

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2015

Monika Cvancigerová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Využitie technológie MassArray® na predikciu rizika
žilovej tromboembólie analýzou relevantných génov**

Bakalářská práce

Monika Cvancigerová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Amit Kishore, Ph.D.

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne v priebehu bakalárskeho štúdia pod vedením vedúceho bakalárskej práce Amita Kishoreho, Ph.D. a s použitím citovaných literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa

.....

Súhrn

V teoretickej časti bakalárskej práce boli popísané rizikové faktory žilovej tromboembólie. Dôraz bol kladený na multifaktoriálnosť žilovej tromboembólie so zameraním na genetické rizikové faktory špeciálne na SNPs v génoch kódujúcich proteíny zúčastňujúce sa koagulačnej kaskády a v génoch kódujúcich samotné koagulačné faktory. V ďalšej kapitole bol popísaný základný princíp technológie MassArray®.

Experimentálna časť bakalárskej práce pozostávala v genotypizácii 100 vzoriek DNA pacientov s diagnostikovanými kardiovaskulárnymi ochoreniami. Technológiou MassArray® boli genotypizované SNPs lokalizované v génoch GP6, F11 a FGG. Stanovované boli genotypové a alelové početnosti v jednotlivých skupinách pacientov. Pacienti boli rozdelení do troch skupín podľa diagnostikovanej Leidenskej mutácie, žilovej tromboembólie a kontrolnej skupiny (pacienti s fibriláciami predsiení, bez Leidenskej mutácie, bez žilovej tromboembólie). Pre zistenie miery asociácie výskytu SNPs v génoch GP6, F11 a FGG s výskytom SNP v géne F5 (Leidenská mutácia) bol porovnaný výskyt daných SNPs u pacientov s Leidenskou mutáciou s výskytom daných SNPs u pacientov kontrolnej skupiny. Miera asociácie výskytu študovaných SNPs s rizikom vzniku žilovej tromboembólie bola stanovovaná porovnávaním výskytu daných SNPs u pacientov s prekonanou žilovou tromboembóliou s výskytom daných SNPs u pacientov kontrolnej skupiny. Pre posúdenie miery týchto asociácií bolo stanovené relatívne riziko SNPs lokalizovaných v génoch GP6, F11 a FGG.

Hodnoty relatívneho rizika nepreukázali signifikantné asociácie SNPs v génoch GP6, F11 a FGG so žilovou tromboembóliou ani signifikantné asociácie daných SNPs s Leidenskou mutáciou. Tieto výsledky sú pripisované použitiu malého súboru pacientov.

Summary

The theoretical part of this bachelor thesis deals with description of acquired and genetic risk factors of venous thromboembolism (VTE). The main aim was description of SNPs localised in genes coding coagulation factors or other proteins involved in coagulation cascade. MassArray[®] technology was described in the next chapter.

In the experimental part of this bachelor thesis 100 DNA samples obtained from patients of University Hospital Olomouc were genotyped using MassArray[®] technology. These patients suffered from cardiovascular diseases.

Subsequently, allele and genotype frequencies of patients with diagnosed Leiden mutation in first group, VTE in second group and in control group (patients with atrial fibrillation, without Leiden mutation, without venous thromboembolism) were counted. To find out the association between SNPs in GP6, F11, FGG genes and SNP in F5 gene (Leiden mutation), the incidence of these SNPs in group of patients with diagnosed Leiden mutation was compared with incidence of these SNPs in control group. The association between SNPs in GP6, F11, FGG genes and VTE, the incidence of these SNPs in group of patients with VTE was compared with incidence of these SNPs in control group. For measure of these associations the relative risk was calculated.

In this bachelor thesis individual SNPs were not significantly associated with VTE or Leiden mutation. These results are attributed to small group used for genotyping.

Rada by som sa poďakovala vedúcemu bakalárskej práce Amitovi Kishoremu, Ph.D. za jeho rady a čas, ktorý mi venoval pri písaní bakalárskej práce. Veľká vďaka patrí taktiež MUDr. Jane Petřkovej, Ph.D. z I. internej kliniky – kardiologickej FN Olomouc, Mgr. Lenke Kocourkovej a Mgr. Veronike Žižkovej z Laboratória kardiogenomiky FN Olomouc, za ich pomoc, cenné rady a pripomienky, ktoré mi pomohli pri spracovávaní bakalárskej práce.

Práca bola vypracovaná v rámci projektu LO1304 (Ústav molekulárnej a translačnej medicíny LF UP).

Obsah

1	Úvod	9
2	Ciele práce	10
3	Literárny prehľad	11
3.1	Patogenéza žilovej tromboembólie	11
3.2	Rizikové faktory vzniku žilovej trombózy	12
3.2.1	Získané rizikové faktory vzniku žilovej tromboembólie	13
3.2.1.1	Chirurgický zákrok	13
3.2.1.2	Rakovina	14
3.2.1.3	Imobilizácia a dlhotrvajúce cestovanie	14
3.2.1.4	Gravidita a puerpérium	15
3.2.1.5	Hormonálna antikoncepcia a hormonálna terapia	15
3.2.1.6	Obezita	15
3.2.2	Genetické rizikové faktory vzniku žilovej trombózy	16
3.2.2.1	Zníženie funkcie endogénnych antikoagulačných faktorov	16
3.2.2.2	Mutácie spôsobujúce zvýšenú funkciu koagulačných faktorov	16
3.2.2.3	SNP v spojení s rizikom vzniku žilovej trombózy	17
3.2.2.4	Rezistencia proti aktivovanému proteínu C (Faktor V Leiden, rs6025)	18
3.2.2.5	SNP lokalizovaný v géne F2 (rs1799963)	19
3.2.2.6	SNP lokalizovaný v géne GP6 (rs1613662)	19
3.2.2.7	SNPs lokalizované v géne F11 (rs2036914 a rs2289252)	20
3.2.2.8	SNP lokalizovaný v géne FGG (rs2066865)	21
3.2.2.9	SNP lokalizovaný v géne AB0 (rs8176719)	21
3.3	Technológia MassArray®	22
3.3.1	Izolácia a kvantifikácia DNA	22
3.3.2	Príprava iPLEX® Gold produktov	23
3.3.2.1	PCR amplifikácia	23
3.3.2.2	SAP reakcia	23
3.3.2.3	Extenzná reakcia (iPLEX® Gold reakcia)	23
3.3.3	Odstránenie solí z iPLEX® Gold produktov	24

3.3.4	Prenos produktov extenznej reakcie na SpectroCHIP®	25
3.3.5	MALDI-TOF MS analýza produktov iPLEX® Gold reakcie MassArray® Analyzerom	25
3.3.6	Získavanie a analýza dát	25
4	Materiál a metódy	27
4.1	Biologický materiál	27
4.2	Mikroizolácia DNA z plnej nezrážlivej ľudskej krvi	27
4.2.1	Meranie koncentrácie a čistoty DNA	28
4.3	Analýza DNA z plnej nezrážlivej ľudskej krvi	28
4.3.1	Príprava iPLEX® Gold produktov pre genotypizáciu	28
4.3.1.1	PCR amplifikácia	31
4.3.1.2	SAP reakcia	33
4.3.1.3	Extenzná reakcia (iPLEX® reakcia)	34
4.4	Odošľovanie produktov iPLEX® Gold reakcie	35
4.5	Spotovanie produktov iPLEX® Gold reakcie na SpectroCHIP pomocou MassArray® Nanodispenseru	37
4.6	Analýza vzoriek pomocou MALDI-TOF hmotnostného spektrometru (MassArray® Analyzer)	38
4.7	Vyhodnotenie výsledkov genotypizácie	38
4.8	Zoznam chemikálií	40
4.8.1	Použité roztoky	41
4.9	Vybavenie laboratória	41
5	Výsledky	43
5.1	Alelové a genotypové frekvencie študovaných SNPs v jednotlivých skupinách	43
5.1.1	Alelové a genotypové frekvencie prvej skupiny pacientov	44
5.1.1.1	Genotypizácia SNP rs1613662	44
5.1.1.2	Genotypizácia SNP rs2036914	44
5.1.1.3	Genotypizácia SNP rs2289252	44
5.1.1.4	Genotypizácia SNP rs2066865	44
5.1.2	Alelové a genotypové frekvencie druhej skupiny pacientov	45
5.1.2.1	Genotypizácia SNP rs1613662	45

5.1.2.2	Genotypizácia SNP rs2036914	45
5.1.2.3	Genotypizácia SNP rs2289252	45
5.1.2.4	Genotypizácia SNP rs2066865	46
5.1.3	Alelové a genotypové frekvencie tretej kontrolnej skupiny pacientov	46
5.1.3.1	Genotypizácia SNP rs1613662	46
5.1.3.2	Genotypizácia SNP rs2036914	46
5.1.3.3	Genotypizácia SNP rs2289252	47
5.1.3.4	Genotypizácia SNP rs2066865	47
5.1.4	Alelové a genotypové frekvencie celého súboru pacientov	47
5.1.4.1	Genotypizácia SNP rs1613662	47
5.1.4.2	Genotypizácia SNP rs2036914	48
5.1.4.3	Genotypizácia SNP rs2289252	48
5.1.4.4	Genotypizácia SNP rs2066865	48
5.2	Relatívne riziko (<i>relative risk</i>)	51
5.2.1	Porovnanie výskytu SNPs v génoch GP6, F11 a FGG s výskytom SNP v géne F5	51
5.2.2	Porovnanie výskytu SNPs v génoch GP6, F11 a FGG u pacientov s diagnostikovanou VTE a u pacientov bez diagnostikovanej VTE	52
6	Diskusia	54
7	Záver.....	57
8	Zoznam použitých skratiek	58
9	Použitá literatúra	60
9.1	Použitie internetové zdroje.....	65

1 Úvod

Žilová tromboembólia je multifaktoriálne ochorenie primárne zahrňujúce hlbokú žilovú trombózu a pľúcnu embóliu. V rámci európskej populácie sa uvádza ročný výskyt 1 tromboembolickej udalosti na 1000 obyvateľov (Koster *et al.*, 1995). Vznik žilovej tromboembólie je podmienený účinkom viacerých faktorov, ktoré je možno rozdeliť na genetické (vrodené) faktory a získané (vonkajšie) faktory. Je známe, že tromboembolické udalosti sú väčšinou vyvolané vplyvom vonkajších faktorov, no pri väčšine z nich ide o kombináciu viacerých faktorov. Aj napriek tomu, že individuálne riziko jednotlivých faktorov je nízke, pri ich kombinácii sa riziko vzniku žilovej tromboembólie rapídne zvyšuje. Intenzívne študovanými sú v súčasnej dobe jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs) lokalizované v génoch kódujúcich koagulačné faktory, či iné proteíny, podieľajúce sa na koagulácii krvi. Zmena jedného nukleotidu v týchto génoch môže viesť k zmene fyziologickej funkcie proteínu (Shastri, 2007), a tým k zvýšenému riziku vzniku žilovej tromboembólie. Komplexné pochopenie patogenézy žilovej tromboembólie a rizikovosti jednotlivých faktorov je nevyhnutné na identifikáciu pacientov so zvýšenou predispozíciou k vzniku žilovej tromboembólie.

2 Ciele práce

1. Vypracovať literárnu rešerš na tému rizikových faktorov žilovej tromboembólie.
2. Popísať technológiu MassArray®.
3. Detekovať SNPs v génoch GP6, F11, a FGG v súbore vybraných pacientov liečených warfarínom.
4. Vyhodnotiť získané výsledky. Porovnať výskyt SNPs v génoch GP6, F11, FGG s výskytom SNP v géne F5.

3 Literárny prehľad

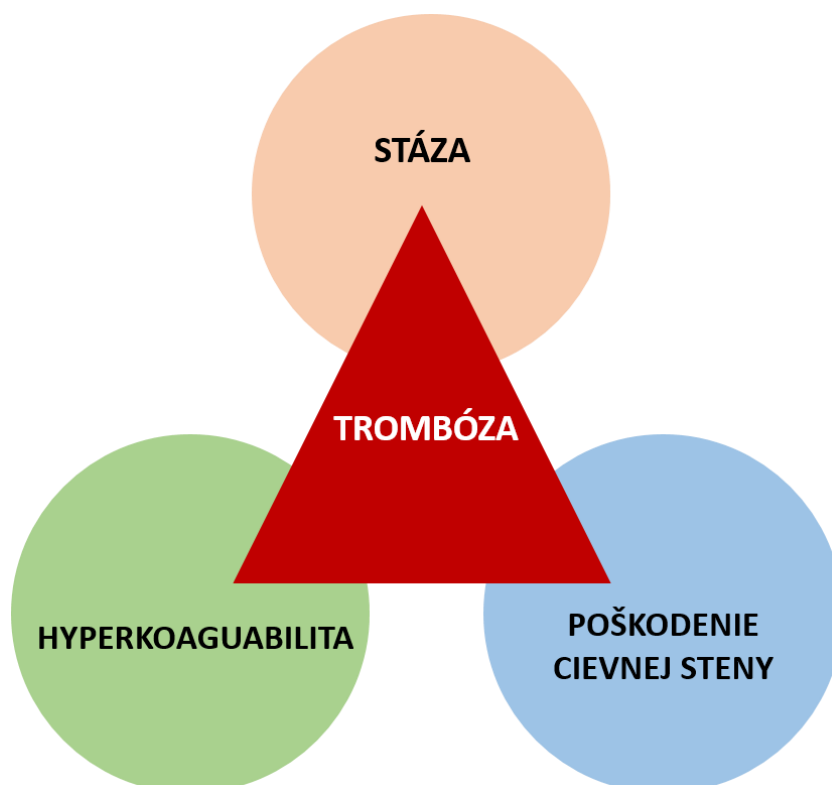
3.1 Patogenéza žilovej tromboembólie

Žilová tromboembólia je multifaktoriálne ochorenie primárne zahrňujúce hlbokú žilovú trombózu a pľúcnu embóliu (Lippi et Franchini, 2008).

Žilová tromboembólia je dej, pri ktorom dochádza ku vzniku krvnej zrazeniny – trombu. Za normálnych okolností je v organizme udržiavaná rovnováha medzi faktormi ovplyvňujúcimi vznik a rozpustenie trombu (Lippi et Franchini, 2008).

Hlavné faktory pôsobiace pri vzniku žilovej trombózy boli popísané v roku 1856. Ide o tzv. Virchowovu triádu (pozri obrázok 1), čiže podmienky, ktoré narušia rovnováhu v organizme a v dôsledku toho dochádza k tvorbe krvnej zrazeniny. Sú to:

- poškodenie cievnej steny napr. pri mechanickom poškodení alebo pri zápaloch
- stáza t.j. nahromadenie a zastavenie prúdenia krvi, napríklad pri obmedzenej pohyblivosti pacienta po operácii
- zmeny v zložení krvi – hyperkoagulácia, kedy dochádza k narušeniu rovnováhy medzi antikoagulačnými a koagulačnými faktormi (Virchow, 1856).



Obr. 1 Schematické znázornenie Virochowovej triády

Vzhľadom na patogenézu žilovej trombózy všetky rizikové faktory vrátane vrodených sú relatívne neškodné, ak sú posúdené samostatne. Samotný rizikový faktor dáva predispozíciu na vznik trombózy, ale sám nie je dostačujúci na podmienenie vzniku trombózy. Vhodnou analógiou vzniku trombózy je predstava poslednej kvapky, ktorá spadne do pohára a voda z pohára pretečie (Lippi *et* Franchini, 2008).

V roku 1992 došlo k záveru, že najmenej dve z troch Virchowových podmienok sú dôležité pre vznik žilovej trombózy, i keď znížený tok krvi tzv. stáza sa zdá byť dominantnou príčinou. Vtedajšia reinterpretácia Virchowovej triády a to, že imobilita redukuje tok krvi ako výsledok zníženej svalovej kontrakcie je i v súčasnosti nesporná (Mammen, 1992).

