klíčové proteiny uplatňující se v organismu v celé řadě esenciálních biologických procesů. Porucha produkce a aktivity těchto centrálních regulačních proteinů imunitní a zánětlivé odpovědi vede k řadě patofyziologických stavů, selhání obranných mechanismů nebo snížení imunitní reaktivity. Za poruchu genové exprese a regulace podřízených signálních drah jsou často odpovědné polymorfismy v genových sekvencích.

Hlavním cílem diplomové práce bylo stanovit polymorfismy R702W, G908R, 1007InsC genu *NOD2/CARD15* a TNF-308 genu *TNF α* u 158 pacientů s prodělaným AIM a dále pak zhodnotit asociaci mezi výskytem studovaných polymorfismů a manifestací AIM.

Důvodem analýzy těchto SNP byla jejich biologická významnost v patogenezi zánětlivých onemocnění. Uvedené SNP genu *NOD2/CARD15* jsou nejčastěji asociovány s Crohnovou chorobou (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001), ale souvisí např. i s nemocí štěpu proti hostiteli (Penack *et al.*, 2010), cirhózou (Appenrodt *et al.*, 2010) nebo s predispozicí vzniku rakoviny žaludku (Angeletti *et al.*, 2009). Polymorfismus R702W se nachází v centrální NOD doméně proteinu NOD2/CARD15. Proto nemá tato nesynonymní substituční mutace tak fatální dopad jako posunová mutace 1007InsC, jež je lokalizována v LRR doméně. Mutace vede ke vzniku stop kodonu a zkrácení vznikajícího proteinového produktu, což má za následek hyperaktivaci NF- κ B a zvýšenou produkci prozánětlivých cytokinů. SNP G908R je také lokalizován v doméně LRR. Jedná se však o substituční mutaci, která nevede ke strukturálním změnám proteinu, ale pouze k aminokyselinovým záměnám v polypeptidovém řetězci (Galluzzo *et al.*, 2010; Mayor *et al.*, 2012).

Pro experimentální účely diplomové práce byl využit soubor 158 pacientů s prodělaným AIM a pro genotypizaci byla zvolena moderní, citlivá a spolehlivá technologie MassArray. Jedná se o vysoce specifickou platformu umožňující multiplexní analýzu až 36 SNP v jediném vzorku a zároveň snadnou a rychlou analýzu až stovek tisíc vzorků denně.

Byl prokázán soulad distribuce genotypů vyšetřovaných SNP s Hardy-Weinbergovou rovnováhou. U polymorfismů rs1800629 (TNF-308), rs2066844 (R702W) a rs2066845 (G908R) nebyl mezi skupinou pacientů a zdravých kontrolních jedinců zjištěn rozdíl v zastoupení alel a nositelů příslušných polymorfních variant. U polymorfismu rs2066847

(1007InsC) byl zaznamenán častější výskyt sledované polymorfni varianty C v kontrolní skupině ve srovnání se skupinou pacientů s AIM. Hodnota relativního rizika činila 0,46, což naznačuje, že riziko výskytu AIM je více než o polovinu nižší u jedinců, kteří jsou nositeli alely C. Tento závěr není v souladu s poznatkem italských autorů, kteří stanovili nosičství varianty 1007InsC v italské populaci jako rizikový faktor koronární aterosklerózy a destabilizace koronárních plaků. Titéž autoři pak dospěli k závěru, že přítomnost polymorfismu G908R koreluje s ochranným efektem vůči koronární ateroskleróze. Polymorfismy v této studii byly analyzovány pouze u 109 pacientů s ICHS (Galluzzo *et al.*, 2010). Soubor pacientů použitý pro účely této práce je sice větší, přesto k definitivnímu ověření validity našeho závěru o protektivním působení rs2066847 je třeba provést další analýzu, preferenčně na souboru pacientů a kontrol z jiného českého zařízení, popř. k posouzení obecnější platnosti asociace pak z jiných evropských pracovišť.

