UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biochemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Výskyt polymorfismů v genu pro methylentetrahydrofolátreduktasu u žen s komplikovaným průběhem gravidity

Vypracovala: Markéta Dajbychová

Školitel: MUDr. Ivan Šubrt

Ústav lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň

Garant: Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Přírodovědecká fakulta UK, katedra biochemie

Praha, 2006

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele MUDr. Ivana Šubrta a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne: 3.5.2006

Podpis:

Dajlychová

Děkuji svému školiteli, MUDr. Ivanu Šubrtovi, za poskytnutí pracovního zázemí a všestrannou pomoc v průběhu vypracovávání mé diplomové práce.

Děkuji své garantce, doc. RNDr. Marii Stiborové, DrSc., za cenné rady, které mi poskytovala v průběhu psaní mé diplomové práce.

Děkuji kolegům z Ústavu lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň, zejména mgr. Martině Šafrové, za pomoc a neocenitelné rady při řešení každodenních problémů při provádění experimentů. Děkuji mgr. Markétě Hejnalové za pomoc při statistickém zpracování výsledků.

Nemenší díky patří mým rodičům a manželovi za podporu a trpělivost při mých studiích.

Obsah

Seznam použitých zkratek ..... - 3 -
1 Předmluva ..... - 5 -
2 Teoretický úvod ..... - 6 -
2.1 Metabolismus folátů ..... - 6 -
2.2 Methylentetrahydrofolátreduktasa ..... - 9 -
2.3 Polymorfismus MTHFR 677C/T ..... - 10 -
2.3.1 Geografická a etnická distribuce polymorfismu MTHFR 677C/T ..... - 10 -
2.3.2 Zdravotní komplikace spojené s polymorfismem MTHFR 677C/T ..... - 11 -
Hyperhomocystinemie ..... - 11 -
Rozštěp neurální trubice ..... - 12 -
Preeklampsie ..... - 12 -
Spontánní potraty ..... - 12 -
Downův syndrom ..... - 13 -
Poruchy methylace DNA ..... - 13 -
2.4 Polymorfismus MTHFR 1298A/C ..... - 13 -
2.5 Kombinovaný výskyt polymorfismů MTHFR 677C/T a 1298A/C ..... - 14 -
2.6 Komplikace gravidity ..... - 16 -
2.6.1 Preeklampsie ..... - 16 -
2.6.2 Spontánní potrat ..... - 17 -
3 Cíl práce ..... - 19 -
4 Experimentální část ..... - 20 -
4.1 Chemikálie, přístroje, biologický materiál ..... - 20 -
4.1.1 Chemikálie ..... - 20 -
4.1.2 Použité roztoky a pufry ..... - 21 -
4.1.3 Přístroje ..... - 22 -
4.1.4 Údaje o původu biologického materiálu ..... - 23 -
4.1.5 Analyzované soubory žen, které prodělaly preeklampsie a žen opakovaně potrácejících ..... - 23 -
4.2 Metody ..... - 24 -
4.2.1 Izolace genomické DNA ..... - 24 -
4.2.2 Metody analýzy genotypů ..... - 25 -
4.2.3 „Real-time“ PCR s fluorescenční detekcí ..... - 26 -
Sekvence genu pro MTHFR, primery pro „real-time“ PCR, fluorescenčně značené sondy ..... - 30 -
Stanovení genotypů polymorfismů 677C/T a 1298A/C metodou „real-time“ PCR s fluorescenční detekcí ..... - 32 -
4.2.4 Metoda analýzy délkového polymorfismu restrikčních fragmentů ..... - 34 -
Sekvence genu pro MTHFR, primery pro PCR, restrikční endonukleasy ..... - 36 -
Klasická polymerasová řetězová reakce ..... - 38 -
Elektroforéza PCR produktů ..... - 39 -
Enzymové štěpení ..... - 39 -
Elektroforetická separace produktů štěpení na agarosovém gelu ..... - 40 -
5 Výsledky ..... - 41 -
5.1 Výsledky genotypizace polymorfismů 677C/T a 1298A/C metodou „real-time“ PCR s fluorescenční detekcí a metodou analýzy délkového polymorfismu restrikčních fragmentů ..... - 41 -

5.2 Souhrnné výsledky genotypizace polymorfismů 677C/T a 1298A/C u souborů žen s komplikacemi gravidity v porovnání s výskytem těchto polymorfismů v obecné populaci České Republiky ..... - 44 -
6 Diskuse ..... - 49 -
7 Souhrn ..... - 52 -
8 Seznam použité literatury ..... - 53 -
9 Přílohy ..... - 58 -
Příloha č. 1: Údaje českého statistického úřadu ..... - 58 -
Příloha č. 2: Dopis kontaktující pacientky hospitalizované na GPK LF UK a FN Plzeň v letech 2000 až 2003 ..... - 59 -
Příloha č. 3: Dopis, ve kterém byl pacientkám zaslán set určený ke stěru sliznice ústní dutiny ..... - 60 -
Příloha č. 4: Návod k provedení stěru sliznice ústní dutiny ..... - 61 -
Příloha č. 5: Informovaný souhlas s molekulárně genetickým vyšetřením ..... - 62 -

Seznam použitých zkratek

A, a	adenin
AV ČR	Akademie věd České Republiky
bp	pár basí (Base Pair)
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)
C, c	cytosin
ČR	Česká republika
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosid-5´-trifosfáty
DS	Downův syndrom
dTMP	deoxythymidin-5´-monofosfát
dUMP	deoxyuridin-5´-monofosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FAD	flavinadenindinukleotid
FN	Fakultní nemocnice
FRET	Fluorescenční Rezonanční Energetický Transfer
G, g	guanin
GPK	Gynekologicko-porodnická klinika
MTHFR	methylentetrahydrofolátreduktasa
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NTD	rozštěp neurální trubice (Neural Tube Defect)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PEE	preeklampsie
Primer F	forward primer
Primer R	reverse primer
RFLP	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism)
Rh faktor	antigen červených krvinek (Rhesus factor)
SAM	S-adenosylmethionin
SP	spontánní potrat
SRN	Spolková republika Německo

T, t	thymin
THF	tetrahydrofolát
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
USA	Spojené státy americké
UV záření	ultrafialové záření
1. LF UK	1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
3. LF UK	3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy

1 Předmluva

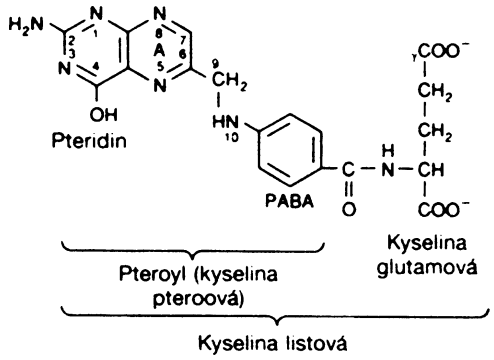
Jako téma své diplomové práce jsem si zvolila „*Výskyt polymorfismů v genu pro methylentetrahydrofolátreduktasu u žen s komplikovaným průběhem gravidity*". Komplikace gravidity se stávají problémem, se kterým se setkává stále více párů. Stále více dětí přichází na svět díky asistované reprodukci. Problémy s početím a donošením potomka má asi každá desátá žena. Dle údajů Českého statistického úřadu, viz příloha 1 [1] (str. 58), za poslední desetiletí významně klesá úhrnná plodnost populace České republiky a naopak stoupá procento spontánních potratů v celkovém množství všech ukončených těhotenství. Komplikace gravidity mohou mít řadu nejrůznějších příčin. Mohou být způsobeny zdravotními problémy na straně matky nebo na straně otce. Dokonce může dojít k tomu, že oba, žena i muž, jsou zdraví, ale společně počít potomka jim dělá potíže.

V tématu této práce se zabývám jen velice malou oblastí komplikací gravidit a to komplikacemi, které mohou být způsobené genovými mutacemi v DNA matky. Cílem mého zájmu je gen pro methylentetrahydrofolátreduktasu a jeho dva nejčastější polymorfismy 677C/T a 1298A/C. Již bylo prokázáno, že tyto polymorfismy hrají důležitou roli například v kardiovaskulárních chorobách a také zvyšují riziko rozštěpu neurální trubice plodu. V posledních letech se objevují domněnky, že mohou hrát určitou roli právě i v mechanismu spontánního potratu a vzniku preeklampsie u těhotné ženy. V této diplomové práci tedy porovnávám výskyt zkoumaných polymorfismů ve skupinách žen, které prodělaly komplikace gravidity (opakované spontánní potraty nebo preeklampsii), s výskytem těchto polymorfismů v obecné populaci České republiky.

