

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2019**

**Bc. Kateřina Beierová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Metody detekce genových variant ovlivňujících  
účinek statinů**

**Diplomová práce**

**Bc. Kateřina Beierová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Veroniky Žižkové, s použitím zdrojů uvedených v závěru práce.

V Olomouci dne .....

Podpis: .....

## SOUHRN

Statiny jsou léky, které snižují hladinu cholesterolu v krvi. Blokují syntézu cholesterolu v játrech a užívají se při prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Nejčastějším vedlejším účinkem terapie statiny jsou svalové obtíže – myopatie. Mimo dalších faktorů jsou pro vznik statinových myopatií klíčové genetické predispozice. Genotypizace variant genů asociovaných se statinovými myopatiemi umožňuje individuální přístup při terapii a rovněž umožňuje snížit riziko vzniku těchto komplikací.

Teoretická část diplomové práce se věnuje ischemické chorobě srdeční, dále biosyntéze cholesterolu a její regulaci. V následujících kapitolách jsou popsány jak statiny, tak metody objevování a genotypizace jednonukleotidových polymorfismů se zaměřením na technologii MassArray.

Cílem experimentální části byla genotypizace jednonukleotidových polymorfismů genů *SLCO1B1* (rs4149056), *GATM* (rs9806699) a *LILRB5* (rs12975366) u pacientů s ischemickou chorobou srdeční. V porovnání s publikovanými výsledky nebyl zaznamenán význačný rozdíl v genotypových, alelických a fenotypových frekvencích u polymorfismů rs4149056 a rs9806699. Frekvence alely T u polymorfismu rs12975366 byla 49 %, tzn. nižší, než byla předpokládaná frekvence.

Genotypizace těchto polymorfismů může usnadnit identifikaci pacientů, kteří mají predispozice ke statinovým myopatiím.

## SUMMARY

Statins are medicaments that reduce cholesterol levels in blood. They block the synthesis of cholesterol in liver and are used as a prevention of cardiovascular diseases. The most common side effect of statin therapy is muscular weakness – myopathy. Apart from other factors, genetic predispositions are the crucial source of statin-induced myopathy. Genotyping of the individual genetic variants associated with statin-induced myopathies enables an individual approach within the therapy and helps reduce the risk of its formation.

In the theoretical part of this thesis I discuss the definition of the ischemic heart disease, cholesterol biosynthesis and its regulation. In the following chapters, statins and methods for detecting and genotyping of single-nucleotide polymorphisms are discussed with focus on the MassArray technology.

The aim of the subsequent experiment is to carry out the genotyping of single-nucleotide polymorphisms of the following genes: *SLCO1B1* (rs4149056), *GATM* (rs9806699) and *LILRB5* (rs12975366) by patients with ischemic heart disease. With respect to the published results, no significant variation of genotype, allelic or phenotype frequencies of rs4149056 and rs9806699 polymorphisms was found. The frequency of the T-allele of rs12975366 polymorphism was 49 %, e.g. lower than the expected frequency.

Genotyping of these polymorphisms could enable easier identification of patients with predispositions for statin-induced myopathies.

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce Mgr. Veronice Žižkové za věnovaný čas, rady, připomínky a laskavý přístup. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Sikorové za pomoc při zpracování experimentální části a také MUDr. Janě Petřkové, Ph.D. za odborné připomínky. Diplomová práce vznikla za podpory projektů IGA UP: LF\_2018\_015 a IGA UP: LF\_2019\_009 a projektu NPU: LO1304.

## OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE .....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	3
3.1	Ischemická choroba srdeční .....	3
3.1.1	Ateroskleróza.....	3
3.1.2	Typy ICHS .....	5
3.1.3	Prognózy a léčba ICHS .....	7
3.1.4	Epidemiologie ICHS .....	8
3.2	Biosyntéza cholesterolu a její regulace .....	8
3.3	Statiny.....	11
3.3.1	Statinové myopatie .....	12
3.3.2	Genetické predispozice vzniku statinových myopatií .....	13
3.4	Jednonukleotidový polymorfismus (SNP) .....	15
3.4.1	Objevování SNP .....	16
3.4.2	Genotypizace SNP.....	17
3.4.3	Genotypovací technologie MassArray .....	19
4	MATERIÁL A METODY.....	22
4.1	Biologický materiál .....	22
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky .....	22
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	25
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	26
4.4.1	Izolace DNA.....	26
4.4.2	Měření koncentrace a čistoty DNA .....	26
4.4.3	PCR amplifikace.....	27
4.4.4	SAP reakce .....	28
4.4.5	iPLEX reakce .....	28
4.4.6	Odsolení iPLEX produktů pomocí clean resin .....	29
4.4.7	Přenos iPLEX produktů na SpectroCHIP .....	29
4.4.8	Analýza iPLEX produktů pomocí MALDI-TOF analyzátoru.....	30
4.5	Statistické metody .....	30
5	VÝSLEDKY.....	32
6	DISKUZE .....	37
7	ZÁVĚR.....	40
8	LITERATURA .....	41

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>A</b>	adenin
<b>AIM</b>	akutní infarkt myokardu
<b>AKS</b>	akutní koronární syndrom
<b>AMP</b>	adenozinmonofosfát
<b>ATP</b>	adenozintrifosfát
<b>C</b>	cytozin
<b>cAMP</b>	cyklický adenosinmonofosfát
<b>CK</b>	kreatinkináza (creatinkinase)
<b>ddNTP</b>	dideoxyribonukleotid
<b>dNTP</b>	deoxyribonukleotid
<b>EDTA</b>	kyselina etylendiamintetraoctová
<b>EKG</b>	elektrokardiografie
<b>ER</b>	endoplazmatické retikulum
<b>G</b>	guanin
<b>GATM</b>	glycin amidinotransferáza
<b>HMGCo-A</b>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A
<b>HRM</b>	high resolution melting
<b>ICHS</b>	ischemická choroba srdeční
<b>IM</b>	infarkt myokardu
<b>LDL</b>	low density lipoprotein
<b>LILRB5</b>	leukocyte immunoglobulin-like subfamily B member 5
<b>MALDI</b>	matrix-assisted laser desorption/ionization
<b>mRNA</b>	mediátorová RNA
<b>OATP1B1</b>	organic anion transporting polypeptide family member 1B1
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
<b>RFLP</b>	polymorfismus délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
<b>S1P</b>	site-1 proteáza
<b>S2P</b>	site-2 proteáza
<b>SAP</b>	shrimp alkaline phosphatase
<b>SBE</b>	prodloužení jedné báze (single base extension)
<b>SCAP</b>	SREBP cleavage activating protein



<b>SDS</b>	dodecylsulfát sodný
<b>SLCO1B1</b>	solute carrier organic anion transporter family member 1B1
<b>SNP</b>	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
<b>SREBP</b>	sterol regulatory element–binding protein
<b>SSCP</b>	single-strand conformation polymorphism
<b>T</b>	thymin
<b>TOF</b>	analyzátor doby letu (time of flight)
<b>VLDL</b>	very low density lipoprotein

## SEZNAM OBRÁZKŮ

**Obrázek 1:** Meziprodukty biosyntézy cholesterolu

**Obrázek 2:** Regulace exprese genů pro biosyntézu cholesterolu proteiny SREBP

**Obrázek 3:** Porovnání vzniku myopatie u pacientů s rozdílným genotypem *SLCO1B1* (rs4149056)

**Obrázek 4:** Jednotlivé kroky SBE genotypizace SNP

**Obrázek 5:** HRM analýza – křivky teplot tání PCR produktů u odlišných genotypů

**Obrázek 6:** Jednotlivé kroky genotypizace technologií MassArray

**Obrázek 7:** Hmotnostní spektrum pro genotyp TT u rs12975366 genu *LILRB5*

**Obrázek 8:** Hmotnostní spektrum pro genotyp TC u rs12975366 genu *LILRB5*

**Obrázek 9:** Hmotnostní spektrum pro genotyp CC u rs12975366 genu *LILRB5*

**Obrázek 10:** Genotypové rozložení u rs12975366 genu *LILRB5* (názorný příklad)

## SEZNAM TABULEK

**Tabulka 1:** Rizikové faktory vzniku aterosklerózy

**Tabulka 2:** Charakteristika souboru pacientů, jejichž krev byla použita v experimentální části

**Tabulka 3:** Stanovené diagnózy souboru pacientů

**Tabulka 4:** Složení PCR reakční směsi pro 1 vzorek

**Tabulka 5:** Podmínky PCR amplifikace

**Tabulka 6:** Složení SAP reakční směsi pro 1 vzorek

**Tabulka 7:** Podmínky SAP reakce

**Tabulka 8:** Složení iPLEX reakční směsi pro 1 vzorek

**Tabulka 9:** Podmínky iPLEX reakce

**Tabulka 10:** Asociace genotypizovaných SNPs se statinovými myopatiemi

**Tabulka 11:** Genotypové, alelické a fenotypové frekvence polymorfismu rs4149056 genu *SLCO1B1* u testovaného souboru pacientů

**Tabulka 12:** Genotypové, alelické a fenotypové frekvence polymorfismu rs9806699 genu *GATM* u testovaného souboru pacientů

**Tabulka 13:** Genotypové, alelické a fenotypové frekvence polymorfismu rs12975366 genu *LILRB5* u testovaného souboru pacientů

# 1 ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění v čele s ischemickou chorobou srdeční jsou celosvětově nejčastější příčinou úmrtí. Rizikovým faktorem vzniku kardiovaskulárních onemocnění je zvýšená hladina cholesterolu a dalších lipidů v krvi. Vysoká hladina lipidů v krvi, společně s dalšími faktory, vede k jejich postupnému ukládání ve stěnách cév a způsobuje jejich zúžení, případně ucpání. Výsledkem jsou pak akutní formy ischemické choroby srdeční, například infarkt myokardu.

Pro prevenci kardiovaskulárních nemocí se užívají statiny. Statiny blokují syntézu cholesterolu v játrech a tím snižují jeho hladinu v krvi. Jedná se o jedny z nejčastěji předepisovaných léků v klinické praxi. Ačkoliv jsou statiny u většiny pacientů dobře přijímány, u 10-15 % pacientů se objevuje statinová intolerance, která se projevuje svalovými myopatiemi a dalšími příznaky, jako je bolest hlavy, nevolnost a další (Banach *et al.*, 2015).

Různá individuální odpověď na statinovou terapii je mimo jiné zapříčiněna i genetickými predispozicemi. Polymorfismy genů, jejichž produkty se účastní metabolismu statinů, výrazně ovlivňují přítomnost či nepřítomnost vedlejších účinků statinů. Zahrnutí genetických faktorů při užívání statinů má velký význam pro předcházení statinové intolerance a efektivní léčbu.

V této diplomové práci byla provedena genotypizace polymorfismů genů *SLCO1B1*, *GATM* a *LILRB5*, u kterých byla potvrzena asociace se statinovými myopatiemi u souboru pacientů s ischemickou chorobou srdeční.

## 2 CÍLE PRÁCE

- 1) Vypracování literární rešerše na téma „Metody detekce genových variant ovlivňujících účinek statinů“
- 2) Izolace DNA z periferní krve 116 pacientů s diagnózou ischemické choroby srdeční
- 3) Genotypizace polymorfismů rs4149056, rs9806699 a rs12975366 technologií MassArray
- 4) Statistické vyhodnocení genotypových, alelických a fenotypových frekvencí u testovaného souboru pacientů

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Ischemická choroba srdeční (ICHS)

Ischemická choroba srdeční je skupina kardiovaskulárních onemocnění, která vzniká na základě omezení nebo zastavení přítoku krve, způsobeného změnami na věnčitých tepnách do konkrétní oblasti srdečního svalu, kde vzniká ischemie až nekróza.

#### 3.1.1 Ateroskleróza

Nejčastější příčinou vzniku všech typů ICHS je ateroskleróza. Jedná se o cévní onemocnění s buněčnými a metabolickými změnami v tepenné stěně. Hromaděním lipidů, cholesterolu, vápníku a dalších látek v cévní stěně vzniká aterosklerotický plát, který se postupně zvětšuje a omezuje průtok krve, což vede ke snížení zásobení orgánů kyslíkem. Ateroskleróza se vyvíjí postupně v průběhu života, a to v několika fázích. (Špinar *et* Vítovec, 2003).

Mechanismus vzniku aterosklerózy vysvětlují dvě základní hypotézy: lipidová hypotéza a hypotéza endotelového poškození, které byly později sloučeny v jednotnou hypotézu vzniku aterosklerózy. Lipidová hypotéza byla formulována již v polovině 19. století Rudolfem Virchowem. Tato teorie vychází z toho, že zvýšená koncentrace plazmatických lipidů vede k jejich postupné akumulaci ve stěně cév. Ross *et* Glomset (1976a) definovali hypotézu endotelového poškození („response-to-injury“). Chronickým působením exogenních i endogenních faktorů (viz Tab. 1) dochází k poruše funkce endotelových buněk.

**Tabulka 1:** Rizikové faktory vzniku aterosklerózy

<b>Modifikovatelné rizikové faktory</b>	Hypercholesterolémie
	Kouření
	Hypertenze
	Diabetes mellitus
	Nedostatek fyzické aktivity
	Obezita
	Infekční agens
<b>Nemodifikovatelné rizikové faktory</b>	Věk mužů > 45 let, věk žen > 55 let
	Mužské pohlaví
	Genetické predispozice

Na místo endotelového poškození adherují monocyty, makrofágy a trombocyty, cirkulující v krevním řečišti. Makrofágy zachycují plazmatické lipidy, dochází k oxidaci lipidů a vzniku pěnových buněk. Makrofágy, pěnové buňky a trombocyty, zachycené na poškozených endotelových buňkách, navozují proliferaci buněk hladké svaloviny cév, ztrátu kontroly propustnosti endotelu a řadu dalších patofyziologických změn, které postupně vedou ke tvorbě aterosklerotického plátu (Ross *et al.*, 1976b; Ross *et al.*, 1977).

Existují dva typy aterosklerotických plátů, které se liší svým složením. Stabilní pláty obsahují velké množství kolagenu a endotelových buněk, naproti tomu menší množství lipidů. Tento typ plátu sice ovlivňuje průtok krve, ale po řadu let bývá stálý a většinou způsobuje vznik nebolestivých forem ICHS. Rizikovější jsou nestabilní aterosklerotické pláty, které jsou charakterizovány měkkým lipidovým jádrem a oproti stabilním plátům obsahují ve větším poměru lymfocyty a makrofágy. Nestabilní pláty jsou také náchylnější k prasknutí – ruptuře, která bývá příčinou vzniku akutního koronárního syndromu (AKS). Ruptura vede ke krvácení do plátu a vzniku nasedajícího trombu, který částečně nebo úplně omezuje krevní průtok. Další příčinou vzniku AKS je např. dynamická obstrukce, jejíž podstatou je nadměrná stažitelnost hladkého svalstva cév (Falk, 2006).

Vznik aterosklerózy je komplexní proces, na kterém se podílejí krevní elementy, svalové buňky, ale také výše popsané buňky imunitního systému, které jsou přítomny ve všech fázích aterosklerózy. V poslední době je zájem soustředěn právě na imunitní a zánětlivé mechanismy aterosklerózy a na potencionální použití zánětlivých markerů pro prognózu a diagnostiku aterosklerózy, respektive ICHS. Zánět je běžnou obrannou reakcí organismu na různá poškození. Ve specifických místech, jako jsou zakřivení nebo větvení tepen, dochází k rychlým změnám rychlosti a směru toku krve (McMillan, 1985). Tyto hemodynamické změny ovlivňují expresi genů, které kódují molekuly zodpovědné za adhezi a akumulaci imunitních buněk v namáhaných místech (Nagel *et al.*, 1994). Mezi tyto molekuly patří selektiny, vaskulární a intercelulární adhezní molekuly. Adhezní molekuly fungují jako receptory pro monocyty a další leukocyty. V momentě, kdy monocyty přilnou k těmto specifickým místům a vzniknou pěnové buňky, jsou buňkami endotelu syntetizované jiné specifické molekuly, které přitahují další monocyty jako následek zánětlivé reakce. Nábor zánětlivých buněk je tedy v průběhu vzniku aterosklerózy postupný. Novou strategií pro prevenci kardiovaskulárních onemocnění jsou terapie zaměřené na snížení rizika aterosklerotických zánětů (Raggi *et al.*, 2018; Ross *et al.*, 1999).