Jednou z možností je také metaanalýza výsledků všech studií, které byly na dané téma provedeny. Jednalo by se např. o práci kolektivu El Mokhtari *et al.*, který studoval asociaci mezi výše uvedenými SNP genu *NOD2/CARD15* a rizikem vzniku ICHS u souboru 900 německých pacientů. Výsledek studie však nepotvrdil vliv těchto genetických variant v etiologii ICHS (El Mokhtari *et al.*, 2007). Do metaanalýzy by taktéž měla být zařazena práce autorů Yazdanyar a Nordestgaard (2010), kteří ve své práci hodnotili, zda jsou polymorfismy R702W, G908R a 1007InsC asociovány se zvýšeným rizikem kardiovaskulárního onemocnění. Pro tento účel byla provedena genotypizace obrovského souboru 43 596 jedinců dánské populace (Yazdanyar *et Nordestgaard*, 2010). V případě polymorfismu TNF-308 genu *TNF α* je dostupných dat méně, např. italští autoři na základě studie 600 pacientů prokázali, že nositelé polymorfni varianty jsou vystaveni zvýšenému riziku AIM (Antonicelli *et al.*, 2005). Zdá se tedy, že výsledky závisí na počtu pacientů a jejich etnickém původu.

V rámci diplomové práce byla provedena genotypizace 158 vzorků DNA českých pacientů s akutním infarktem myokardu. Kromě možného protektivního charakteru alely C polymorfismu rs2066847 (1007InsC) nebyla zjištěna souvislost mezi dalšími sledovanými polymorfismy genů *NOD2/CARD15* a *TNF α* a manifestací onemocnění. S ohledem na velikost souboru je vhodné výsledky ověřit a pokračovat v analýzách s rozšířeným souborem pacientů a zdravých jedinců, ideálně ve spolupráci s jinými pracovišti v ČR, popř. také v zahraničí.

7 ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce, vycházející z dostupných literárních zdrojů, je věnována problematice akutního infarktu myokardu, jednonukleotidovým polymorfismům, možnostem jejich detekce a genotypizace a dále také poznatkům, které se týkají genů *NOD2/CARD15* a *TNF α* .

Experimentální část této práce je zaměřena na stanovení polymorfismů rs2066844 (R702W), rs2066845 (G908R) a rs2066847 (1007InsC) genu *NOD2/CARD15* a dále rs1800629 (TNF-308) genu *TNF α* u pacientů s AIM, a to pomocí MassArray genotypizace. Celkem bylo genotypizováno 158 vzorků DNA pacientů s prodělaným AIM a 93 vzorků DNA potenciálně zdravých nepříbuzných jedinců, jakožto kontrolní skupiny. Oba tyto soubory vykazovaly jistou heterogenitu.

Na základě statistického vyhodnocení experimentálně získaných dat bylo zjištěno, že distribuce sledovaných SNP byla v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou. Mezi sledovaným souborem pacientů a jedinci z kontrolní skupiny byl zjištěn signifikantní rozdíl v genotypových a alelických frekvencích pouze v případě polymorfismu rs2066847 (NOD2 1007InsC), kdy $p = 0,04$. Genetická asociace sledovaných SNP se zvýšeným rizikem výskytu AIM tak nebyla u vybraného souboru pacientů prokázána.

V rámci polymorfismu rs2066847 (NOD2 1007InsC) byl také zaznamenán častější výskyt sledované polymorfnní varianty C v kontrolní skupině. Hodnota RR činila 0,46, což může svědčit o možné protektivní funkci této alely před manifestací AIM. Tento závěr je však z důvodu omezeného počtu probandů předběžný, a je tak potřeba jej ověřit na větším souboru pacientů.

Pro další studii by bylo vhodné rozšířit soubor pacientů, více jej homogenizovat v rámci klinické charakteristiky a případně zohlednit etnický původ sledovaných jedinců.