2 Teoretický úvod

2.1 Metabolismus folátů

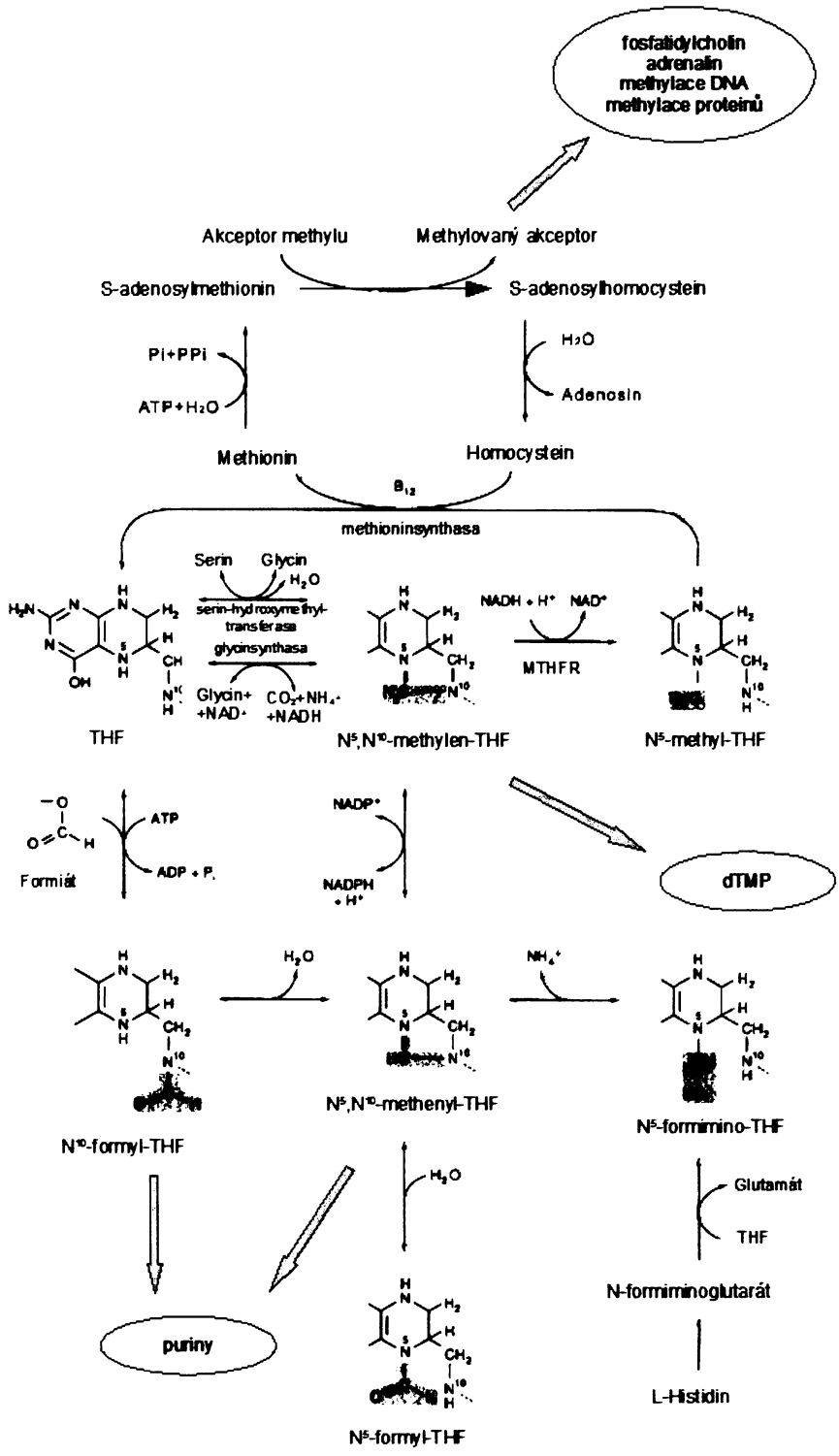
Foláty jsou látky odvozené od vitaminu kyseliny listové (folacinu). Kyselin listová je tvořena pteridinem, ke kterému je připojena kyselina p-aminobenzoová a kyselina glutamová, viz obr. č. 1. Živočichové nejsou schopni syntetizovat kyselinu p-aminobenzoovou a spojovat pteridin s kyselinou glutamovou, proto musí přijímat folacin ve stravě. Ten je nejvíce obsažen v kvasnicích, játrech a listové zelenině. V rostlinách je kyselina listová přítomna jako polyglutamátový konjugát složený ze sedmi glutamátových zbytků. V játrech je vitamin vázán ve formě pentaglutamátového konjugátu. Deriváty folacinu jsou ve střevě rozštěpeny na monoglutamylfoláty, které jsou ve střevních buňkách redukovány na tetrahydrofoláty (THF) NADPH dependentní folátreduktasou.



Obr. č. 1: Vzorec kyseliny listové – převzato z [2]

Tetrahydrofolát je aktivní formou kyseliny listové. Je to přenašeč aktivovaných jednouhlíkových zbytků, které jsou kovalentně vázány na N(5) a N(10) tetrahydrofolátu. Mohou být v různých oxidačních stavech (methyly, methyleny, methenyly, formyly a formiminy), přičemž všechny jsou metabolicky vzájemně směnitelné, viz obr. č. 2 (str. 7).

Hlavním zdrojem jednouhlíkových zbytků jsou aminokyseliny. Serin reversibilně předává methylen tetrahydrofolátu, čímž vzniká N^5,N^{10}-methylen-THF a glycin. Tato reakce je katalyzována serinhydroxymethyltransferasou. Štěpením glycinu glycinsynthasou vzniká N^5,N^{10}-methylen-THF. Degradací histidinu vzniká N^5-formimino-THF.

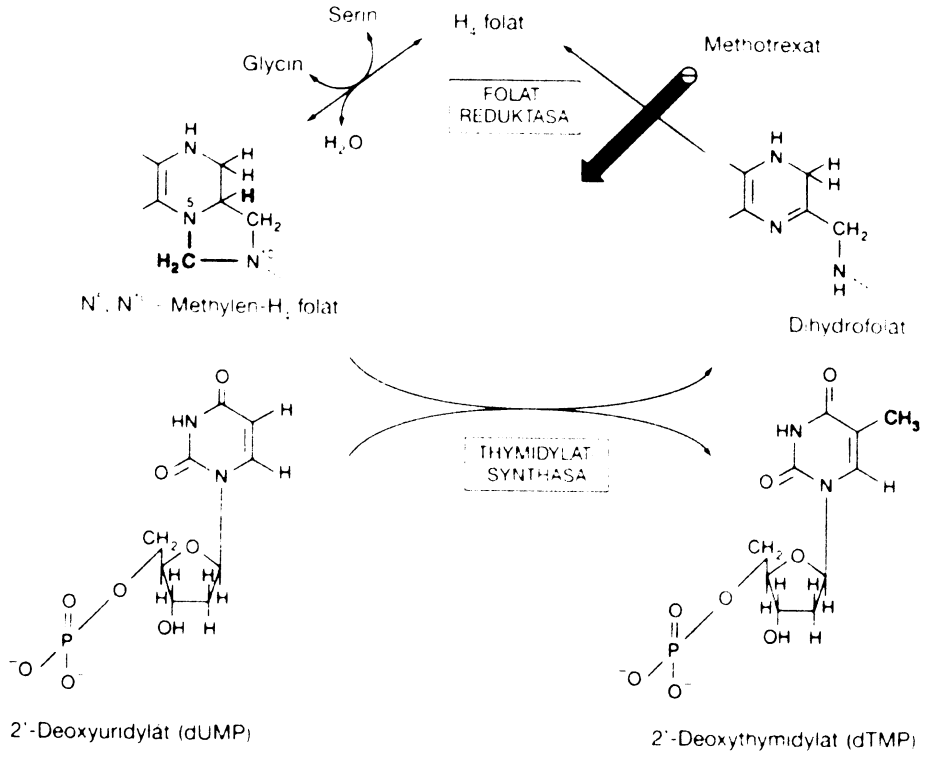


Obr. č. 2: Metabolismus jednouhlíkových zbytků – převzato z [2] a dále upraveno

N^5,N^{10}-methylen-THF hraje ústřední roli v metabolismu jednouhlíkových zbytků. Může být redukován na N^5-methyl-THF, oxidován na N^5,N^{10}-methenyl-THF, který může být dále hydratován na N^5-formyl-THF nebo N^{10}-formyl-THF.

Jednouhlíkové zbytky vázané k tetrahydrofolátu slouží:

- při přeměně dUMP na dTMP v reakci katalyzované thymidylátsynthasou, viz obr. č. 3
- po oxidaci přes N^5,N^{10}-methin-THF na N^{10}-formyl-THF jsou využívány pro výstavbu purinů
- po redukci na N^5-methyl-THF se využívají k syntéze methioninu z homocysteinu
- N^{10}-formyl-THF poskytuje formyl pro vznik formylmethionin-tRNA



Obr. č. 3: Úloha THF při přeměně deoxyuridylátu na deoxythymidylát – převzato z [2]

Nedostatek kyseliny listové působí megaloblastickou (zhoubnou) anemii. To znamená, že v organismu nevzniká dostatečné množství thymidylátu, který je nezbytný pro

syntézu DNA a tvorbu erytrocytů. Ženy s deficitem folátů mají zvýšené riziko početí dítěte s rozštěpem neurální trubice. Riziko se snižuje prekoncepčním podáváním kyseliny listové [3], [4], [5] a [6].