### 3.1.2 Typy ICHS

ICHS se dělí na následující typy:

1. nebolestivé formy:

- němá ischemie
- arytmie
- srdeční selhání
- náhlá smrt

2. bolestivé formy:

- angina pectoris (námahová nebo stabilní)
- akutní koronární syndrom (AKS)

AKS pak zahrnuje ještě tato onemocnění:

1. nestabilní angina pectoris
2. Prinzmetalova angina pectoris
3. infarkt myokardu (IM)

#### Nebolestivé formy

Mezi nebolestivé formy ICHS řadíme němou ischemii, při které dochází k ischemii srdečního svalu bez anginózních bolestí na hrudi. Němá ischemie je stejně jako všechny typy ICHS nejlépe diagnostikována na základě elektrokardiografického vyšetření (EKG), kde jsou hodnoceny změny úseků ST, a pro němou ischemii jsou typické deprese úseků ST, větší než 1 mm a trvající déle než 1 minutu bez bolestí na hrudi. Předpokládá se, že se vyskytuje častěji než bolestivé formy ICHS právě proto, že ji není snadné diagnostikovat, protože pro ni nejsou typické bolestivé symptomy (Schang *et* Pepine, 1977; Conti *et al.*, 2012).

Arytmie (dysrytmie) jsou dysfunkce srdečního rytmu. Jedná se o rozsáhlou skupinu onemocnění srdce. Příčinami arytmií jsou poruchy vzniku nebo vedení srdečních vzruchů. Arytmie se liší délkou trvání, pravidelností, místem vzniku apod. Asymptomatické arytmie jsou takové, které pacient nemusí vnímat – jde o pomalé či chronické arytmie. Pro symptomatické arytmie jsou specifické palpitace neboli nepřírozené vnímání bušení srdce a synkopy, což jsou krátké ztráty vědomí. Kromě těchto příznaků mohou být arytmie maligní a vést až k srdečnímu selhání (Špinar *et* Vítovec, 2003).

Srdeční selhání je označení pro soubor symptomů, které jsou způsobeny onemocněním srdečního svalu nebo vlivem extrakardiálních příčin. Jde o postižení srdce, u kterého navzdory plnění komor klesá minutový výdej a srdce tak není schopno pokrýt metabolické potřeby tkání. Srdeční selhání probíhá ve 3 fázích. V první fázi vzniká příčinná choroba, která pak vede k dysfunkci srdce (různé formy ICHS a další kardiovaskulární choroby). Druhá fáze



je bezpříznaková a po nějakou dobu se nemění. Třetí fáze je typická v manifestaci příčinné choroby a dochází podle rychlosti vývoje k chronickému nebo akutnímu srdečnímu selhání (Štefka, 2007).

### **Angina pectoris**

Angina pectoris je jednou z bolestivých forem ICHS a projevuje se svíravými bolestmi na hrudi postiženého. Příčinou vzniku je náhlý nepoměr mezi spotřebou kyslíku a jeho přísunem do srdečního svalu. Stejně jako u většiny ICHS může být důvodem zúžení cév vlivem aterosklerózy, ale i mnoho dalších faktorů. Angina pectoris je často bezpříznaková, bolest je většinou až posledním symptomem ischemie myokardu.

Anginózní bolest je vyvolána fyzickou námahou. Nejčastěji se projevuje při chůzi do kopce, u náhlého zrychlení pohybu, při dýchání chladného vzduchu, při pohybu ihned po jídle, důsledkem negativních emocí anebo kombinací těchto faktorů. Při zastavení a odpočínutí bolest ustává. Bolest je popisována jako tupá, palčivá nebo tlaková v oblasti hrudní kosti s nejasným ohraničením. Angina pectoris může být během života stabilní, vyšší riziko nastává při její manifestaci v podobě nestabilní anginy pectoris, která patří mezi AKS.

Nestabilní angina pectoris se dělí do 3 skupin podle klinických projevů: 1. nově vznikající záchvaty, 2. zhoršující se záchvaty a 3. klidové záchvaty. Pro nově vzniklou anginu pectoris jsou charakteristické bolesti bez předcházející diagnostikované stabilní anginy pectoris. Dalším typem je zhoršená angina pectoris, u které dochází ke změně charakteru onemocnění v podobě častějších, intenzivnějších nebo déle trvajících záchvatů. Posledním a nejzávažnějším typem je klidová angina pectoris, kdy se záchvaty vyskytují bez zvýšené fyzické zátěže a bolesti přetrvávají více než 20 minut (Braunwald, 1989; Špinar *et* Vítovec, 2003).

### **Infarkt myokardu**

Infarkt myokardu (IM) lze definovat z různých úhlů pohledu a v průběhu let se jeho definice proměňovala. V současné době je IM z patologického hlediska definován jako nekróza buněk myokardu, způsobená dlouhotrvající ischemií. Z klinického pohledu je IM stav, kdy dochází ke zvýšení a/nebo poklesu hodnot biochemických markerů poškození myokardu, jako jsou srdeční troponiny, kreatinkináza (CK) a další. Současně se musí vyskytovat alespoň jeden z následujících projevů: a) symptomy ischemie myokardu, b) nové ischemické změny na EKG, c) vývoj patologických Q vln, d) důkazy o nově vznikající ztrátě viabilního myokardu nebo nově vznikající abnormality srdeční stěny. Tato kritéria platí pro akutní infarkt myokardu (AIM). Existuje také tzv. překonaný (proběhlý, přechozený) infarkt myokardu, pro který platí

a) přítomnost patologických Q vln se symptomy nebo bez nich a vyloučení neischemických změn nebo b) důkazy o ztrátě viabilního myokardu nebo c) patologickoanatomický nález překonaného IM (Thygesen *et al.*, 2019).

Příčinou AIM je ruptura aterosklerotického plátu s nasedající trombózou. Podle rozsahu a místa vzniku nekrózy jsou infarkty myokardu transmurální – nekróza prostupuje v celé šířce stěnou srdečního svalu, nebo subendokardiální – nekróza se nachází pouze ve vnitřní části stěny srdečního svalu. AIM doprovázejí anginózní bolesti, ale nejsou podmínkou. V některých případech se AIM projeví až s postupnými komplikacemi, jako jsou jednostranné srdeční selhání nebo synkopy. Rozhodující při vzniku AIM je doba od prvních příznaků po nasazení léčby. Od toho se poté odvíjí následky a délka rekonvalescence pacienta (Štejf, 2007).

### **3.1.3 Prognózy a léčba ICHS**

Rizika vzniku ICHS souvisí s jejich příčinou, aterosklerózou. Eliminace rizikových faktorů vzniku aterosklerózy pozitivně ovlivňuje vznik ICHS. Základním rizikovým faktorem je obecně hypercholesterolemie, dále zvýšená hodnota triacylglycerolů a VLDL (very low density lipoprotein) v krvi. Podle studie INTERHEART jsou konkrétně pro infarkt myokardu rizikové ještě tyto faktory: psychosociální faktory, užívání drog (kokainu nebo amfetaminu), nadměrná konzumace alkoholu a nedostatečná konzumace ovoce a zeleniny (Yusuf *et al.*, 2004). Dále to je také časová prodleva od prvních potíží do začátku léčby AIM, způsob léčby, selhání ledvin, počet zasažených koronárních tepen a ejekční frakce levé komory. Po prvním prodělaném AIM se pravděpodobnost dalšího infarktu také zvyšuje (Steg *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2015).

Léčba různých typů ischemické choroby srdeční se liší, ale společné jsou jim obecné léčebné zásady. Klíčová je prevence ICHS. Samozřejmostí je eliminace veškerých modifikovatelných rizikových faktorů. Co se týče samotné léčby, tak v první řadě se jedná o zastavení aterosklerotických změn a tím předcházení jejich zvětšování a ruptury. K tomuto účelu se používají statiny, které se primárně indikují při léčbě hypercholesterolemie a vedou ke stabilizaci aterosklerotických plátů. Dále je léčba ICHS zaměřována na prevenci trombotických komplikací a maligních arytmií. Při použití medikamentů se většinou řeší symptomatická léčba příznaků. V souvislosti s AKS jsou indikovány nitráty, beta-blokátory, opiáty a další (Špínar *et Vítovec*, 2003).

### 3.1.4 Epidemiologie ICHS

Ischemická choroba srdeční je celosvětově nejčastější příčinou úmrtí v dospělosti. V roce 2016 představovalo úmrtí na ICHS podle světové zdravotnické organizace 16,6 % z celkového počtu všech příčin úmrtí na světě a v průběhu let se počet případů stále zvyšuje (<https://www.who.int>).

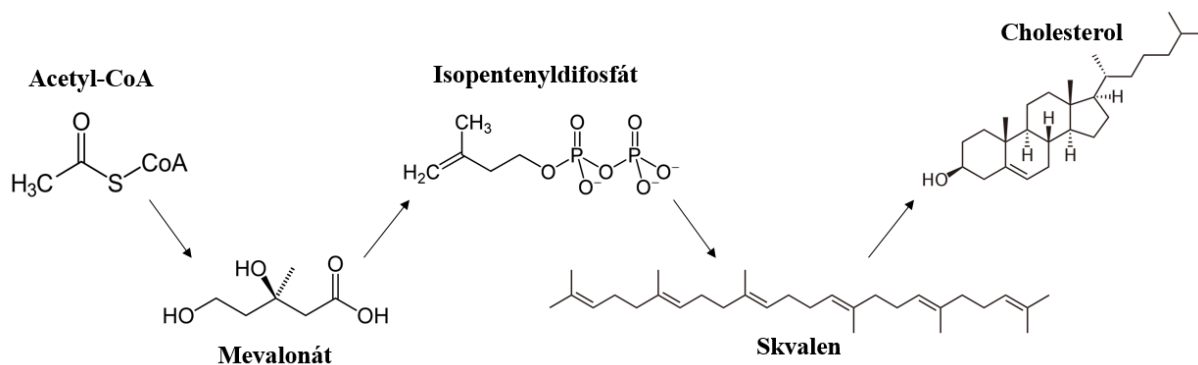
V České republice dokumentovaly výskyt ICHS se zaměřením na AKS registry CZECH 1, CZECH 2 a CZECH 3. Klady si za cíl získat epidemiologické informace a postupy léčby u všech pacientů s AKS z různých zdravotnických zařízení po celé ČR. Do registru byli zařazováni pacienti, kteří byli hospitalizováni pro podezření na AKS v definované období. Konkrétně se jednalo o diagnózy: infarkt myokardu, nestabilní angina pectoris, srdeční selhání a neurčené bolesti hrudi. Podle registru CZECH 1, který probíhal v roce 2005, byla incidence AKS 3248 pacientů / 1 milion obyvatel / 1 rok. Nejčastější diagnózou byl infarkt myokardu (40 %), dále nestabilní angina pectoris (29 %) a neurčené bolesti hrudi (24 %) (Widimsky *et al.*, 2007). Následoval registr CZECH 2, který analyzoval data z roku 2012 a uvádí incidenci AKS 2149 pacientů / 1 milion obyvatel / 1 rok. Na rozdíl od CZECH 1, nejvíce pacientů bylo hospitalizováno z důvodu neurčených bolestí hrudi. Zvýšil se také průměrný věk přijatých pacientů z 66 na 68 let (Toušek *et al.*, 2014). V roce 2015 byla v registru CZECH 3 odhadovaná incidence AKS 2250 pacientů / 1 milion obyvatel / 1 rok. Převažovali pacienti s diagnostikovaným infarktem myokardu a poté nestabilní anginou pectoris. Celkově se dá říci, že incidence AKS v průběhu let klesá, což lze připisovat lepší prevenci kardiovaskulárních onemocnění (Toušek *et al.*, 2017).

## 3.2 Biosyntéza cholesterolu a její regulace

Cholesterol je steroidní organická molekula, která je důležitou součástí buněčných membrán. Cholesterol je také prekurzorem žlučových kyselin, vitamínu D či steroidních hormonů, jako jsou androgeny, estrogeny, kortikosteroidy a další. Částečně je cholesterol přijímán z potravy, ale většina molekul cholesterolu je syntetizována v buňkách jater a střev.

Biosyntéza cholesterolu je náročný sled reakcí, které můžou být rozděleny do 4 fází:

1. Vznik mevalonátu ze 3 molekul acetylkoenzymu A (acetyl-CoA)
2. Přeměna mevalonátu na isopentenylidifosfát
3. Syntéza skvalenu
4. Cyklizace skvalenu a odštěpení 3 methylových skupin za vzniku cholesterolu (viz Obr. 1)



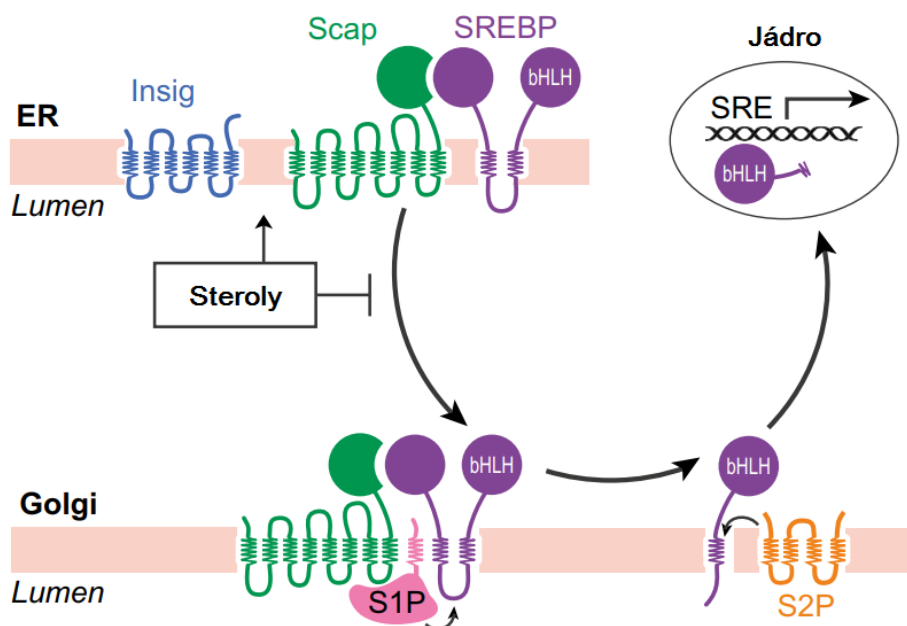
**Obrázek 1:** Meziprodukty biosyntézy cholesterolu

Pro regulaci biosyntézy cholesterolu je klíčová první fáze, kdy vzniká mevalonát z acetyl-CoA. Tato fáze se skládá ze 3 reakcí. Nejprve probíhá kondenzace dvou molekul acetyl-CoA za vzniku acetacetyl-CoA, která je katalyzována thiolázou. Acetacetyl-CoA pak reaguje s další molekulou acetyl-CoA a vzniká 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) za katalýzy HMG-CoA syntázy. Poslední reakcí první fáze je redukce HMG-CoA na mevalonát enzymem HMG-CoA reduktázou.

Důležitým enzymem pro regulaci biosyntézy je HMG-CoA reduktáza, který se účastní první fáze. HMG-CoA reduktáza je součástí endoplazmatického retikula a může být regulována na několika úrovních. Nejrychlejším způsobem regulace je inhibice nebo aktivace HMG-CoA reduktázy fosforylací, která je řízena hormonálně. V případě zvýšené hladiny glukagonu narůstá koncentrace intracelulárního cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), která aktivuje AMP-dependentní proteinkinázu. Její aktivace vede k fosforylaci HMG-CoA reduktázy, která je ve fosforylovaném stavu neaktivní a biosyntéza cholesterolu se zastavuje. Hormony inzulín a noradrenalin působí jako antagonisté a udržují nízkou hladinu cAMP v intracelulárním prostoru, čímž je zaručeno, že HMG-CoA reduktáza je v aktivním, defosforylovaném stavu (Edwards *et al.*, 1979).