8 LITERATURA

Abraham, C. et Cho, J.H. (2006): Functional consequence of NOD2 (CARD15) mutations. *Inflammantory Bowel Diseases*; 12: 641-650

Ahmad, M.I. et Sharma, N. (2012): Biomarkers in Acute Myocardial Infarction. *Journal of Clinical & Experimental Cardiology*; 3: 222

Aldous, S.J. (2013): Cardiac biomarkers in acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*; 164: 282-294

Angeletti, S., Galluzzo, S., Santini, D., Ruzzo, A., Vincenzi, B., Ferraro, E., Spoto, C., Lorino, G., Graziano, N., Calvieri, A., Magnani, M., Graziano, F., Pantano, F., Tonini, G. et Dicuonzo, G. (2009): NOD2/CARD15 polymorphisms impair innate immunity and increase susceptibility to gastric cancer in an Italian population. *Human Immunology*; 70: 729-732

Antonicelli, R., Olivieri, F., Cavallone, L., Spazzafumo, L., Bonafè, M., Marchegiani, F., Cardelli, M., Galeazzi, R., Giovagnetti, S., Perna, G.P. et Franceschi, C. (2005): Tumor necrosis factor-alpha gene -308G>A polymorphism is associated with ST-elevation myocardial infarction and with high plasma levels of biochemical ischemia markers. *Coronary Artery Disease*; 16: 489-493

Appenrodt, B., Gruühage, F., Gentemann, M.G., Thyssen, L., Sauerbruch, T. et Lammert, F. (2010): Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *Hepatology*; 51: 1327-1333

Aschermann, M., Sedláček, K., Aschermann, O. et Linhart, A. (2007): Molekulární genetika infarktu myokardu. *Vnitřní Lékařství*; 53: 348-353

Barbara, J.A., Van ostade, X. et Lopez, A. (1996): Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. *Immunology and Cell Biology*; 74: 434-443

Barkley, N.A. et Wang, M.L. (2008): Application of TILLING and EcoTILLING as Reverse Genetic Approaches to Elucidate the Function of Genes in Plants and Animals. *Current Genomics*; 9: 212-226

Bělohávek, J. et Aschermann, M. (2008): Doporučený postup pro diagnostiku a léčbu akutních koronárních syndromů bez elevací ST úseků na EKG. *Vnitřní lékařství*; 54: 1S7-1S23

Botstein, D. et Risch, N. (2003): Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature Genetics*; 33: 228-237

Burke, A.P. et Virmani, R. (2007): Pathophysiology of acute myocardial infarction. *Medical Clinics of North America*; 91: 553-572

Cibula, D. et Petruželka, L. (eds.) (2009): Onkogynekologie. Grada, Praha, 616 s

Cífková, R., Škodová, Z., Bruthans, J., Adámková, V., Jozífová, M., Galovcová, M., Wohlfahrt, P., Krajčoviechová, A., Poledne, R., Stávek, P. et Lánská, V. (2010): Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. Czech MONICA and Czech post-MONICA. *Atherosclerosis*; 211: 676–681

Černá, H., Jebavý, P. et Škvařil, J. (2005): Akutní ruptura septa komor a subakutní ruptura volné stěny levé komory – mechanické komplikace infarktu myokardu. *Intervenční a akutní kardiologie*; 4: 108-110

Davies, M. J. (2000): The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart*; 83: 361-366

Di Sabatino, A., Rovedatti, L., Vidali, F., MacDonald, T.T. et Corazza, G.R. (2013): Recent advances in understanding Crohn's disease. *Internal and Emergency Medicine*; 8: 101-113

Dracup, K. et Moser, D.K. (1991): Treatment-seeking behavior among those with signs and symptoms of acute myocardial infarction. *Heart & Lung*; 20: 570-575

El Mokhtari, N.E., Ott, S.J., Nebel, A., Schäfer, A., Rosenstiel, P., Förster, M., Nothnagel, M., Simon, R. et Schreiber, S. (2007): Role of NOD2/CARD15 in coronary heart disease. *BMC Genetics*; 8: 76

Elahi, M.M., Asotra, K., Matata, B.M. et Mastana, S.S. (2009): Tumor necrosis factor alpha – 308 gene locus promoter polymorphism: An analysis of association with health and disease. *Biochemica et Biophysica Acta*; 1792: 163-172