2.2 Methylentetrahydrofolátreduktasa

Enzym methylentetrahydrofolátreduktasa (MTHFR) je tvořen 656 aminokyselinami a jeho molekulová hmotnost je 150 kD. Enzym je aktivní jako homodimer. Každá podjednotka nekovalentně váže FAD. Gen pro MTHFR se nachází na prvním chromosomu [7] a skládá se z jedenácti exonů [8].

MTHFR se účastní metabolismu folátů, viz obr. č. 2 (str. 7). Katalyzuje redukci N^5,N^{10}-methylen-THF za vzniku N^5-methyl-THF:

$$N^5,N^{10}\text{-methylen-THF} + NADPH + H^+ \leftrightarrow N^5\text{-methyl-THF} + NADP^+$$

Methyl z N^5-methyl-THF je přenesen na homocystein za vzniku THF a methioninu. THF je pak methylenován serinem za vzniku N^5,N^{10}-methylen-THF, čímž se kruh uzavírá. Methionin je v organismu uchováván ve formě S-adenosylmethioninu (SAM). Jeho vysoce reaktivní methylová skupina je biologicky důležitým methylačním činidlem. SAM bývá donorem methylu při syntéze fosfatidylcholinu z fosfatidylethanolaminu, při přeměně noradrenalinu na adrenalin nebo při methylaci DNA a proteinů. SAM rovněž allostericky reguluje aktivitu enzymu MTHFR.

Nedostatek nebo snížená aktivita enzymu MTHFR přispívá ke vzniku homocystinurie a hyperhomocystinemie. Homocystinurie je onemocnění primárně způsobené defektem cystathionbetasynthasy. Hyperhomocystinemie je autosomálně recesivní onemocnění projevující se řadou klinických symptomů (opožděný vývoj, vážná mentální retardace, úmrtí plodu, psychiatrické a neurodegenerativní poruchy). Hyperhomocystinemie bývá provázena nízkou koncentrací folátů v plazmě.

2.3 Polymorfismus MTHFR 677C/T

Polymorfismus v 677C/T v genu pro methylentetrahydrofolátreduktasu (MTHFR) identifikovali Frosst a kol. [9]. Substituce cytosinu za thymin v poloze 677 sekvence DNA vede k záměně alaninu za valin v poloze 222 proteinové sekvence enzymu MTHFR. Mutací se vytvoří místo rozpoznávané restrikční endonukleasou *Hinf*I z *Hemophilus influenzae*. Tato mutace je v katalytické doméně enzymu a je zodpovědná za syntézu termolabilní formy MTHFR. Polymorfismus způsobuje výrazný pokles katalytické aktivity enzymu (u homozygotů 677TT až o 70 % [9]). V séru homozygotů 677TT se potom nachází zvýšená koncentrace homocysteinu (hyperhomocystinemie) a naopak snížená koncentrace folátů. Proto je alela 677T potenciálně rizikový faktor vzniku kardiovaskulárních onemocnění [9].

2.3.1 Geografická a etnická distribuce polymorfismu MTHFR 677C/T

Geografickou a etnickou distribuci polymorfismu 677C/T studovali Wilcken a kol. [10]. Analyzovali genotyp 7000 novorozenců z šestnácti oblastí světa. Zjišťovali frekvenci výskytu mutované alely 677T:

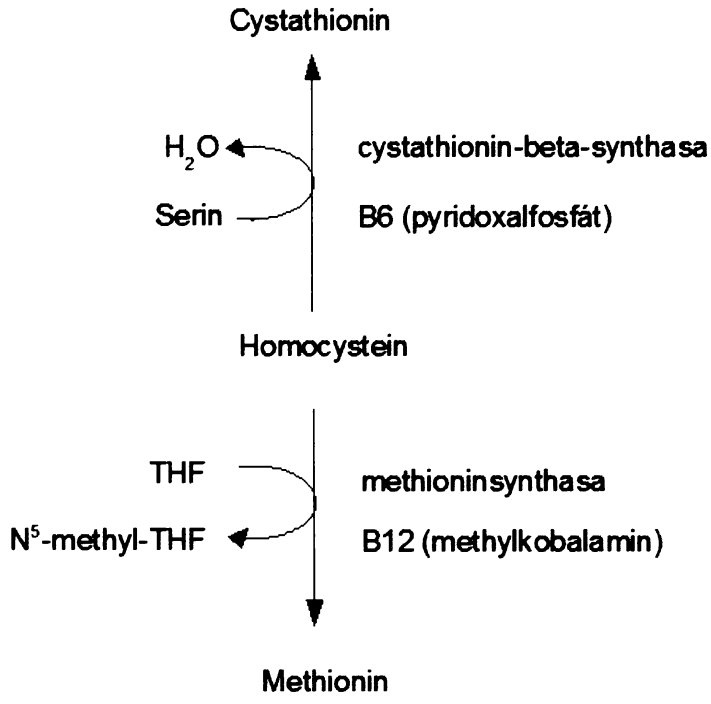
- Z geografického hlediska
  - 0,20 v severní Číně
  - 0,26 v jižní Itálii
  - 0,32 v Mexiku
  - v Evropě roste od severu k jihu
  - v Číně klesá od severu k jihu
- Z etnického hlediska
  - v černošské populaci je nízká
  - v evropské populaci je střední
  - v hispánské populaci je vysoká

Etnicky různou distribuci polymorfismu 677C/T potvrdili McAndrew a kol., kteří stanovili frekvenci výskytu alely T 0,30 u bělošské a 0,10 u černošské populace [11]. Podobné závěry učinili také Schneider a kol. [12].

2.3.2 Zdravotní komplikace spojené s polymorfismem MTHFR 677C/T

Hyperhomocystinemie

Hyperhomocystinemie je multifaktoriální onemocnění, projevující se zvýšenou koncentrací homocysteinu v plazmě (více než 15 μmol/l). Kromě polymorfismu MTHFR 677C/T k tomuto onemocnění přispívá defekt v cystathionbetasynthase a nedostatek vitaminu B12 (methylkobalaminu) a B6 (pyridoxalfosfátu), viz obr. č. 4. Podáváním nízkých dávek kyseliny listové pacientům s hyperhomocystinemií se zvýšená hladina homocysteinu v séru vrátí k normálním hodnotám [13], [14] a [15].



Obr. č. 4: Schéma metabolických přeměn homocysteinu

Zvýšená koncentrace homocysteinu v krevní plazmě je rizikovým faktorem vzniku kardiovaskulárních chorob. Motulsky [16] provedl metaanalýzu 27 relevantních publikací pojednávajících o hyperhomocystinemii. Závěrem zjistil, že homocystein je rizikový faktor arteriosklerosy a arteriothrombosy nesouvisející s hyperlipidemií, hypertensí, diabetem a nikotinismem. Toto potvrzují i další studie. Osoby s genotypem 677TT mají třikrát vyšší riziko předčasného vzniku kardiovaskulárních chorob [17]. Genotyp 677TT je častější

u pacientů trpících žilní thrombosou [18] a [19]. Polymorfismus 677C/T je rizikovým faktorem nemoci koronárních artérií [20] a [21].

Ženy trpící hyperhomocystinemií mají vyšší riziko opakovaných spontánních potratů [22], [23], [24] a [25]. V těchto případech dochází ke vzniku thrombů v placentě, čímž se omezí výživa embrya či plodu. Může dojít až k abrupci placenty (porušení placentárních vén a artérií).

Rozštěp neurální trubice

Lidé s genotypem 677TT mají vyšší riziko rozštěpu neurální trubice (NTD) [26] a [27]. Ou a kol. [28] udávají 7,2 x vyšší riziko NTD. Těhotné ženy nesoucí alelu 677T, mají vyšší riziko narození dítěte s NTD [27], [29] a [30]. Toto riziko se snižuje prekoncepčním podáváním kyseliny listové.

Relativní riziko vzniku rozštěpu neurální trubice u plodů matek 677TT homozygotních je asi dvakrát zvýšené proti plodům matek s normálním genotypem. Riziko se zvyšuje až pětkrát při nedostatku folátů. Genotyp otců se uplatňuje hlavně při kombinaci heterozygotní otec / homozygotní plod. Pokud jsou oba matka i plod homozygotní, je relativní riziko vzniku rozštěpu neurální trubice sedminásobné [31].

Etnický rozdíl ve frekvenci výskytu alely T potvrzuje studie van der Put a kol. [29], která udává výrazně nižší výskyt rozštěpu neurální trubice v černošské než bělošské populaci.

Preeklampsie

U žen zvyšuje přítomnost alely 677T pravděpodobnost vzniku preeklampsie (PEE) [32]. Studie Kobashi a kol. [33] tuto skutečnost nepotvrzuje kvůli různým příjmům kyseliny listové v dietě.