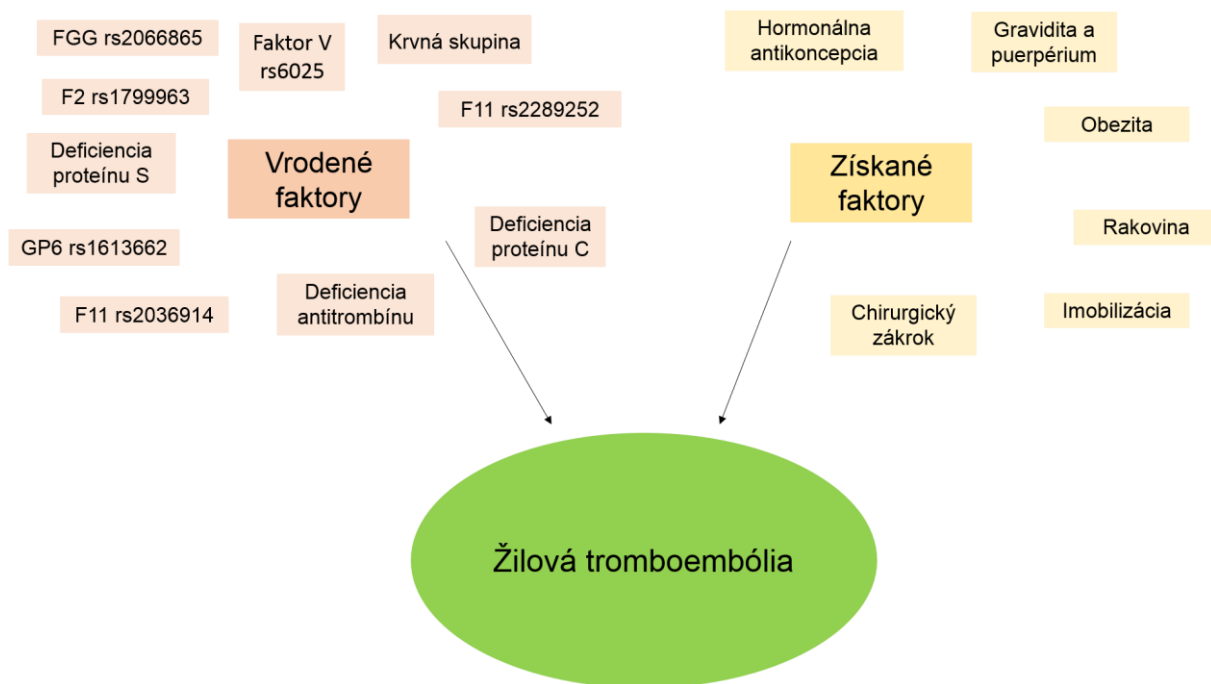
V tom čase mala akákoľvek menovaná abnormalita spôsobovať väčšie riziko vzniku žilovej trombózy. Dôraz sa kládol na fakt, že prítomnosť jedinej vrodenej abnormality nie je dostatočná ako príčina vzniku žilovej trombózy (Mammen, 1992).

Predpokladá sa, že žilová trombóza sa vytvára v chlopniach ciev (Aird, 2007). Postupná akumulácia krvi v intramuskulárnych sínusoch, obzvlášť v lýtku, spúšťa hyperkoaguabilitu kvôli:

- A. lokálnej akumulácii aktivovaných zrážacích faktorov a aktivácii produktov koagulácie
- B. súčasnej spotreby koagulačných inhibítorov (Lippi *et* Franchini, 2008).

3.2 Rizikové faktory vzniku žilovej trombózy

V súčasnosti je známych mnoho rizikových faktorov, ktoré sú spojované s predispozíciou pre vznik žilovej trombózy. Je možné ich rozdeliť do dvoch základných skupín: genetické faktory a získané faktory (Rosendaal, 1999). Na obrázku 2 sú znázornené rizikové faktory žilovej trombózy.



Obr. 2 Rizikové faktory vzniku žilovej tromboembólie

3.2.1 Získané rizikové faktory vzniku žilovej tromboembólie

Získané rizikové faktory pre vznik trombóz zahrňujú situácie, pri ktorých je spôsobená dlhodobá imobilizácia alebo paralýza (napr. po operácii alebo po zlomenine pri použití sadry) (Rosendaal, 1999). Za vyšším rizikom vzniku trombózy stoja aj ďalšie faktory: kongestívne srdcové zlyhanie, obezita, rakovina, pokročilý vek, tehotenstvo, puerpérium, kŕčové žily či užívanie hormonálnej antikoncepcie (Mammen, 1992).

3.2.1.1 Chirurgický zákrok

Medzi hlavné faktory spájajúce vznik žilovej trombózy s operáciou patria: uvoľnenie prokoagulačných faktorov počas operácie, imobilita trvajúca pred, počas aj po operácii a znížená fibrinolytická aktivita po operácii (Mammen, 1992).

Riziko vzniku žilovej trombózy sa však líši v závislosti na type operácie. Pri absencii antitrombotickej profylaxie môže dochádzať až k viac ako 50% riziku vzniku žilovej trombózy (Rosendaal, 2005).

Špecificky vysoké riziko oproti iným všeobecne vykonávaným chirurgickým zákrokom nesú kolorektálne operácie, pretože sú bežne sprevádzané ďalšími

sprievodnými rizikovými faktormi ako napr. pokročilý vek, zápalové črevné choroby alebo nádorové ochorenia (Bergqvist, 2006).

Jedným z hlavných rizikových faktorov vzniku žilovej trombózy sú i ortopedické operácie najmä výmeny bedrových či kolenných kĺbov (Rosendaal, 2005). I napriek dostupnej antitrombotickej profylaxii približne 15 – 20 % pacientov je prepustených do domácej liečby s asymptomatickou žilovou trombózou (Hirsh, 1998).

V neposlednom rade sú v súčasnosti zaradzované medzi operácie s vyšším rizikom vzniku trombózy i často nepotrebné plastické operácie (Lippi *et Franchini*, 2008).

3.2.1.2 Rakovina

Spojenie rakoviny a žilovej trombózy je známe už od roku 1865 ako paraneoplastický syndróm (Trousseau, 1865). V súčasnosti je známe, že hlavná interakcia medzi nádorom a hemostázou je prostredníctvom prokoagulačných vezikúl obsahujúcich tkanivové faktory, rakovinové prokoagulanty či trombín, pričom prokoagulanty sú súčasne silným promótorom vzniku a šírenia rakoviny (Franchini *et al.*, 2007).

Transformujúce gény malígnych tumorov sa správajú v zhode s epigenetickými faktormi zahrňujúce napr. hypoxiu, zápal, kontakt rakovinových buniek s krvnými bunkami a emisiu prokoagulačných vezikúl z nádorových buniek na ustálenie nerovnováhy hemostatického potenciálu (Franchini *et al.*, 2007). Pri spojitosti rakoviny a žilovej trombózy sa jedná pravdepodobne o sprievodný jav zložitej a efektívnej spätnej väzby na zachovanie a podporu progresie rakoviny (Franchini *et al.*, 2007).

Riziko vzniku žilovej trombózy u pacientov s nádorovým ochorením závisí na type rakovinového ochorenia. Vo všeobecnosti je však riziko u pacientov s rakovinou sedemkrát vyššie ako u pacientov bez nádorového ochorenia (Blom *et al.*, 2005).

3.2.1.3 Imobilizácia a dlhotrvajúce cestovanie

Imobilita sa radí k popredným rizikovým faktorom vzniku žilovej trombózy, pretože znemožňuje správne fungovanie lýtkového svalstva v rámci správneho krvného obehu (Gallus *et al.*, 2005).

Dlhotrvalé cestovanie bolo dlho diskutovaným rizikovým faktorom vzniku žilovej trombózy. Uvádza sa dvojnásobné až štvornásobné riziko vzniku žilovej trombózy pri cestovaní dlhšom ako 4 hodiny, pričom cestovanie kratšie ako 4 hodiny nie je spájané so vznikom žilovej trombózy (Kuipers *et al.*, 2007).

3.2.1.4 Gravidita a puerpérium

Hyperkoaguabilita v tehotenstve vzniká pravdepodobne ako ochrana proti krvácaniu v čase pôrodu (James, 2009).

Riziko vzniku žilovej trombózy začína pri gravidite v prvom trimestri tehotenstva (James *et al.*, 2005), pričom riziko vzniku trombózy oproti ženám, ktoré nie sú tehotné je päťkrát vyššie a prvé tri mesiace po pôrode môže byť vyššie až šesťdesiatkrát (Pomp *et al.*, 2008). Práve preto, je obdobiu po pôrode pripisované najväčšie riziko vzniku žilovej trombózy (James *et al.*, 2005).

3.2.1.5 Hormonálna antikoncepcia a hormonálna terapia

Užívanie hormonálnej antikoncepcie u žien je spájané s dva až šesťkrát zvýšeným rizikom žilovej trombózy (Gomes *et Deitcher*, 2004). Všeobecne je za najnebezpečnejšie v tejto oblasti považovaná hormonálna antikoncepcia tretej generácie, ktorej účinné látky sú desogestrel a gestodén (Spitzer *et al.*, 1996).

3.2.1.6 Obezita

Pre posudzovanie relatívneho rizika vzniku žilovej trombózy v závislosti na obezite sa používajú hodnoty BMI (Body mass index) a WHR (Waist-to-hip ratio). Pomer pravdepodobnosti (OR – *odd ratio*) vzniku trombózy u obéznych pacientov v porovnaní s kontrolnými pacientami netrpiacich obezitou bolo určené na 2,33 (95% CI) (Ageno *et al.*, 2008).

3.2.2 Genetické rizikové faktory vzniku žilovej trombózy

3.2.2.1 Zníženie funkcie endogénnych antikoagulačných faktorov

Prvá zmienka o dedičných tendenciách ku vzniku trombózy sa datuje do roku 1965, kedy bola popísaná prvá správa o rodine s dedičnou deficienciou antitrombínu (Egeber, 1965).

Antitrombín je prirodzeným inhibítorom trombínu a ďalších koagulačných faktorov. Táto deficiencia vykazuje autozomálne dominantnú dedičnosť a pacienti obvykle prekonávajú opakujúce sa žilové trombózy počas druhej až tretej dekády ich života (Lippi *et Franchini*, 2008).

V osemdesiatych rokoch minulého storočia boli popísané deficiencie proteínu C a proteínu S s autozomálne dominantným typom dedičnosti (Griffin *et al.*, 1981; Schwarz *et al.*, 1984).

Proteín C je vitamín K dependentný plazmatický glykoproteín syntetizovaný v pečeni, ktorý je rozštiepený trombín – trombomodulínovým komplexom na aktívnu formu. Aktívna forma obsahuje serínovú proteázovú doménu a funguje ako prirodzený inhibítor koagulácie (inhibuje aktivované formy koagulačných faktorov V a VIII).

Všeobecne je však výskyt deficiencie proteínu C v populácii iba 0,2 – 0,4 % a 3 – 5 % v populácii pacientov s diagnostikovanou žilovou trombózou (Lippi *et Franchini*, 2008).

Protein S je vitamín K dependentný plazmatický proteín produkovaný hlavne hepatocytmi ale tiež bunkami endotelu a megakaryocytmi. Hrá dôležitú úlohu v inhibícii koagulácie ako kofaktor aktivovaného proteínu C. Degraduje aktivované koagulačné faktory Va a VIIIa.

Deficiencie proteínu C a S individuálne spôsobujú približne desaťkrát väčšie riziko vzniku žilovej trombózy u jedincov s týmito deficienciami v porovnaní so všeobecnou populáciou (Lippi *et Franchini*, 2008).

3.2.2.2 Mutácie spôsobujúce zvýšenú funkciu koagulačných faktorov

V deväťdesiatych rokoch minulého storočia boli nájdené ďalšie dva genetické faktory, SNP (single nucleotide polymorphism) v koagulačnom faktore V a SNP v protrombíne (Dahlbäck *et Hildenbrand*, 1994; Poort *et al.*, 1996), ktoré boli súčasne

asociované so zvýšeným rizikom vzniku žilovej trombózy (Dirven *et al.*, 1994; Poort *et al.*, 1996).

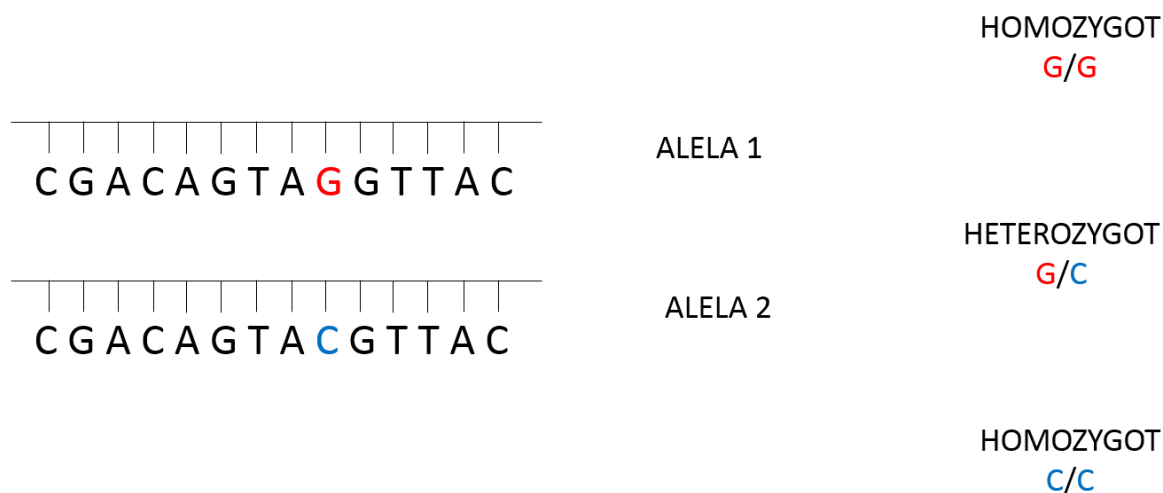
3.2.2.3 SNP v spojení s rizikom vzniku žilovej trombózy

SNP je jednonukleotidový polymorfizmus, teda zmena jednej dusíkatej bázy v určitej pozícii v molekule DNA (pozri obrázok 3), ktorá má potenciál zmeniť funkciu alebo hladinu proteínu (Shastri, 2007).

Polovica SNPs je lokalizovaná v nekódujúcich oblastiach DNA, približne štvrtina zodpovedá za tzv. synonymné mutácie, teda nedochádza v dôsledku zmeny nukleotidu k zámene aminokyseliny a zvyšná štvrtina je zodpovedná za nesynonymné mutácie, pri ktorých dochádza k zmene proteínu, čo môže mať patologické následky (Halushka *et al.*, 1999). SNPs môžu byť teda predispozíciou pre vývin ochorení či evolúciu genómu. (Shastri, 2007).

Vzhľadom na to, že ochorenia sú dedičné, má veľký význam zistiť, ktoré gény predurčujú jedinca k vývinu danej choroby a ako jednotlivé variácie v géne ovplyvňujú jeho funkciu a proteínový produkt (Shastri, 2007). Z tohto dôvodu môžu byť SNPs použité ako markery na identifikáciu génov spôsobujúcich ochorenie pomocou asociačných štúdií (Gray *et al.*, 2000). Predpokladá sa, že dve blízko lokalizované alely (gén a marker) sú dedené spoločne. Vzhľadom na to jednoduchá komparácia genetických variant medzi pacientami trpiacimi ochorením a medzi zdravými jedincami môže poskytnúť metódu na identifikáciu lokusov zodpovedných za dané ochorenie (Hirshorn *et al.*, 2005).

V posledných rokoch bolo niekoľko SNPs spájaných s rizikom vývinu žilovej trombózy, pričom niektoré z týchto SNPs sú lokalizované v blízkosti génov, ktoré kódujú proteíny zodpovedné za koaguláciu krvi. (Bezemer *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Tirado *et al.*, 2004; Uitte de Willige *et al.*, 2005). Identifikácia ďalších genetických variant asociovaných so vznikom žilovej trombózy môže zlepšiť možnosti predikcie rizika žilovej trombózy a prispieť k pochopeniu tejto choroby (Bezemer *et al.*, 2008).



Obr. 3 Schématické znázornenie SNP a možných genotypov

3.2.2.4 Rezistencia proti aktivovanému proteínu C (Faktor V Leiden, rs6025)

Gén F5 nachádzajúci sa na chromozóme 1 kóduje esenciálny kofaktor koagulačnej kaskády krvi, koagulačný faktor V (proakcelerín). Proakcelerín je prítomný v plazme ako kofaktor komplexu aktivátoru protrombínu.

Rezistencia proti aktivovanému proteínu C (APC) spôsobovaná mutáciou v koagulačnom faktore V bola popísaná v roku 1994 (Dahlbäck *et* Hildenbrand, 1994).

Táto mutácia je spôsobená SNP označovaným pod identifikačným číslom rs6025, kedy sa guanín (G) mení za adenín (A). Prítomnosť alely s A sa označuje ako Leidenská mutácia (Koster, 1994).

V dôsledku zmeny jedného nukleotidu v géne F5 dochádza k substitúcii aminokyseliny arginínu v pozícii 506 na glutamín, čo spôsobuje štrukturálnu zmenu výsledného proteínu. V dôsledku toho je faktor V rezistentný k inaktivácii APC (Dahlbäck a Hildenbrand, 1994). Dochádza k pomalšej degradácii Va a VIIIa.

Rezistencia proti APC je považovaná za jednu z najbežnejších genetických porúch. Faktor V Leiden sa vyskytuje u 10 – 50 % pacientov s prvou prekonanou tromboembolickou udalosťou (Franco *et* Reitsma, 2001).