Erdmann, J., Linsel-Nitschke, P. et Schunkert, H. (2010): Genetic causes of myocardial infarction: new insights from genome-wide association studies. *Deutsches Ärzteblatt International*; 107: 694-699

Falk, E. (2006): Pathogenesis of Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*; 47: C7-12

Falk, E., Shah, P.K. et Fuster, V. (1995): Coronary plaque disruption. *Circulation*; 92: 657-671

Fillon, S., Soulis, K., Rajasekaran, S., Benedict-Hamilton, H., Radin, J.N., Orihuela, C.J., El Kasmi, K.C., Murti, G., Kaushal, D., Gaber, M.W., Weber, J.R., Murray, P.J. et Tuomanen, E.I. (2006): Platelet-activating factor receptor and innate immunity: uptake of gram-positive bacterial cell wall into host cells and cell-specific pathophysiology. *The Journal of Immunology*; 177: 6182-6191

Fischerová, B. (2008): Specifika akutního infarktu myokardu ve stáří. *Interní medicína pro praxi*; 10: 110-112

Frangogiannis, N.G. (2012): Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circulation Research*; 110: 159-173

Frangogiannis, N.G. (2014): The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nature Reviews Cardiology*; 11: 255-265

Frangogiannis, N.G., Shimoni, S., Chang, S.M., Ren, G., Dewald, O. et Gersch, C. (2002): Active interstitial remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. *Journal of the American College of Cardiology*; 39: 1468-1474

Gabriel, S., Ziaugra, L. et Tabbaa, D. (2009): SNP Genotyping Using Sequenom MassARRAY iPLEX Platform. *Current Protocols in Human Genetics*; 60: 2.12.1-2.12.18

Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., Faggart, M., LiuCordero, S.N., Rotimi, C., Adeyemo, A., Cooper, R., Ward, R., Lander, E.S., Daly, M.J. et Altshuler, D. (2002): The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*; 296: 2225-2229

Galluzzo, S., Patti, G., Dicuonzo, G., Di Sciascio, G., Tonini, G., Ferraro, E., Spoto, C., Campanale, R., Zoccoli, A. et Angeletti, S. (2010): Association between NOD2/CARD15 polymorphisms and coronary artery disease: a case–control study. *Human Immunology*; 72: 636-640

Gear, A.R. et Camerini, D. (2003): Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation*; 10: 335-350

Gojová, L. et Kozák, L. (2006): Možnosti využití DNA čipů v molekulární diagnostice dědičných onemocnění. *Klinická biochemie a metabolismus*; 14: 89-95

González, M., Ruiz-Ros, J.A., Pérez-Paredes, M., Lozano, M.L., García-Almagro, F.J., Martínez-Corbalán, F., Giménez, D.M., Carrillo, A., Carnero, A., Cubero, T., González, J.J., Ureña, I. et Vicente, V. (2007): Prognostic Value of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Patients With ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction. *Revista Española de Cardiología*; 60: 1233-1241

Guillen, I., Blanes, M., Gomez-Lechon, M.J. et Castell, J.V (1995): Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 β and IL-6. *American Journal of Physiology*; 269: 229-35

Guyen-Maiorov, E., Acuner-Ozbabacan, S.E., Keskin, O., Gursoy, A. et Nussinov, R. (2014): Structural Pathways of Cytokines May Illuminate Their Roles in Regulation of Cancer Development and Immunotherapy. *Cancers*; 6: 663-683

Hafler D.A. et De Jager P.L. (2005): Applying a new generation of genetic maps to understand human inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*; 5: 83-91

Hampe, J., Cuthbert, A., Croucher, P.J., Mirza, M.M., Mascheretti, S., Fisher, S., Frenzel, H., King, K., Hasselmeyer, A., MacPherson, A.J., Bridger, S., van Deventer, S., Forbes, A., Nikolaus, S., Lennard-Jones, J.E., Foelsch, U.R., Krawczak, M., Lewis, C., Schreiber, S. et Mathew, C.G. (2001): Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*; 357: 1925-1928