Spontánní potraty

Ke spontánním potratům v souvislosti s polymorfismem MTHFR 677C/T může dojít hned z několika důvodů:

- zvýšená koncentrace homocysteinu v plazmě a deficit folátů (thrombosa)
- preeklampsie (hypertense)
- defekt embrya či plodu (rozštěp neurální trubice)

V odpovědi na otázku do jaké míry ovlivňuje polymorfismus MTHFR 677C/T vznik spontánního potratu u žen se názory vědců rozcházejí. Jedni ze svých statistických studií vyvodili, že přítomnost alely 677T u žen riziko spontánních potratů zvyšuje [23], [34] a [35]. Jiní s tímto závěrem nesouhlasí. Například proto, že každá žena má různý příjem kyseliny listové ve stravě. Dostatečný příjem kyseliny listové může výrazně zmírnit zdravotní komplikace spojené s genotypem 677TT [36]. Podle některých dalších studií [37], [38], [39] a [40] nebyla nalezena žádná statisticky významná závislost mezi výskytem alely 677T a vznikem spontánního potratu v důsledku zvýšeného rizika thrombosy u vyšetřovaných žen.

Downův syndrom

Frekvence výskytu alely 677T je vyšší u osob postižených Downovým syndromem (DS) než u zdravých jedinců [41]. Matky dětí s DS mají častěji alelu 677T než matky dětí tímto syndromem nepostižených [42], [43]. Toto nepotvrzuje studie Boduroglu a kol. [44].

Poruchy methylace DNA

Homozygoté 677TT v genu pro methylentetrahydrofolátreduktasu jsou náchylnější k nemocem souvisejícím s hypomethylací DNA (abnormální methylace DNA je často spojena s procesem karcinogeneze) [45]. Hypomethylace DNA bývá způsobena pomalou přeměnou homocysteinu na methionin, který ve formě S-adenosylmethioninu slouží jako methylační činidlo DNA. Methylentetrahydrofolátreduktasa je jedním z regulačních enzymů methylace homocysteinu za vzniku methioninu, viz obr. č. 2 (str. 7).

2.4 Polymorfismus MTHFR 1298A/C

Van der Put a kol. [46] identifikovali polymorfismus v genu pro methylentetrahydrofolátreduktasu (MTHFR) v poloze 1298. V tomto místě dochází k záměně adeninu za cytosin v DNA sekvenci enzymu, což způsobuje substituci kyseliny glutamové za alanin v pozici 429 v sekvenci proteinu. Frekvence výskytu alely 1298C je asi 0,33. Mutací zanikne místo, které rozpoznává restrikční endonukleasa *Mbo*II z *Moraxella bovis*. Polymorfismus se nachází v předpokládané regulační doméně enzymu [46] a [47]. Přítomností mutace sice klesá katalytická aktivita MTHFR, ale nedochází ke zvýšení hladiny homocysteinu v séru [46], [47], [48]. Polymorfismus 1298A/C je rovněž

jako 677C/T považován za thrombofilní faktor a klinicky se zjišťuje přítomnost rizikového genotypu u osob, u kterých se vyskytla žilní thrombosa nebo u osob s dědičnými dispozicemi k tomuto onemocnění.

2.5 Kombinovaný výskyt polymorfismů MTHFR 677C/T a 1298A/C

Yamada a kol. [49] použili bakulovirový expresní systém k přípravě lidského rekombinantního enzymu MTHFR. Enzym připravili ve čtyřech formách. Poprvé byl v poloze 222 proteinové sekvence zařazen valin (to odpovídá genotypu 677T). Podruhé byl v poloze 429 zařazen alanin (to odpovídá genotypu 1298C). Potřetí byl připraven enzym, který nesl současně v poloze 222 valin a v poloze 429 alanin. Počtvrté připravili enzym divokého typu (nemutovaný). Všechny čtyři proteiny pak byly biochemicky charakterizovány. Protein mutovaný v pozici 429 proteinové sekvence měl biochemické vlastnosti neodlišitelné od divokého typu. Protein mutovaný v pozici 222 proteinové sekvence byl náchylnější k disociaci na monomery (divoký typ enzymu je homodimerní). Při této disociaci byl rovněž uvolněn z podjednotek FAD a enzym tak ztratil svou katalytickou aktivitu. Protein s oběma mutacemi zároveň neměl žádné další biochemické charakteristiky odlišné od proteinu mutovaného v poloze 222 proteinové sekvence.

Teoreticky existuje devět různých kombinací genotypů:

- 677CC a 1298AA – zdravý homozygot v obou polymorfismech → žádná mutace
- 677CT a 1298AA – heterozygot v polymorfismu 677, zdravý homozygot v polymorfismu 1298 → jedna mutace
- 677CC a 1298AC – zdravý homozygot v polymorfismu 677, heterozygot v polymorfismu 1298 → jedna mutace
- 677TT a 1298AA – mutovaný homozygot v polymorfismu 677, zdravý homozygot v polymorfismu 1298 → dvě mutace
- 677CC a 1298CC – zdravý homozygot v polymorfismu 677, mutovaný homozygot v polymorfismu 1298 → dvě mutace
- 677CT a 1298AC – složený heterozygot → dvě mutace

- 677TT a 1298AC – mutovaný homozygot v polymorfismu 677, heterozygot v polymorfismu 1298 → tři mutace
- 677CT a 1298CC – heterozygot v polymorfismu 677, mutovaný homozygot v polymorfismu 1298 → tři mutace
- 677TT a 1298 CC – mutovaný homozygot v obou polymorfismech → čtyři mutace

Genotypové kombinace obsahující tři a čtyři mutace nebyly nalezeny ve vzorcích DNA živě narozených jedinců, dle studie Isolato a kol. [50]. Z toho se usuzuje, že zvyšující se množství mutovaných alel MTHFR 677T a 1298C snižuje životaschopnost plodu nesoucího tyto mutace.

Volcik a kol. [51] zkoumali současný výskyt polymorfismů 677C/T a 1298A/C u 808 osob hispánské populace, u 482 osob americké populace evropského původu a u 121 osoby kanadské populace evropského původu. Pouze v hispánské populaci nalezli jedinou ženu nesoucí genotypovou kombinaci 677TT a 1298CC (za zmínku stojí, že potomci této ženy se rodili s rozštěpem neurální trubice). Současný výskyt genotypové kombinace se třemi mutacemi (677TT a 1298AC nebo 677CT a 1298CC) byl velice výjimečný ve všech třech zkoumaných populacích.

Zetterberg a kol. [52] zkoumali DNA ze vzorků tkání embryí potracených mezi 6. a 12. týdnem těhotenství. 95% vzorků neslo aspoň jednu mutaci. Genotyp se třemi nebo čtyřmi mutacemi nebyl vůbec nalezen. Z toho se usuzuje, že přítomnost jedné a více mutací v pozicích 677 a 1298 sekvence DNA enzymu MTHFR může být škodlivá v průběhu embryonálního vývoje.

Obecně platí, že oba polymorfismy snižují enzymovou aktivitu MTHFR [9], [46] a [49]. Zdá se, že míra poškození funkce enzymu je stejná u složených heterozygotů jako u homozygotů 677TT [46]. U složených heterozygotů je enzymová aktivita MTHFR redukována až o 50% [46], [47].

2.6 Komplikace gravidity

2.6.1 Preeklampsie

Preeklampsie (PEE) je závažná komplikace gravidity, vyskytuje se u 3-5 % těhotných žen. Většina případů nastává při prvním těhotenství. Preeklampsie je nižší stupeň choroby zvané eklampsie. Eklampsie je nejtěžší forma těhotenské toxikosy, vzniká v poslední fázi těhotenství nebo při porodu. Hlavními příznaky eklampsie jsou záchvaty tonicko-klonických křečí, zúžení zornic a hyperreflexie (zvýšená dráždivost motorických nervů). U těhotných dochází v důsledku velkého zvýšení krevního tlaku k plicnímu a mozkovému edému, selhání srdce a ledvin, odchlípení sítnice, intracerebrálnímu krvácení a hypertonu dělohy. Plod je hypoxický a může dojít až k abrupci placenty. Jediným řešením je ukončení těhotenství císařským řezem.

Preeklampsie se projevuje edémy, proteinurií (nad 300 mg / 24 h) a hypertensí (krevní tlak nad 149/90 mm Hg nebo vzestup tlaku o více než 30/15 mm Hg oproti době před těhotenstvím či oproti prvnímu trimestru). Jednotlivé příznaky se mohou vyvíjet postupně. Mezi minoritní příznaky patří bolesti hlavy, spavost, mdloby, poruchy vidění, bolesti uší, známky placentární insuficience až abrupce placenty, rostoucí hematokrit (poměr červených krvinek k plazmě) a hemolýza. Vysoký krevní tlak narušuje normální funkci cévní výstelky. To vede k aktivaci koagulačního procesu a k thrombosám. Obecné informace o průběhu a patologii preeklampsie byly převzaty z [53].

Cross [54] uvedl, že preeklampsie může být iniciována třemi na sobě nezávislými mechanismy:

- u matky dříve existující hraniční hypertense, která je obnovená těhotenstvím
- v oběhu matky je rostoucí hladina angiotensinu II díky placentární nadprodukci reninu
- patologie placenty

Preeklampsie v počátečním stádiu lze léčit podáváním příslušných medikamentů. V pokročilém stádiu je často nutné ukončit těhotenství a poté ještě pokračovat ve snižování krevního tlaku a léčení proteinurie. Preeklampsie, či eklampsie, jsou nejčastější příčinou úmrtí těhotných v lékařsky vyspělých zemích.