Homozygoti v rs6025 (A;A) môžu niesť riziko vzniku žilovej trombózy až osemdesiatkrát vyššie v porovnaní s jedincami bežného genotypu v rs6025 (G,G) (Rosendaal *et al.*, 1995). V štúdiách LETS a MEGA-1 je uvádzané OR pre faktor

V Leiden 7,19 (95% CI 4,05 – 12,77) a 4,10 (95% CI 3,23 – 5,21) (Bezemer *et al.*, 2008). Atributívne riziko žilovej trombózy populácie bolo pre rs6025 stanovené na 10% (Sode *et al.*, 2013).

3.2.2.5 SNP lokalizovaný v géne F2 (rs1799963)

Gén F2 lokalizovaný na chromozóme 11 kóduje koagulačný faktor II (protrombín), ktorý v prvom kroku koagulačnej kaskády odštiepuje ľahký N – terminálny reťazec a mení sa na aktivovanú formu – trombín.

SNP označovaný identifikačným číslom rs1799963 bol prvýkrát popísaný v roku 1996, kedy bolo zistené, že zmena z G na A v pozícii 20210 v 3' neprekladanom úseku v géne pre protrombín spôsobuje vyššiu hladinu protrombínu v krvi, čím predurčuje heterozygotných jedincov v tomto znaku k zvýšenému riziku vzniku žilovej trombózy, a to približne dva až štyrikrát (Poort *et al.*, 1996).

Táto jednonukleotidová zmena v géne pre protrombín zvyšuje hladinu protrombínu v krvi u heterozygotných i homozygotných jedincov v tomto znaku (Ridker *et al.*, 1999) a vyskytuje sa približne v 2 % populácie (Rosendaal *et al.*, 1998). Relatívne riziko u homozygotných jedincov v tomto znaku oproti heterozygotom je vyššie, ale prítomnosť tohto genotypu v populácii je zriedkavejšia. Pri jedincoch heterozygotných v tomto SNP bolo prisúdené hazard ratio (HR) 1,5 (95% CI 1,2 – 1,9) a 11 (95% CI 2,8 – 44,0) pre homozygotných jedincov s dvomi rizikovými alelami (Sode *et al.*, 2013). Atributívne riziko žilovej trombózy populácie bolo pre rs1799963 stanovené na 1 % (Sode *et al.*, 2013).

3.2.2.6 SNP lokalizovaný v géne GP6 (rs1613662)

Gén GP6 (glykoproteín 6) je v ľudskom genóme lokalizovaný na chromozóme 19. Tento gén kóduje membránový glykoproteín krvných doštičiek, ktorý je receptorom pre kolagén a plní dôležitú funkciu pri kolagénom indukovanej agregácii trombocytov a vytváraní trombu.

SNP označovaný identifikačným číslom rs1613662 je spájaný so žilovou trombózou ako jej rizikový faktor (El-Galaly *et al.*, 2013), kde sa A mení za G.

Mechanizmus vzniku žilovej trombózy, ktorý podmieňuje zmena serínu v pozícii 219 na prolín, spôsobovaná prítomnosťou vzácnej alely v kolagénovom receptore

GP6, je neznáma. Predpokladá sa, že prítomnosť vzácnej alely redukuje kolagénom indukovanú aktivitu krvných doštičiek (Snoep *et al.*, 2010).

Tento polymorfizmus vykazuje trend smerom k vyššiemu riziku vzniku žilovej trombózy v závislosti na počte riskantnej alely v danom genotype. V štúdiách však neboli dosiahnuté štatisticky významné hodnoty (El-Galaly *et al.*, 2013). V štúdiách LETS a MEGA-1 vykazovali nízku asociáciu so vznikom žilovej trombózy OR bolo stanovené na 2,98 (95% CI 1,43 – 6,20) a 2,89 (95% CI 1,94 – 4,29) (Bezemer *et al.*, 2008).

3.2.2.7 SNPs lokalizované v géne F11 (rs2036914 a rs2289252)

Génom F11 lokalizovaný na chromozóme 4 je kódovaný proteín koagulačnej kaskády zvaný koagulačný faktor XI. Tento proteín je prítomný v krvnej plazme vo forme zymogénu, teda neaktívneho enzýmového prekursoru, ktorý sa v plazme nachádza vo forme homodiméru spojeného disulfidickými väzbami. Počas aktivácie tohto koagulačného faktoru sú peptidické väzby rozrušené faktorom XII v každom z dvoch reťazcov, čoho výsledkom je aktivovaný faktor XIa, čiže serínová proteáza pozostávajúca z dvoch ťažkých a dvoch ľahkých reťazcov, spojených disulfidickou väzbou. Táto aktivovaná forma potom spúšťa vnútornú cestu koagulačnej kaskády aktivovaním faktoru IX.

Bolo zistené, že SNP v tomto géne označovaný identifikačným číslom rs2289252, kde dochádza k zámene cytozínu (C) za tymín (T), je významne asociovaný so vznikom žilovej trombózy (Bezemer *et al.*, 2008).

OR rs2289252 ako rizikový faktor VTE bolo stanovené na 1,31 (95% CI 1,20 – 1,43) (Li *et al.*, 2009).

Druhým významným SNP spájaným s rizikom vzniku žilovej trombózy je rs2036914, u ktorého dochádza k zámene tymínu za cytozín. SNP rs2036914 vykazuje v testoch nižšie OR vzniku žilovej trombózy, OR \geq 1,22 (95% CI 1,04 – 1,44) ako rs2289252, no takisto je asociovaný s rizikom vzniku žilovej trombózy (Li *et al.*, 2009).

Pri testovaní haplotypu, ktorý obsahuje rizikové alely rs2289252 i rs2036914 nebola preukázaná asociácia so vznikom žilovej trombózy (Li *et al.*, 2009).

Rizikové alely rs2289252 a rs2036914 korelujú s vyššou hladinou koagulačného faktoru F11 v krvnej plazme (Li *et al.*, 2009).

3.2.2.8 SNP lokalizovaný v géne FGG (rs2066865)

Fibrinogén je proteín koagulačnej kaskády a prekursor koncového komponentu hemostatického systému fibrínu. Fibrinogén je plazmatický glykoproteín, ktorý sa skladá z troch rozdielnych polypeptidových reťazcov (α, β, γ), ktoré sú kódované tromi rôznymi génmi FGA (fibrinogén alfa), FGB (fibrinogén beta) a FGG (fibrinogén gamma). Konverzia fibrinogénu na fibrín indukovaná trombínom je nepostrádateľnou v hemostáze pri stabilizácii trombu.

Gén FGG je lokalizovaný na chromozóme 4. V pozícii 10034 dochádza k zámene C za T, tento SNP nesie identifikačné číslo rs2066865 a je spájaný so zvýšeným rizikom vzniku žilovej trombózy (de Haan *et al.*, 2014; de Willige *et al.*, 2005; Grünbacher *et al.*, 2007).

Genetické varianty fibrinogénu môžu ovplyvňovať riziko žilovej trombózy. Je možné, že ovplyvňujú hladinu fibrinogénu v plazme, vytváranie fibrínovej siete alebo citlivosť zrazeniny na fibrínovú sieť (de Willige *et al.*, 2005).

OR vzniku žilovej trombózy u homozygotov nesúcich dve alely T bolo stanovené na 1,84 (95% CI 1,14 – 2,98) (Grünbacher *et al.*, 2007).

OR vzniku žilovej trombózy pri prítomnosti jednej T alely v genotype bolo stanovené na 1,33 (95% CI 1,09 – 1,63), a to i nezávisle na veku, pohlaví a prítomnosti Leideneskej mutácie alebo prítomnosti SNP G20210A v protrombíne (Grünbacher *et al.*, 2007).

3.2.2.9 SNP lokalizovaný v géne AB0 (rs8176719)

Gén AB0 leží na chromozóme 9. Krvná skupina je determinovaná v závislosti na prítomnosti konkrétnej alely tohto génu. Pri jedincoch s krvnou skupinou 0 dochádza v oboch alelách k delícii guanínu v pozícii 258 v blízkosti N – konca výsledného proteínu. Následkom tejto delície dochádza k translácii iného proteínu ako v prípade jedincov s krvnou skupinou A, B alebo AB (prítomnosť minimálne jednej alely bez delécie G), u ktorých sa exprimuje enzým glykosyltransferáza. Tento enzým konvertuje antigén H na antigén A alebo B (Yamamoto *et al.*, 1990). Tento SNP sa označuje identifikačným číslom rs8176719.

Jedinci s krvnou skupinou A, B alebo AB majú častejšie diagnostikovanú VTE oproti jedincom s krvnou skupinou 0 (Dentali *et al.*, 2012). HR vzniku VTE bolo

stanovená na 1,4 (95% CI 1,3 – 1,5) pri jedincoch krvnej skupiny A, B alebo AB ku jedincom krvnej skupiny 0 (Sode *et al.*, 2013). Atributívne riziko žilovej trombózy populácie bolo pre rs8176719 stanovené na 20 % (Sode *et al.*, 2013).

Asociácia žilovej trombózy s AB0 systémom krvných skupín môže byť vysvetlená zvýšenou hladinou von Willebrandovho faktora a/alebo faktora VIII v krvi jedincov s krvnou skupinou A,B alebo AB, ktorá spôsobuje zvýšené riziko vzniku žilovej trombózy (Koster *et al.*, 1995; Nossent *et al.*, 2006).

Posledné štúdie však ukazujú, že antigény systému AB0 môžu uplatňovať zvýšenie rizika vzniku žilovej trombózy aj iným spôsobom (Barbalic *et al.*, 2010; Paterson *et al.*, 2009).

3.3 Technológia MassArray®

Technológia MassArray® je komerčne dostupná platforma spoločnosti Sequenom, Inc. Jedná sa o univerzálnu metódu určenú na detekciu inzercíí, delécií, substitúcií a iných polymorfizmov v študovanej vzorke DNA. Technológia MassArray® je založená na lokus – špecifickej PCR (polymerázovej reťazovej reakcii) nasledovanej reakciou, pri ktorej dochádza k predĺženiu oligonukleotidového primeru o jeden špecifický dideoxynukleotidtrifosfátový (ddNTP) terminátor, ktorý nasadá priamo do miesta záujmu genotypizácie. Použitím hmotnostnej spektrometrie je determinovaná molekulová hmotnosť (dalton) predĺženého primeru, ktorá udáva informáciu o variante alely v mieste polymorfizmu (Gabriel *et al.*, 2009; Jurinke *et al.*, 2002).

Genotypizácia technológiou MassArray® zahŕňa izoláciu a kvantifikáciu DNA, amplifikáciu DNA, prípravu produktov iPLEX® Gold reakcie, prenos produktov iPLEX® Gold reakcie na SpectroCHIP®, analýzu iPLEX® Gold produktov hmotnostnou spektrometriou a následné spracovanie získaných dát. Technológia je určená na multiplexnú analýzu, je teda možné analyzovať viacero SNPs z jednej vzorky DNA (Gabriel *et al.*, 2009).

3.3.1 Izolácia a kvantifikácia DNA

Izolácia genomickej DNA môže byť prevádzaná akoukoľvek metódou, nie je nutné použitie komerčných kitov. Vyizolovaná DNA by mala mať nízku koncentráciu proteínov, čo odpovedá pomeru absorbancií A_{260}/A_{280} v rozmedzí 1,7 – 2,0 pri UV spektrofotometrickom stanovení čistoty DNA (Gabriel *et al.*, 2009). Minimálna

koncentrácia vyizolovanej DNA na prevedenie analýzy technológiou MassArray® musí byť 5ng/μl (Oeth *et al.*, 2005)

3.3.2 Príprava iPLEX® Gold produktov

3.3.2.1 PCR amplifikácia

Amplifikácia špecifických úsekov, ktoré majú byť analyzované použitím technológie MassArray® sa prevádza pomocou polymerázovej reťazovej reakcie. Hlavným cieľom optimálnej multiplexnej PCR amplifikácie je zároveň v jednej skúmavke naamplifikovať viacero individuálnych lokusov DNA za minimálneho vzniku nešpecifických produktov. Purifikované produkty tejto PCR amplifikácie sú následne použité pri extenznej reakcii (Gabriel *et al.*, 2009).

Primery pre túto PCR amplifikáciu môžu byť navrhnuté Sequenom's Assay Design Software, ale taktiež iným programom určeným na navrhovanie primerov. Typickým znakom primerov pre technológiu MassArray® je sekvencia 5'- ACGTTGGATG - 3' pripojená na 5' konci každého primeru. Amplikony používané na iPLEX® Gold reakciu sú zvyčajne dlhé 80 – 120 bp (Beaulieu *et Hong*, 2003; Sexton *et al.*, 2010).

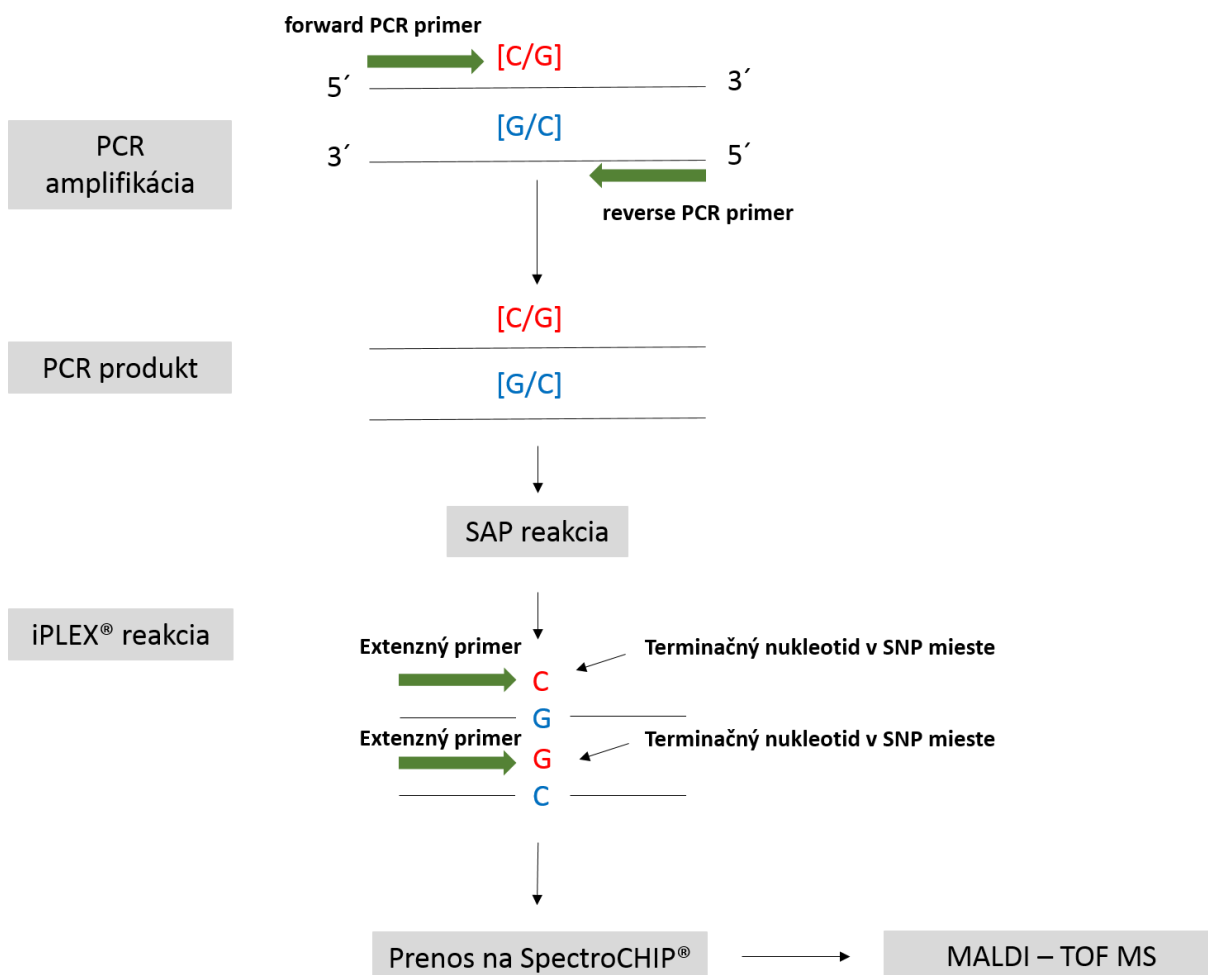
3.3.2.2 SAP reakcia

Inaktivácia nezačlenených deoxynukleotidtrifosfátov (dNTP) sa prevádza prostredníctvom enzýmu schimp alkaline phosphatase (odtiaľ názov SAP), ktorý patrí do enzymatickej triedy hydroláz. Tento enzým odstraňuje fosfátovú skupinu na 5' konci nezačlenených dNTPs z PCR amplifikácie. Z dNTPs sa štruktúrne stávajú deoxynukleotiddifosfáty (dNDPs), čo ich učiní neaktívne pre ďalšie reakcie (Gabriel *et al.*, 2009; Oeth *et al.*, 2005).