Hansson, G.K., Robertson, A.K.L. et Cecilia Söderberg-Nauclér, C. (2006): Inflammation and Atherosclerosis. *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*; 1: 297–329

Holler, E., Rogler, G., Herfarth, H., Brenmoehl, J., Wild, P.J., Hahn, J., Eissner, G., Schölmerich, J. et Andreesen, R. (2004): Both donor and recipient *NOD2/CARD15* mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*; 104: 889-894

Horáková, L., Pudil, R., Tichý, M., Ulrychová, M. et Vojáček, J. (2010): Kardiospecifické markery v průběhu akutního infarktu myokardu – zkušenosti s využitím proteinových biočipů. *Intervenční a akutní kardiologie*; 9: 175-179

Hořejší, V. et Bartůňková, J. (2009): Základy imunologie. TRITON, Praha, 307 s

Hradec, J et Býma, S. (2007): Ischemická choroba srdeční. Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, Praha, 14 s

Hrnčířová, L., Krejsek, J., Šplíchal, I. et Hrnčíř, T. (2014): Crohn's disease: a role of gut microbiota and Nod2 gene polymorphisms in disease pathogenesis. *Acta Medica*; 57: 89-96

Hugot, J.P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Olson, J.M., Lee, J.C., Beaugerie, L., Naom, I., Dupas, J.L., Van Gossum, A., Orholm, M., Bonaiti-Pellie, C., Weissenbach, J., Mathew, C.G., Lennard-Jones, J.E., Cortot, A., Colombel, J.F. et Thomas, G. (1996): Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*; 379: 821-823

Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M. et Thomas, G. (2001): Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*; 6837: 599-603

Chaer, R.A., Billeh, R. et Massad, M.G. (2004): Genetics and Gene Manipulation Therapy of Premature Coronary Artery Disease. *Cardiology*; 101: 122-130

Chan, D. et Ng, L.L. (2010): Biomarkers in acute myocardial infarction. *BMC Medicine*; 8: 34

Chen, G., Shaw, M.H., Kim, Y.G. et Nunez, G. (2009): NOD-Like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease. *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*; 4: 365-398

Inohara, N. et Nunez, G. (2001): The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene*; 20: 6473-6481

Janský, P. (2003): Přednemocniční péče o nemocné s akutním infarktem myokardu. *Interní medicína pro praxi*; 9: 460-465

Johansson, M.E., Zhang, X.Y., Edfeldt, K., Lundberg, A.M., Levin, M.C., Borén, J., Li, W., Yuan, X.M., Folkersen, L., Eriksson, P., Hedin, U., Low, H., Sviridov, D., Rios, F.J., Hansson, G.K. et Yan, Z.Q. (2014): Innate immune receptor NOD2 promotes vascular inflammation and formation of lipid-rich necrotic cores in hypercholesterolemic mice. *European Journal of Immunology*; 44: 3081-3092

Jurinke, C., Denissenko, M.F., Oeth, P., Ehrich, M., van de Boom, D. et Cantor, C.R. (2005): A single nucleotide polymorphism based approach for the identification and characterization of gene expression modulation using MassARRAY. *Mutation Research*; 573: 83-95

Kabesch, M., Peters, W., Carr, D., Leupold, W., Weiland, S.K. et von Mutius, E. (2003): Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 111: 813-817

Kanaan, Z.M., Eichenberger, M.R., Ahmad, S., Weller, C., Roberts, H., Pan, J., N Rai, S., Petras, R., Weller, E.B. Jr. et Galandiuk, S. (2012): Clinical predictors of inflammatory bowel disease in a genetically well-defined Caucasian population. *Journal of Negative Results in BioMedicine*; 11: 7

Kaplan, G. et Freedman, V.H. (1996): The role of cytokines in the immune response to tuberculosis. *Research in Immunology*; 147: 565-572