Preeklampsie je pravděpodobně do určité míry dědičná. Soudí se tak proto, že je častější u žen, jejichž matky preeklampsii prodělaly. Je zajímavé, že na vzniku preeklampsie se zcela určitě podílejí i otcovské geny plodu. Je prokázáno, že těhotenství s mužem, který se narodil matce trpící preeklampsií, zvyšuje riziko vzniku preeklampsie [55], [56] a [57]. Zatím bohužel nejsou geny zodpovědné za dědičnost preeklampsie známy.

2.6.2 Spontánní potrat

Potrat je obvykle definován jako vypuzení plodu z dělohy, který nedosáhl schopnosti extrauterinního života. Potrat může být samovolný (spontánní, *abortus spontaneus*) nebo indukovaný (terapeutický, *abortus inductus*). Spontánní potrat pak může být způsoben defekty plodového vejce, problémy na straně matky nebo patologickým spermiogramem otce.

- Příčiny spontánního potratu způsobené defekty plodového vejce:

Téměř 40 % potracených plodů je abnormálních – strukturální defekty (rozštěp neurální trubice), chromosomální odchylky (Downův syndrom), genetické choroby. Takto postižené plody bývají potraceny v prvním trimestru. Další příčinou spontánního potratu bývá nízká implantace placenty (abortus ve druhém trimestru). V dalším průběhu těhotenství můžou být příčinou potratu cévní poruchy v placentě.

- Příčiny spontánního potratu způsobené problémy na straně matky:

Častými příčinami spontánního potratu bývají hormonální poruchy v organismu matky nebo těhotenský diabetes mellitus. Mezi další pří příčiny abortů patří malformace, záněty a nádory dělohy nebo inkompetence děložního hrdla (děložní hrdlo je dilatováno). Všechny defekty dělohy vytváří nevhodné podmínky pro nidaci plodového vejce a velmi brzy dochází k potratům. V neposlední řadě k spontánním potratům přispívají také onemocnění, infekce, případné otravy a traumata, která matka v průběhu těhotenství i před ním prodělala. V tomto výčtu nesmí být opomenuty imunologické faktory, mezi které patří např. Rh faktor a Rh-izoimunizace.

Stav, kdy žena potrácí třikrát či vícekrát za sebou se označuje jako potrat habituální. Vyskytuje se asi u 1 % těhotných. Riziko dalšího potratu u ženy, která již tři potraty prodělala, je 30 – 70 %. Informace o patologii spontánního potratu byly převzaty z [53].

3 Cíle diplomové práce

- Zavedení genotypizace mutací 677C/T a 1298A/C genu pro methylentetrahydrofolátreduktasu metodou „real-time“ PCR s detekční metodou fluorescenčního resonančního energetického transferu (FRET).

- Stanovení frekvence výskytu sledovaných genotypů v porovnání s frekvencemi stanovenými v obecné populaci České Republiky.

- Ověření existence statisticky významné závislosti mezi frekvencí výskytu mutací genu pro methylentetrahydrofolátreduktasu a výskytem komplikací gravidity ve sledovaných souborech.

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie, přístroje, biologický materiál

4.1.1 Chemikálie

chemikálie	**Výrobce, země (město)**
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, USA
dNTP (10 mM roztok)	MBI Fermentas, Litva
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Penta, ČR
Ethidium bromid	Sigma-Aldrich, USA
FRET Sonda 1298Cy5	Biosearch Technologies, USA
FRET Sonda 1298JOE	Biosearch Technologies, USA
FRET Sonda akceptor pro 677C/T	Biosearch Technologies, USA
FRET Sonda donor pro 677C/T	Biosearch Technologies, USA
Glycerol	Penta, ČR
*Hinf*I (10 U/µl)	MBI Fermentas, Litva
Deionizovaná voda	Biotika, Slovenská Republika
Izolační kit NucleoSpin Blood	Macherey-Nagel, SRN
KCl	Penta, ČR
KH_2PO_4	Penta, ČR
Kyselina boritá	Penta, ČR
*Mbo*II (5 U/µl)	MBI Fermentas, Litva
$MgCl_2$ (25 mM roztok)	MBI Fermentas, Litva
$Na_2HPO_4 . 12H_2O$	Penta, ČR
NaCl	Penta, ČR
PCR primer F pro 1298A/C	VBC-Genomics, SRN
PCR primer F pro 677C/T	VBC-Genomics, SRN
PCR primer R pro 1298A/C	VBC-Genomics, SRN

PCR primer R pro 677C/T	VBC-Genomics, SRN
Pufr B+ (10x koncentrovaný)	MBI Fermentas, Litva
Pufr R+ (10x koncentrovaný)	MBI Fermentas, Litva
„Real-time" PCR primer F pro 1298A/C	VBC-Genomics, SRN
„Real-time" PCR primer F pro 677C/T	VBC-Genomics, SRN
„Real-time" PCR primer R pro 1298A/C	VBC-Genomics, SRN
„Real-time" PCR primer R pro 677C/T	VBC-Genomics, SRN
RedTaq DNA Polymerasa (D 5684)	Sigma-Aldrich, USA
RedTaq PCR pufr	Sigma-Aldrich, USA
Tag DNA polymerasa	MBI Fermentas, Litva
Taq PCR pufr	MBI Fermentas, Litva
TopVision LE GQ Agarose	MBI Fermentas, Litva
Tris - HCl	Serva, SRN
Xylene cyanole FF	Sigma-Aldrich, USA

4.1.2 Použité roztoky a pufry

PBS pufr, pH 7,4

150 mM NaCl

10 mM Na_2HPO_4

2 mM KH_2PO_4

2 mM KCl

Pufr B+, pH 7,5

10 mM Tris-HCl

10 mM $MgCl_2$

0,1 mg/ml BSA

Pufr R+, pH 8,5

10 mM Tris-HCl

10 mM $MgCl_2$

100 mM KCl

0,1 mg/ml BSA

RedTaq PCR pufr, pH 8,3

100 mM Tris-HCl

500 mM KCl

11 mM $MgCl_2$

0,1% gelatin

Taq PCR pufr, pH 8,8

750 mM Tris-HCl

200 mM $(NH_4)_2SO_4$

0,1 % Tween 20

TBE pufr, pH 8

90 mM Tris-borát

2 mM EDTA

TE pufr, pH 8

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

DNA gel loading buffer, pH 8 (10 x koncentrovaný)

0,21 % bromfenolová modř

0,21 % xylene cyanole FF

0,2 M EDTA

50 % glycerol

4.1.3 Přístroje

Přístroj	**Výrobce, země**
Microcentrifuga Micro 20	Hettich Zentrifugen, SRN
Rotor Gene RG 2000	Corbett Research, Austrálie
Termocycler T-personal combi	Biometra, SRN
Předvážky P3/200	Chirana, ČSR
Zařízení pro horizontální elektroforézu (Easy Cast Electrophoresis System B1)	Owl Scientific, USA

Zdroj k elektroforéze PP3000	Biometra, SRN
Vortex reax top	Heidolph, SRN
Mrazící box (-20°C)	Bosch, SRN
Dry Bath Incubator MD-01	Major Science, USA
Biological termostat BT120	Ekom Polná, ČSR
UV transiluminátor TFX-20-M	Vilber Lourmat, Francie
Chladnička	Liebherr, SRN
Digitální fotoaparát DC120 Zoom	Estman Kodak Copany, Japonsko

4.1.4 Údaje o původu biologického materiálu

Analyzované soubory tvořily ženy, které byly v průběhu let 2000 až 2004 hospitalizovány na Gynekologicko-porodnické klinice FN v Plzni z důvodů komplikací gravidity. Souhlas s jejich vyšetřováním byl dán Etickou komisí FN Plzeň. Pacientky byly oslovovány průběžně v roce 2004, jak byly hospitalizované. Pacientky hospitalizované v letech 2000 až 2003 byly kontaktovány prostřednictvím dopisu, viz příloha č. 2 (str. 59). Pokud souhlasily s účastí v našem výzkumném záměru, byly pozvány k odběru krve na Ústav lékařské genetiky nebo jim byl zaslán odběrový set určený ke stěru sliznice ústní dutiny, viz příloha č. 3 (str. 60) a příloha č. 4 (str. 61). Stěr ústní sliznice si pacientky provedly sami a poté odeslaly set zpátky. Bylo rozesláno 176 dopisů. Na písemnou žádost o účast ve výzkumném záměru zareagovalo 49 žen, z toho 45 kladně. Všechny ženy byly seznámeny s průběhem a záměrem výzkumu a podepsaly informovaný souhlas s analýzou své DNA, viz příloha č. 5 (str. 62).