3.3.2.3 Extenzná reakcia (iPLEX® Gold reakcia)

V tejto reakcii je k PCR produktom po SAP reakcii pridaná reakčná zmes iPLEX® Gold reakcie pozostávajúca z pufru, enzýmu, extenzných primerov a terminačných nukleotidov. Terminačné nukleotidy tejto reakcie sú dideoxynukleotidtrifosfáty (ddNTPs). Extenzné primery sa v tomto kroku predĺžia o jeden terminačný nukleotid, čím sa vytvoria alelicky špecifické terminačné produkty iPLEX® Gold reakcie (pozri obrázok 4). Pri analýze jednonukleotidových

polymorfizmov (SNPs) miesto dosadenie ddNTP odpovedá lokalizácii sledovaného SNP (Gabriel *et al.*, 2009; Jurinke *et al.*, 2002).



Obr.4 Znáozornenie jednotlivých krokov genotypizácie použitím technológie MassArray® (Upravené podľa z Oeth *et al.*, 2005)

3.3.3 Odstránenie solí z iPLEX® Gold produktov

Na optimalizáciu MALDI-TOF MS analýzy iPLEX® Gold produktov sa používa čistiaci resin, ktorý odstraňuje soli, napr. sodné, draselné a horečnaté katióny. Prítomnosť týchto solí vo vzorke, by mohla spôsobiť vysoké pozadie pri analýze iPLEX® Gold produktov hmotnostnou spektrometriou (Gabriel *et al.*, 2009; Oeth *et al.*, 2005).

3.3.4 Prenos produktov extenznej reakcie na SpectroCHIP®

Prístroj používajúci sa na prenos vzoriek, MassArray® Nanodispenser, prenáša veľkou rýchlosťou malé objemy vzoriek (~25nl) z mikrotitračnej doštičky a aplikuje ich na existujúce body na povrchovo upravených silikátových čipoch s nanosenou maticou (Gabriel *et al.*, 2009).

3.3.5 MALDI-TOF MS analýza produktov iPLEX® Gold reakcie MassArray® Analyzerom

Matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) time – of – fly (TOF) mass spectrometry (MS) je metóda hmotnostnej spektrometrie aplikovateľná nielen na malé molekuly, ale i na veľké biomakromolekuly o hmotnosti aj niekoľko stotisíc daltonov (Karas *et Hillenkamp*, 1988). Práve táto metóda bola použitá v tejto bakalárskej práci na analýzu iPLEX® Gold produktov.

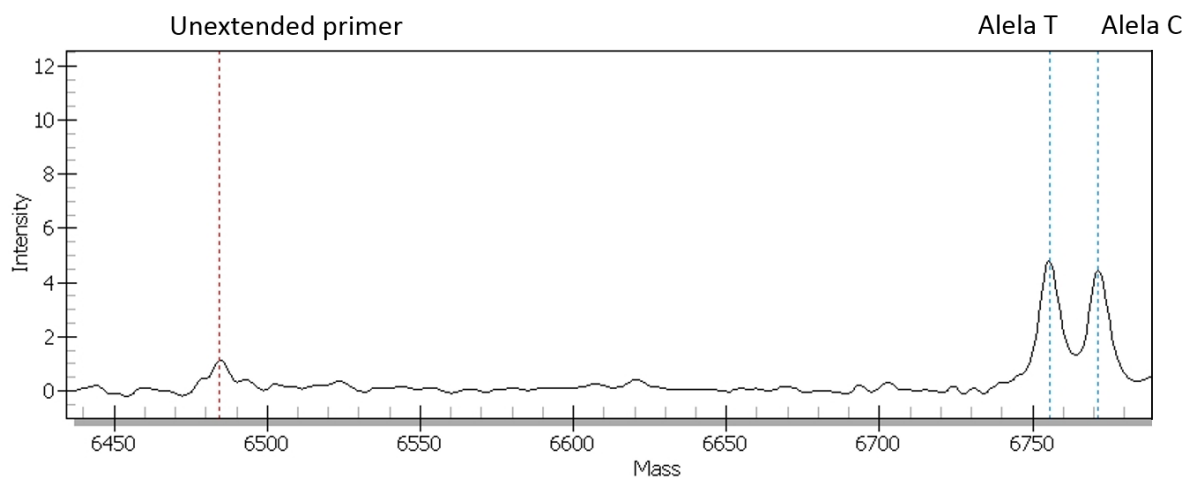
Základným princípom hmotnostnej spektrometrie je produkovať, separovať a detekovať ióny v plynnej fáze. Vzorka je v čipe vnorená v kryštalickej štruktúre malej organickej molekuly, v tzv. matici (Jurinke *et al.*, 2002). Matrica je látka, prostredníctvom ktorej sa ionizačná energia laseru prenáša na molekuly vzorky, čím zabraňuje štiepeniu molekúl vzorky v dôsledku ožiarenia laserom (Gabriel *et al.*, 2009).

Zmes matrice a vzorky v každej pozícii na čipe je ožiarená nanosekundovým laserovým lúčom. Matrica sa v dôsledku absorbovanej svetelnej energie laseru rozloží a ionizuje molekuly vzorky, prenáša na nich protón (napr. H⁺). Ióny vzorky sú potom extrahované elektrickým poľom a následne poháňané elektricky nenabitým priestorom trubice prístroja až ku detektoru. Na základe pomeru molekulovej hmotnosti k náboju sú častice detekované a následne analyzované. Detekcia iónov je v prípade TOF – MS založená na dobe letu jednotlivých iónov, pričom väčšie častice letia trubicou dlhšie než menšie (Jurinke *et al.*, 2002).

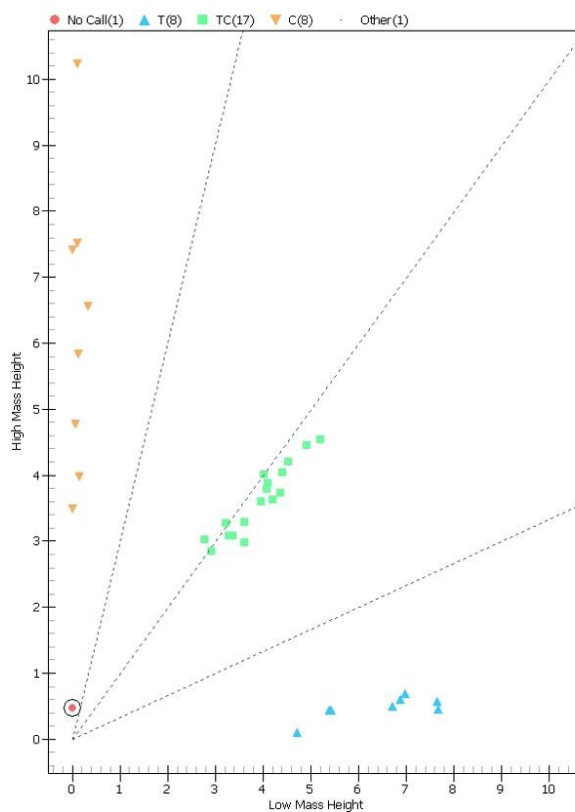
3.3.6 Získavanie a analýza dát

Na spracovávanie a vyhodnotenie dát po MALDI-TOF analýze sa používa Typer Analyzer Software. Výsledky sú spracovávané v reálnom čase a sú tak dostupné ihneď po detekcii. Softvér umožňuje grafické aj tabuľkové zobrazenie všetkých výsledkov multiplexných reakcií a poskytuje tiež používateľovi možnosť manuálneho upravenia výsledkov, teda vlastnej interpretácie výsledkov (Gabriel *et al.*, 2009). Na obrázkoch 5

a 6 sú zobrazené možné grafické spracovania výsledkov genotypizácie SNP prostredníctvom metódy MassArray® Typer Analyzer Softwarem.



Obr. 5 Spektrum C a T terminačných extenzných produktov iPLEX® Gold reakcie (Typer Analyzer Software)



Obr. 6 Výsledky genotypizácie SNPs technológiou MassArray® v podobe bodového diagramu

4 Materiál a metódy

4.1 Biologický materiál

Na izoláciu DNA v experimentálnej časti tejto práce bola použitá plná nezáživá ľudská krv (*Homo sapiens sapiens*) odobratá do skúmaviek s K3-EDTA.

Ako pozitívna kontrola bola pri genotypizácii použitá referenčná DNA.

4.2 Mikroizolácia DNA z plnej nezážlivej ľudskej krvi

Na mikroizoláciu DNA z plnej nezážlivej ľudskej krvi bola použitá Arrow BUGS'n BEADS™ metóda s použitím prístroja NorDiag Arrow. Vyizolovaná DNA bola skladovaná v mrazničke pri - 20 °C v sterilných šrubovacích 1,5ml mikroskúmavkách.

Proti zabráneniu kontaminácie sa pri izolácii DNA sa pracovalo na vopred vydezinfikovanej pracovnej ploche, ktorá je určená práve na izoláciu DNA z plnej nezážlivej ľudskej krvi. Pracovalo sa v ochranných latexových rukaviciach a ochrannom plášti. Po každej práci bola pracovná plocha a používané pipety dôkladne dezinfikované a očistené špeciálnymi roztokmi na odstránenie DNA.

1. Zapnúť prístroj NorDiag Arrow a zvoliť protokol, podľa ktorého má prístroj postupovať. Voľba protokolu závisí na tom, aký má byť výsledný objem roztoku DNA.
2. Krv opatrne premiešať obrátením skúmavky s K3 – EDTA.
3. Napipetovať 500 µl krvi do prázdnej sterilnej riadne označenej 1,5ml mikroskúmavky s odstrihnutým viečkom.
4. Následne, podľa počtu vzoriek umiestniť jednorazové plastové pipety s pumpičkami do príslušných pozícií na pohyblivom ramene prístroja.
5. Potom umiestniť do príslušných dráh prístroja patróny s reagensiami, ktorých hliníková fólia je perforovaná kovovou pomôckou na to určenou.
6. Do rady otvorov vedľa patrón s reagensiami umiestniť 1,5ml mikroskúmavky s plnou nezáživou ľudskou krvou.
7. Do prvej rady otvorov na mikroskúmavky smerom od užívateľa umiestniť označené prázdne sterilné 1,5ml mikroskúmavky s odstrihnutým viečkom.

8. Prístroj uzavrieť a spustiť mikroizoláciu DNA príslušnými povelmi na dotykovej obrazovke.
9. Po dokončení mikroizolácie prepipetovať roztok obsahujúci DNA do sterilnej 1,5ml mikroskúmavky so šrubovacím viečkom. Sterilnú 1,5ml mikroskúmavku s roztokom DNA patrične uskladniť a patróny, jednorazové pipety a vzorkové mikroskúmavky odstrániť.
10. Po ukončení práce prístroj podrobiť UV dekontaminácii a kovovú pracovnú dosku očistiť 70% etanolom.
11. Nakoniec prístroj vypnúť.

4.2.1 Meranie koncentrácie a čistoty DNA

Koncentrácia a čistota vyizolovanej DNA bola meraná pomocou spektrofotometru NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer. Koncentrácia DNA sa pohybovala v rozmedzí 20 – 60 ng/μl. Odporúčaná čistota DNA pre analýzu technológiou MassArray® bola v rozmedzí 1,7 – 2,0 pri pomere absorbancií vlnových dĺžok 260 nm a 280 nm ($A_{260}/A_{280} = 1,7 - 2,0$).

Na meranie koncentrácie a čistoty DNA boli použité 3 μl roztoku DNA. Ako blank bol použitý elučný pufer, v ktorom bola DNA rozpustená.

4.3 Analýza DNA z plnej nezrážlivej ľudskej krvi

Amplifikácia a následná analýza DNA bola prevedená metódou MassArray® s použitím iPLEX® Gold Reagent Kitu na detekciu SNPs nachádzajúcich sa v študovanej DNA.

4.3.1 Príprava iPLEX® Gold produktov pre genotypizáciu

Príprava iPLEX® Gold produktov v tejto metóde pozostáva z troch základných krokov: amplifikácia DNA (PCR amplifikácia), neutralizácia nezačlenených dNTPs (SAP reakcia) a vytvorenie iPLEX® Gold produktov (extenzná reakcia). Podrobný popis týchto krokov sa nachádza v kapitole 3.3.

Na PCR amplifikáciu bola použitá sada siedmich párov primerov, ktorých súčasťou boli aj primery na amplifikáciu oblasti DNA obsahujúcej mnou študované

SNPs v génoch GP6, F11 a FGG. Primery boli navrhnuté pomocou programu Assay Design Suite (Sequenom).

Pre primery používané pri genotypizácii metódou MassArray® je charakteristická sekvencia 10 nukleotidov (5'-ACGTTGGATG-3') pripojená na 5' konci týchto primerov. Nukleotidové sekvencie jednotlivých primerov sú uvedené v tabuľke 1.

Na extenznú reakciu bola použitá sada siedmich extenzných primerov, ktorých súčasťou boli aj extenzné primery pre detekciu mnou študovaných SNPs v génoch GP6, F11 a FGG. Nukleotidové sekvencie jednotlivých primerov sú uvedené v tabuľke 2.

Primer mixy na PCR amplifikáciu a extenznú reakciu boli pripravené zmiešaním PCR grade vody a zásobných primerov o koncentrácii 100 pmol/μl (PCR amplifikácia) a 400 pmol/μl (extenzná reakcia).

Aby sa zabránilo kontaminácii pri príprave reakčných zmesí jednotlivých reakcií, bol použitý laminárny box umiestnený v špeciálnej miestnosti určenej len na tieto účely. Pracovalo sa v ochranných latexových rukaviciach a ochrannom plášti. Boli použité špičky s filtrom, s polymerázou sa pracovalo rýchlo a vždy bola umiestnená v chladiacom stojane.

Tab. 1 Špecifikácia párov primerov PCR amplifikácie

Názov primeru	Sekvencia primeru
1613662 – F	ACGTTGGATGATGGACCCTGCAGAACCTAC
1613662 – R	ACGTTGGATGATTTCCCAGGAACCTCTGTG
2036914 – F	ACGTTGGATGAAAAGCAGAAGGCTCGTTCC
2036914 – R	ACGTTGGATGGAGTGCTTTGAGGGTAATTG
2289252 – F	ACGTTGGATGGCAGGATCAAAGTGAGTTGG
2289252 – R	ACGTTGGATGCCTCAGGTTCCAGCACGATAT
2066865 – F	ACGTTGGATGGACCCCATGTTGAAAACCTCC
2066865 – R	ACGTTGGATGAGTGGTGGTTTTTAATGGTC
4149056 – F	ACGTTGGATGAATCTGGGTCATACATGTGG
4149056 – R	ACGTTGGATGTATGGGAGTCTCCCCTATTC
8176719 – F	ACGTTGGATGTGTGCAGTAGGAAGGATGTC
8176719 – R	ACGTTGGATGCGTTGAGGATGTTCGATGTTG
1045642 – F	ACGTTGGATGACTGCAGCATTGCTGAGAAC
1045642 – R	ACGTTGGATGAAGGCATGTATGTTGGCCTC

Pozn. Číslo v názve primerov odpovedá rs číslu študovaných SNPs. F označuje forward primer, R označuje reverse primer. Primery používané na amplifikáciu oblasti DNA mnou študovaných SNPs v génoch GP6, F11 a FGG sú podfarbené šedou farbou.

Tab. 2 Špecifikácia primerov extenznej reakcie

Názov primeru	Sekvencia primeru
1613662	ACCTACCTGCTACCG
2036914	GGTAATTGAATCATTTC AAGG
2289252	AGGCTTGTCTCTCTCT
2066865	TGGTTTTTAATGGTCAATAAAG
4149056	AAGCATATTACCCATGAAC
8176719	GGATGTCCTCGTGGT
1045642	CTCCTTTGCTGCCCTCAC

Pozn. Číslo v názve primerov odpovedá rs číslu študovaných SNPs. Extenzné primery používané na amplifikáciu oblasti DNA mnou študovaných SNPs v génoch GP6, F11 a FGG sú podfarbené šedou farbou.