Koltsova, E.K. et Ley, K. (2011): How dendritic cells shape atherosclerosis. *Trends in Immunology*; 32: 540-547

Kraus, W.E. (2000): Genetic approaches for the investigation of genes associated with coronary heart disease. *American Heart Journal*; 140: 527-535

Krawczak, M., Ball, E.V., Fenton, I., STenson, P.D., Abeysinghe, S., Thomas, N. et Cooper, D.N. (2000): Human gene mutation database-a biomedical information and research resource. *Human Mutation*; 15: 45-51

Kubistova, Z., Mrazek, F. et Petrek, M. (2009): Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic*; 153: 93-102

Kwok, P.Y. (2000): High-throughput genotyping assay approaches. *Pharmacogenomics*; 1: 95-100

Kwok, P.Y. (2001): Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*; 2: 235-258

Kwok, P.Y. et Chen, X. (2003): Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Current Issues in Molecular Biology*; 5: 43-60

Lakatos, P.L., Fischer, S., Lakatos, L., Gal, I. et Papp, J. (2006): Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease – crosstalk between genetic and microbial factors: Pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take „toll“? *World Journal of Gastroenterology*; 12: 1829-1841

Lala, S., Ogura, Y., Osborne, C., Hor, S.Y., Bromfield, A., Davies, S., Ogunbiyi, O., Nuñez, G. et Keshav, S. (2003): Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology*; 125: 47-57

Libby, P., Ridker, P.M. et Maseri, A. (2002): Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*; 105: 1135-1143

Lievens, D. et von Hundelshausen, P. (2011): Platelets in atherosclerosis. *Thrombosis and Haemostasis*; 2011; 106: 827-838

Linhart, A., Dostálová, G., Bělohávek, J. et Vítek, L. (2012): Patogeneze a příčiny vzniku akutního infarktu myokardu u mladých nemocných. *Postgraduální medicína – příloha Interna*; 14: 8-11

Liu, H.Q., Zhang, X.Y., Edfeldt, K., Nijhuis, M.O., Idborg, H., Bäck, M., Roy, J., Hedin, U., Jakobsson, P.J., Laman, J.D., de Kleijn, D.P., Pasterkamp, G., Hansson, G.K. et Yan, Z.Q. (2013): NOD2-Mediated Innate Immune Signaling Regulates the Eicosanoids in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*; 33: 2193-2201

Mackay, J.H. et Arrowsmith, J.E. (eds.) (2012): Core Topics in Cardiac Anesthesia. Cambridge University Press, Cambridge, 520 s

Marvin, L.F, Roberts, M.A. et Fay, L.B. (2003): Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*; 337: 11-21

Masopust, J. (2011): Smíšená dyslipidemie – 2. část: Sdružené choroby jako diabetes mellitus 2. typu, obezita, kardiovaskulární onemocnění. *Labor Aktuell*; 4-10

Mayor, N.P., Shaw, B.E., Madrigal, J.A. et Marsh, S.G.E. (2012): NOD2 Polymorphisms and Their Impact on Haematopoietic Stem Cell Transplant Outcome. *Bone Marrow Research*; 180391, 13 s

McCall, C.E., El Gazzar, M., Liu, T., Vachharajani, V. et Yoza, B. (2011): Epigenetics, bioenergetics, and microRNA coordinate gene-specific reprogramming during acute systemic inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*; 90: 439-446

Mendis, S., Puska, P. et Norrving, B. (2011): Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. WHO, Geneva, 155 s

Miceli-Richerd, C., Lesage, S., Rybojad, M., Prieur, A.M., Manouvrier-Hanu, S., Häfner, R., Chamaillard, M., Zouali, H., Thomas, G. et Hugot, J.P. (2001): CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nature Genetics*; 29: 19-20

Mitrovič, M. et Potočnik, U. (2011): High-resolution melting curve analysis for high-throughput genotyping of NOD2/CARD15 mutations and distribution of these mutations in Slovenian inflammatory bowel diseases patients. *Disease Markers*; 30: 265-274