4.1.5 Analyzované soubory žen, které prodělaly preeklampsii, a žen opakovaně potrácejících

U všech žen zařazených do souboru PEE byla stanovena diagnóza preeklampsie. To znamená, že pacientky trpěly v průběhu těhotenství hypertensí (krevní tlak nad 149/90 mm Hg nebo vzestup tlaku o více než 30/15 mm Hg oproti době před těhotenstvím či oproti prvnímu trimestru) a proteinurií (koncentrace proteinů v moči nad 300 mg / 24 h).

Do souboru SP byly zařazeny habituálně potrácející ženy. Zařazovacím kritériem byly dva a více spontánní potraty do 20. týdne těhotenství nebo jeden potrat po 20. týdnu

těhotenství. Vyřazeny byly všechny ženy, u kterých byla zjištěna nějaká zjevná příčina opakovaných spontánních potratů, jako malformace, záněty a nádory dělohy, inkompetence děložního hrdla, hormonální poruchy v organismu ženy, závažná onemocnění a infekce (diabetes mellitus, toxoplasmosa, listeriosa, syphilis atd.). Vyřazeny byly také ženy, které potratily plodové vejce se strukturálními defekty (např. rozštěpem neurální trubice), chromosomálními odchylkami (např. Downovým syndromem) nebo genetickými chorobami.

4.2 Metody

4.2.1 Izolace genomické DNA

Venózní krev byla odebrána vakuovou venepunkcí do zkumavek s EDTA (1,6 mg draselné soli EDTA na 1 ml krve) a skladována při teplotě + 4°C maximálně dva dny. Do té doby byla provedena izolace genomické DNA. Buňky ze stěru sliznice ústní dutiny byly skladovány v PBS pufru.

K izolaci genomické DNA byl použit komerčně dostupný kit NucleoSpin Blood [58]. Tato izolace je založena na interakci DNA s membránou obsahující křemičité ionty.

Lyze krevních buněk / buněk ústní sliznice:

inkubace 15 min při 70°C s proteinasou K a pufrem B3

Přidán 96 % ethanol

Přenesení obsahu mikrozkumavky na kolonku s membránou

Centrifugace 60 s při 11000 g:

filtrát vyhozen

kolonka přendána do nové mikrozkumavky

Přidán promývací pufr BW

Centrifugace 60 s při 11000 g:

filtrát vyhozen

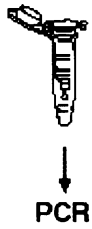
kolonka přendána do nové mikrozkumavky

Přidán promývací pufr B5

Centrifugace 120 s při 11000 g:

filtrát vyhozen

kolonka přendána do sterilní mikrozkumavky



Přidán mírně alkalický eluční BE pufr

Inkubace 2 min při 70°C

Centrifugace 60 s při 11000 g:

filtrát uschován

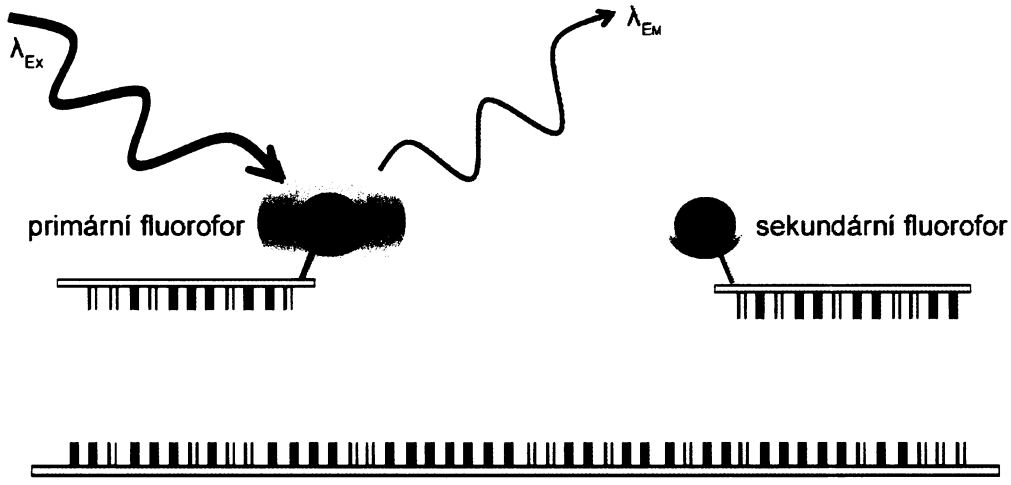
V elučním pufru byla DNA skladována při - 20°C do doby dalšího použití. Izolací z plné krve bylo získáno maximálně 4 – 6 μg DNA. Izolací z buněk ústní sliznice bylo získáno menší množství DNA, protože koncentrace vzorku DNA závisela na tom, jak pečlivě která z oslovených žen stěr ústní sliznice provedla.

4.2.2 Metody analýzy genotypů

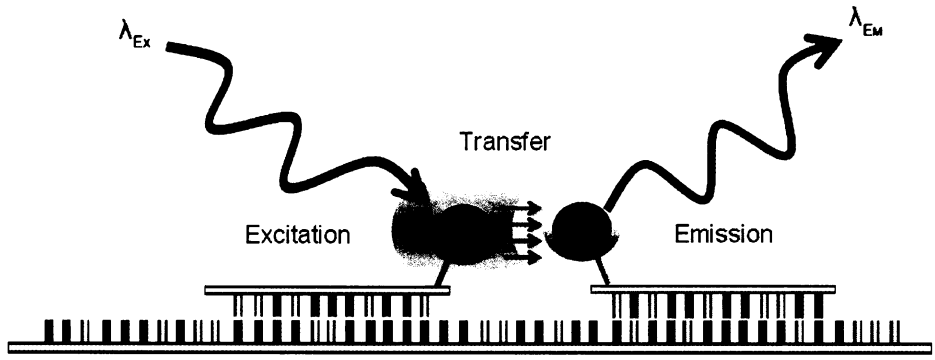
Pro analýzu genotypu DNA vzorků izolovaných z venózní krve byla použita metoda „real-time" PCR s fluorescenční detekcí (metoda fluorescenčního resonančního energetického transferu, FRET). Metoda „real-time" PCR s FRET detekcí je velice přesná, poměrně rychlá a hodí se pro analýzu velkého množství vzorků. Tato metoda ale nebyla vhodná pro analýzu genotypů vzorků DNA izolovaných z buněk ústní sliznice. Vzorky DNA izolované z buněk ústní sliznice byly poměrně málo koncentrované. Metoda „real-time" PCR s FRET detekcí není pro tak malá množství DNA příliš citlivá z důvodu přítomnosti oligonukleotidů fluorescenčních sond v reakčním roztoku. Tyto oligonukleotidy potom ruší průběh polymerasové reakce. Proto byla pro analýzu genotypu DNA izolované ze stěru sliznice ústní dutiny použita metoda klasické polymerasové řetězové reakce s následným restrikčním štěpením, metoda délkového polymorfismu restrikčních fragmentů (RFLP).

4.2.3 „Real-time“ PCR s fluorescenční detekcí

Při „real-time“ PCR se průběh amplifikace sleduje v reálném čase, například pomocí fluorescenčních sond metodou fluorescenčního resonančního energetického transferu (FRET). Tato metoda je založena na vzdálenosti závislé interakci mezi dvěma fluorofory navázanými na dva oligonuklotidové řetězce. Jedna ze sond je označena primárním fluoroforem na 3´ konci prvního oligonukleotidu, druhá sekundárním fluoroforem na 5´ konci druhého oligonukleotidu. V okamžiku, kdy sondy hybridizují s komplementárními sekvencemi vlákna DNA, dostávají se sondy do vzájemné těsné blízkosti (obvykle 10 – 100 Å). Primární fluorofor je excitován světlem o určité vlnové délce a emituje světlo s delší vlnovou délkou, která excituje sekundární fluorofor. Následně sekundární fluorofor emituje světlo, které má opět delší vlnovou délku, viz obr. č. 5 a 6 (str. 27). Jako sekundární fluorofor se používá např. molekula Cy5 (N,N'-biscarboxypentyl-5,5'-disulfonatoindodicarbocyanine), která je schopna pohltit fluorescenční signál emitovaný primárním fluoroforem. Výsledkem je, že hybridizace takových dvou sond s vláknem DNA vede ke snížení fluorescenčního signálu. V tabulce č. 1 (str. 27) jsou uvedeny použité fluorofory.