Dalším ze způsobů, jak může být regulována biosyntéza cholesterolu, je zpětnovazebná inhibice, tzn. že rychlost biosyntézy je závislá na koncentraci sterolů v intracelulárním prostoru. Tato regulace může být na úrovni transkripce genu pro HMG-CoA reduktázu a dalších genů spojených s biosyntézou cholesterolu, nebo na úrovni degradace HMG-CoA reduktázy. V prvním případě hrají důležitou roli SREBPs (sterol regulatory element-binding proteins). SREBPs jsou membránově vázané transkripční faktory, které ovlivňují transkripci asi 30 genů, jejichž produkty se účastní biosyntézy cholesterolu. SREBPs se nacházejí v membráně endoplazmatického retikula (ER) a svou N-koncovou a C-koncovou doménou ční

do cytoplazmy. Společně se SREBPs se v membráně ER nachází SREBP cleavage activating protein (SCAP). SCAP funguje jako senzor, který reaguje na koncentraci cholesterolu v buňce. Když dojde ke snížení koncentrace sterolů v intracelulárním prostoru, SCAP vytvoří komplex společně se SREBP a komplex je transportován do Golgiho aparátu, kde jsou proteázami site-1 protease (S1P) a site-2 protease (S2P) odštěpeny obě koncové domény SREBP. Uvolněná N-koncová doména označovaná jako bHLH vstupuje do jádra, kde pozitivně ovlivňuje transkripci příslušných genů a začne probíhat biosyntéza cholesterolu. V případě vysoké koncentrace sterolů v buňce se SCAP váže na další membránový protein ER, který se nazývá INSIG. INSIG je trvale umístěn v ER membráně, tudíž pokud je k němu vázán SCAP, není možné, aby se komplex SCAP-SREBP mohl transportovat do Golgiho aparátu a tam proběhlo jeho štěpení viz Obr. 2 (Goldstein *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1997; Radhakrishnan *et al.*, 2010).



**Obrázek 2:** Regulace exprese genů pro biosyntézu cholesterolu proteiny SREBP

Legenda: Vysoká koncentrace sterolů vede k interakci proteinů SREBP-SCAP-INSIG a transkripce genů, účastnících se biosyntézy cholesterolu, neprobíhá. Vzhledem k nízké koncentraci sterolů směřuje komplex SCAP-SREBP do Golgiho aparátu, odtud je N-koncová doména bHLH transportována do jádra, kde pozitivně ovlivňuje transkripci těchto genů (převzato a upraveno podle Radhakrishnan *et al.*, 2010).

Druhým způsobem regulace zpětnovazebnou inhibicí je degradace HMG-CoA reductázy ubikvitin-proteazomovým systémem. Zvýšené koncentrace sterolů v buňce způsobují jejich akumulaci v membránách ER a iniciují vazbu HMG-CoA reductázy na již zmíněné proteiny INSIG. Tato vazba vede k aktivaci ubikvitin ligázy gp78, která ubikvitinuje HMG-CoA

reduktázu. Ubikvitinem označená HMG-CoA reduktáza směřuje do 26S proteazomu, kde je degradována (Jo *et* DeBose-Boyd, 2010).

### 3.3 Statiny

Statiny jsou kompetitivní inhibitory HMG-CoA reduktázy a používají se jako základní léky, které snižují hladinu cholesterolu v krvi a riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění. V roce 2017 bylo podle Státního ústavu pro kontrolu léčiv vydáno téměř 3 miliony balení atorvastatinu. Toto množství odpovídá 202,5 mil doporučených denních dávek, čímž se atorvastatin řadí na druhé místo vydaných léčivých látek a nejčastěji užívaných léčiv v ČR. V České republice je dostupných pět statinů – atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, rosuvastatin a simvastatin. Dále existují cerivastatin, pitavastatin a cerivastatin, ale ty nejsou součástí žádného přípravku používaného v ČR (<http://www.sukl.cz>).

Statiny jsou rozdělovány do několika skupin podle různých kritérií. Podle fyzikálně-chemických vlastností jsou statiny hydrofilní (fluvastatin a rosuvastatin) nebo hydrofobní (simvastatin, lovastatin a atorvastatin). Rozdílný je také jejich původ. Lovastatin a simvastatin jsou přírodního původu, získávají se z hub. Ostatní statiny se připravují synteticky. Některé statiny existují v již aktivní formě (atorvastatin, fluvastatin), zatímco lovastatin, rosuvastatin a simvastatin jsou podávány ve formě laktonu, který je v těle enzymy rozštěpen na aktivní produkty (Stancu *et* Sima, 2001).

Účinek statinů je založen na kompetitivní inhibici HMG-CoA reduktázy. Místem účinku všech statinů jsou hepatocyty, kde je soustředěna většina biosyntézy cholesterolu. Molekuly statinů se částečně podobají přirozenému substrátu HMG-CoA reduktázy – HMG-CoA. Statiny soutěží s HMG-CoA o aktivní místo enzymu. Po navázání statinu do aktivního místa HMG-CoA reduktázy dochází ke změně její konformace a enzym ztrácí svou funkci. Statiny se do aktivního místa nenavazují trvale, jejich vazba je reverzibilní. Afinity statinů k HMG-CoA reduktáze je vyšší než u přirozeného substrátu. U statinů je řádově nanomolární, zatímco u HMG-CoA je na úrovni mikromolů. Inhibice HMG-CoA reduktázy způsobí snížení koncentrace cholesterolu v hepatocytech, které je kompenzováno zvýšenou expresí genu pro receptory LDL (low density lipoprotein). LDL jsou skupinou lipoproteinů o nízké hustotě, které oproti ostatním obsahují vyšší podíl vázaného cholesterolu a cholesterolových esterů. LDL se vážou na nově exprimované LDL receptory hepatocytů a endocytózou jsou pohlceny – dochází ke snížení jejich koncentrace v krvi (Corsini *et al.*, 1999).

Statiny mají i další pleiotropní účinky a ovlivňují nejenom aktivitu HMG-CoA reductázy. Po podání statinů je pozitivně ovlivněno celé lipoproteinové spektrum – snížení koncentrace VLDL a apolipoproteinu B a naopak zvýšená koncentrace HDL (high density lipoprotein) v krvi, jehož vysoké koncentrace snižují rizika vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Kostner *et al.*, 1989). Statiny také zabraňují LDL v jeho oxidaci a udržují tak nízké riziko vzniku aterosklerózy; zvyšují koncentraci oxidu dusnatého produkovaného endotelovými buňkami, který způsobuje relaxaci cév; obnovují aktivitu krevních destiček a mají pozitivní vliv na koagulační procesy (Bellosta *et al.*, 2009; Stancu *et al.*, 2001).

### 3.3.1 Statinové myopatie

Mezi nejzávažnější vedlejší účinky užívání statinů patří svalová poškození různého rozsahu. Příznaky se objevují většinou po 1 měsíci užívání statinů a výskyt statinových myopatií se pohybuje u observačních studií v rozmezí od 15–20 % (Cohen *et al.*, 2012), u klinických studií je to do 5 % s tím, že u 1 % pacientů jde o ty nejzávažnější formy myopatií, jako je rabdomyolýza (Thompson *et al.*, 2003). Projevy statinových myopatií jsou nespecifické a různorodé, řadí se mezi ně slabost a ztuhlost svalů, svalové křeče a bolesti, ale také zvýšená hladina CK. CK je enzym, který katalyzuje přenos fosfátu z adenzinotriposfátu (ATP) na kreatin za vzniku kreatinfosfátu. Hodnota CK v krvi je mimo jiné markerem svalového poškození (Bruckert *et al.*, 2005; Laufs *et al.*, 2015).

Ze všech svalových poškození se nejčastěji vyskytuje tzv. myalgie (9–25 % ze všech svalových obtíží u pacientů užívajících statiny), která může být doprovázena jak zvýšenou, tak normální hladinou CK. Bolesti svalů u myalgie lze přirovnat k bolesti svalů u chřipky (Rosenson *et al.*, 2014). Méně častěji se objevuje myopatie nebo myozitida, jejichž symptomy jsou podobné jako v případě myalgie a hladina CK je zvýšená, ale nepřekračuje 10násobek normy. Myopatie mohou být zánětlivé nebo i nekrotizující. Velmi vzácně se vyskytuje rabdomyolýza, u níž je hladina CK vyšší než 10násobek normy. Rabdomyolýza způsobuje rozpad myocytů a může vést k vážným svalovým poškozením a akutnímu renálnímu selhání (Stroes *et al.*, 2015). Zvýšený výskyt rabdomyolýzy byl pozorován v souvislosti s užíváním cerivastatinu, u kterého byla z tohoto důvodu v roce 2001 v ČR ukončena distribuce (<http://www.sukl.cz>).

S užíváním statinů jsou také spojeny imunologicky podmíněné myopatie, které se objevují při dlouhodobém užívání statinů. Jejich příčinou je přítomnost specifických protilátek proti HMG-CoA reductáze. S výjimkou imunologicky podmíněných myopatií, téměř všechna svalová poškození způsobená statiny po jejich vysazení odeznívají (Werner *et al.*, 2012).

Buněčné a molekulární mechanismy vedoucí ke vzniku statinových myopatií jsou různé a předpokládá se, že se jedná o souhrn několika z nich. Statiny inhibují metabolickou cestu mevalonátu, který je prekurzorem pro řadu důležitých metabolitů, jejichž nedostatek souvisí se vznikem statinových myopatií. Statiny blokují syntézu farnesylpyrofosfátu, který společně s geranylpyrofosfátem zvyšuje proliferaci buněk, a naopak brání apoptóze. Jeho nedostatek také způsobuje sníženou produkci koenzymu Q10 a má za následek mitochondriální dysfunkce a oxidační stres. Další příčinou vzniku myopatií je snížená hladina vitamínu D, která vede k poklesu biosyntézy proteinů ve svalových vláknech. Statiny také narušují činnost iontových pump v myocytech, především  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázy a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ATPázy. Porucha hladin těchto iontů je pro myocyty toxická. (Chapman *et* Carrie, 2005; Marcoff *et* Thomson, 2007; Gluba-Brzozka *et al.*, 2016).

Ke vzniku statinových myopatií přispívá řada faktorů. Patří mezi ně výše předepsané dávky statinů, které se pohybují v rozmezí od 5 do 80 mg/den. Záleží také na předepsaném typu statinu, přičemž se předpokládá, že hydrofobní statiny zvyšují riziko vzniku myopatií více než hydrofilní. Dalšími predispozicemi jsou vysoký věk, ženské pohlaví, nízká hodnota BMI, nadměrná fyzická aktivita, přítomnost multisystémového onemocnění (diabetes mellitus), onemocnění jater a ledvin, současné užívání některých léků a genetické faktory (Bruckert *et al.*, 2005; Sewright *et al.*, 2007).

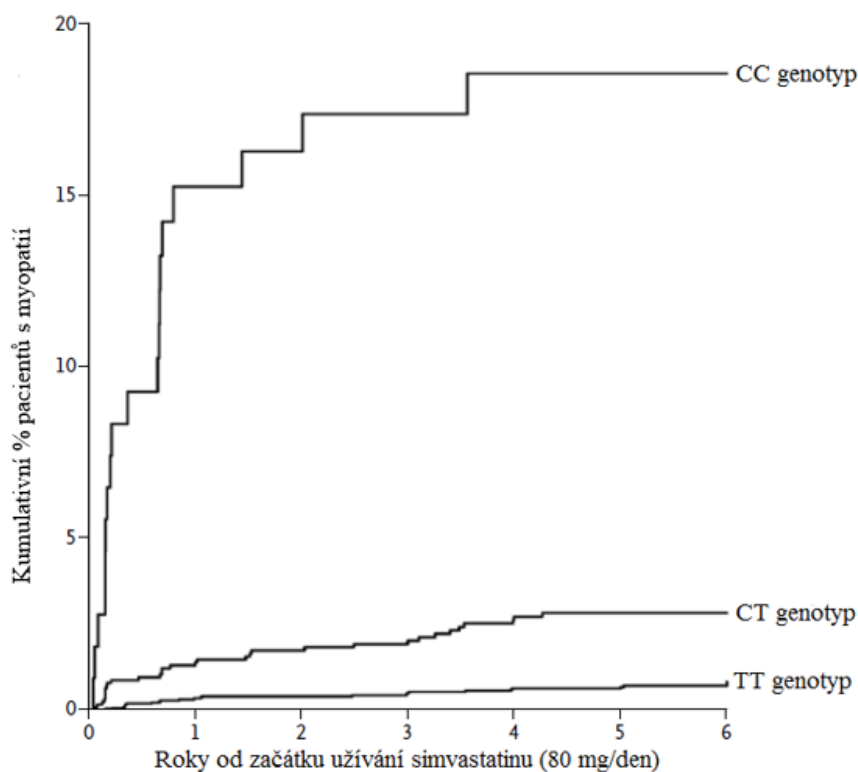
### 3.3.2 Genetické predispozice vzniku statinových myopatií

Vznik vedlejších účinků při užívání statinů je spojen s několika kandidátními geny. Produkty těchto genů jsou zodpovědné za koncentraci statinů v krvi, regulaci koncentrace statinů v myocytech, vaskularizaci a další.

Nejvýrazněji je se vznikem statinových myopatií asociován gen *SLCO1B1* (solute carrier organic anion transporter family member 1B1), který kóduje organické anionické transportní polypeptidy OATP1B1 (organic anion transporting polypeptide family member 1B1). OATP1B1 jsou transportéry exprimované v játrech a hrají klíčovou roli v rozpoznání a absorpci léčiv. Snížená aktivita transportéru vede ke zvýšeným hladinám koncentrací statinů v plazmě a vyššímu riziku vzniku myopatií. Gen *SLCO1B1* je lokalizován na krátkém raménku chromozómu 12 a jeho součástí je 14 exonů. Podle Niemi *et al.* (2011) bylo popsáno 41 nesynonymních mutací genu *SLCO1B1*, z nichž 14 významně snižuje aktivitu transportéru OATP1B1. The SEARCH Collaboratory Group (2008) identifikovala často se vyskytující jednonukleotidový polymorfismus (SNP) v exonu 5 – rs4149056 (T>C).



V populaci se u rs4149056 majoritně vyskytuje alela T, výskyt méně frekventované alely C je 15 %. Alela C vede k aminokyselinové záměně valinu na alanin v aktivním místě transportéru a snižuje jeho absorpční a transportní aktivitu. U homozygotů CC je pravděpodobnost vzniku myopatie 17x vyšší ve srovnání s homozygoty TT. V případě heterozygotů CT byla pravděpodobnost vyšší 4,5x než u homozygotů TT viz Obr. 3.



**Obrázek 3:** Porovnání vzniku myopatie u pacientů s rozdílným genotypem *SLCO1B1* (rs4149056) (převzato a upraveno podle The SEARCH Collaboratory Group, 2008)

Dalšími genovými polymorfismy, které mají souvislost se vznikem statinových myopatií, jsou SNPs genu *LILRB5*, který se nachází na dlouhém raménku chromozómu 19. *LILRB5* kóduje receptor leukocyte immunoglobulin-like subfamily B member 5, patřící do skupiny receptorů, exprimovaných v buňkách myeloidní řady, které jsou progenitory leukocytů a dalších buněk imunitního systému. Tyto buňky se aktivně účastní protizánětlivých reakcí. Nejvíce asociovaný polymorfismus genu *LILRB5* se statinovými myopatiemi je rs12975366. Nesynonymní SNP rs12975366 (T>C) ovlivňuje hladinu CK a laktátdehydrogenázy (markery svalového poškození) v krvi pacientů. U homozygotů TT byly zaznamenány 2x vyšší hladiny CK a laktátdehydrogenázy než u heterozygotů CT nebo homozygotů CC (Siddiqui *et al.*, 2017).

Glycin amidinotransferáza (GATM) je enzym klíčový pro biosyntézu kreatinu ve svalcích, který je důležitým zdrojem energie pro myocyty. Mangravite *et al.* (2013) popsali SNP rs9806699

(G>A), který koreluje s poklesem exprese GATM. Minoritně se vyskytující alela A má protektivní účinky před statinovými myopatiemi a podle studie je její výskyt v populaci 30 %.

Mezi další kandidátní geny patří *ABCB1* kódující transportér, jehož funkcí je eliminace xenobiotik z tkání. Přítomnost alely T vede k většímu snížení celkového a LDL cholesterolu v krvi v porovnání s homozygoty GG u SNP polymorfismu rs11285030. Metabolismus statinů také závisí na aktivitě cytochromů P450. Polymorfismy genů *CYP3A4*, *CYP3A5* a *CYP2D6* ovlivňují rychlost metabolismu statinů a tím také jejich koncentraci v krvi (Fiegenbaum *et al.*, 2005).

### 3.4 Jednonukleotidový polymorfismus (SNP)

Pojmem jednonukleotidový polymorfismus (SNP, z anglického single-nucleotide polymorphism) se rozumí přítomnost více variant jediného nukleotidu na konkrétním místě v genomu, přičemž nejméně častá varianta se v populaci musí vyskytovat s frekvencí více než 1 %.