Munir, M.S., Wang, Z., Alahdab, F., Steffen, M.W., Erwin, P.J., Kullo, I.J. et Murad, M.H. (2014): The association of 9p21-3 locus with coronary atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medical Genetics*; 15:66

Nagareddy, P. et Smyth, S.S. (2013): Inflammation and thrombosis in cardiovascular disease. *Current opinion in hematology*; 20: 457-463

Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., Thompson, J. et Thompson M.W. (2004): *Klinická genetika*. Triton, Praha, 492 s

O'Brien, S.J., Nelson, G.W., Winkler, C.A. et Smith, M.W. (2000): Polygenic and multifactorial disease gene association in man: Lessons from AIDS. *Annul Review of Genetics*; 34: 563-91

Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nunez, G. et Cho, J.H. (2001): A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*; 411: 603-606

O'Neal, W.T., Griffin, W.F., Kent, S.D. et Virag, J.A.I. (2012): Cellular Pathways of Death and Survival in Acute Myocardial Infarction. *Journal of Clinical & Experimental Cardiology*; S6:003

Orgogozo, V. et Rockman, M. (eds.) (2011): *Molecular Methods for Evolutionary Genetics*. Humana Press, New York, 519 s

Packard, R.R.S. et Libby, P. (2008): Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *Clinical Chemistry*; 54: 24-38

Penack, O., Holler, E. et van den Brink, M.R.M. (2010): Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood*; 115: 1865-72

Ragoussis, J., Elvidge, G.P., Kaur, K. et Colella, S. (2006): Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time-of-Flight Mass Spectrometry in Genomics Research. *PLOS Genetics*; 2: e100

Ramensky, V., Bork, P. et Sunyaev, S. (2002): Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Research*; 30: 3894-3900

Rink, L. et Kirchner, H. (1996): Recent progress in the tumor necrosis factor-alpha field. *International Archives of Allergy and Immunology*; 111: 199-209

Robin, N.H., Tabereaux, P.B., Benza, R. et Korf, B.R. (2007): Genetic testing in cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*; 50: 727-737

Ross, R. (1999): Mechanisms of disease: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*; 340: 115-126

Sequenom[®] (2006): iPLEX[™] Gold Application Guide, 100 s

Serbati, N., Badre, W., Diajite, B. et Nadifi, S. (2014): NOD2/CARD15 gene influences disease behaviour but not IBD susceptibility in a Moroccan population. *The Turkish Journal of Gastroenterology*; 25: 122-128

Slaný, M., Šváchová, H. et Hájek, R. (2008): Použití jedno-nukleotidových polymorfizmů u analýzy mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie*; 21: 237-240

Snustad, D.P. et Simmons, M.J. (2009): Genetika. Masarykova univerzita, Brno, 871 s

Špaček, R. (2002): Komplikace infarktu myokardu. *Postgraduální medicína*; 4: 909-914

Špaček, R. et Widimský, P. (2003): Infarkt myokardu. Galén, Praha, 231 s

Štejfa, M. (2007): Kardiologie – 3., přepracované a doplněné vydání. Grada, Praha: Grada, 722 s

Taurino, C., Miller, W.H., McBride, M.W., McClure, J.D., Khanin, R., Moreno, M.U., Dymott, J.A., Delles, C. et Dominiczak, A.F. (2010): Gene expression profiling in whole blood of patients with coronary artery disease. *Clinical Science*; 119: 335-343

Thygesen, K., Alpert, J.S., Jaffe, A.S., Simoons, M.L., Chaitman, B.R. et White, H.D. (2012): Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*; 60: 1581-1598

Tsukamoto, K., Ohta, N., Shirai, Y., et Emi, M. (1998): A highly polymorphic CA repeat marker at the human tumor necrosis factor alpha (TNFA alpha) locus. *Journal of Human Genetics*; 43: 278-279

Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky (2013): Zdravotnická ročenka České republiky 2012. ÚZIS ČR, Praha, 276 s

Visel, A., Zhu, Y., May, D., Afzal, V., Gong, E., Attanasio, C., Blow, M.J., Cohen, J.C., Rubin, E.M. et Pennacchio, L.A. (2010): Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature*; 464: 409-412