4.3.1.1 PCR amplifikácia

1. Spustiť laminárny box, vyčistiť pracovné plochy dezinfekčným roztokom a pripraviť potrebné špičky a stojany.
2. Z mrazničky vybrať potrebné komponenty – PCR grade vodu, pufer, roztok $MgCl_2$, mix nukleotidov, mix primerov a polymerázu. Všetky komponenty nechať rozmraziť v laminárnom boxe a polymerázu umiestniť do chladiaceho stojana.
3. Z chladničky vybrať vzorky vyizolovanej DNA a PCR grade vodu.
4. Podľa vopred pripravenej schémy nariediť DNA PCR grade vodou do sterilných 1,5ml mikroskúmaviek na výslednú koncentráciu 10 ng/ μ l do celkového objemu 20 μ l.
5. Pred pipetovaním DNA mikroskúmavku premiešať preklepaním prstom po stene mikroskúmavky a následne krátko centrifugovať na minicentrifúge.
6. Mikroskúmavky s nariedenou DNA krátko pretrepať na trepačke a centrifugovať na minicentrifúge.
7. Následne v laminárnom boxe do označenej 1,5ml mikroskúmavky pripraviť PCR reakčnú zmes. Pred pipetovaním všetky zložky PCR reakčnej zmesi jemne palcom preklepať, aby sa premiešali a krátko centrifugovať na minicentrifúge. Komponenty pipetovať v poradí PCR grade voda, pufer, roztok $MgCl_2$, mix nukleotidov, mix primerov a nakoniec polymeráza. Presné zloženie reakčnej zmesi je uvedené v tabuľke 3.
8. Po napipetovaní všetkých komponentov reakčnej zmesi krátko a pri malých otáčkach pretrepať a následne krátko centrifugovať na minicentrifúge.
9. Potom do príslušných jamiek riadne označenej 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky napipetovať 4 μ l PCR reakčnej zmesi.
10. Pre vytvorenie negatívnej kontroly napipetovať do príslušnej jamky 1 μ l PCR grade vody.
11. Následne do zvyšných jamiek s PCR reakčnou zmesou pipetovať podľa predurčenej schémy 1 μ l určitej nariedenej vzorky DNA. Do jednej jamky použiť referenčnú DNA ako pozitívnu kontrolu.

12. Po dokončení pipetovania prekryť 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku priehľadnou fóliou.
13. 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku centrifugovať 1 minútu pri 2750 rpm .
14. 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku umiestniť do termocykléru a spustiť príslušný program na PCR amplifikáciu. Teplotný a časový profil tohto programu je uvedený v tabuľke 4.
15. Všetky PCR komponenty uložiť späť do mrazničky a pracovné plochy vydezinfikovať. Na pracovné prostredie laminárneho boxu nechať 30 minút pôsobiť UV žiarenie.
16. Po prebehnutí reakcie mikrotitračnú doštičku vybrať z termocykléru a centrifugovať pri 2750 rpm po dobu 1 minúty.
17. 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku je možné skladovať v chladničke (ak analýza prebieha počas nasledujúceho dňa) alebo v mrazničke (ak analýza prebieha neskôr ako do nasledujúceho dňa). Možné je i ihneď pokračovať v SAP reakcii.

Tab.3 Zloženie PCR reakčnej zmesi

	množstvo potrebné na 1 reakciu [µl]
PCR grade water	2,4
Buffer 10 x	0,5
MgCl₂ 25 mmol/l	0,4
dNTPmix 25mmol/l	0,2
Primer mix 1 µmol/l	0,5
HotStarTaq 5 U/µl	0,1
DNA 10 ng/µl	1

Tab. 4 Teplotný a časový profil PCR amplifikácie

1 x	94°C	Pre-denaturation	2 min
44 x	94°C	Denaturation	30 s
	56°C	Annealing	30 s
	72°C	Elongation	1 min
1 x	72°C	Final extension	5 min
1 x	4°C	Final hold	forever

4.3.1.2 SAP reakcia

Na vydezinfikovanú plochu určenú na prevádzanie tejto reakcie vybrať z mrazničky PCR grade vodu, SAP pufer a SAP enzým. PCR grade vodu a SAP pufer umiestniť do stojanu na mikroskúmavky. SAP enzým uchovávať v chladiacom stojane.

1. SAP reakčnú zmes pripraviť do označenej sterilnej 1,5ml mikroskúmavky zmiešaním komponentov v nasledovnom poradí: PCR voda, pufer, enzým. Presné zloženie SAP reakčnej zmesi je uvedené v tabuľke 5.
2. Následne pripravenú reakčnú zmes krátko pretrepať na trepačke a centrifugovať na minicentrifúge.
3. Po centrifugovaní a odlepení priehľadnej fólie pridať do každej jamky 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky s PCR produktom 2 µl SAP reakčnej zmesi.
4. Potom 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku znova prelepiť novou priehľadnou fóliou a centrifugovať 1 minútu pri 2750 rpm.
5. Po centrifugácii umiestniť 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku do termocykléru a spustiť príslušný program pre SAP reakciu. Teplotný a časový profil tohto programu je uvedený v tabuľke 6.
6. Všetky komponenty uložiť späť do mrazničky a pracovnú plochu vydezinfikovať.
7. Po prebehnutí reakcie 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku vybrať z termocykléru a centrifugovať ju pri 2750 rpm po dobu 1 minúty.
8. 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku je možné skladovať v chladničke (ak analýza prebieha počas nasledujúceho dňa) alebo v mrazničke (ak analýza prebieha

neskôr ako do nasledujúceho dňa). Je však možné ihneď pokračovať v extenznej reakcii.

Tab.5 Zloženie SAP reakčnej zmesi

	množstvo potrebné na 1 reakciu [μl]
PCR grade water	1,53
SAP buffer 10x	0,17
SAP enzyme 1,7 U/μl	0,3

Tab. 6 Teplotný a časový profil SAP reakcie

1 x	37 °C	Incubation	40 min
1 x	85 °C	Incubation	5 min
1 x	4 °C	Final hold	forever

4.3.1.3 Extenzná reakcia (iPLEX® reakcia)

Pomocou tejto reakcie dochádza k vytvoreniu výsledných iPLEX® Gold produktov za použitia extenzných primerov a terminačných nukleotidov.

1. Na vydezinfikovanú pracovnú plochu vybrať z mrazničky PCR grade vodu, pufer, mix terminačných nukleotidov, mix extenzných primerov a uložiť ich do stojanu. Polymerázu uložiť do chladiaceho stojanu.
2. Do označenej sterilnej 1,5ml mikroskúmavky pripraviť iPLEX® reakčnú zmes. Pred pipetovaním všetky zložky iPLEX® reakčnej zmesi jemne palcom preklepať, aby sa premiešali. Komponenty pipetovať v poradí PCR grade voda, pufer, roztok MgCl₂, mix terminačných nukleotidov, mix extenzných primerov a polymerázu. Zloženie iPLEX® reakčnej zmesi je uvedené v tabuľke 7.
3. Pripravenú iPLEX® reakčnú zmes krátko pretrepať na trepačke a centrifugovať.
4. Následne do 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky po SAP reakcii pridať 2 μl iPLEX® reakčnej zmesi, 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku prekryť novou priehľadnou fóliou a centrifugovať pri 2750 rpm po dobu 1 minúty.
5. Po centrifugácii umiestniť 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku do termocykléru a spustiť príslušný program pre extenznú reakciu. Teplotný a časový profil tohto programu je uvedený v tabuľke 8.

6. Všetky komponenty vrátiť späť do mrazničky a pracovnú plochu vydezinfikovať.
7. Po dokončení programu centrifugovať 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku pri 2750 rpm po dobu 1 minúty a následne uložiť do chladničky, mrazničky alebo pokračovať ďalším krokom.

Tab. 7 Zloženie iPLEX® reakčnej zmesi pre extenznú reakciu

	množstvo potrebné na 1 reakciu [μl]
PCR grade water	0,739
iPLEX® buffer Plus 10x	0,2
iPLEX® -Termination mix 0,5 x	0,1
Primer mix	0,94
iPLEX® enzyme	0,021

Tab. 8 Teplotný a časový profil extenznej reakcie

1x	94°C	Pre-denaturation	30 s	
40 x	5x	94°C	Denaturation	5 s
		52°C	Annealing	5 s
	80°C	Elongation	5 s	
1x	72°C	Final extension	3 min	
1x	4°C	Final hold	forever	

4.4 Odsol'ovanie produktov iPLEX® Gold reakcie

Tento stabilizačný krok je nevyhnutný pre správny výsledok hmotnostnej spektrometrickej analýzy produktov iPLEX® Gold reakcie.

1. 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku s produktami reakcie vybrať z chladničky alebo mrazničky a nechať približne 20 minút stáť, kým nenadobudne laboratórnu teplotu.
 - Produkty musia byť dobre rozmrazené, inak by sa v tejto reakcii neodsolili.
2. Nachystať pracovnú podložku, vaničku na sterilnú deionizovanú vodu, plastovú lyžičku, resin a 96-jamkovú doštičku na resin so stierkou.

3. Na vydezinfikovaný pracovný stôl umiestniť čistú plastovú podložku, na ktorej sa bude pracovať.
 - Podložka sa používa na to, aby bolo možné zvyšný resin vrátiť späť do zásobnej nádoby.
4. Plastovou lyžičkou naniesť primerané množstvo resinu na 96-jamkovú doštičku pre resin a naplniť jamky adekvátne k tým, v ktorých sú iPLEX® Gold produkty v 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke.
5. Jamky, ktoré nie je potrebné naplniť resinom zalepiť novou priehľadnou fóliou.
6. Plastovou stierkou prejsť po celej dĺžke 96-jamkovej doštičky pre resin asi pod 45° uhlom, aby resin rovnomerne zaplnil potrebné jamky 96-jamkovej doštičky pre resin.
7. Piesok v jamkách nechať schnúť 20 minút pri laboratórnej teplote. Zvyšný piesok vrátiť z plastovej podložky späť do nádoby a zvyšné pomôcky odložiť z pracovného stola.
8. Po rozmrazení iPLEX® Gold produktov v 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke centrifugovať 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku 1 minútu pri 2750 rpm.
9. Po centrifugovaní odstrániť z mikrotitračnej doštičky priehľadnú fóliu a multikanálovou pipetou pridať 41 µl sterilnej deionizovanej vody do každej jamky 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky, v ktorej sa nachádza iPLEX® Gold produkt.
10. Po vysušení resinu v 96-jamkovej doštičky pre resin priložiť 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku hore dnom adekvátne priestorovej orientácii jamiek naplnených resinom. Po oboch stranách doštičky pevne oboma rukami uchytiť, pretočiť o 180° a poklepnúť o pracovný stôl tak, aby sa piesok s 96-jamkovej doštičky pre resin, ktorá je teraz umiestnená navrchu hore dnom dostal do jamiek s iPLEX® Gold produktom v 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky.
11. Potom prelepiť 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku priehľadnou fóliou a nechať točiť na rotátore po dobu 30 minút pri 5 rpm, aby došlo k dôkladnému premiešaniu.

12. Nakoniec vydezinfikovať pracovný stôl, poupratovať a poumývať všetky potrebné pomôcky.
13. Po dotočení 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky na rotátore, centrifugovať 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku 5 minút pri 2750 rpm.

4.5 Spotovanie produktov iPLEX® Gold reakcie na SpectroCHIP pomocou MassArray® Nanodispenseru

V tomto kroku sa prevádzajú iPLEX® Gold produkty z predchádzajúcich reakcií z 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky prístrojom MassArray® Nanodispenser na komplementárny SpektroCHIP®, ktorý bude následne použitý pre analýzu produktov MALDI-TOF hmotnostným spektrometrom.

Pred prácou s prístrojom MassArray® Nanodispenser je potrebné previesť 30 minútové denné čistenie ihlíc ponorených do 96% etanolu a následne vyčistiť ihly pomocou tridsiatich cyklov kompletného čistenia v 50% etanole. Po ukončení tohto čistenia je možné s prístrojom začať pracovať.

1. Pred zavedením 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky a čipu do prístroja zaviesť ihly prístroja do základnej pozície.
2. Následne prístroj otvoriť a umiestniť 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku a čip do príslušnej pozície.
3. Prístroj uzavrieť, zadať pokyn pre prenos vzoriek, pozíciu vzoriek na 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke a rýchlosť, akou majú byť vzorky nanášané na čip. (Pozn. V tejto práci bola použitá rýchlosť nanášania vzoriek 110 mm/s).
4. Potom je možné previesť samotný prenos vzoriek na čip, pričom je možné kontrolovať objem, ktorý bol nanosený a v prípade potreby (malé alebo naopak veľké množstvo nanesej vzorky) upraviť rýchlosť nanášania vzorky (Pozn. Ideálne je pracovať v rozmedzí objemu od 5 – 15 nl).

4.6 Analýza vzoriek pomocou MALDI-TOF hmotnostného spektrometru (MassArray® Analyzer)

Pred samotnou genotypizáciou vzoriek nanesených na čip bolo počítačovými programami prístroja zadané umiestnenie vzoriek v 96-jamkovej mikrotitračnej dosičke. Následne boli zadané SNPs, ktoré je potrebné v danej vzorke (pozícii na čipe analyzovať).

1. V počítačovom programe MassArray® Typer 4.0 cez záložku Plate editor vytvoriť nový pokus.
2. V ďalšom kroku v záložke Typer chip programu MassArray® Typer 4.0 spárovať čip (Pozn. Každý čip má svoje identifikačné číslo) s novým pokusom vytvoreným v predchádzajúcom kroku, v ktorom sú definované pozície jednotlivých vzoriek na 96-jamkovej mikrotitračnej dosičke.
3. Pomocou pinzety umiestniť čip, ktorý bude analyzovaný do príslušnej pozície v MassArray® analyzátore.
4. Pomocou počítačového programu START RT PROCESSES odštartovať genotypizáciu vzoriek.
5. Po dokončení genotypizácie programom Typer 4.0 záložku TYPER ANALYZER zobrazí výsledky.

4.7 Vyhodnotenie výsledkov genotypizácie

Zo získaných dát genotypizácie boli spočítané genotypové a alelové početnosti. Pomocou chí – kvadrát testu bola posudzovaná Hardy-Weinbergova rovnováha v jednotlivých skupinách pacientov a v celom súbore pacientov.

Hardy-Weinbergov zákon (Hardy-Weinbergova rovnováha) – vyjadruje teoretické zastúpenie alel a genotypov v rámci ideálnej populácie.

$$p + q = 1$$

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

p – frekvencia dominantnej alely

q – frekvencia recesívnej alely

p^2 – frekvencia dominantných homozygotov

$2pq$ – frekvencia heterozygotov

q^2 – frekvencia recesívnych homozygotov

Genotypová početnosť (genotypová frekvencia) – vyjadruje zastúpenie jednotlivých genotypov vzhľadom na genotypizovaný súbor jedincov.

$$f_g = \frac{n_i}{n_{\text{celk.}}}$$

f_g – genotypová frekvencia

n_i – počet jedincov daného genotypu

$n_{\text{celk.}}$ – počet jedincov v celom genotypizovanom súbore

Alelová početnosť (alelová frekvencia) – vyjadruje zastúpenie konkrétnej alely vzhľadom na celkový počet alel na danom lokuse.

$$f_a = \frac{2 \times n_i + n_j}{2 \times n_{\text{celk.}}}$$

f_a – frekvencia danej alely

n_i – počet homozygotných jedincov pre danú alely

n_j – počet heterozygotných jedincov pre danú alely

$n_{\text{celk.}}$ – počet jedincov v celom genotypizovanom súbore

Chí-kvadrát test – štatistická metóda, ktorá sa používa na posúdenie preukázateľne výrazného vzťahu medzi dvomi znakmi. V prípade tejto bakalárskej práce medzi očakávanými a pozorovanými genotypovými početnosťami. Genotypové a alelové početnosti sú v HW rovnováhe, ak $p > 0,05$.

$$\chi_N^2 = \frac{\sum(\text{OBS} - \text{EXP})^2}{\text{EXP}}$$

χ^2 – chí – kvadrát

OBS – pozorovaná (*observed*) hodnota

EXP – očakávaná (*expected*) hodnota

N – počet stupňov voľnosti ($N = n - 1$)

n – počet genotypových tried

Pre určenie miery rizikovosti študovaných SNPs bola vypočítané relatívne riziko (RR) pomocou online kalkulátora MedCalc®.

Kalkulátor MedCalc® pre výpočet RR je dostupný na webovej adrese http://www.medcalc.org/calc/relative_risk.php.