SNPs patří mezi nejčastější polymorfismy v lidském genomu; jeden SNP připadá zhruba na 300 nukleotidů. Distribuce SNPs v rámci genomu není rovnoměrná – mnohem častěji se SNP nacházejí v nekódujících a intergenových oblastech. Pokud se SNPs nacházejí v kódující nebo regulační oblasti, mohou být nesynonymní nebo synonymní. Prvním typem jsou nesynonymní SNP. V tomto případě je při genové expresi zařazena jiná aminokyselina nebo je syntéza proteinu předčasně ukončena a může vznikat nefunkční nebo jinak pozměněný produkt daného genu. Synonymní SNP nezpůsobují záměnu aminokyseliny v kódované doméně nebo proteinu. I přesto, že je zachována primární struktura proteinu, synonymní SNPs mohou ovlivnit sestřih a strukturu mRNA nebo skládání proteinů. Tyto změny mohou výrazně ovlivnit funkci proteinů, buněčnou odpověď a jsou také důvodem, proč řada pacientů reaguje různě na konkrétní léčbu (Ramensky *et al.*, 2002; Kwok *et al.*, 2003; Sauna *et al.*, 2007).

Studiem přítomnosti konkrétní varianty nukleotidu (alely) může být prokázáno riziko vzniku onemocnění, citlivost k léčivům nebo patogenům apod. Spojitostí SNP alely s určitou nemocí se zabývají asociační studie, které vycházejí ze souboru pacientů, trpících daným onemocněním. U těchto pacientů se zkoumá, jestli se u nich určitá alela vyskytuje častěji než u zdravých jedinců. Na vzniku řady nemocí se podílí více genů a asociační studie se zaměřují na kombinaci SNP alel ve více lokusech, které jsou v těsné vazbě a dědí se společně v tzv.

haplotypu. Asociační mapování je zatíženo statistickou chybou, zvláště u vzácných onemocnění, kde je počet pacientů omezen (Bell, 2002; Kwok *et al.*, 2003).

### 3.4.1 Objevování SNP

Metody objevování jednonukleotidových polymorfismů jsou založeny na charakteristických vlastnostech heteroduplexů, prostorové konformaci DNA nebo sekvenování DNA.

Heteroduplex je složen ze dvou vláken DNA, přičemž každé z vláken nese jinou SNP alelu a pochází původně ze dvou různých molekul. Prvním krokem u analýzy heteroduplexů bývá namnožení konkrétního úseku DNA, kde se předpokládá výskyt SNP, pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Pokud je v populaci přítomný jednonukleotidový polymorfismus, po denaturaci a renaturaci amplifikovaných úseků vznikají heteroduplexy, které jsou nekomplementární v místě výskytu SNP. V případě, že místo není polymorfní, vznikají homoduplexy. Homoduplexy a heteroduplexy mají odlišné vlastnosti a na jejich základě je potvrzena nebo vyvrácena přítomnost SNP. Příkladem metody založené na analýze heteroduplexů je denaturující gradientová gelová elektroforéza, kdy je v gelu vytvořen denaturační gradient. Heteroduplexy denaturují rychleji než homoduplexy – pohyb vznikajících denaturovaných vláken heteroduplexů se zpomalí a zastaví se blíže startu elektroforézy. Na podobném principu je založena také denaturující vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Heteroduplexy a homoduplexy se pohybují v koloně různou rychlostí a jejich retenční čas je odlišný (Wolford *et al.*, 2000).

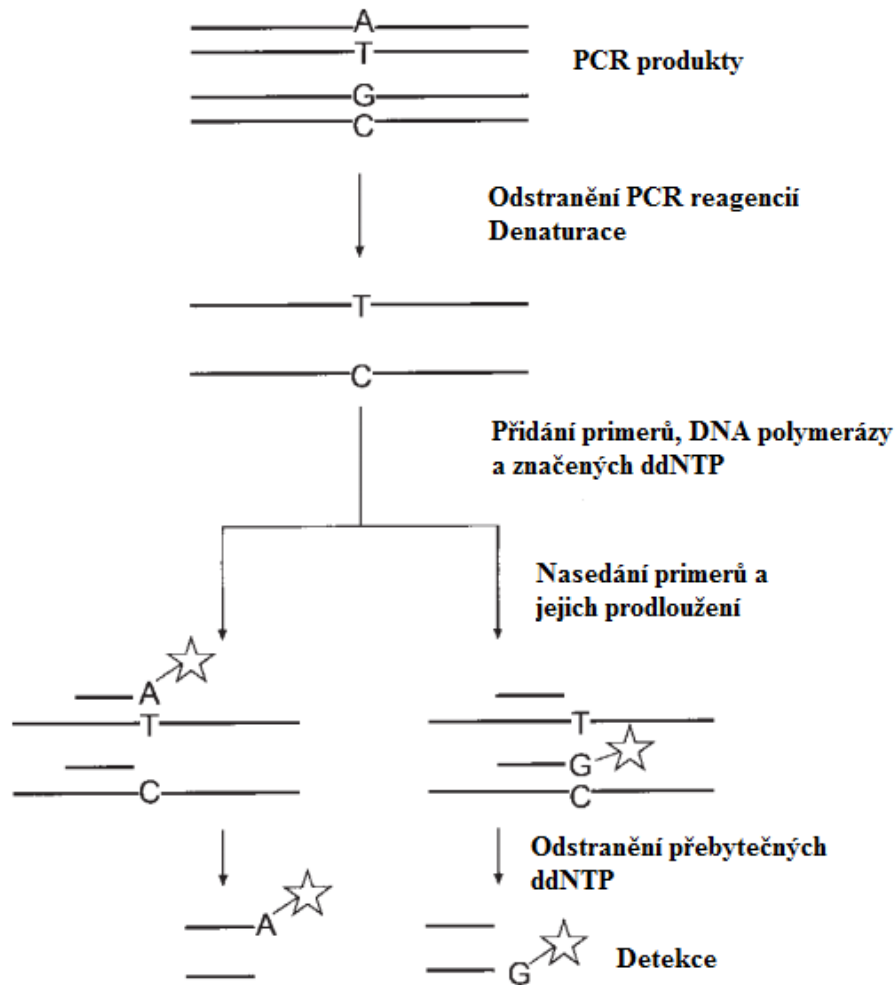
Další technikou objevování SNP je SSCP (single-strand conformation polymorphism) analýza. Prostorová konformace DNA vlákna v nedenaturujícím prostředí závisí na jeho složení. Nejprve je pomocí PCR amplifikován studovaný úsek a poté provedena denaturace. Jednovláknová DNA je separována gelovou elektroforézou. Pokud jsou separována vlákna, která nesou různé SNP, jejich pohyb v elektrickém poli se bude lišit (Orita *et al.*, 1989; Kwok *et al.*, 2003). SSCP analýzu je také možné provést s použitím fluorescenčního značení a kapilární elektroforézy. Každé vlákno po PCR amplifikaci nese jinou fluorescenční značku a je možné je analyzovat zároveň. Výhodou kapilární elektroforézy je navíc velmi rychlá separace, automatické nanášení vzorků a také vysoká reprodukovatelnost (Inazuka *et al.*, 1997). S rozvojem technologií sekvenování nové generace je možné SNP lokus identifikovat přímo na základě sekvence porovnáním genomových sekvencí více jedinců.

### 3.4.2 Genotypizace SNP

Cílem genotypizace SNP je určení konkrétní alely SNP lokusu. Téměř všechny metody SNP genotypizace jsou založeny na těchto základních molekulárních procesech: polymerace, hybridizace a ligace (Kwok *et* Chen, 2003).

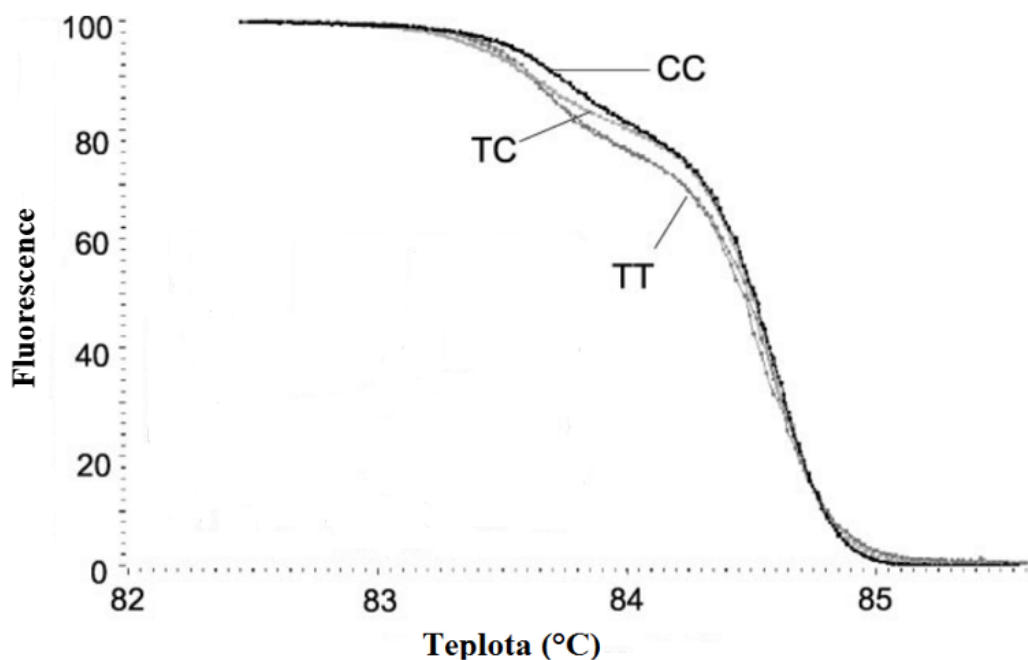
Metody založené na PCR amplifikaci patří mezi nejpoužívanější. Zde se řadí například PCR spojená s polymorfismem délky restrikčních fragmentů (RFLP). Po namnožení studovaného úseku jsou produkty štěpeny restrikční endonukleázou, což je enzym, který štěpí DNA v specifických, tzv. restrikčních místech. Pokud má restrikční místo odlišnou sekvenci, je v populaci přítomno více variant jednonukleotidových polymorfismů a restrikční endonukleáza dvouvláknovou DNA nerozštěpí. Produkty štěpení jsou separovány pomocí gelové elektroforézy a SNP genotyp je určen podle délky a počtu produktů (Myakishev, 2001). Další technikou je PCR amplifikace s alelově specifickými primery (AS-PCR). Součástí této metody je použití specifických primerů navržených tak, aby byly stoprocentně komplementární k dané SNP alele. V případě, že je primer komplementární k templátu, vzniká detekovatelné množství produktů. Ty jsou separovány opět pomocí gelové elektroforézy a je odečten výsledek (Darawi *et al.*, 2013). Dalším způsobem genotypizace SNPs, založené na polymeraci, je metoda SBE (single base extension, prodloužení jedné báze). U SBE se používají specifické detekční primery navržené k SNP lokusu. Na rozdíl od AS-PCR je primer u SBE navržen tak, že se váže svým 3' koncem přesně jednu pozici před jednonukleotidový polymorfismus. Součástí reakce jsou značené dideoxyribonukleotidy (ddNTPs) a DNA polymeráza. Podstatou SBE je tedy prodloužení detekčního primeru o jediný ddNTP, který ukončí reakci a polymerace dál neprobíhá. Poté jsou detekovány SBE produkty a je určen SNP genotyp (viz Obr. 4).

Existuje několik variant provedení SBE i detekce SBE produktů. Reakce může probíhat v roztoku nebo na čipu. Na rozdíl od reakce v roztoku, jsou na čipu kovalentně imobilizovány detekční primery svým 5' koncem a čip je reagenciemi promýván. Různé bývá také značení ddNTPs. Dříve se ddNTPs značily radioaktivně, v dnešní době převládá značení fluorescenční. Výhodou SBE je tzv. multiplexing – genotypizace několika různých SNPs najednou (Syvanen, 1999; DiGiusto *et* King, 2003).



**Obrázek 4:** Jednotlivé kroky SBE genotypizace SNP (převzato a upraveno podle Syvanen, 1999).

Dalším typem metody genotypizace SNP je analýza křivek tání, tzv. HRM analýza (z anglického high resolution melting). Nejprve je studovaný úsek namnožen pomocí PCR v přítomnosti interkalačního barviva, kterým je nejčastěji SYBR Green I. Pokud jsou molekuly barviva navázány na dvouvláknovou DNA, fluoreskují. Po namnožení následuje postupné zahřívání až na teplotu 95 °C, během kterého PCR produkty denaturují a dochází k úbytku fluorescence. Výsledkem HRM analýzy jsou křivky teploty tání PCR produktů, jejichž tvary jsou podobné, ale liší se v přítomnosti SNP teplotou tání (viz Obr. 5). Teplota tání se definuje jako teplota, při které se nachází polovina PCR produktů v denaturovaném stavu, a odvíjí se od obsahu a pořadí bází (Wittwer *et al.*, 2003).



**Obrázek 5:** HRM analýza – křivky teplot tání PCR produktů u odlišných genotypů (převzato a upraveno podle Wittwer *et al.*, 2003)

Mezi další metody genotypizace SNP patří například 5' exonukleázový test, což je metoda využívající alelově specifické sondy (molecular beacon). Podobně jako u objevování SNP, i detekce polymorfismů je provedena pomocí sekvenování, tzv. genotyping by sequencing (Kwok *et al.*, 2003).

### 3.4.3 Genotypovací technologie MassArray

Pro genotypizaci velkého souboru SNPs byly vyvinuty vysokokapacitní genotypovací metody. Jednou z nich je technologie MassArray, která kombinuje PCR a hmotnostní spektrometrii. Díky kombinaci těchto dvou metod se jedná o rychlou a přesnou technologii, jak analyzovat genotyp. S využitím technologie MassArray je možné provádět genotypizaci v 96jamkovém nebo 384jamkovém formátu až u 40 různých SNP najednou, tudíž je možné za poměrně krátký čas získat informaci o alelické konstituci u více než 10 000 SNP lokusů. Technologie MassArray se využívá hlavně ve farmakogenomice a onkologii, avšak její uplatnění není pouze pro genotypizaci, ale také pro objevování SNPs, studium genové exprese, zachycení somatických mutací, detekci patogenů nebo analýzu metylace v promotorových oblastech genů (Gabriel *et al.*, 2009).

Prvním krokem genotypizace technologií MassArray je amplifikace studovaných úseků pomocí PCR. Na všechny lokusy jsou navrženy primery tak, aby výsledné amplikony měly velikost od 60 do 400 bp, ideálně 100 bp. Pro následující kroky je důležité, aby při této reakci vznikalo

co nejméně nespecifických produktů, které by negativně ovlivnily celkový výsledek genotypizace. Následuje enzymatické ošetření amplikonů alkalickou fosfatázou (SAP – shrimp alkaline phosphatase), kdy SAP defosforyluje nezačleněné dNTPs tím, že odštěpuje fosfátovou skupinu z jejich 5' konce, jelikož jsou v následující iPLEX reakci nežádoucí.

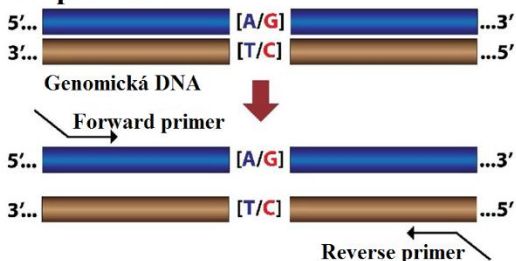
Dále probíhá iPLEX reakce, jejíž výsledkem jsou alelově specifické produkty. Ošetřené amplikony jsou smíchány s extenčními primery, které jsou navrženy na studovaný lokus a musí mít jinou molekulovou hmotnost než primery použité v první amplifikační PCR, aby nedošlo k jejich záměně v hmotnostním spektru. Řešením může být použití primerů, které jsou cíleně prodlouženy na 5' konci o 10 nukleotidů. Délka extenčních primerů se pohybuje v rozmezí od 15 do 30 nukleotidů a jejich molekulová hmotnost mezi 4,5 až 9 kDa. Extenční primery jsou navrhovány podobně jako u SBE genotypizace, tzn. tak, aby byly svým 3' koncem vázány jednu bázi před SNP místem. Součástí iPLEX reakční směsi jsou dále hmotnostně modifikované ddNTPs. Každý ze čtyř ddNTPs nese jinou hmotnostní značku. V průběhu reakce jsou extenční primery prodlouženy o jeden z ddNTP, který je komplementární k SNP, a prodloužení primerů dál neprobíhá – výsledné iPLEX produkty jsou zakončeny odlišně značeným ddNTP, který je možné rozlišit v hmotnostním spektru a je možné provést genotypizaci.

iPLEX produkty musí být před analýzou hmotnostním spektrometrem odsoleny. K tomuto účelu se používá tzv. clean resin, který odstraňuje  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ionty, pocházející z pufrů, které jsou součástí PCR reakčních směsí. V případě, že by soli nebyly odstraněny, v hmotnostním spektru by se vyskytoval vysoký šum na pozadí – jedná se o významný stabilizační krok.