Obr. č. 5: Excitace primárního fluoroforu



Obr. č. 6: Excitace sekundárního fluoroforu

		excitační vlnová délka λ_{Ex} (nm)	emitovaná vlnová délka λ_{Em} (nm)
primární fluorofor pro detekci polymorfismu 677C/T	FAM[1)]	495	520
primární fluorofor pro detekci polymorfismu 1298A/C	JOE[2)]	520	548
sekundární fluorofor	Cy5[3)]	647	667

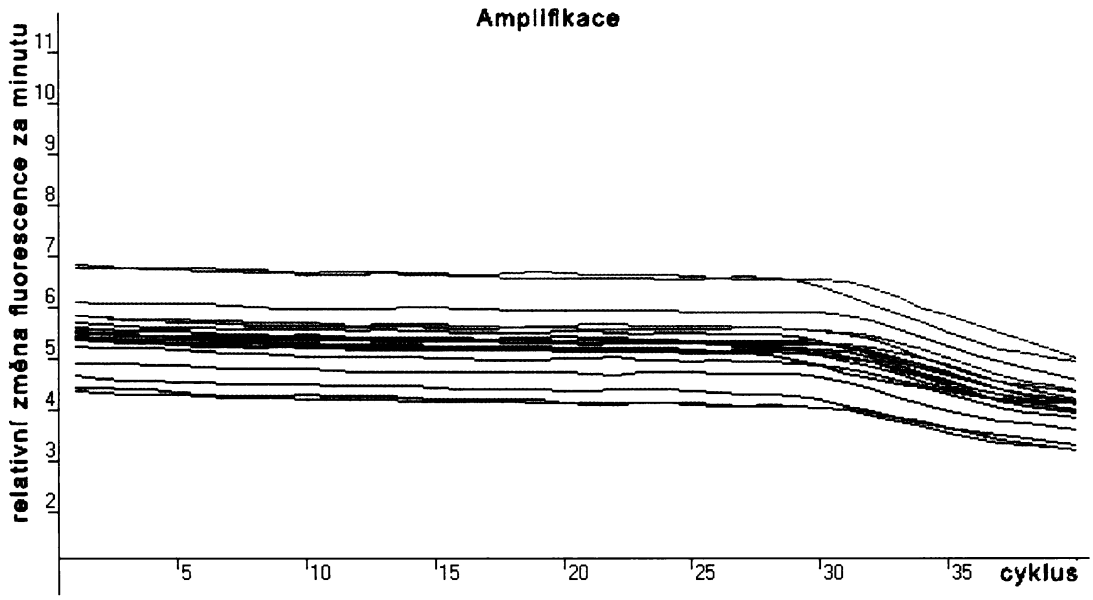
[1)] *5(6)-carboxyfluorescein*

[2)] *6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein*

[3)] *N,N'-biscarboxypentyl-5,5'-disulfonatoindodicarbocyanine*

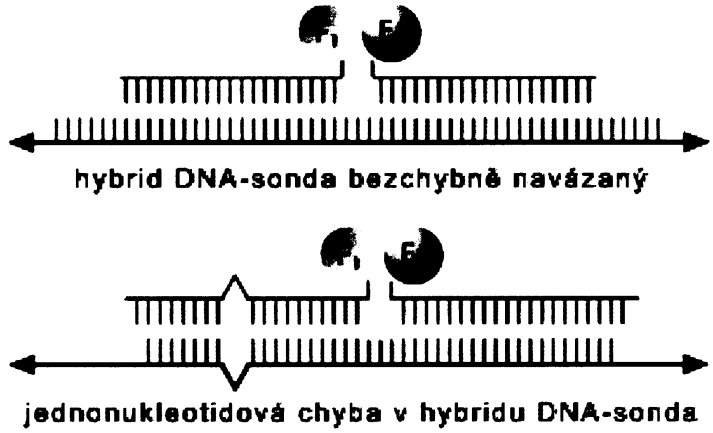
Tab. č. 1: Použité fluorofory

Průběh polymerasové řetězové reakce se sleduje měřením vlnové délky λ_{Em} fluorescenčního záření primárního fluoroforu. S narůstajícím počtem cyklů PCR tedy klesá fluorescence, protože všechny sondy jsou navázány na DNA a všechno záření λ_{Em} primárních fluoroforů je absorbováno sekundárními fluorofory, viz obr.č. 8 (str. 28).



Obr. č. 8: Amplifikace úseku DNA při „real-time" PCR – při narůstajícím počtu cyklů klesá fluorescence, protože všechny sondy jsou navázány na DNA a všechno záření λ_{Em} primárních fluoroforů je absorbováno sekundárními fluorofory

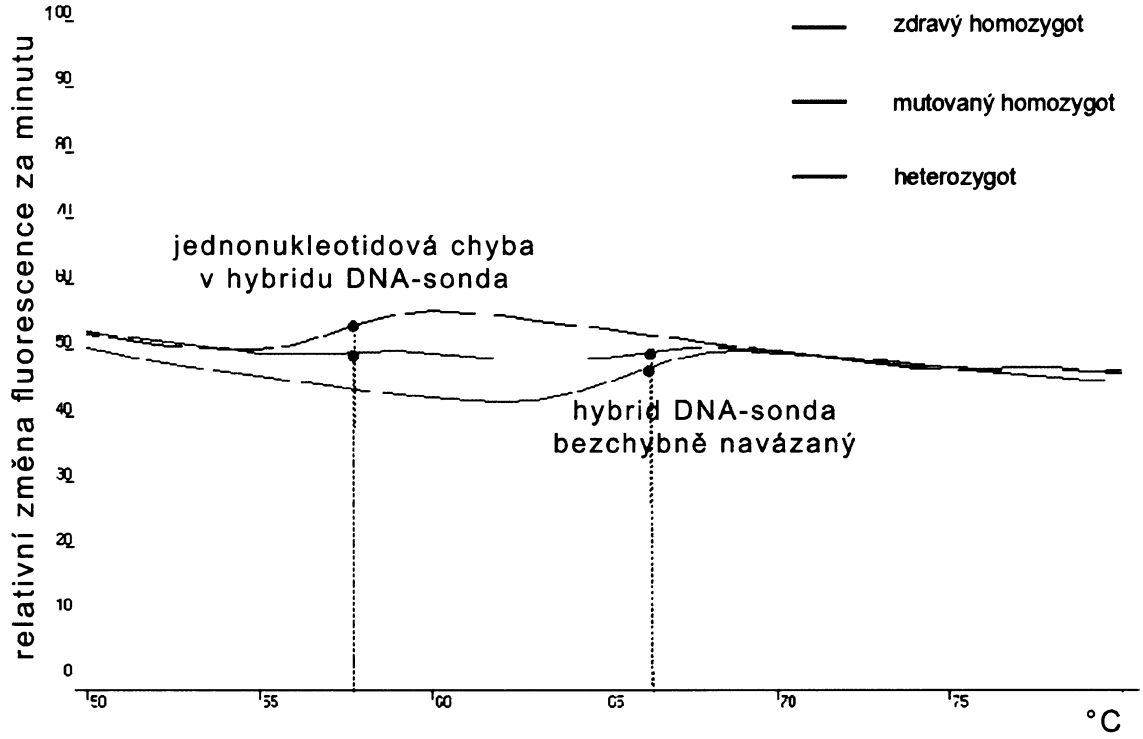
Po amplifikaci se provádí analýza tání hybridu DNA-sonda. Při tání, denaturaci, hybridu DNA-sonda dojde k nárůstu fluorescence. Mutace v kterémkoliv místě DNA, kde se sondy váží, snižuje stabilitu hybridu DNA-sonda a vede ke snížení teploty tání tohoto hybridu, viz obr. č. 9.



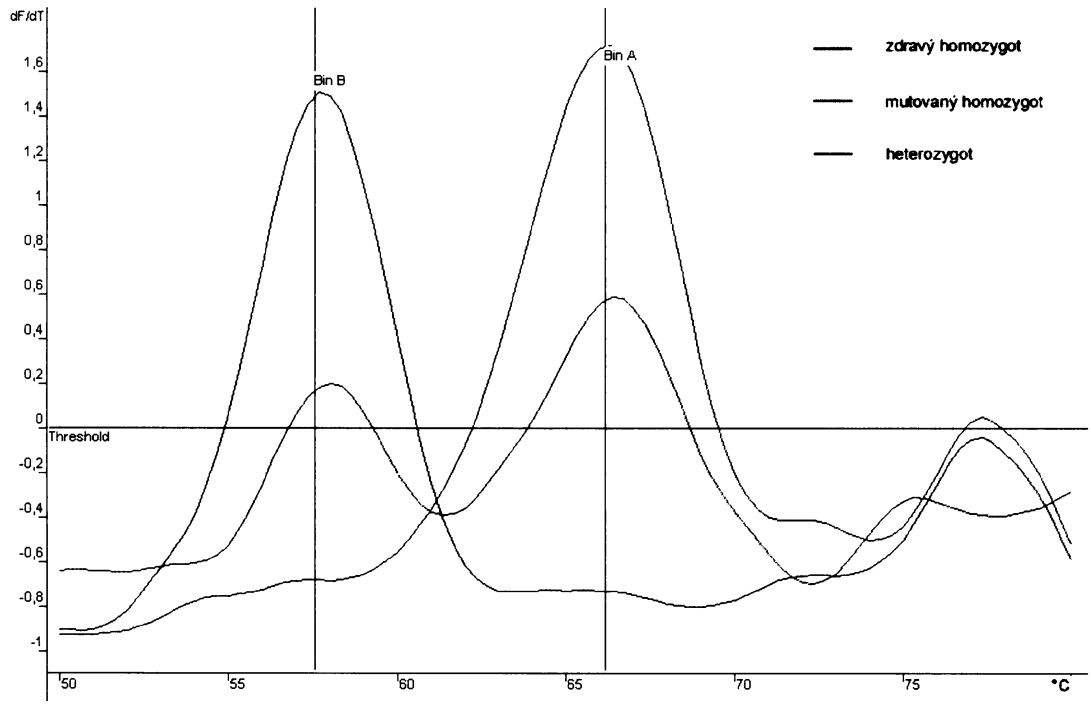
Obr. č. 9: Hybridizace fluorescenčně značených sond s vláknem DNA

V případě polymorfismů MTHFR 677C/T a 1298A/C odpovídá hybrid DNA-sonda s jednonukleotidovou chybou genotypu 677T, resp. 1298C. Obsahuje-li vlákno DNA

mutaci, sonda k němu není plně komplementární a hybrid DNA-sonda denaturuje při nižší teplotě, viz obr. č. 10. Z první derivace závislosti relativní změny fluorescence na teplotě tání hybridu DNA-sonda (dF/dT) jsou pak zřetelné jednotlivé genotypy (závislost relativní změny fluorescence na teplotě, tj. křivka tání hybridu DNA-sonda viz obr. č. 10, první derivace viz obr. č. 11 na str. 30). Křivka, která má maximum při nižší teplotě náleží hybridu DNA-sonda s jednonukleotidovou chybou (v DNA vláknu je mutace 677T, resp. 1298C). Křivka s maximem při vyšší teplotě náleží hybridu DNA-sonda, který je přesně navázaný (DNA vlákno není mutováno), viz obr. č. 11 (str. 30).