Wajant, H., Pfizenmaier, K. et Scheurich, P. (2003): Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation*; 10: 45-65

Weidinger, S., Klopp, N., Rummler, L., Wagenpfeil, S., Baurecht, H.J., Gauger, A., Darsow, U., Jakob, T., Novak, N., Schafer, T., Heinrich, J., Behrendt, H., Wichmann, H.E., Ring, J. et Illig, T. (2005): Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related traits in a populationbased cohort of Caucasian adults. *Clinical & Experimental Allergy*; 35: 866-872

Widimský, P., Janoušek, S. et Vojáček, J. (2002): Doporučení pro diagnostiku a léčbu akutního infarktu myokardu (Q typ// s elevacemi ST// s raménkovým blokem). *Cor et Vasa – Kardio*; ročník 44: K123-K143

Widimský, P., Hlinomaz, O., Kala, P. et Jirmář, R. (2009): Diagnostika a léčba akutního infarktu myokardu s elevacemi ST. *Cor et Vasa*; 51: 724-740

Yazdanyar, S. et Nordestgaard, B.G. (2010): NOD2/CARD15 genotype, cardiovascular disease and cancer in 43 600 individuals from the general population. *Journal of Internal Medicine*; 268: 162-170

Zimmerman, F.H., Cameron, A., Fisher, L.D. et Ng, G. (1995): Myocardial infarction in young adults: Angiographic characterization, risk factors and prognosis (coronary artery surgery study registry). *Journal of the American College of Cardiology*; 26: 654-661

Zong, J., Salim, M., Zhou, H., Bian, Z.Y., Dai, J., Yuan, Y., Deng, W., Zhang, J.Y., Zhang, R., Wu, Q.Q. et Tang, Q.Z. (2013): NOD2 deletion promotes cardiac hypertrophy and fibrosis induced by pressure overload. *Laboratory Investigation*; 93: 1128-1136

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	adenin (adenine)
AIM	akutní infarkt myokardu (acute myocardial infarction)
C	cytosin (cytosine)
CAD	onemocnění koronárních tepen (coronary artery disease)
CARD15	kaspasová aktivační doména rodiny 15 (caspase activation recruitment domain family-15)
CD	Crohnova nemoc (Crohn's disease)
CK	kreatinfosfokinasa (creatine phosphokinase)
DEL	delece (deletion)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoxynukleosid 5'-trifosfát (deoxynucleoside 5'-triphosphate)
EKG	elektrokarfiografie (electrocardiography)
G	guanin (guanine)
GWAS	asociační studie napříč genomem (genome wide association study)
ICHS	ischemická choroba srdeční (ischemic heart disease)
IL	interleukin (interleukin)
IM	infarkt myokardu (myocardial infarction)
K2-EDTA	di-draselná sůl kyseliny etylen-diamin-tetraoctové (ethylenediamine-tetraacetic acid, dipotassium salt)
LRR	region bohatý na leucin (leucine rich region)
MALDI	laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (matrix assisted laser desorption/ionisation)
MDP	muramyl dipeptid (muramyl dipeptide)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NF-κB	jaderný faktor kappa B (nuclear factor kappa B)

NLR	NOD-like receptory (NOD-like receptors)
NOD2	nukleotid-vázající oligomerizační doména 2 (nucleotide binding oligomerization domain 2)
nsSNP	nesynonymní jednonukleotidový polymorfismus (non-synonymous single-nucleotide polymorphism)
NSTEMI	infarkt myokardu bez elevací úseků ST (non ST elevation myocardial infarction)
PCR	polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RR	relativní riziko (relative risk)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single-nucleotide polymorphism)
SSCP	konformační polymorfismus jednořetězcové DNA (single strand conformation polymorphism)
STEMI	infarkt myokardu s elevacemi úseků ST (ST elevation myocardial infarction)
T	thymin (thymine)
TNF	tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)
TOF	analyzátor doby letu (time of flight)