Relatívne riziko (*relative risk*) – pomer výskytu určitého faktoru v exponovanej skupine s výskytom daného faktoru v kontrolnej skupine. RR posudzuje mieru asociácie. Faktor je považovaný za rizikový, ak $RR > 1$, CI (1;∞), $p > 0,05$.

$$RR = \frac{\frac{a}{(a+b)}}{\frac{c}{(c+d)}}$$

$$SE \{\ln(RR)\} = \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{c} - \frac{1}{a+b} - \frac{1}{c+d}}$$

$$95\% \text{ CI} = (\exp[\ln(RR) - 1,96 \times SE \{\ln(RR)\}]; \exp[\ln(RR) + 1,96 \times SE \{\ln(RR)\}])$$

RR – relatívne riziko

CI – interval spoľahlivosti (*confidence interval*)

SE – smerodatná chyba (*standard error*)

a – počet jedincov s posudzovaným faktorom v exponovanej skupine

b – počet jedincov bez posudzovaného faktoru v exponovanej skupine

c – počet jedincov s posudzovaným faktorom v kontrolnej skupine

d – počet jedincov bez posudzovaného faktoru v kontrolnej skupine

4.8 Zoznam chemikálií

- 96% etanol (Fagron)
- Arrow BUGS'n BEADS™ kit (NorDiag)
- Desprej® (Bochemie)
- DNA Remover™ (Minerva Biolabs)
- Incidin foam (Ecolab)

- iPLEX® Gold Reagent Kit (Sequenom®)
- Sterilná deionizovaná voda (Brown)
- PCR grade voda (5prime)

4.8.1 Použité roztoky

- 50% etanol
520 ml 96% etanolu doplniť 480 ml sterilnej deionizovanej vody
- 70% etanol
- 729 ml 96% etanolu doplniť 271 ml sterilnej deionizovanej vody

4.9 Vybavenie laboratória

- 1,5ml a 2ml sterilné mikroskúmavky (Eppendorf)
- 1,5 ml sterilné šrúbovacie mikroskúmavky (Axygen)
- 96-jamkové mikrotitračné doštičky
- 96-jamková doštička pre resin so stierkou (Sequenom)
- Centrifúga (Hermle Z300)
- Minicentrifúga (Minispin®, Eppendorf)
- Chladiaci stojan na mikroskúmavky (Eppendorf)
- Laminárny box (BIOAIR 1.2 TOPSAFE)
- MALDI-TOF hmotnostný spektrometer (Sequenom, MassArray® Analyzer Sequenom)
- MassArray® Nanodispenser (Sequenom)
- Mikropipety (Eppendorf Research) rozsah 0,1- 2,5 µl, 2- 20 µl, 20- 200 µl
- Multikanálová pipeta (Eppendorf Research) rozsah 30- 300 µl
- NorDiag Arrow (NorDiag)
- Ochranné latexové rukavice (Sempermed)
- Plastová lyžička

- Plastová vanička na vodu
- Priehľadné fólie na 96-jamkové mikrotitračné doštičky (Eppendorf)
- Pasteurove pipety
- Rotátor (Labroller II, Labnet)
- Skúmavka s K3-EDTA (Vacuette® 6 ml K3EDTA)
- Spektrofotometer NanoDrop 1000 (NanoDrop)
- Sterilné špičky s filtrom (Eppendorf Dualfilter)
- Sterilné špičky (Eppendorf)
- Stojany na mikroskúmavky
- Termocycler (Eppendorf, Mastercycler Vapo.protect)
- Trepačka (Labnet)

5 Výsledky

V experimentálnej časti bakalárskej práce bola technológiou MassArray® prevedená genotypizácia štyroch SNPs lokalizovaných v génoch GP6 (rs1613662), F11(rs2036914, rs2289252) a FGG(rs2066865). Na genotypizáciu bolo použitých 100 vzoriek DNA pacientov Fakultnej nemocnice Olomouc užívajúcich warfarín na liečbu alebo prevenciu tromboembolických udalostí.

Z výsledkov genotypizácie technológiou MassArray® boli spočítané alelové a genotypové početnosti jednotlivých SNPs v príslušných skupinách pacientov. Na určenie miery asociácie výskytu študovaných SNPs s rizikom vzniku žilovej tromboembólie (VTE) a Leidenskou mutáciou bolo spočítané relatívne riziko (RR).

5.1 Alelové a genotypové frekvencie študovaných SNPs v jednotlivých skupinách

Z dát získaných genotypizáciou SNPs technológiou MassArray® boli spočítané alelové a genotypové početnosti jednotlivých SNPs v troch rôznych skupinách a následne v celom súbore pacientov.

V prvej skupine bolo 30 pacientov, ktorí niesli Leidenskú mutáciu (časť mala diagnostikovanú hlbokú žilovú trombózu alebo pľúcnu embóliu). V druhej skupine bolo ďalších 30 pacientov, ktorí neniesli Leidenskú mutáciu a mali diagnostikovanú hlbokú žilovú trombózu alebo pľúcnu embóliu, všetci pacienti v tejto skupine prekonali VTE. Tretia skupina pozostávala z ďalších 40 pacientov, u ktorých bola diagnostikovaná len fibrilácia predsiení. Pacienti v tretej skupine neprekonali VTE a neniesli Leidenskú mutáciu. Tretia skupina pacientov bola v tejto práci považovaná za kontrolnú skupinu. V tabuľke 9 sú zobrazené diagnózy a počet pacientov v jednotlivých skupinách.

Tab. 9 Diagnózy, prítomnosť Leidskej mutácie a počet pacientov v jednotlivých skupinách pacientov

Skupiny pacientov	Diagnóza	Prítomnosť Leidskej mutácie	Počet pacientov v skupine
Prvá skupina	HŽT, EP	áno	30
Druhá skupina	HŽT, EP	nie	30
Tretia (kontrolná) skupina	FIS	nie	40

Pozn. EP – pľúcna embólia, HŽT – hlboká žilová trombóza

5.1.1 Alelové a genotypové frekvencie prvej skupiny pacientov

5.1.1.1 Genotypizácia SNP rs1613662

Frekvencia rizikovej G alely v rs1613662 v prvej skupine pacientov bola 23,00 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs1613662 v tejto skupine bola AA = 60,00 %; AG = 33,00 %; GG = 7,00 %, ktorá zodpovedá Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P > 0,05$ ($P = 0,4112$; 95% CI).

5.1.1.2 Genotypizácia SNP rs2036914

Frekvencia rizikovej C alely v rs2036914 v prvej skupine pacientov bola 52,00 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs2036914 v tejto skupine bola TT = 20,00 %; TC = 57,00 %; CC = 23,00 %, ktorá zodpovedá Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P > 0,05$ ($P = 0,1585$; 95% CI).

5.1.1.3 Genotypizácia SNP rs2289252

Frekvencia rizikovej T alely v rs2289252 v prvej skupine pacientov bola 35,00 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs2289252 v tejto skupine bola TT = 6,00 %; TC = 57,00 %; CC = 37,00 %, ktorá nezodpovedá Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P < 0,05$ ($P = 0,0090$; 95% CI).

5.1.1.4 Genotypizácia SNP rs2066865

Frekvencia rizikovej T alely v rs2066865 v prvej skupine pacientov bola 21,70 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs2066865 v tejto skupine bola TT = 0,00 %; TC = 43,00 %; CC = 57,00 %, ktorá nezodpovedá Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P < 0,05$ ($P = 0,0062$; 95% CI).

Súhrnne sú všetky vyššie uvedené alelové, genotypové frekvencie a jednotlivé p-hodnoty prvej skupiny pacientov uvedené v tabuľke 10.

Tab. 10 Genotypové, alelové početnosti a p-hodnoty prislúchajúce SNPs v prvej skupine pacientov

SNP	Genotypové frekvencie v %			Alelové frekvencie v %		p-hodnota
	AA	AG	GG	A	G	
GP6 rs1613662	60,00	33,00	7,00	77,00	23,00	0,4112
F11 rs2036914	20,00	57,00	23,00	48,00	52,00	0,1585
FGG rs2066865	0,00	43,00	57,00	21,70	78,30	0,0062
F11 rs2289252	6,00	57,00	37,00	35,00	65,00	0,0090

5.1.2 Alelové a genotypové frekvencie druhej skupiny pacientov

5.1.2.1 Genotypizácia SNP rs1613662

Frekvencia rizikovej G alely v rs1613662 v prvej skupine pacientov bola 13,00 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs1613662 v tejto skupine bola AA = 73,00 %; AG = 27,00 %; GG = 0,00 %, ktorá zodpovedá Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P > 0,05$ ($P = 0,1186$; 95% CI).

5.1.2.2 Genotypizácia SNP rs2036914

Frekvencia rizikovej C alely v rs2036914 v prvej skupine pacientov bola 60,00 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs2036914 v tejto skupine bola TT = 20,00 %; TC = 40,00 %; CC = 40,00 %, ktorá zodpovedá Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P > 0,05$ ($P = 0,0956$; 95% CI).

5.1.2.3 Genotypizácia SNP rs2289252

Frekvencia rizikovej T alely v rs2289252 v prvej skupine pacientov bola 47,00 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs2289252 v tejto skupine bola TT = 27,00 %; TC = 40,00 %; CC = 33,00 %, ktorá nezodpovedá Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P < 0,05$ ($P = 0,0487$; 95% CI).

5.1.2.4 Genotypizácia SNP rs2066865

Frekvencia rizikovej T alely v rs2066865 v prvej skupine pacientov bola 32,00 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs2066865 v tejto skupine bola TT = 0,00 %; TC = 63,00 %; CC = 37,00 %, ktorá nezodpovedá Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P < 0,05$ ($P = 4 \times 10^{-6}$ 95% CI).

Súhrnne sú všetky vyššie uvedené alelové, genotypové frekvencie a jednotlivé p-hodnoty druhej skupiny pacientov uvedené v tabuľke 11.

Tab. 11 Genotypové, alelové početnosti a p-hodnoty prislúchajúce SNPs v druhej skupine pacientov

SNP	Genotypové frekvencie v %			Alelové frekvencie v %		p-hodnota
	AA	AG	GG	A	G	
GP6 rs1613662	73,00	27,00	0,00	87,00	13,00	0,1186
F11 rs2036914	20,00	40,00	40,00	40,00	60,00	0,0956
FGG rs2066865	0,00	63,00	37,00	32,00	68,00	4×10^{-6}
F11 rs2289252	27,00	40,00	33,00	47,00	53,00	0,0487

5.1.3 Alelové a genotypové frekvencie tretej kontrolnej skupiny pacientov

5.1.3.1 Genotypizácia SNP rs1613662

Frekvencia rizikovej G alely v rs1613662 v tretej skupine pacientov bola 14,00 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs1613662 v tejto skupine bola AA = 75,00 %; AG = 22,50 %; GG = 2,50 %, ktorá zodpovedá Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P > 0,05$ ($P = 0,6074$; 95% CI).

5.1.3.2 Genotypizácia SNP rs2036914

Frekvencia rizikovej C alely v rs2036914 v tretej skupine pacientov bola 54,00 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs2036914 v tejto skupine bola TT = 20,00 %; TC = 52,50 %; CC = 27,50 %, ktorá zodpovedá Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P > 0,05$ ($P = 0,5759$; 95% CI).

5.1.3.3 Genotypizácia SNP rs2289252

Frekvencia rizikovej T alely v rs2289252 v tretej skupine pacientov bola 40,00 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs2289252 v tejto skupine bola TT = 12,50 %; TC = 55,00 %; CC = 32,50 %, ktorá zodpovedá Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P > 0,05$ ($P = 0,1447$; 95% CI).

5.1.3.4 Genotypizácia SNP rs2066865

Frekvencia rizikovej T alely v rs2066865 v tretej skupine pacientov bola 25,00 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs2066865 v tejto skupine bola TT = 0,00 %; TC = 50,00 %; CC = 50,00 %, ktorá nevykazovala hodnoty zodpovedajúce Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P < 0,05$ ($P = 0,0009$; 95% CI).

Súhrnne sú všetky vyššie uvedené alelové, genotypové frekvencie a jednotlivé p-hodnoty tretej skupiny pacientov uvedené v tabuľke 12.

Tab. 12 Genotypové, alelové početnosti a p-hodnoty prislúchajúce SNPs v tretej skupine pacientov

SNP	Genotypové frekvencie v %			Alelové frekvencie v %		p-hodnota
	AA	AG	GG	A	G	
GP6 rs1613662	75,00	22,50	2,50	86,00	14,00	0,6074
F11 rs2036914	20,00	52,50	27,50	46,00	54,00	0,5759
FGG rs2066865	0,00	50,00	50,00	25,00	75,00	0,0009
F11 rs2289252	12,50	55,00	32,50	40,00	60,00	0,1447

5.1.4 Alelové a genotypové frekvencie celého súboru pacientov

5.1.4.1 Genotypizácia SNP rs1613662

Frekvencia rizikovej G alely v rs1613662 v prvej skupine pacientov bola 16,50 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs1613662 v tejto skupine bola AA = 70,00 %; AG = 27,00 %; GG = 3,00 %, ktorá zodpovedá Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P > 0,05$ ($P = 0,8404$; 95% CI).

5.1.4.2 Genotypizácia SNP rs2036914

Frekvencia rizikovej C alely v rs2036914 v prvej skupine pacientov bola 55,00 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs2036914 v tejto skupine bola TT = 20,00 %; TC = 50,00 %; CC = 30,00 %, ktorá zodpovedá Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P > 0,05$ ($P = 0,9195$; 95% CI).

5.1.4.3 Genotypizácia SNP rs2289252

Frekvencia rizikovej T alely v rs2289252 v prvej skupine pacientov bola 40,50 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs2289252 v tejto skupine bola TT = 15,00 %; TC = 51,00 %; CC = 34,00 %, ktorá zodpovedá Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P > 0,05$ ($P = 0,5606$; 95% CI).

5.1.4.4 Genotypizácia SNP rs2066865

Frekvencia rizikovej T alely v rs2066865 v prvej skupine pacientov bola 26,00 %. Distribúcia jednotlivých genotypov v rs2066865 v tejto skupine bola TT = 0,00 %; TC = 52,00 %; CC = 48,00 %, ktorá nevykazovala hodnoty zodpovedajúce Hardy-Wienbergovej rovnováhe, pretože $P < 0,05$ ($P = 0,0004$; 95% CI).

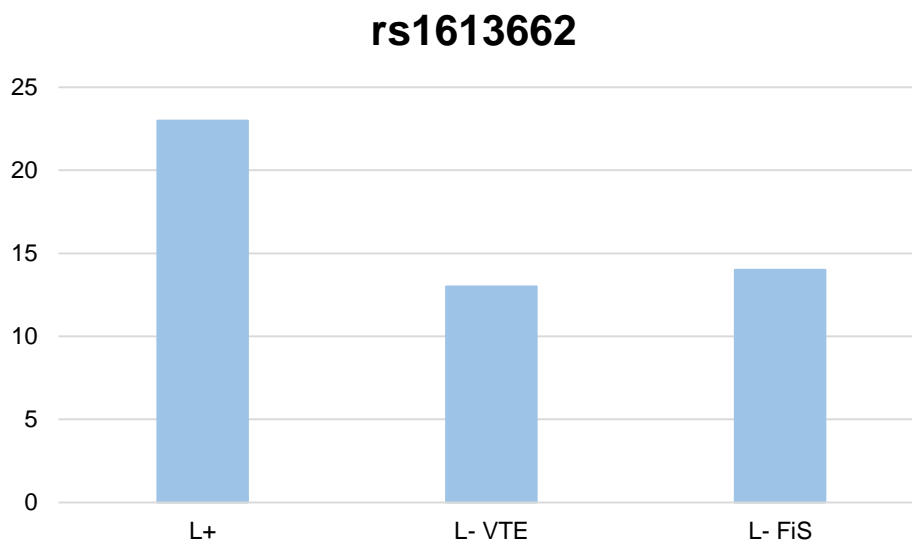
Súhrnne sú všetky vyššie uvedené alelové, genotypové frekvencie a jednotlivé p-hodnoty celého súboru pacientov uvedené v tabuľke 13.

Tab. 13 Genotypové, alelové početnosti a p-hodnoty prislúchajúce SNPs v celom súbore pacientov

SNP	Genotypové frekvencie v %			Alelové frekvencie v %		p-hodnota
	AA	AG	GG	A	G	
GP6 rs1613662	70,00	27,00	3,00	83,50	16,50	0,8404
F11 rs2036914	20,00	50,00	30,00	45,00	55,00	0,9195
FGG rs2066865	0,00	52,00	48,00	26,00	74,00	0,0004
F11 rs2289252	15,00	51,00	34,00	40,50	59,50	0,5606

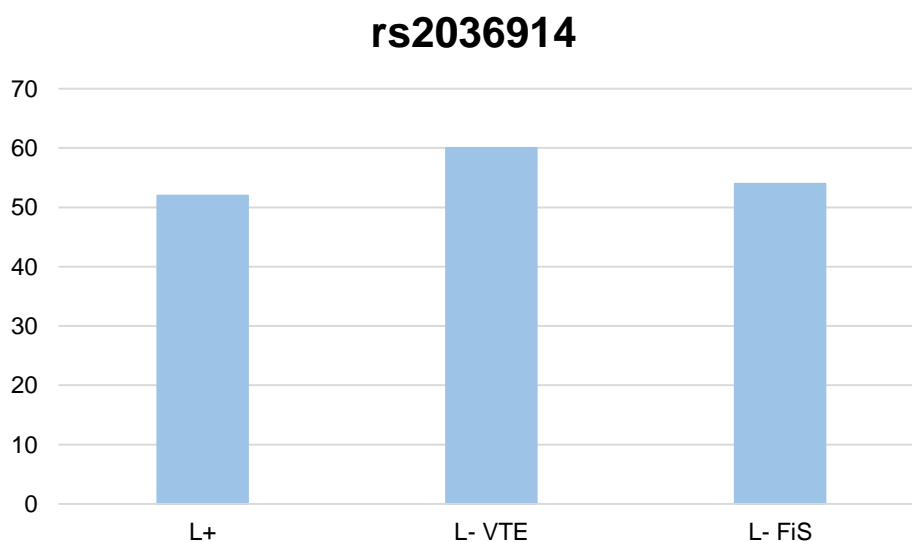
Rozdiely alelových frekvencií rizikovej alely jednotlivých SNPs v závislosti na ich diagnóze resp. nosičstve Leidenskej mutácie sú graficky znázornené v grafoch 1 – 4.