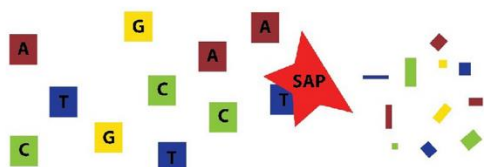
Součástí genotypizace technologií MassArray je analýza iPLEX produktů pomocí hmotnostní spektrometrie. Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, jejíž podstatou je převedení molekul na ionty a poté měření poměru hmotnosti a náboje těchto iontů v závislosti na jejich pohybu v elektrickém nebo magnetickém poli. Výstupem každého měření je hmotnostní spektrum, které je grafem závislosti relativní intenzity detekovaných iontů na poměru hmotnosti a náboje iontů ( $m/z$ ). Existuje několik typů hmotnostních spektrometrů, kdy se v případě technologie MassArray používá tzv. MALDI-TOF. Jde o spektrometr, který kombinuje ionizaci vzorku laserem v přítomnosti matrice MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) a analýzu iontů průletovým analyzátozem TOF (time of flight).

Měření na hmotnostním spektrometru zahrnuje několik kroků. Prvním z nich je přenos vzorku a jeho ionizace. U technologie MassArray jsou vzorky, iPLEX produkty, přeneseny z mikrotitrační destičky na SpectroCHIP. Jedná se o silikonový čip, na jehož povrchu se nachází kyselina 3-hydroxypikolinová, která funguje jako matrice pro ionizaci. Matricí bývá obvykle aromatičká karboxylová kyselina, která po zasažení laserem předává nebo přijímá proton od vzorku a tím zajišťuje jeho ionizaci a přechod do plynného stavu. Po ionizaci a odpaření se molekuly vzorku pomocí elektrostatických sil dostávají do TOF analyzátoru. Na konci analyzátoru se nachází detektor, který zachycuje jednotlivé molekuly v různém čase právě na základě hodnoty m/z. Součástí technologie MassArray je software, který automaticky zpracovává získané hmotnosti iPLEX produktů a vyhodnocuje genotyp (Ding *et al.*, 2003; Jurinke *et al.*, 2005; Ragoussis *et al.*, 2006; Svidnicki *et al.*, 2015). Jednotlivé kroky genotypizace technologií MassArray jsou schematicky zobrazeny na Obr. 6.

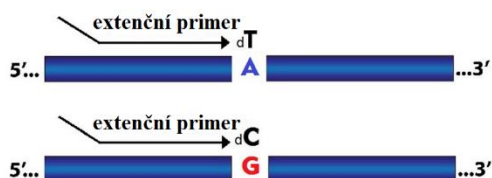
### Amplifikace



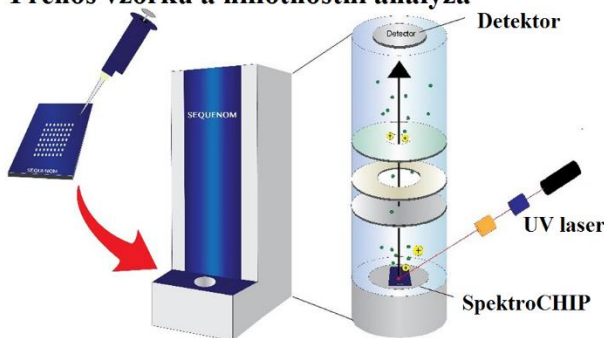
### SAP reakce



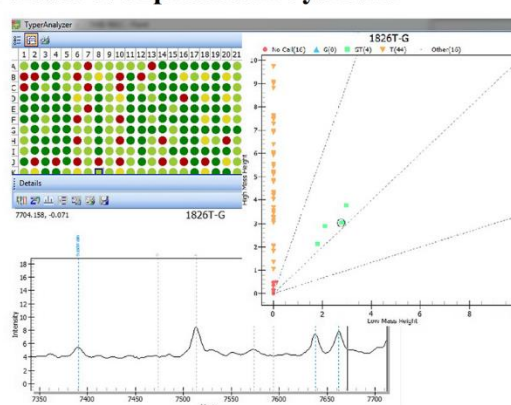
### iPLEX reakce



### Přenos vzorku a hmotnostní analýza



### Softwarové zpracování výsledků



**Obrázek 6:** Jednotlivé kroky genotypizace technologií MassArray (převzato a upraveno podle Svidnicki *et al.*, 2015)



## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

V experimentální části byla jako biologický materiál použita periferní krev 116 pacientů, která byla odebrána do zkumavek s protisrážlivým činidlem EDTA. Charakteristika souboru pacientů je uvedena v Tabulce 2. U pacientů byla diagnostikována ischemická choroba srdeční; konkrétní diagnózy jsou vypsány v Tabulce 3. Součástí experimentu byla pozitivní kontrola – referenční DNA NA17252 Human Variation Panel – Caucasian Panel of 100 (Coriell Institut).

**Tabulka 2:** Charakteristika souboru pacientů, jejichž krev byla použita v experimentální části

<b>Počet mužů</b>	78
<b>Počet žen</b>	38
<b>Průměrný věk</b>	62,2
<b>Průměrný věk muži</b>	60,9
<b>Průměrný věk ženy</b>	64,8
<b>Věkové rozmezí muži</b>	31–85
<b>Věkové rozmezí ženy</b>	43–87

**Tabulka 3:** Stanovené diagnózy souboru pacientů

<b>Diagnóza</b>		<b>Počet pacientů</b>
I20.0	Nestabilní angina pectoris	6
I21.0	Akutní transmurální infarkt myokardu přední stěny	1
I21.4	Akutní subendokardiální infarkt myokardu	12
I21.9	Akutní infarkt myokardu	69
I25.9	Chronická ischemická choroba srdeční	28

### 4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

#### Použité chemikálie

- 96% etanol (Fagron, 605455)
- Dihydrát chloridu vápenatého ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, C3306)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, L3771)
- Hexahydrát chloridu hořečnatého ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, M2670)
- Hydroxid sodný (NaOH) (Sigma-Aldrich, 71687)
- Chlorid sodný (NaCl) (Sigma-Aldrich, S9625)

- Kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich, 798681)
- Kyselina octová (CH<sub>3</sub>COOH) (Sigma-Aldrich, T1258)
- Primery (Integrated DNA Technologies)
- Sacharóza (Sigma-Aldrich, 84097)
- TritonX100 (Roth, 3051.2)
- Trizma hydrochloride (Sigma-Aldrich, T5941)
- Trizma base (Sigma-Aldrich, T6066)

### **Použité soupravy**

- Blood DNA 500 Extraction Kit (DiaSorin, 121702-180326)
- iPLEX Gold Reagent Kit (Agena Bioscience, Inc.; 0000024303)
  - Calibrant
  - Clean resin
  - dNTP mix
  - iPLEX buffer
  - iPLEX enzyme
  - iPLEX termination mix
  - MgCl<sub>2</sub>
  - PCR buffer (10x)
  - SAP enzyme
  - TS buffer (10x)
  - PCR enzyme
- SpectroCHIP kit (Agena Bioscience, Inc.; 0000027136)

### **Použité roztoky a jejich příprava**

- 1mol.l<sup>-1</sup> Tris (pH 7,5)
  - 31,75 g Trizma hydrochloride
  - 5,9 g Trizma base
  - Rozpustit v 250 ml destilované vody.
- 1mol.l<sup>-1</sup> Tris (pH 8)
  - 0,444 g Trizma hydrochloride
  - 0,265 g Trizma base
  - Rozpustit v 5 ml destilované vody.

- 0,5mol.l<sup>-1</sup> EDTA (pH 8)
  - 18,62 g EDTA rozpustit v 50 ml destilované vody.
  - Pomocí NaOH a CH<sub>3</sub>COOH upravit na pH 8.
  - Doplnit destilovanou vodou do 100 ml.
- 0,5mol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>
  - 20,32 g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O
  - Rozpustit v 200 ml destilované vody.
- 0,1mol.l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>
  - 0,147 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O
  - Rozpustit v 10 ml destilované vody.
- 25% SDS
  - 5 g SDS
  - Rozpustit v 15 ml destilované vody.
- 50% etanol
  - 230 ml destilované vody
  - 250 ml 96% etanolu.
- 70% Etanol
  - 135 ml destilované vody
  - 365 ml 96% etanolu.
- LB pufr:
  - 102,7 g 0,3mol.l<sup>-1</sup> sacharózy
  - 10 ml 1mol.l<sup>-1</sup> Tris (pH 7,5)
  - 10 ml 0,5mol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>
  - 10 ml TritonuX100
  - Rozpustit v 500 ml deionizované vody. Po rozpuštění doplnit do 1000 ml.
- Rostok R:
  - 10 ml 1mol.l<sup>-1</sup> Tris (pH 7,5)
  - Rozpustit v 990 ml deionizované vody.
- Rostok P:
  - 32,5 ml deionizované vody
  - 0,5 ml 1mol.l<sup>-1</sup> Tris (pH 7,5)
  - 4 ml 0,5mol.l<sup>-1</sup> EDTA
  - 2 ml 0,1mol.l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>

- 3 ml  $5\text{mol.l}^{-1}$  NaCl
- 8 ml 25% SDS
- V tomto pořadí smíchat tak, aby roztok nepěnil.
- Proteináza K:
  - 100 mg proteinázy K
  - 5 ml skladovacího roztoku pro proteinázu K.
- Skladovací roztok pro proteinázu K:
  - 100  $\mu\text{l}$   $1\text{mol.l}^{-1}$  Tris (pH 7,5)
  - 50  $\mu\text{l}$   $1\text{mmol.l}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$
  - 2,5 ml 99% glycerolu
  - Doplnit do 5 ml deionizovanou vodou.
- $5\text{mol.l}^{-1}$  NaCl:
  - 58,44 g NaCl
  - Rozpustit v 200 ml deionizované vody.
- TE pufr:
  - 2 ml  $1\text{mol.l}^{-1}$  Tris (pH 8)
  - 0,4 ml  $0,5\text{mol.l}^{-1}$  EDTA
  - Rozpustit v 200 ml deionizované vody.

### 4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Arrow (NorDiag)
- Centrifuga Z206A (Hermle)
- Centrifuga Z233 M-2 (Hermle)
- Centrifuga Z300 (Hermle)
- Inkubátor IPS (Mettler)
- Laminární box Herasafe (Thermo Fisher Scientific)
- MALDI-TOF analyzátor MassArray Analyzer (Agena Bioscience, Inc.)
- MassArray Nanodispenser (Agena Bioscience, Inc.)
- Nanodrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific)
- Rotátor Labroller (Labnet)
- Termocyklér Mastercycler pro (Eppendorf)
- Vortex mixer (Labnet)

## **4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy**

### **4.4.1 Izolace DNA**

DNA z periferní krve byla izolována dvěma metodami. První z nich využívá k izolaci DNA přístroj NorDiag Arrow a během druhé je DNA získána vysolovací metodou.

#### **Izolace DNA s využitím přístroje NorDiag Arrow**

Izolace DNA z periferní krve byla provedena pomocí přístroje NorDiag Arrow s využitím Blood DNA 500 Extraction Kit.

Periferní krev ve zkumavce byla převrácením důkladně promíchána. Poté bylo pipetou odebráno 500  $\mu$ l krve do 1,5ml mikrozkuhavky bez víčka. Do přístroje byly umístěny špičky s pumpičkou, patrony s reagensii a prázdná 1,5ml mikrozkuhavka bez víčka, určena pro eluci. Získaná DNA byla rozpuštěna ve 400  $\mu$ l elučního pufru.

#### **Izolace DNA vysolovací metodou**

Po důkladném promíchání periferní krve převrácením byly napipetovány 3 ml krve do 50ml zkumavky a doplněny do 45 ml vychlazeným LB pufrem. Poté byla zkumavka protřepána a centrifugována 5 min při 4 000 rpm (1 700 g). Supernatant byl odstraněn a k sedimentu bylo přidáno 5 ml roztoku R. Následovalo narušení sedimentu třepáním a centrifugace 5 min při 4 000 rpm (1 700 g). Supernatant byl odstraněn a k sedimentu bylo přidáno 950  $\mu$ l roztoku R. Sediment byl narušen třepáním a dále bylo přidáno 350  $\mu$ l roztoku P a 40  $\mu$ l roztoku proteinázy K. Roztok byl promíchán a inkubován přes noc při 37 °C.

Další den bylo k vychladlým vzorkům přidáno 400  $\mu$ l roztoku 5mol.l<sup>-1</sup> NaCl. Roztok byl 15 s důkladně protřepán a centrifugován 15 min při 4 000 rpm (1 700 g). Supernatant byl přelit do 2ml zkumavky a centrifugován při 14 000 rpm (18 220 g). Supernatant byl přelit do 15ml zkumavky s 3,5 ml 96% etanolu. Převrácením zkumavky byla vysrážena DNA. Vysrážená DNA byla přesunuta do 1,5ml zkumavky s 300  $\mu$ l 70% etanolu a promyta. Promytí bylo provedeno ještě jednou v nové 1,5ml zkumavce s 300  $\mu$ l 70% etanolu a vysrážená DNA byla nakonec přenesena kultivační kličkou do šroubovací zkumavky s 350  $\mu$ l TE pufru. Rozpuštění DNA probíhalo 14 dní v lednici.

### **4.4.2 Měření koncentrace a čistoty DNA**

V obou případech izolace byla spektrofotometricky změřena koncentrace a čistota DNA pomocí přístroje Nanodrop. Na měření byly použity 3  $\mu$ l roztoku DNA. Jako reference sloužil

eluční pufr, ve kterém byla DNA rozpuštěna. Čistota DNA byla určena na základě poměru hodnot absorbancí při vlnových délkách 260 nm a 280 nm, který by měl být ideálně v rozmezí 1,7–1,9.

#### 4.4.3 PCR amplifikace

Před PCR amplifikací bylo nutné naředit vzorky DNA PCR vodou na finální koncentraci  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Pro PCR amplifikaci byly použity specifické primery pro konkrétní SNPs (rs4149056, rs9806699 a rs12975366). Naředěním lyofilizovaných primerů PCR vodou byly vytvořeny zásobní roztoky o koncentraci  $100 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Ze zásobních roztoků byl smícháním připraven primer mix, který měl pracovní koncentraci  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Dále byla podle počtu vzorku připravena PCR reakční směs podle Tabulky 4. Do 96jamkové destičky byl napipetován  $1 \mu\text{l}$  naředěné DNA a poté  $4 \mu\text{l}$  PCR reakční směsi. V rámci experimentu byla vždy použita negativní kontrola – PCR voda a pozitivní kontrola – referenční DNA NA17252 Human Variation Panel. Příprava PCR reakční směsi a pipetování probíhalo v laminárním boxu. Po napipetování byla 96jamková destička zalepena průhlednou PCR fólií a centrifugována 1 min při 2 750 rpm (1 033 g). Poté byla 96jamková destička vložena do termocykléru, kde probíhala PCR amplifikace za podmínek uvedených v Tabulce 5. Po PCR amplifikaci byla 96jamková destička centrifugována 1 min při 2 750 rpm (1 033 g)

**Tabulka 4:** Složení PCR reakční směsi pro 1 vzorek

Položka	Koncentrace	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
PCR voda		2,4
PCR buffer	10x	0,5
MgCl <sub>2</sub>	$25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	0,4
dNTP mix	$25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	0,1
Primer mix	$1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	0,5
PCR enzym	$5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	0,1
DNA	$10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	1,0
Celkový objem		5,0

**Tabulka 5:** Podmínky PCR amplifikace

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
95	2 min	1
95	30 s	45
56	30 s	
72	1 min	
72	5 min	1
4	∞	

#### 4.4.4 SAP reakce

Podle Tabulky 6 byla připravena SAP reakční směs. Do každé jamky byly k PCR produktům přidány 2  $\mu$ l SAP reakční směsi. Poté byla 96jamková destička zalepena průhlednou PCR fólií a centrifugována 1 min při 2 750 rpm (1 033 g). 96jamková destička byla vložena do termocykléru a SAP reakce probíhala za podmínek uvedených v Tabulce 7. Po SAP reakci byla 96jamková destička centrifugována 1 min při 2 750 rpm (1 033 g).