Graf 1 Frekvencie rizikovej alely rs1613662 v jednotlivých skupinách pacientov



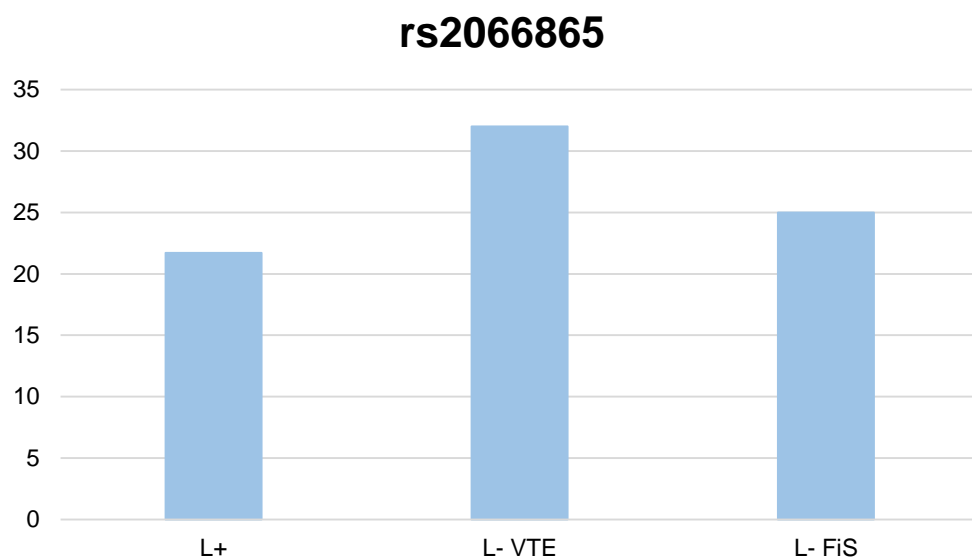
Pozn.: L+ – skupina pacientov s Leidenskou mutáciou, L- VTE – skupina pacientov s diagnostikovanou žilovou tromboembóliou a bez Leidenskej mutácie, FiS – skupina pacientov s diagnostikovanou fibriláciou predsiení bez Leidenskej mutácie a bez VTE

Graf 2 Frekvencie rizikovej alely rs2036914 v jednotlivých skupinách pacientov



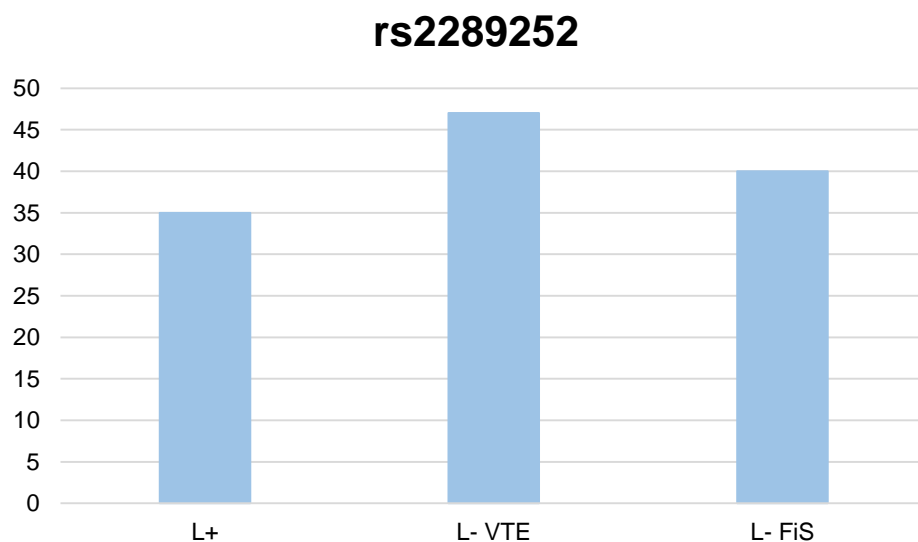
Pozn.: L+ – skupina pacientov s Leidenskou mutáciou, L- VTE – skupina pacientov s diagnostikovanou žilovou tromboembóliou a bez Leidenskej mutácie, FiS – skupina pacientov s diagnostikovanou fibriláciou predsiení bez Leidenskej mutácie a bez VTE

Graf 3 Frekvencie rizikovej alely rs2066865 v jednotlivých skupinách pacientov



Pozn.: L+ – skupina pacientov s Leidenskou mutáciou, L- VTE – skupina pacientov s diagnostikovanou žilovou tromboembóliou a bez Leidenskej mutácie, FiS – skupina pacientov s diagnostikovanou fibriláciou predsiení bez Leidenskej mutácie a bez VTE

Graf 4 Frekvencie rizikovej alely rs2289252 v jednotlivých skupinách pacientov



Pozn.: L+ – skupina pacientov s Leidenskou mutáciou, L- VTE – skupina pacientov s diagnostikovanou žilovou tromboembóliou a bez Leidenskej mutácie, FiS – skupina pacientov s diagnostikovanou fibriláciou predsiení bez Leidenskej mutácie a bez VTE

5.2 Relatívne riziko (*relative risk*)

Pre zistenie miery rizikovosti študovaných SNPs posúdených samostatne bolo spočítané RR (*relative risk*), teda relatívne riziko.

5.2.1 Porovnanie výskytu SNPs v génoch GP6, F11 a FGG s výskytom SNP v géne F5

Pre zistenie asociácie SNPs v génoch GP6 (rs1613662), F11 (rs2036914 a rs2289252) a FGG (rs2066865) s výskytom SNP v géne F5 (rs6025) boli porovnávané dve skupiny pacientov za použitia RR. Ako exponovaná skupina bola použitá prvá skupina pacientov z predchádzajúceho rozdelenia (pozri kapitolu 5.1). Pacienti tejto skupiny mali diagnostikovanú Leidenskú mutáciu, sú teda nosičmi rizikovej alely v rs6025. Skupina obsahovala 30 pacientov. Pacienti kontrolnej skupiny mali diagnostikovanú fibriláciu predsiení, nenesú Leidenskú mutáciu a neprekonali žilovú tromboembóliu. Ako kontrolná skupina bola použitá tretia skupina pacientov z predchádzajúceho rozdelenia (kapitola 5.1), ktorá obsahovala 40 pacientov.

RR pre nosičstvo rizikovej alely G rs1613662 u pacientov s Leidenskou mutáciou bolo stanovené na 1,60 (95% CI 0,80 – 3,20).

RR pre nosičstvo rizikovej alely C rs2036914 u pacientov s Leidenskou mutáciou bolo stanovené na 1,00 (95% CI 0,79 – 1,27).

RR pre nosičstvo rizikovej alely T rs2289252 u pacientov s Leidenskou mutáciou bolo stanovené na 0,94 (95% CI 0,66 – 1,33).

RR pre nosičstvo rizikovej alely T rs2066865 u pacientov s Leidenskou mutáciou bolo stanovené na 0,87 (95% CI 0,52 – 1,45).

V tabuľke 14 sú zaznamenané počty nosičov rizikových alel študovaných SNPs v jednotlivých skupinách pacientov a zhrnuté RR študovaných SNPs.

Tab.14 Počet nosičov rizikových alel v jednotlivých skupinách, hodnoty RR, CI a p-hodnota jednotlivých SNPs pri štúdiu asociácie výskyt SNPs v génoch GP6, F11 a FGG s výskytom SNP v géne F5

Gén	SNP	Počet nosičov rizikovej alely/počet pacientov skupine		RR	CI	p-hodnota
		Exponovaná skupina	Kontrolná skupina			
GP6	rs1613662	12/30	10/40	1,60	0,80 – 3,20	0,1837
F11	rs2036914	24/30	32/40	1,00	0,79 – 1,27	1,0000
	rs2289252	19/30	27/40	0,94	0,66 – 1,33	0,7189
FGG	rs2066865	13/30	20/40	0,87	0,52 – 1,45	0,5848

Pozn. exponovaná skupina – 30 pacientov s Leidenskou mutáciou, kontrolná skupina – 40 pacientov bez Leidenskej mutácie

5.2.2 Porovnanie výskytu SNPs v génoch GP6, F11 a FGG u pacientov s diagnostikovanou VTE a u pacientov bez diagnostikovanej VTE

Pre zistenie asociácie SNPs v génoch GP6 (rs1613662), F11 (rs2036914 a rs2289252) a FGG (rs2066865) s výskytom VTE bolo vypočítané RR jednotlivých SNPs. Porovnávané boli dve skupiny pacientov. Exponovaná skupina pacientov pozostávala so 40 pacientov s diagnostikovanou VTE. Táto skupina zahrňovala celú druhú skupinu pacientov a desať pacientov z prvej skupiny pacientov, podľa predchádzajúceho delenia (pozri kapitolu 5. 1). Všetci pacienti exponovanej skupiny mali diagnostikovanú VTE. Ako kontrolná skupina bola použitá tretia skupina pacientov s predchádzajúceho rozdelenia (pozri kapitolu 5.1). Táto skupina zahrňovala 40 pacientov, ktorí mali diagnostikovanú jedine fibriláciu predsiení.

RR pre nosičstvo rizikovej alely G rs1613662 u pacientov s VTE bolo stanovené na 1,20 (95% CI 0,59 – 2,45).

RR pre nosičstvo rizikovej alely C rs2036914 u pacientov s VTE bolo stanovené na 1,00 (95% CI 0,80 – 1,25).

RR pre nosičstvo rizikovej alely T rs2289252 u pacientov s VTE bolo stanovené na 1,00 (95% CI 0,74 – 1,36).

RR pre nosičstvo rizikovej alely T rs2066865 u pacientov s VTE bolo stanovené na 1,20 (95% CI 0,80 – 1,79).

V tabuľke 15 sú zaznamenané počty nosičov rizikových alel študovaných SNPs v jednotlivých skupinách pacientov a zhrnuté RR študovaných SNP.

Tab.15 Počet nosičov rizikových alel v jednotlivých skupinách, hodnoty RR, CI a p-hodnota jednotlivých SNPs pri štúdiu asociácie SNPs v génoch GP6, F11 a FGG s VTE

Gén	SNP	Počet nosičov rizikovej alely/počet pacientov skupine		RR	CI	p-hodnota
		Exponovaná skupina	Kontrolná skupina			
GP6	rs1613662	12/40	10/40	1,20	0,59 – 2,45	0,6176
F11	rs2036914	32/40	32/40	1,00	0,80 – 1,25	1,0000
	rs2289252	27/40	27/40	1,00	0,74 – 1,36	1,0000
FGG	rs2066865	24/40	20/40	1,20	0,80 – 1,79	0,3718

Pozn. exponovaná skupina – 40 pacientov s žilovou tromboembóliou, kontrolná skupina - 40 pacientov bez žilovej tromboembólie

6 Diskusia

Žilová tromboembólia je multifaktoriálne ochorenie, ktoré je ovplyvňované mnohými faktormi. Okrem iných genetických faktorov ovplyvňujú riziko vzniku žilovej tromboembólie aj jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs) lokalizované v génoch kódujúcich proteíny zúčastňujúce sa koagulačnej kaskády krvi (Bezemer *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Tirado *et al.*, 2004; Uitte de Willige *et al.*, 2005).

V tejto práci boli technológiou MassArray® genotypizované SNPs v génoch GP6 (rs1613662), F11 (rs2036914, rs2289252) a FGG (rs2066865). Genotypizovaný bol súbor, ktorý zahrňoval 100 vzoriek DNA pacientov Fakultnej nemocnice Olomouc s rôznymi kardiovaskulárnymi ochoreniami liečenými warfarínom.

Technológia MassArray® bola posúdená ako vhodná metóda na genotypizáciu SNPs, pretože ide o robustnú, rýchlu, citlivú a spoľahlivú metódu. Jej výhody spočívajú hlavne v možnosti analýzy niekoľkých SNPs v rámci jednej vzorky a takisto možnosti genotypizovať naraz niekoľko desiatok až stoviek vzoriek.

Z výsledkov genotypizácie SNPs boli vypočítané alelové a genotypové početnosti v jednotlivých skupinách pacientov a v celom súbore pacientov (pozri kapitolu 5.1). Získané hodnoty alelových a genotypových početností sa významne medzi jednotlivými skupinami nelíšia (pozri kapitola 5.1, tabuľky 10 – 13). Z týchto výsledkov je možné usudzovať, že nosičstvo rizikových alel jednotlivých SNPs sa neasociuje s Leidenskou mutáciou (pacienti prvej skupiny) alebo VTE (pacienti druhej skupiny).

Genotypové frekvencie rs2066865 neboli v Hardy-Weinbergovej (HW) rovnováhe ($P < 0,05$) v prvej, druhej, tretej skupine ani v celom súbore pacientov. Genotypové frekvencie rs2289252 neboli v HW rovnováhe ($P < 0,05$) v prvej a druhej skupine pacientov. To, že genotypové frekvencie daných SNPs nie sú v HW rovnováhe môže byť spôsobené viacerými faktormi. Skupiny pacientov sú veľkostne malé, čo nemusí odrážať genotypové rozloženie v skutočných, veľkých populáciách. Súbor obsahuje jedincov, ktorí nie sú zdraví ale majú diagnostikované rôzne ochorenia kardiovaskulárneho systému, čo je najpravdepodobnejším dôvodom, prečo daný súbor nie je v HW rovnováhe.

Následne bolo stanovené relatívne riziko (RR) asociácie výskytu SNPs v génoch GP6, F11 a FGG s výskytom SNP v géne F5 a RR asociácie vzniku žilovej tromboembólie a nosičstva rizikovej alely SNPs v génoch GP6, F11 a FGG. Z hodnôt RR, CI a p-hodnoty (pozri tabuľky 14 a 15) je zrejmé, že hodnoty nie sú štatisticky významné.

Prostredníctvom tohto súboru pacientov teda nebola preukázaná významná asociácia žiadneho so študovaných polymorfizmov so vznikom žilovej tromboembólie či výskytom Leidenskej mutácie. Niektoré SNPs síce dosiahli hodnotu RR vyššiu ako 1 ale nebol splnený interval spoľahlivosti, ktorý by výsledok RR potvrdil.

Výsledky tejto práce nepotvrdzujú publikované výsledky, ktoré posudzujú študované SNP ako rizikové faktory vzniku žilovej trombózy, prípadne zaznamenávajú zvýšený trend rizikovosti vzniku trombózy v prítomnosti daných faktorov (Bezemer *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Tirado *et al.*, 2004; Uitte de Willige *et al.*, 2005).

SNP v géne GP6 (rs1613662) doposiaľ buď so žilovou trombózou asociovaný nebol (El-Galaly *et al.*, 2013) alebo bola zistená len veľmi nízka asociácia. OR rizikovej alely rs1613662 dosiahlo hodnotu 1,15 (95% CI 1,01 – 1,30) (Bezemer *et al.*, 2008).

SNPs v géne F11 (rs2036914 a rs2289252) vykazujú zvýšené riziko vzniku žilovej trombózy (El-Galaly *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2009). *Hazard ratio* (HR) pre genotypy rs2289252 TT a CT bolo stanovené na 1,71 (95% CI 1,29 – 2,27) a 1,34 (95% CI 1,08 – 1,66). Pre genotyp CC rs2036914 bolo HR stanovené na 1,65 (95% CI 1,26 – 2,17) (El-Galaly *et al.*, 2013). OR pre rs2289252 bol stanovený na 1,31 (95% CI 1,20 – 1,43) (Li *et al.*, 2009).

Rizikovosť SNP v géne FGG (rs2066865) sa dá posudzovať aj na základe možných haplotypov, ktoré vykazujú rôzne riziká vzniku žilovej trombózy (de Willige *et al.*, 2005). Homozygoti TT rs2066865 majú OR 1,84 (95% CI 1,14 – 2,98). Pri zahrnutí rizikových faktorov ako je pohlavie, vek a Leidenská mutácie vzrastie OR na 2,01 (95% CI 1,23 – 3,21) pre VTE (Grünbacher *et al.*, 2007).

Rozdielnosť výsledkov tejto práce s inými publikovanými výsledkami je prisudzovaný malej veľkosti genotypizovaného súboru pacientov. Súbor o veľkosti 100 pacientov nevykazuje vhodnú aproximáciu na väčšie populácie. Populácie posudzované v publikovaných štúdiách sa veľkostne pohybujú rádovo v stovkách až

tisícoch pacientov. Ďalšou možnou príčinou nepotvrdenia asociácie študovaných SNPs s rizikom vzniku žilovej tromboembólie a s Leidenskou mutáciou je nevhodná kontrolná skupina. Kontrolná skupina zahrňovala chorých jedincov, ktorí síce nemali diagnostikovanú VTE, ale vzhľadom na ich diagnózu – fibriláciu predsiení majú zvýšené riziko vzniku tromboembolickej udalosti. Použitie zdravých jedincov ako kontrolnej skupiny by pri genotypizácii študovaných SNP mohlo ukázať iné alelové a genotypové rozloženie.