**Tabulka 6:** Složení SAP reakční směsi pro 1 vzorek

Položka	Koncentrace	Objem [ $\mu$ l]
PCR voda		1,53
TS buffer	10x	0,17
SAP enzyme		0,30
Celkový objem		2,00

**Tabulka 7:** Podmínky SAP reakce

Teplota [°C]	Čas
37	40 min
85	5 min
4	∞

#### 4.4.5 iPLEX reakce

Lyofilizované primery pro iPLEX reakci byly naředěny PCR vodou na zásobní koncentraci 400 pmol. $\mu$ l<sup>-1</sup>. Ze zásobních roztoků byl smícháním připraven primer mix. Podle Tabulky 8 byla připravena iPLEX reakční směs pro daný počet vzorků. Do každé jamky byly přidány 2  $\mu$ l iPLEX reakční směsi. 96jamková destička byla zalepena průhlednou fólií a centrifugována 1 min při 2 750 rpm (1 033 g). Potom byla 96jamková destička vložena do termocykléru

a iPLEX reakce probíhala za podmínek uvedených v Tabulce 9. Po iPLEX reakci byla 96jamková destička centrifugována 1 min při 2 750 rpm (1 033 g).

**Tabulka 8:** Složení iPLEX reakční směsi pro 1 vzorek

Položka	Koncentrace	Objem [ $\mu$ l]
PCR voda		0,739
iPLEX buffer	10x	0,200
iPLEX termination mix		0,100
Primer mix		0,940
iPLEX enzyme		0,021
Celkový objem		2,000

**Tabulka 9:** Podmínky iPLEX reakce

Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů	
94	30 s	1	40
94	5 s	5	
52	5 s		
80	5 s		
72	3 min	1	
4	$\infty$		

#### 4.4.6 Odsolení iPLEX produktů pomocí clean resin

Do 96jamkové destičky určené pro clean resin byl podle pozice vzorků nanesen clean resin. Po dobu 20 minut clean resin schnul při pokojové teplotě. Ke všem iPLEX produktům byl přidán clean resin a 41  $\mu$ l PCR vody. 96jamková destička byla zalepena průhlednou PCR fólií a umístěna na dobu 30 minut do rotátoru. Po uplynutí této doby byla 96jamková destička centrifugována 5 min při 2 750 rpm (1 033 g).

#### 4.4.7 Přenos iPLEX produktů na SpectroCHIP

iPLEX produkty byly nanесeny na SpectroCHIP pomocí přístroje MassArray Nanodispenser. Nejprve bylo vždy provedeno denní čištění v 96% etanolu a 25 cyklů celkového čištění v 50% etanolu. Poté byla do MassArray Nanodispenseru umístěna 96jamková destička s iPLEX produkty, SpectroCHIP a 70  $\mu$ l calibrantu. V nastavení byly vybrány pozice na 96jamkové destičce, kde se nacházejí iPLEX produkty, které mají být přeneseny, a byl proveden samotný přesun na SpectroCHIP. Po přenosu iPLEX produktů proběhlo 15 cyklů denního čištění.



#### 4.4.8 Analýza iPLEX produktů pomocí MALDI-TOF analyzátoru

Pro analýzu iPLEX produktů pomocí MALDI-TOF analyzátoru byl vytvořen v programu Typer 4.0 nový experiment. V záložce Plate editor byly nadefinovány podmínky analýzy – umístění iPLEX produktů v 96jamkové destičce a analyzované SNPs. V dalším programu Typer Chip linker bylo zadáno identifikační číslo SpectroCHIPu pro spárování s vytvořeným experimentem. Před genotypizací bylo v MALDI-TOF analyzátoru vypuštěno vakuum, dovnitř přístroje byl vložen SpectroCHIP a pak byla provedena analýza. V programu Typer 4.0 v záložce Typer analyzer byly odečteny výsledky genotypizace.

#### 4.5 Statistické metody

**Hardy-Weinbergův zákon** – vyjadřuje teoretické četnosti genotypů a alel v populaci

$$p + q = 1$$

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

p...frekvence dominantní alely

q...frekvence recesivní alely

$p^2$ ...frekvence jedinců dominantního genotypu

$q^2$ ...frekvence jedinců recesivního genotypu

2pq...frekvence heterozygota

**Genotypová frekvence** – vyjadřuje relativní četnost daného genotypu v populaci

$$f_g = \frac{n_x}{n_c}$$

$f_g$ ...genotypová frekvence

$n_x$ ...počet jedinců daného genotypu

$n_c$ ...celkový počet genotypizovaných jedinců

**Alelická frekvence** – vyjadřuje zastoupení dané alely vzhledem k celkovému počtu alel v populaci

$$f_a = \frac{2n_x + n_y}{2n_c}$$

$f_a$ ...alelická frekvence

$n_x$ ...počet homozygotních jedinců pro danou alelu

$n_y$ ...počet heterozygotních jedinců

$n_c$ ...celkový počet genotypizovaných jedinců

**Fenotypová frekvence (nosičství alely)** – vyjadřuje zastoupení počtu nositelů dané alely vzhledem k celkovému počtu

$$f_f = \frac{n_x + n_y}{n_c}$$

$f_f$ ...fenotypová frekvence (nosičství alely)

$n_x$ ...počet homozygotních jedinců pro danou alelu

$n_y$ ...počet heterozygotních jedinců

$n_c$ ...celkový počet genotypizovaných jedinců

**$\chi^2$  (chí-kvadrát) test** – statistická metoda, která hodnotí, zda se pozorovaný genotypový poměr shoduje s očekávaným. Chí-kvadrát testem vypočtená hodnota se porovná s kritickou hodnotu odpovídající zvolené hladině významnosti při daném počtu stupňů volnosti. Chí-kvadrát test slouží k ověření, zda jsou genotypové a alelické frekvence v Hardy-Weinbergově rovnováze ( $p > 0,05$ ).

$$\chi_{(n-1)}^2 = \sum \frac{(x_i - e_i)^2}{e_i}$$

$x_i$ ...naměřené hodnoty

$e_i$ ...očekávané hodnoty

$N$ ...počet stupňů volnosti,  $N = n - 1$

$n$ ...počet genotypových tříd

## 5 VÝSLEDKY

Cílem experimentální části byla genotypizace 3 vybraných jednonukleotidových polymorfismů kandidátních genů asociovaných se statinovými myopatiemi u 116 pacientů s diagnózou ischemické choroby srdeční.

Z krve pacientů byla izolována DNA a byla změřena její koncentrace a čistota. U všech vzorků byly naměřeny hodnoty koncentrace i čistoty DNA v rozmezí, které je vhodné pro genotypizaci technologií MassArray. Genotypizovány byly následující SNPs: rs4149056, rs9806699 a rs12975366, jejichž souvislost se statinovými myopatiemi je shrnuta v Tabulce 10.

**Tabulka 10:** Asociace genotypizovaných SNPs se statinovými myopatiemi

SNP	Gen	Majoritně se vyskytující alela	Minoritně se vyskytující alela	Literatura
rs4149056	<i>SLCO1B1</i>	T	C	The Search Collaboratory Group, 2008
rs9806699	<i>GATM</i>	G	A	Mangravite <i>et al.</i> , 2013
rs12975366	<i>LILRB5</i>	T	C	Siddiqui <i>et al.</i> , 2017

Legenda: Tučně vyznačené alely jsou asociovány se zvýšeným rizikem vzniku myopatií u uživatelů statinů

Získaná data byla statisticky vyhodnocena. Pro každý SNP byly vypočteny genotypové, alelické a fenotypové frekvence. Také bylo posouzeno, zda jsou tyto frekvence v Hardy-Weinbergově rovnováze ( $p > 0,05$ ).

### Polymorfismus rs4149056 genu *SLCO1B1*

Procentuální genotypové zastoupení polymorfismu rs4149056 genu *SLCO1B1* u testovaného souboru pacientů bylo TT = 69 %, TC = 25 % a CC = 6 %. Alelická frekvence u majoritně se vyskytující alely T byla 81 %. Méně častá alela C související se statinovými myopatiemi se vyskytovala v 19 % případů u 36 pacientů, přičemž 7 z nich bylo homozygotních pro tuto alelu. Genotypové, alelické i fenotypové frekvence jsou v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou ( $p = 0,06$ ) (viz Tab. 11).

**Tabulka 11:** Genotypové, alelické a fenotypové frekvence polymorfismu rs4149056 genu *SLCO1B1* u testovaného souboru pacientů

Genotypová frekvence			Alelická frekvence		Fenotypová frekvence	
TT	TC	CC	T	C	T	C
0,69 (80)	0,25 (29)	0,06 (7)	0,81 (189)	0,19 (43)	0,94 (109)	0,31 (36)
p	0,06					

### Polymorfismus rs9806699 genu *GATM*

Procentuální genotypové zastoupení polymorfismu rs9806699 genu *GATM* u testovaného souboru pacientů bylo GG = 51 %, GA = 39 % a AA = 10 %. U 70 % pacientů byla přítomna majoritní alela G. Výskyt minoritní protektivní alely A byl 30 % u 57 pacientů, z nichž 12 bylo homozygotních pro tuto alelu. Genotypové, alelické i fenotypové frekvence byly v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou ( $p = 0,44$ ) (viz Tab. 12).

**Tabulka 12:** Genotypové, alelické a fenotypové frekvence polymorfismu rs9806699 genu *GATM* u testovaného souboru pacientů

Genotypová frekvence			Alelická frekvence		Fenotypová frekvence	
GG	GA	AA	G	A	G	A
0,51 (59)	0,39 (45)	0,10 (12)	0,70 (163)	0,30 (69)	0,90 (104)	0,49 (57)
p	0,44					

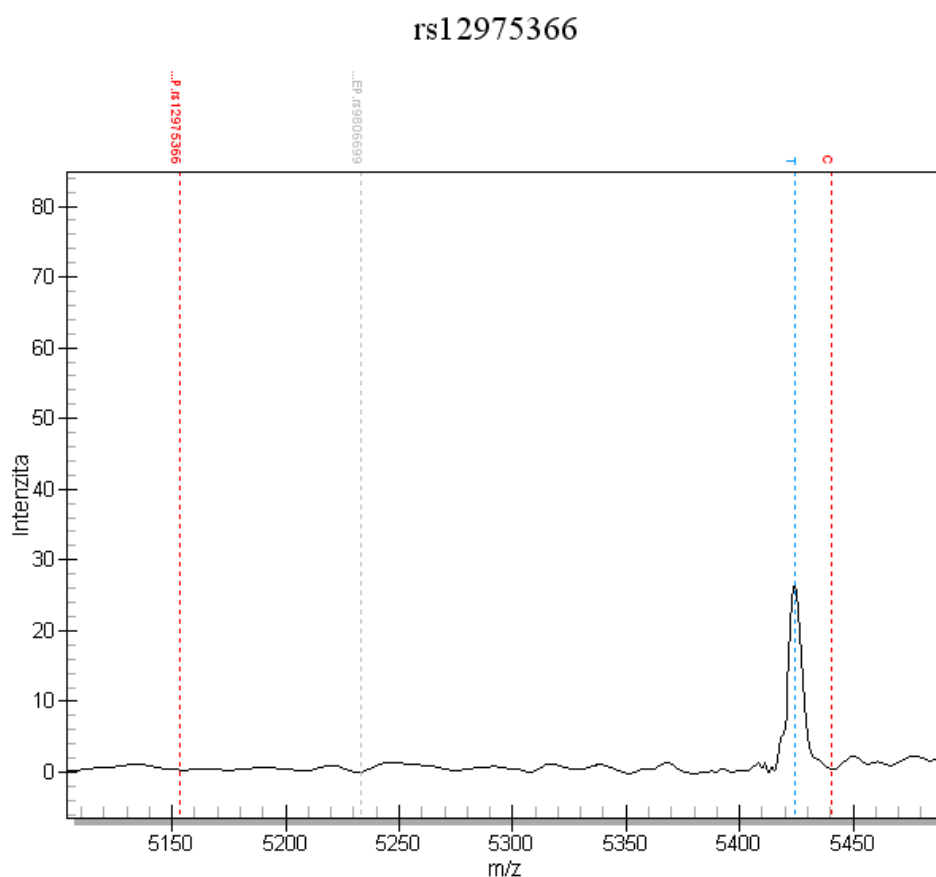
### Polymorfismus rs12975366 genu *LILRB5*

Procentuální genotypové zastoupení polymorfismu rs12975366 genu *LILRB5* u testovaného souboru pacientů bylo TT = 24 %, TC = 50 % a CC = 26 %. Alela T se v populaci vyskytuje častěji než alela C. Nositel vzácnější alely C lépe toleruje podávání statinů a předpokládá se u něj menší riziko vzniku statinových myopatií. U testovaného souboru pacientů tomu bylo naopak, kdy frekvence rizikové alely T byla 49 %, tzn. nižší než předpokládaná a frekvence alely C byla 51 %. Genotypové, alelické i fenotypové frekvence byly v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou ( $p = 0,99$ ) (viz Tab. 13).

**Tabulka 13:** Genotypové, alelické a fenotypové frekvence polymorfismu rs12975366 genu *LILRB5* u testovaného souboru pacientů

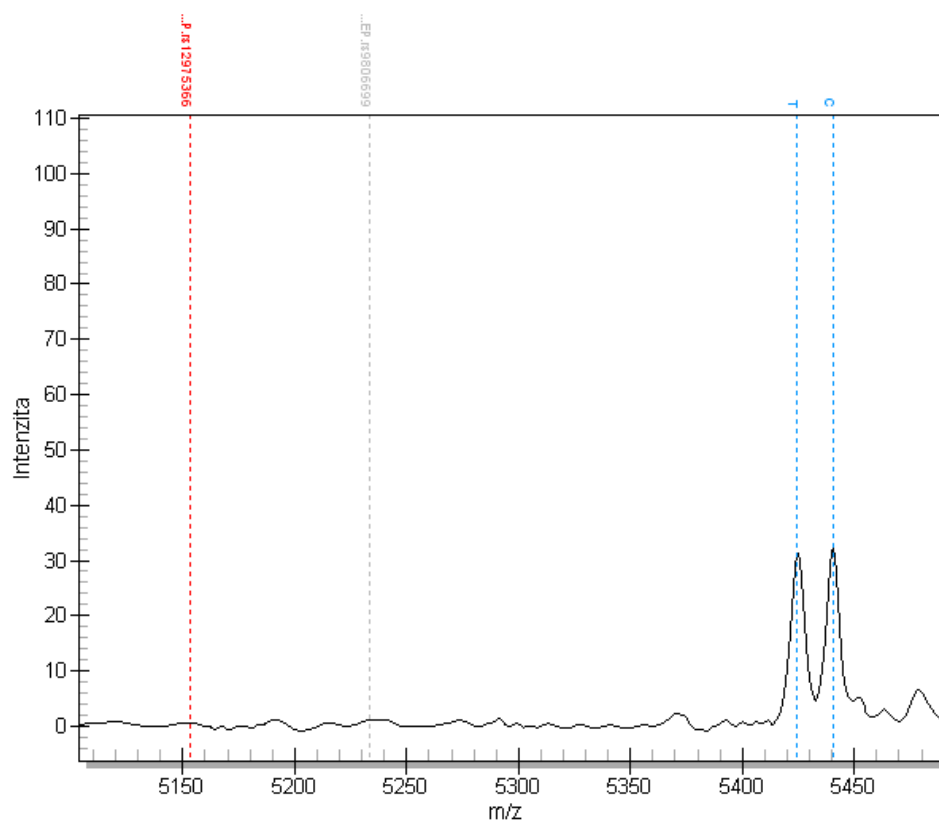
Genotypová frekvence			Alelická frekvence		Fenotypová frekvence	
TT	TC	CC	T	C	T	C
0,24 (28)	0,50 (58)	0,26 (30)	0,49 (114)	0,51 (118)	0,74 (86)	0,76 (88)
p	0,99					

Hmotnostní spektra jako výstup z hmotnostní analýzy u rs12975366 pro genotypy TT, TC a CC jsou zobrazena na Obr. 7, 8 a 9. Na Obr. 10 je pak znázorněna ukázka genotypového rozložení u části testovaného souboru pro rs12975366 genu *LILRB5*.