Z grafov 1 – 4 (pozri kapitola 5.1) je však možné pozorovať stúpajúci trend nosičstva rizikovej alely v skupinách pacientov s už diagnostikovanou VTE oproti skupine pacientov, ktorí nemajú diagnostikovanú VTE. Z tohto môžeme usudzovať, že asociácia žilovej tromboembólie a nosičstva rizikovej alely jednotlivých SNPs by bola pravdepodobne štatisticky významná pri štúdiu väčšieho súboru pacientov.

7 Záver

V teoretickej časti bakalárskej práce boli popísané získané a genetické rizikové faktory vzniku žilovej tromboembólie. Medzi genetickými faktormi boli popísané aj SNPs v génoch GP6 (rs1613662), F11 (rs2036914, rs2289252) a FGG (rs2066865) a F5 (rs6025), ktoré vykazujú asociáciu s rizikovou vznikom žilovej tromboembólie. V ďalšej kapitole bol popísaný princíp technológie MassArray®.

V experimentálnej časti bakalárskej práce bolo genotypizovaných 100 DNA vzoriek pacientov Fakultnej nemocnice v Olomouci. Pacienti vybraní pre štúdium SNPs užívali warfarín pre liečbu alebo prevenciu kardiovaskulárnych ochorení. Súbor pacientov bol rozdelený na základe ich diagnóz do troch skupín. Prvá skupina obsahovala pacientov s Leidenskou mutáciou, druhá skupina obsahovala pacientov s diagnostikovanou žilovou tromboembóliou bez Leidenskej mutácie. Tretia skupina, považovaná v tejto bakalárskej práci za kontrolnú skupinu obsahovala pacientov s diagnostikovanou fibriláciou predsiení, bez Leidenskej mutácie a VTE.

Pre posúdenie miery asociácie výskytu SNPs v génoch GP6, F11 a FGG s výskytom SNP v géne F5 bol použitý výpočet relatívneho rizika (RR). V žiadnom so študovaných SNPs RR asociácie SNPs v génoch GP6, F11 a FGG so SNP v géne F5 nedosiahlo štatisticky významné hodnoty.

Miera asociácie žilovej tromboembólie s nosičstvom rizikových alel SNPs v génoch GP6, F11 a FGG bola posudzovaná hodnotou RR. Štatisticky významné hodnoty RR asociácie študovaných SNPs s VTE neboli dosiahnuté u žiadneho so študovaných SNPs.

Z uvedených výsledkov vyplýva, že asociácia SNPs v génoch GP6, F11 a FGG s Leidenskou mutáciou ani žilovou tromboembóliou nebola potvrdená.

Z grafického znázornenia frekvencie rizikových alel v jednotlivých skupinách pacientov bol však pozorovaný narastajúci trend frekvencie rizikovej alely študovaných SNPs v skupine s pacientami s diagnostikovanou VTE. Predpokladá sa, že genotypizácia väčšieho súboru pacientov by asociáciu študovaných SNPs s Leidenskou mutáciou a VTE mohla potvrdiť.

8 Zoznam použitých skratiek

A	adenín
A₂₆₀	absorbancia žiarenia vlnovej dĺžky 260 nm
A₂₈₀	absorbancia žiarenia vlnovej dĺžky 280 nm
APC	aktivovaný proteín C
BMI	index telesnej hmotnosti (<i>body mass index</i>)
bp	pár bází (<i>base pair</i>)
C	cytozín
CI	interval spoľahlivosti (<i>confidence interval</i>)
ddNTP	dideoxynukleotidtrifosfát (<i>dideoxynucleotide triphosphates</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNDP	deoxynukleotiddifosfát (<i>deoxynucleotide diphosphates</i>)
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát (<i>deoxynucleotide triphosphates</i>)
F11	koagulačný faktor XI
FGA	fibrinogén alfa
FGB	fibrinogén beta
FGG	fibrinogén gama
G	guanín
GP6	glykoproteín VI
HR	<i>hazard ratio</i>

HW rovnováha	Hardy-Weinbergova rovnováha
MALDI-TOF MS	<i>matrix assisted laser desorption/ionization time-of-fly mass spectrometry</i>
MS	hmotnostná spektrometria (<i>mass spectrometry</i>)
OR	pomer pravdepodobnosti (<i>odd ratio</i>)
P	p-hodnota (<i>p-value</i>)
PCR	polymerázová reťazová reakcia (<i>polymerase chain reaction</i>)
RR	relatívne riziko (<i>relative risk</i>)
SAP	<i>schimp alkaline phosphatase</i>
SE	smerodatná chyba (<i>standard error</i>)
SNP	jednonukleotidový polymorfizmus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SNPs	jednonukleotidové polymorfizmy (<i>single nucleotide polymorphisms</i>)
T	tymín
VTE	venózna tromboembólia (<i>venous thromboembolism</i>)
WHR	pomer obvodu pásu a bokov (<i>wiast-to-hip ratio</i>)

9 Použitá literatura

- Ageno, W., Becattini, C., Brighton, T., Selby, R., Kamphuisen, P. W. (2008): Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism a meta-analysis. *Circulation* 117: 93 – 102.
- Aird, W. C. (2007): Vascular bed-specific thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5: 283 – 291.
- Barbalic, M., Dupuis, J., Dehghan, A., Bis, J. C., Hoogeveen, R. C., Schnabel, R. B., Nambi, V., Bretler, M., Smith, N.L., Peters, A., Lu, C., Tracy, R.P., Aleksic, N., Heeriga, J., Keaney Jr., J.F., Rice, K., Lip, G.Y.H., Vasan, R.S., Glazer, N.L., Larson, M.G., Uitterlinden, A.G., Yamamoto, J., Durda, P., Haritunians, T., Psaty, B.M., Boerwinkle, E., Hofman, A., Koenig, W., Jenny, N.S., Wittemna, J.C., Ballatyne, C., Benjamin, E. J. (2010): Large-scale genomic studies reveal central role of ABO in sP-selectin and sICAM-1 levels. *Human molecular genetics* 19: 1863 – 1872.
- Beaulieu, M., Hong, P. (2003): Multiplexing the homogeneous MassEXTEND assay. *Sequenom Application Note: Doc. No.: 8876 – 001.*
- Bergqvist, D. (2006): Venous thromboembolism: a review of risk and prevention in colorectal surgery patients. *Diseases of the colon and rectum* 49: 1620 – 1628.
- Bezemer, I. D., Bare, L. A., Doggen, C.J.M., Arellano, A. R., Tong, C., Rowland, C. M., Catanese, J., Young, B.A., Reitsma, P.H., Devlin, J.J., Rosendaal, F. R. (2008): Gene variants associated with deep vein thrombosis. *Jama* 299: 1306 – 1314.
- Blom, J. W., Doggen, C. J., Osanto, S., Rosendaal, F. R. (2005): Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *Jama* 293: 715 – 722.
- Dahlbäck, B., Hildebrand, B. (1994): Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 1396 – 1400.
- de Haan, H. G., Bezemer, I. D., Doggen, C. J., Le Cessie, S., Reitsma, P. H., Arellano, A. R., Tong, C.H., Devlin, J.J., Bare, L.A., Rosendaal, F.R., Vossen, C. Y. (2012): Multiple SNP testing improves risk prediction of first venous thrombosis. *Blood*, 120: 656 – 663.

- de Willige, S. U., de Visser, M. C., Houwing-Duistermaat, J. J., Rosendaal, F. R., Vos, H. L., Bertina, R. M. (2005): Genetic variation in the fibrinogen gamma gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen γ' levels. *Blood* 106: 4176 – 4183.
- Dentali, F., Sironi, A. P., Ageno, W., Turato, S., Bonfanti, C., Frattini, F., Crestani, S., Franchini, M. (2012): Non-O blood type is the commonest genetic risk factor for VTE: results from a meta-analysis of the literature. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 38: 535 – 548.
- Dirven, R. J., de Ronde, H., van der Yelden, P. A., Reitsma, P. H. (1994): Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369: 64 – 76.
- Egeberg, O. (1965): Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thrombosis et diathesis haemorrhagica* 13: 516 – 530.
- El-Galaly, T. C., Severinsen, M. T., Overvad, K., Steffensen, R., Vistisen, A. K., Tjønneland, A., Kristensen, S. R. (2013): Single nucleotide polymorphisms and the risk of venous thrombosis: results from a Danish case-cohort study. *British journal of haematology* 160: 838 – 841.
- Franco, R. F., Reitsma, P. H. (2001): Genetic risk factors of venous thrombosis. *Human genetics* 109: 369 – 384.
- Franchini, M., Montagnana, M., Targher, G., Manzato, F., Lippi, G. (2007): Pathogenesis, clinical and laboratory aspects of thrombosis in cancer. *Journal of thrombosis and thrombolysis* 24: 29 – 38.
- Gabriel, S., Ziaugra, L., Tabbaa, D. (2009): SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Current protocols in human genetics*: 2.12.1 – 2.12.18.
- Gallus, A. S. (2005): Travel, venous thromboembolism, and thrombophilia. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 31: 90 – 96.
- Gomes, M. P., Deitcher, S. R. (2004): Risk of venous thromboembolic disease associated with hormonal contraceptives and hormone replacement therapy: a clinical review. *Archives of internal medicine*, 164: 1965 – 1976.
- Gray, I. C., Campbell, D. A., Spurr, N. K. (2000): Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Human molecular genetics* 9: 2403 – 2408.

- Griffin, J. H., Evatt, B., Zimmerman, T. S., Kleiss, A. J., Wideman, C. (1981): Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *Journal of Clinical Investigation* 68: 1370 – 1373.
- Grünbacher, G., Weger, W., Marx-Neuhold, E., Pilger, E., Köppel, H., Wascher, T., März, W., Renner, W. (2007): The fibrinogen gamma (FGG) 10034C > T polymorphism is associated with venous thrombosis. *Thrombosis research* 121: 33 – 36.
- Halushka, M. K., Fan, J. B., Bentley, K., Hsie, L., Shen, N., Weder, A., Cooper, R., Lipshutz, R., Chakravarti, A. (1999): Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nature genetics* 22: 239 – 247.
- Hirsh, J. (1998): Evidence for the needs of out-of-hospital thrombosis prophylaxis: introduction. *CHEST Journal* 114: 113 – 114.
- Hirschhorn, J. N., Daly, M. J. (2005): Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics* 6: 95 – 108.
- James, A. H. (2009): Venous thromboembolism in pregnancy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29: 326 – 331.
- James, A. H., Tapson, V. F., Goldhaber, S. Z. (2005): Thrombosis during pregnancy and the postpartum period. *American journal of obstetrics and gynecology* 193: 216 – 219.
- Jurinke, C., Van Den Boom, D., Cantor, C. R., Köster, H. (2002): Automated genotyping using the DNA MassArray™ technology. *PCR Mutation Detection Protocols* 187: 179 – 192.
- Karas, M., Hillenkamp, F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry* 60: 2299 – 2301.
- Koster, T. (1994): Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369: 64 – 67.
- Koster, T., Vandenbroucke, J. P., Rosendaal, F. R., Briët, E., Blann, A. D. (1995): Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *The Lancet* 345: 152 – 155.

- Kuipers, S., Schreijer, A. J. M., Cannegieter, S. C., Büller, H. R., Rosendaal, F. R., Middeldorp, S. (2007): Travel and venous thrombosis: a systematic review. *Journal of internal medicine* 262: 615 – 634.
- Li, Y., Bezemer, I. D., Rowland, C. M., Tong, C. H., Arellano, A. R., Catanese, J. J., Devlin, J.J., Reitsma, P.H., Bare, L.A., Rosendaal, F. R. (2009): Genetic variants associated with deep vein thrombosis: the F11 locus. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7: 1802 – 1808.
- Lippi, G., Franchini, M. (2008): Pathogenesis of venous thromboembolism: when the cup runneth over. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 34: 747 – 761.
- Mammen, E. F. (1992): Pathogenesis of venous thrombosis. *CHEST Journal* 102: 640 – 644.
- Nossent, A. Y., van Marion, V., van Tilburg, N. H., Rosendaal, F. R., Bertina, R. M., van Mourik, J. A., Eikenboom, H. C. J. (2006): von Willebrand factor and its propeptide: the influence of secretion and clearance on protein levels and the risk of venous thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 4: 2556 – 2562.
- Oeth, P., Beaulieu, M., Park, C., Kosman, D., del Mistro, G., van den Boom, D., Jurinke, C. (2005): iPLEX™ assay: increased plexing efficiency and flexibility for MassARRAY® system through single base primer extension with mass-modified terminators. *Sequenom application note: Doc.no.: 8876 – 006.*
- Paterson, A. D., Lopes-Virella, M. F., Waggott, D., Boright, A. P., Hosseini, S. M., Carter, R. E., Shen, E., Mirea, L. Bharaj, B., Sun, L., Bull, S. B. (2009): Genome-wide association identifies the ABO blood group as a major locus associated with serum levels of soluble E-selectin. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29: 1958 – 1967.
- Pomp, E. R., Lenselink, A. M., Rosendaal, F. R., Doggen, C. J. M. (2008): Pregnancy, the postpartum period and prothrombotic defects: risk of venous thrombosis in the MEGA study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 6: 632 – 637.
- Poort, S. R., Rosendaal, F. R., Reitsma, P. H., Bertina, R. M. (1996): A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is

associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 88: 3698 – 3703.

- Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Miletich, J. P. (1999): G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation* 99: 999 – 1004.
- Rosendaal, F. R., Koster, T., Vandenbroucke, J. P., Reitsma, P. H. (1995): High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden. *Blood* 85: 1504 – 1508.
- Rosendaal, F. R., Doggen, C. J. M., Zivelin, A., Arruda, V. R., Aiach, M., Siscovick, D. S., Hillarp, A., Watzke, H.H., Bernardi, F., Cumming, A.M., Preston, F.E., Reitsma, P. H. (1998): Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thrombosis and haemostasis* 79: 706 – 708.
- Rosendaal, F. R. (1999): Venous thrombosis: a multicausal disease. *The Lancet* 353: 1167 – 1173.
- Rosendaal, F. R. (2005): Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. *ASH Education Program Book 1*: 1 – 12.
- Sexton, T. R., Henry, R. J., McManus, L. J., Bowen, S., Shepherd, M. (2010): Capture of assay template by multiplex[®] PCR of long amplicons for genotyping SNPs and InDels with MALDI-TOF mass spectrometry. *Molecular breeding* 25: 471 – 480.
- Shastri, B. S. (2007): SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. *Journal of human genetics* 52: 871 – 880.
- Schwarz, H. P., Fischer, M., Hopmeier, P., Batard, M. A., Griffin, J. H. (1984): Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 64: 1297 – 1300.
- Snoep, J. D., Gaussem, P., Eikenboom, J. C. J., Emmerich, J., Zwaginga, J. J., Holmes, C. E., Vos, H.L., De Groot, P.H.G., Herrington, D.M., Bray, P.F., Rosendaal, F.R., van der Bom, J. G. (2010): The minor allele of GP6 T13254C is associated with decreased platelet activation and a reduced risk of recurrent cardiovascular events and mortality: results from the SMILE–Platelets project. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8: 2377 – 2384.
- Sode, B. F., Allin, K. H., Dahl, M., Gyntelberg, F., Nordestgaard, B. G. (2013): Risk of venous thromboembolism and myocardial infarction associated with

factor V Leiden and prothrombin mutations and blood type. Canadian Medical Association Journal: 185: 229 – 237.

- Spitzer, W. O., Lewis, M. A., Heinemann, L. A., Thorogood, M. (1996): Third generation oral contraceptives and risk of venous thromboembolic disorders: an international case-control study. Bmj 312: 83 – 88.
- Tirado, I., Soria, J. M., Mateo, J., Oliver, A., Souto, J. C., Santamaria, A., Felices, R., Borrell, M., Fontcuberta, J. (2004): Association after linkage analysis indicates that homozygosity for the 46C → T polymorphism in the F12 gene is a genetic risk factor for venous thrombosis. Thrombosis and haemostasis-Stuttgart 91: 899 – 904.
- Trousseau, A. (1865): Clinique médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris. Baillière 2.
- Virchow, R. (1856): Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem. Gesammelte abhandlungen zur Wundheilkunde: 458 – 633.
- Yamamoto, F. I., Clausen, H., White, T., Marken, J., Hakomori, S. I. (1990): Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. Nature 345: 229 – 233.

9.1 Použité internetové zdroje

https://www.medcalc.net/tests/relative_risk.php