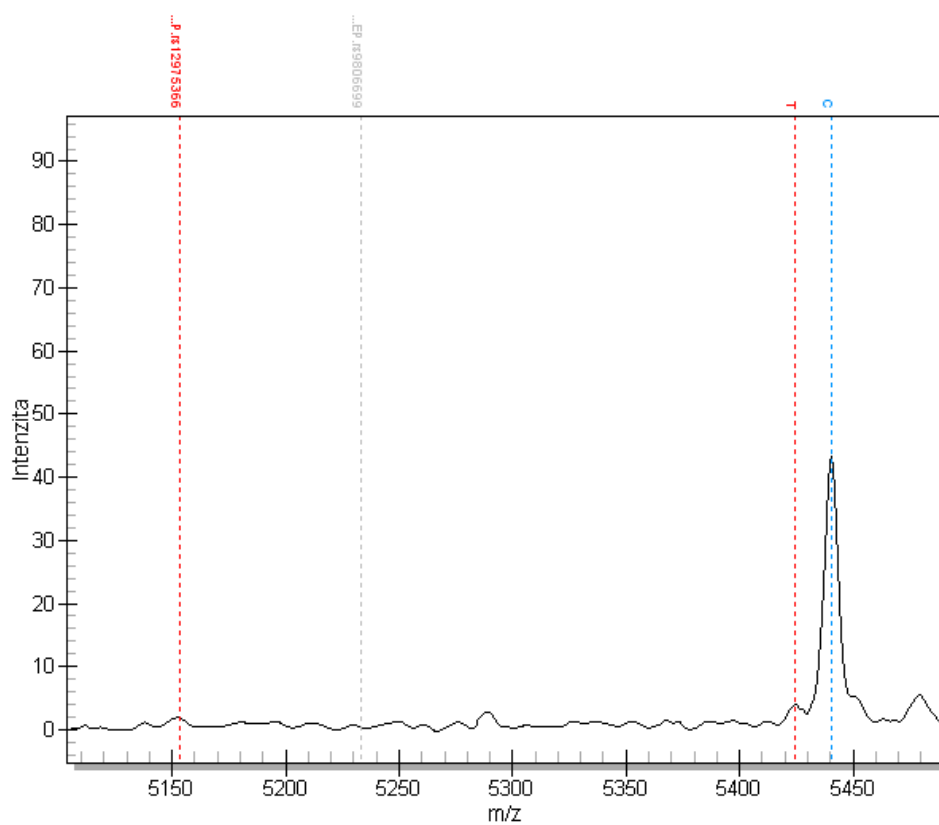
**Obrázek 7:** Hmotnostní spektrum pro genotyp TT u rs12975366 genu *LILRB5*

rs12975366

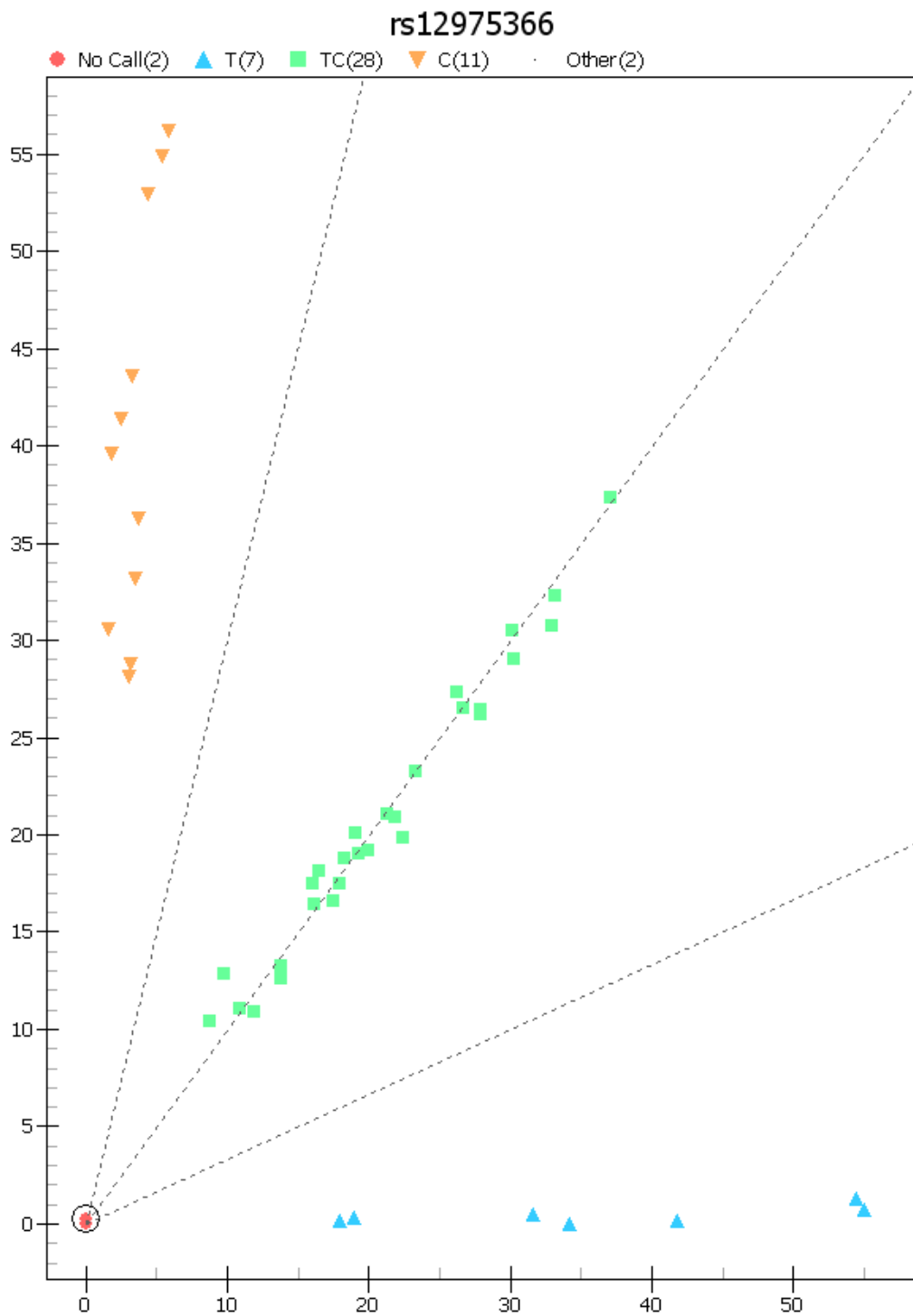


Obrázek 8: Hmotnostní spektrum pro genotyp TC u rs12975366 genu *LILRB5*

rs12975366



Obrázek 9: Hmotnostní spektrum pro genotyp CC u rs12975366 genu *LILRB5*



**Obrázek 10:** Genotypové rozložení u rs12975366 genu *LILRB5* (názorný příklad)

Legenda: oranžová značka – genotyp CC, zelená značka – genotyp TC, modrá značka – genotyp TT, červená značka – negativní kontrola

## 6 DISKUZE

V této diplomové práci byla provedena genotypizace 3 SNPs asociovaných se statinovými myopatiemi technologií MassArray. Statiny jsou léky první volby při léčbě hypercholesterolemie a jsou důležité pro prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Myopatie a různá svalová poškození jsou nejčastějším vedlejším účinkem terapie statiny.

Prvním studovaným SNP byl rs4149056 genu *SLCO1B1* a minoritně se vyskytující alela C. Nositelé alely C mají signifikantně vyšší riziko vzniku statinových myopatií, u homozygotů CC je až 17x vyšší než u homozygotů TT. Podle The Search Collaboratory Group (2008) je výskyt alely C v populaci přibližně 15 %. V testovaném souboru pacientů v této diplomové práci se alelická frekvence příliš nelišila (19 %). Analýza polymorfismu rs4149056 byla v ČR provedena již v roce 2012. Hubáček *et al.* (2012) studovali variantu rs4149056 u 253 pacientů s dyslipidémií, kteří byli léčeni simvastatinem nebo atorvastatinem. Výsledky byly srovnány s kontrolní skupinou 470 pacientů, kteří statiny neužívali. Pro genotypizaci použili metodu PCR-RFLP. Genotypové zastoupení rs4149056 u pacientů s dyslipidémií bylo TT = 61,7 %, CT = 31,6 % a CC = 6,7 % a přibližně odpovídalo zastoupení genotypů u kontrolní skupiny (TT = 64,4 %, CT = 31,3 % a CC = 4,3 %). Podobné genotypové zastoupení u obou skupin si vysvětlují nereprezentativním vzorkem testovaných pacientů. Autoři se také zaměřili na genderové rozdíly při snížení celkové hladiny cholesterolu v krvi u pacientů užívajících statiny. U mužů homozygotů CC došlo k méně výraznému poklesu hladiny cholesterolu v krvi než u žen genotypu CC při užívání statinů. Podle dostupné literatury jsou poměrně velké rozdíly v alelických frekvencích popisovány také mezi různými etnickými skupinami. U evropské a americké populace byla alela C přítomna 3x častěji než u testovaných pacientů z Oceánie a subsaharské Afriky (Pasanen *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2011). Silná asociace se statinovými myopatiemi je také v případě polymorfismu rs4363657, který se nachází v nekódující oblasti *SLCO1B1*. Předpokládá se silná vazebná nerovnováha tzn., že tyto dva SNPs jsou zřejmě ve vazbě a tvoří haplotypový blok.

V roce 2013 byl představen další potencionální SNP marker pro stanovení predispozice ke vzniku statinové myopatie, a to polymorfismus genu *GATM*, který kóduje enzym klíčový pro syntézu kreatinu ve svalech. Přítomnost alely A (rs9806699) je pro pacienty dobrou prognózou a jsou tak vystaveni nižšímu riziku vzniku těchto vedlejších účinků statinů. Frekvence minoritní alely A byla u testovaného souboru pacientů 32 %; výsledky této diplomové práce se příliš neliší a alelická frekvence byla 30 % (Mangravite *et al.*, 2013). Luzum



*et al.* (2015) provedli genotypizaci 715 jedinců a analyzovali stejný SNP. Testovaná skupina obsahovala pacienty s mírnými příznaky statinových myopatií, závažnými příznaky a kontrolní skupinu bez příznaků. Při porovnání alelických četností u těchto tří skupin nebyla potvrzena asociace alely A se sníženým rizikem myopatií. Ke stejnému závěru došla i skupina Carr *et al.* (2014). Nezaznamenali signifikantní rozdíl mezi frekvencí alely A u pacientů s diagnostikovanou statinovou myopatií (28 %) a u kontrolní skupiny (30 %). Asociace této varianty *GATM* se statinovými myopatiemi naznačí až další rozsáhlejší populační studie.

SNPs genu *LILRB5* mají také spojitost se statinovými myopatiemi. V experimentální části byla provedena genotypizace polymorfismu rs12975366 a byla sledována přítomnost rizikové alely T. Výsledky ukázaly, že ve studovaném souboru pacientů se nejčastěji vyskytovali heterozygoti (50 % pacientů) a frekvence homozygotů TT a CC byla 24 %, respektive 26 %. Podle dostupných zdrojů se v populaci častěji vyskytuje alela T. Tento poznatek se neshoduje s výsledky této práce, kdy se frekvence alely T rovnala 49 %. Důvodem bude zřejmě nízký počet nebo nereprezentativní vzorek testovaných pacientů. Dubé *et al.* (2014) uvádějí další polymorfismus asociovaný se statinovými myopatiemi, který je lokalizován před *LILRB5* a nebyl testován v této diplomové práci. Jedná se o rs2361797 (C > T). U homozygotů TT, podstupujících terapii statiny, byla pozorována zvýšená hodnota CK v krvi narozdíl od heterozygotů TC nebo CC.

Pro genotypizaci byla použita technologie MassArray, která je rychlou a spolehlivou metodou genotypizace několika SNPs u velkého souboru pacientů. Mezi její další výhody patří vysoká kapacita, flexibilita, multiplexing a také přesnost (McBean *et al.*, 2015). Meyer *et al.* (2014) srovnávali výsledky genotypizace 760 vzorků u 11 400 SNPs mezi dvěma nezávislými laboratořemi, které používaly technologii MassArray. Hodnota call rate, vyjadřující míru přesnosti a reprodukovatelnosti, dosáhla 99 %, respektive 98,5 % a shodnost genotypů byla 100%. I přes tyto výhody má tato metoda svá omezení. V první řadě je to manuální zručnost a schopnost přesně pipetovat v prvních krocích genotypizace. Při přípravě reakčních směsí pro PCR, SAP i IPLEX reakci může dojít jak k pipetování nepřesného objemu reagentů, tak i ke kontaminaci vzorku. To bylo také potvrzeno během vypracování experimentální části, kdy byla genotypizace 116 pacientů rozvržena do několika skupin a většinou zahrnovala 24 pacientů. V každém případě alespoň u jednoho SNP jednoho pacienta software nebyl schopen vyhodnotit genotyp. Příčinou byla zřejmě chyba při pipetování reakčních směsí, protože při zopakování experimentu u konkrétních případů pak byl genotyp vyhodnocen.

Genotypizace asociovaných SNPs se statinovými myopatiemi umožňuje individuální přístup pro terapii statiny. Po určení genotypu pacienta a zvážení všech dalších rizikových faktorů by bylo možné upravit výši dávky statinu, předepsat jiný typ statinu, případně statiny vysadit tak, aby se předcházelo vedlejším účinkům. Na základě poznatků o genetických predispozicích vzniku těchto komplikací se nabízí otázka o zařazení genotypizace konkrétních SNPs do klinické praxe. Wilke *et al.* (2012) uvádějí, jak postupovat u nositelů rizikové alely C polymorfismu rs4149056 *SLCO1B1*. Doporučují u heterozygotů TC a homozygotů CC snížit dávku simvastatinu na 20 mg za současného sledování hladiny CK v krvi, nebo indikaci alternativního statinu. SNP rs4149056 by mohl být analyzován samostatně pomocí nějaké z genotypizačních metod založených na PCR nebo současně s dalšími, kdy se jako vhodná metoda jeví právě technologie MassArray, která multiplexing umožňuje (Ramsey *et al.*, 2014). Rutinní farmakogenomika má také své nevýhody a rizika. Potencionálním rizikem je nesprávné vyhodnocení genotypu. V případě falešně negativního výsledku by terapie pokračovala a pacient by byl vystaven riziku vzniku svalových obtíží, ke kterým by měl genetické predispozice. V opačné situaci falešně pozitivního výsledku by snížení dávek statinů nebylo na místě a léčba by byla nedostačující. V úvahu také připadá možnost vysazení nebo snížení dávky statinů přímo pacientem po objasnění genetické predispozice spojené s myopatiemi. Mitchell *et al.* (2017) upozorňují, že nespecifické svalové obtíže mohou nabídat pacienta k vlastní úpravě medikace, která je nežádoucí, vedla by k nárůstu hladin cholesterolu v krvi a zvyšovala by riziko vzniku aterosklerózy atd.

## 7 ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce se věnuje především ischemické chorobě srdeční, dále statinům a genům, které jsou asociovány se statinovými myopatiemi a možnostmi genotypizace jednonukleotidových polymorfismů se zaměřením na technologii MassArray.

Cílem experimentální části byla genotypizace jednonukleotidových polymorfismů genů *SLCO1B1* (rs4149056), *GATM* (rs9806699) a *LILRB5* (rs12975366), asociovaných se statinovými myopatiemi, u 116 pacientů s ischemickou chorobou srdeční. Genotypizace byla provedena přesnou a rychlou metodou MassArray. Pokud je znám genotyp u těchto pacientů, je možné odhadnout riziko vzniku statinových myopatií a přizpůsobit jejich léčbu tak, aby byla efektivní a bez vedlejších příznaků.

U prvního studovaného polymorfismu rs4149056 byla alelická frekvence rizikové alely C 19 % a odpovídala popsánému výskytu této alely. Frekvence alely A polymorfismu rs9806699, u které se předpokládá, že její nositel bude mít nižší riziko vzniku statinové myopatie, byla 30 % a opět se shodovala s výsledky z dostupných zdrojů. V případě polymorfismu rs12975366 je častěji v populaci přítomna riziková alela T. Frekvence alely T byla 49 %, tudíž nižší než předpokládaná, a důvodem může být malá velikost testovaného souboru pacientů.

## 8 LITERATURA

- Banach M., Rizzo M., Toth P., Farnier M., Davidson M., Al-Rasadi K., Aronow W., Athyros V., Djuric D., Ezhov M., Greenfield R., Hovingh G., Kostner K., Serban C., Lighezan D., Fras Z., Moriarty P., Muntner P., Goudev A., Ceska R., Nicholls S., Broncel M., Nikolic D., Pella D., Puri R., Rysz J., Wong N., Bajnok L., Jones S., Ray K., Mikhailidis D. (2015): Position paper statin intolerance – An attempt at a unified definition. Position paper from an international lipid expert panel. *Archives of Medical Science*. 11(1):1-23.
- Bell J. I., Kimchi-Safraty C., Ambudkar S. V., Gottesman M. M. (2002): Single nucleotide polymorphisms and disease gene mapping. *Arthritis Research*. 4(3): S273-S278.
- Bellosta S., Fed N., Bernini F., Paoletti R., Corsini A. (2009): Non-lipid-related effects of statins. *Annals of Medicine*. 32(3): 164-176.
- Braunwald E. (1989): Unstable angina. A classification. *Circulation*. 80(2): 410-414.
- Brown M. S., Goldstein J. L. (1997): The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell*. 89(3): 331-340.
- Bruckert E., Hayem G., Dejager S., Yau C., Begaud B. (2005): Mild to Moderate Muscular Symptoms with High-Dosage Statin Therapy in Hyperlipidemic Patients —The PRIMO Study. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 19(6): 403-414.
- Carr D. F., Alfirevic A., Johnson R., Chinoy H., van Staa T., Pirmohamed M. (2014): GATM gene variants and statin myopathy risk. *Nature*. 513(7518): E1-E3.
- Cohen J. D., Brinton E. A., Ito M. K., Jacobson T. A. (2012): Understanding Statin Use in America and Gaps in Patient Education (USAGE): An internet-based survey of 10,138 current and former statin users. *Journal of Clinical Lipidology*. 6(3): 208-215.
- Conti C. R., Bavry A. A., Petersen J. W. (2012): Silent Ischemia. *Journal of the American College of Cardiology*. 59(5): 435-441.
- Corsini A., Bellosta S., Baetta R., Fumagalli R., Paoletti R., Bernini F. (1999): New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacology and Therapeutics*. 84(3): 413-428.
- Darawi M. N., Ai-Vyryn Ch., Ramasamy K., Hua P. P. J., Pin T. M., Kamaruzzaman S. B., Majjed A. B. A. (2013): Allele-specific polymerase chain reaction for the detection

of Alzheimer's disease-related single nucleotide polymorphisms. *BMC Medical Genetics*. 14(1).

DiGiusto D., King G. C. (2003): Single base extension (SBE) with proofreading polymerases and phosphorothioate primers: improved fidelity in single-substrate assays. *Nucleic Acids Research*. 31(3): 7e-7.

Ding C., Cantor C. R. (2003): A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(6): 3059-3064.

Dubé M., Zetler R., Barhdadi A., Brown A., Mongrain I, Normand V., Laplante N., Asselin G., Feroz Zada Y., Provost S., Bergeron J., Kouz S., Dufour R., Diaz A., de Denus S., Turgeon J., Rhéaume E., Phillips M., Tardif J. (2014): CKM and LILRB5 Are Associated With Serum Levels of Creatine Kinase: Amerindians as a high risk ethnic group. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 7(6): 880-886.

Edwards P., Lemongello D., Fogelman A. (1979): The effect of glucagon, norepinephrine, and dibutyryl cyclic AMP on cholesterol efflux and on the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in rat hepatocytes. *Journal of Lipid Research*. 20: 2-7.

Falk E. (2006): Pathogenesis of Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 47(8): C7-C12.

Fiegenbaum M., Dasilveira F., Vandersand C., Vandersan L. C., Ferreira M., Pires R., Hutz M. (2005): The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS*. 78(5): 551-558.

Gabriel S., Ziaugra L., Tabbaa D., Vandersteen J., Pryor R. (2009): SNP Genotyping Using the Sequenom MassARRAY iPLEX Platform. *Current Protocols in Human Genetics*. Hoboken, NJ, USA, 49(6): 853-860.

Gluba-Brzozka A., Franczyk B., Toth P. P., Rysz J., Banach M. (2016): Molecular mechanisms of statin intolerance. *Archives of Medical Science*. 3: 645-658.

Goldstein J. L., Brown M. S., Fogelman A. (1990): Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 343(6257): 425-430.

- Hubáček J., Dlouhá D., Adámková V., Lánská V., Češka R., Vrablík M. (2012): Possible gene-gender interaction between the SLCO1B1 polymorphism and statin treatment efficacy. *Neuroendocrinology Letters*. 33(2): 22-25.
- Chapman M. J., Carrie A. (2005): Mechanisms of Statin-Induced Myopathy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 25(12): 2441-2444.
- Inazuka M., Wenz H-M., Sakabe M., Tahira T., Hayashi K. (1997): A Streamlined Mutation Detection System: Multicolor Post-PCR Fluorescence Labeling and Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis by Capillary Electrophoresis. *Genome Research*. 7(11), 1094-1103.
- Jo Y., DeBose-Boyd R. A. (2010): Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG CoA reductase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 45(3): 185-198.
- Jurinke, C., Denissenko, M. F., Oeth, P., Ehrich, M., Van de Boom, D. et Cantor, C. R. (2005): A single nucleotide polymorphism based approach for the identification and characterization of gene expression modulation using MassARRAY. *Mutation Research*; 573: 83-95
- Kostner G. M., Gavish D., Leopold B., Bolzano K., Weintraub M. S., Breslow J. L. (1989): HMG CoA reductase inhibitors lower LDL cholesterol without reducing Lp(a) levels. *Circulation*. 80(5): 1313-1319.
- Kwok, P.Y., Chen, X. (2003): Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Current Issues in Molecular Biology*; 5: 43-60.
- Laufs U., Scharnagl H., Halle M., Windler E., Endres M., Marz W. (2015): Treatment Options for Statin-Associated Muscle Symptoms. *Deutsches Aerzteblatt Online*. 80(5): 1313-1319.
- Lu L., Liu M., Sun R., Zhen Y., Zhang P. (2015): Myocardial Infarction: Symptoms and Treatments. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 72(3): 865-867.
- Luzum J. A., Kitzmiller J. P., Isackson P. J., Ma Ch., Medina M. W., Dauki A. M., Mikulik E. B., Ochs-Balcom H. M., Vladutiu G. D. (2015): GATM Polymorphism Associated with the Risk for Statin-Induced Myopathy Does Not Replicate in Case-Control Analysis of 715 Dyslipidemic Individuals. *Cell Metabolism*. 21(4): 622-627.

- Mangravite L. M., Engelhardt B. E., Medina M. W., Smith J. D., Brown Ch. D., Chasman D. I., Mecham B. H., Howie B., Shim H., Naidoo D., Feng Q., Rieder M. J., Chen Y.-D. I., Rotter J. I., Ridker P. M., Hopewell J. C., Parish S., Armitage J., Collins R., Wilke R. A., Nickerson D. A., Stephens M., Krauss R. M. (2013): A statin-dependent QTL for GATM expression is associated with statin-induced myopathy. *Nature*. 502(7471): 377-380.
- Marcoff L., Thompson P. D. (2007): The Role of Coenzyme Q10 in Statin-Associated Myopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 49(23): 2231-2237.
- McBean R., Hyland C., Flower R. (2015): Blood group genotyping: the power and limitations of the Hemo ID Panel and MassArray platform. *Immunohematology*. 31(2): 75-80.
- McMillan D. (1985): Blood flow and the localization of atherosclerotic plaques. *Stroke*. 16(4): 582-587.
- Meyer S., Vollmert C., Trost N., Bronnimann Ch., Gottschalk J., Buser A., Frey B., Gassner Ch. (2014): High-throughput Kell, Kidd, and Duffy matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry-based blood group genotyping of 4000 donors shows close to full concordance with serotyping and detects new alleles: Amerindians as a high risk ethnic group. *Transfusion*. 54(12): 3198-3207.
- Mitchell D., Guertin J., Iliza A., Fanton-Aita F., Leloir J. (2017): Economic Evaluation of a Pharmacogenomics Test for Statin-Induced Myopathy in Cardiovascular High-Risk Patients Initiating a Statin. 21(1): 95-105.
- Myakishev M. V. (2001): High-Throughput SNP Genotyping by Allele-Specific PCR with Universal Energy-Transfer-Labeled Primers. *Genome Research*. 11(1): 163-169.
- Nagel T., Resnick N., Atkinson W. J., Dewey C.F., Gimbrone C.F. (1994): Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*. 94(2): 885-891.
- Niemi M., Pasanen M. K., Neuvonen P. J. (2011): Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1: a Genetically Polymorphic Transporter of Major Importance for Hepatic Drug Uptake. *Pharmacological Reviews*. 63(1): 157-181.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K, Sekiya T. (1989): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86: 2766-2770.

- Pasanen M., Neuvonen, Niemi M. (2008): Global analysis of genetic variation in SLCO1B1. *Pharmacogenomics*. 9(1): 19-33.
- Radhakrishnan A., Sun L., Espenshade P. J., Goldstein J. L., Brown M. S. (2010): The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Handbook of Cell Signaling*. Elsevier, 89(3): 2505-2510.
- Raggi P., Genest J., Giles J. T., Rayner K. J., Dwivedi G., Beanlands R. S., Gupta M. (2018): Role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic interventions. *Atherosclerosis*. 276: 98-108.
- Ragoussis, J., Elvidge, G. P., Kaur, K. et Colella, S. (2006): Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time-of-Flight Mass Spectrometry in Genomics Research. *PLOS Genetics*; 2: e100
- Ramensky V., Bork P., Sunyaev S. (2002): Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acid Research*. 30(17): 3894-3900.
- Ramsey L., Johnson S., Caudle K., Haidar C., Voora D., Wilke R., Maxwell W., McLeod H., Krauss R., Roden D., Feng Q., Cooper-DeHoff R., Gong L., Klein T., Wadelius M., Niemi M. (2014): The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy. 96(4): 423-428.
- Rosenson R. S., Baker S. K., Jacobson T. A., Kopecky S. L., Parker B. A. (2014): An assessment by the Statin Muscle Safety Task Force: 2014 update. *Journal of Clinical Lipidology*. 8(3): S58-S71.
- Ross R., Epstein F. H. (1999): Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*. 340(2) 115-126.
- Ross R., Glomset A. J. (1976a): The Pathogenesis of Atherosclerosis (first of two part). *New England Journal of Medicine*. 295(7): 369-377.
- Ross R., Glomset A. J. (1976b): The Pathogenesis of Atherosclerosis (second of two part). *New England Journal of Medicine*. 295(8): 420-425.
- Ross R., Glomset J., Harker L. (1977): Response to injury and atherogenesis. *American Journal of Pathology*. (86): 675-684.
- Santos P., Soares R., Nascimento R., Machando-Coelho G., Mill J, Krieger J., Pereira A. (2011): SLCO1B1 rs4149056 polymorphism associated with statin-induced myopathy is



differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population: Amerindians as a high risk ethnic group. *BMC Medical Genetics*. 12(1): 19-33

Sauna Z. E., Kimchi-Sarfaty C., Ambudkar S. V., Gottesman M. M. (2007): Silent Polymorphisms Speak: How They Affect Pharmacogenomics and the Treatment of Cancer. *Cancer Research*. 67(20): 9609-9612.

Sewright K. A., Clarkson P. M., Thompson P. D. (2007): Statin myopathy: Incidence, risk factors, and pathophysiology. *Current Atherosclerosis Reports*. 9(5), 389-396.

Schang S., Pepine C. (1977): Transient asymptomatic S-T segment depression during daily activity. *The American Journal of Cardiology*. 39: 396-402.

Siddiqui M., Maroteau C., Valuchamy A., Tornio A., Tavendale R., Carr F., Abelega N-U., Carr D., Bloch K., Hallberg P., Yue Q-Y., Pearson E. R., Colhoun H. M., Morris A. D., Dow E., George J., Pirmohamed M., Ridker P. M., Doney A. S. F., Alfirevic A., Wadelius M., Maitland-van der Zee A-H., Chasman D. I., Palmer C. N. A. (2017): A common missense variant of LILRB5 is associated with statin intolerance and myalgia. *European Heart Journal*. 38(48): 3569-3575.

Stancu C., Sima A. (2001): Statins: mechanism of action and effects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 5(4): 378-387.

Steg P. G., James S. K., Atar D. Badano L. P., Lundqvist C. B., Borger M. A., Di Mario C., Dickstein K., Ducrocq G., Fernandez-Aviles F., Gershlick A. H., Giannuzzi P., Halvorsen S., Huber K., Juni P., Kastrati A., Knuuti J., Mahaffey K. W., Valgimigli M., van't Hof (2012): ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *European Heart Journal*. 33(20): 2569-2619.

Stroes E. S., Thompson P. D., Corsini A., Vladutiu G. D., Raal F. J., Ray K. K., Roden M., Stein E., Tokgözoğlu L., Nordestgaard B. G., Bruckert E., De Backer G., Krauss R. M., Laufs U., Santos R. D., Hegele R. A., Hovingh G. K., Leiter L. A., Mach F., März W., Newman C. B., Wiklund O., Jacobson T. A., Catapano A. L., Chapman M. John, Ginsberg H. N. (2015): Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy—European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. *European Heart Journal*. 36(17): 1012-1022.

Svidnicki M. C., Costa C., Mělo C., Silva-Costa S. M., Ramos P. Z., Dos Santos N. Z. P., Martins F. T. A., Castilho A. M., Sartorato E. L. (2015): Screening of genetic alterations

related to non-syndromic hearing loss using MassARRAY iPLEX® technology. *BMC Medical Genetics*. 16(1).

Syvanen A-Ch. (1999): From gels to chips: “Minisequencing” primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Human mutation*. 13: 1-10.

Špinar J., Vítovec J. (2003): *Ischemická choroba srdeční*. Grada, Praha

Štejfá M. (2007): *Kardiologie*. 3., přepracované a doplněné vydání. Grada, Praha

The Search Collaboratory Group (2008): SLCO1B1 Variants and Statin-Induced Myopathy – A Genomewide Study. *New England Journal of Medicine*. 359(8): 789-799.

Thompson P.D., Clarkson P., Karas R. H. (2003): Statin-associated myopathy. *Journal of the American Medical Association*. 289(13): 1681-1690.

Thygesen K., Alpert J. S., Jaffe A. S., Hygesen K., Alpert J. S., Jaffe A. S., Chaitman B. R., Bax J. J., Morrow D. A., White H. D., Mickley H., Crea F., Van de Werf F., Bucciarelli-Ducci Ch. Katus H. A., Pinto F. J., Antman E. M., Hamm Chr. W., De Caterina R., Januzzi J. L., Apple F. S., Alonso G. M. A., Underwood S. R., Canty J. M., Lyon A. R., Devereaux P. J., Zamorano J. L., Lindahl B., Weintraub W. S., Newby L. K., Virmani R., Vranckx P., Cutlip D., Smith S. C., Atar D. (2019): Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *European Heart Journal*. 40(3): 237-269.

Toušek P., Horák D., Toušek F., Rokyta R., Červinka P., Želízko M., Aschermann M, Janský P., Holm F., Pešl L., Jarkovský J., Widimský P. (2014): Trends in epidemiology and the treatment of acute coronary syndromes in the Czech Republic: Comparison of the CZECH-1 and CZECH-2 registries. *Cor et Vasa*. 56(4): e285-e290.

Toušek P., Stasková K., Malá A, Sluka M., Vodzinská A., Jančar R., Malusková D., Jarkovský J., Widimský P. (2017): Incidence, treatment strategies and outcomes of acute coronary syndrome with and without ongoing myocardial ischaemia: results from the CZECH-3 registry. *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care*. 119(2): 212-219.

Werner J. L., Christopher-Stine L., Ghazarian S. R., Pak K. S., Kus J. E., Daya N. R., Lloyd T. E., Mammen A. L. (2012): Antibody levels correlate with creatine kinase levels and strength in anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. 64(12): 4087-4093.

Widimsky P., Želízko M., Janský P., Toušek F., Holm F., Aschermann M. (2007): The incidence, treatment strategies and outcomes of acute coronary syndromes

in the “reperfusion network” of different hospital types in the Czech Republic: Results of the Czech evaluation of acute coronary syndromes in hospitalized patients (CZECH) registry. *International Journal of Cardiology*. 119(2): 212-219.

Wilke R., Ramsey L., Johnson S., Maxwell W., McLeod H., Voora D., Krauss R., Roden D., Feng Q., Cooper-DeHoff R., Gong L., Klein T., Wadelius M., Niemi M. (2012): The Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium: CPIC Guideline for SLCO1B1 and Simvastatin-Induced Myopathy. 92(1): 112-117.

Wittwer C., Reed G., Gundry C., Vandersteen J., Pryor R. (2003): High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Molecular Diagnostics and Genetics*. 49(6): 853-860.

Wolford J. K., Blunt D., Ballecer C., Procházka M. (2000): High-throughput SNP detection by using DNA pooling and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *Human Genetics*. 107: 483-487.

Yusuf S., Hawken S. Ounpuu S., Dans T., Avezum A., Lanas F., McQueen M., Budaj A., Pais P., Varigos J., Lisheng L. (2004): Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet*. 364(9438): 937-952.

### **Internetové zdroje**

World Health Organization. [online] [navštíveno 9.3.2019] Dostupné z <https://www.who.int/>

Státní ústav pro kontrolu léčiv. [online] [navštíveno 9.3.2019] Dostupné z <http://www.sukl.cz/>