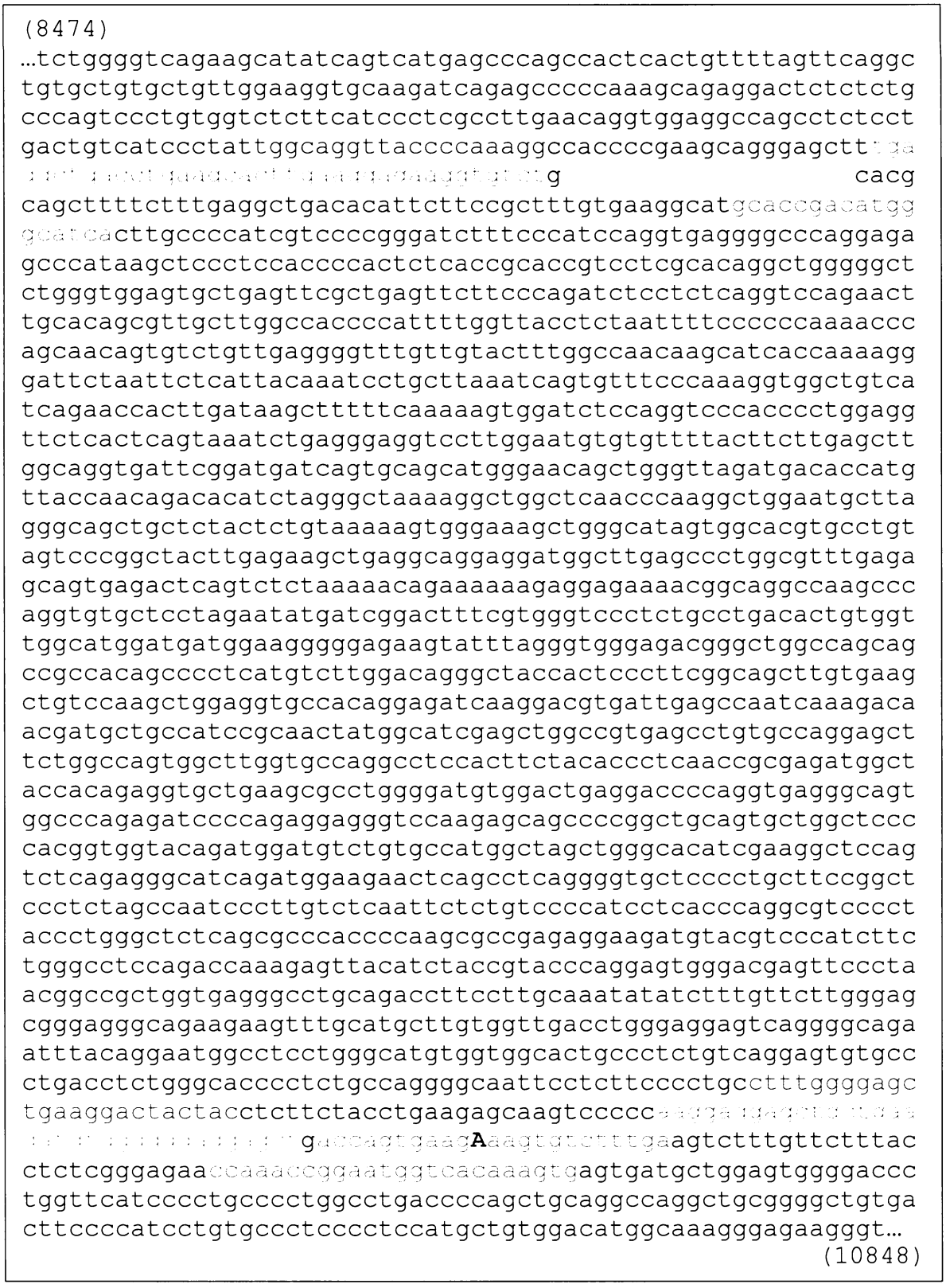
Obr. č. 10: Denaturace hybridu DNA-sonda při analýze tání tohoto hybridu – obsahuje-li vlákno DNA mutaci, sonda k němu není plně komplementární a hybrid DNA-sonda denaturuje při nižší teplotě, denaturace se projeví nárůstem fluorescence



Obr. č. 11: První derivace závislosti relativní změny fluorescence na teplotě tání hybridu DNA-sonda (dF/dT)

Sekvence genu pro MTHFR, primery pro „real-time" PCR, fluorescenčně značené sondy

Metodou „real-time" PCR s fluorescenční detekcí byly amplifikovány úseky DNA obsahující polymorfismy MTHFR 677C/T a 1298A/C. Celý gen tvoří 15835 párů basí. Na obrázku č. 12 (str. 31) je znázorněna část sekvence DNA genu pro MTHFR obsahující zkoumané polymorfismy [59]. Barevně jsou označena místa, na která se vážou primery a fluorescenční sondy pro jednotlivé PCR produkty. Místo polymorfismů je označeno velkým písmenem. Sekvence primerů a sond jsou uvedeny v tabulce č. 2, resp. 3 (str. 32).



Obr. č. 12: Část sekvence genu pro MTHFR – barevně jsou vyznačeny primery pro „real-time" PCR a fluorescenčně značené sondy, místa polymorfismů jsou psána velkým písmenem

(pozn.: barevné značení primerů a sond viz tab. č. 2 resp. tab. č. 3, str. 32)

primer	*sekvence*
Polymorfismus 677C/T - Forward	5´ tggcaggttaccccaaagg 3´
Polymorfismus 677C/T - Reverse	5´ tgatgccccatgtcggtgc 3´
Polymorfismus 1298A/C - Forward	5´ ctttggggagctgaaggactactac 3´
Polymorfismus 1298A/C - Reverse	5´ cactttgtgaccatttcgggtttg 3´

Tab. č. 2: Sekvence primerů, použitých při „real-time" PCR

(pozn. stejné barevné označení primerů je použito v obrázku č. 12 na straně 31)

sonda	*fluorofor*	*sekvence*
Polymorfismus 677C/T	FAM	5´ tgaggctgacctgaagcacttgaaggagaaggtgtct 3´ – FAM
Polymorfismus 677C/T	Cy5	Cy5 – 5´ cgggagccgatttcattcat 3´
Polymorfismus 1298A/C	JOE	5´ aaggaggagctgctgaagatggtgggggaggagct 3´ – JOE
Polymorfismus 1298A/C	Cy5	Cy5 – 5´ accagtgaagaaagtgctttga 3´

Tab. č. 3: Fluorescenčně značené sondy použité při „real-time" PCR

(pozn. stejné barevné označení sond je použito v obrázku č. 12 na straně 31)

Stanovení genotypů polymorfismů 677C/T a 1298A/C metodou „real-time" PCR s fluorescenční detekcí

Do sterilních mikrozkumavek byly pipetovány reagencie pro polymerasovou řetězovou reakci a nakonec byl do každé mikrozkumavky přidán odpovídající vzorek DNA ze zkoumaných souborů žen s komplikacemi gravidity (DNA izolované z krve). Tabulka č. 4 (str. 33) udává složení reakčních roztoků pro množení úseků DNA obsahující polymorfismy MTHFR 677C/T a 1298A/C. Mikrozkumavky byly umístěny do PCR cykleru Rotor Gene 2000. Tabulka č. 5 (str. 33) popisuje podmínky, které byly pro polymerasovou řetězovou reakci nastaveny.

	polymorfismus 677C/T	*polymorfismus 1298A/C*
reagencie	*objem* (µl)*	*objem* (µl)*
deionizovaná voda	102,5	87,5
Taq PCR pufr (1 x)	25,0	25,0
chlorid hořečnatý (25 mM)	25,0	25,0
dNTP (10 mM)	5,0	5,0
DMSO (5 % v/v)	12,5	12,5
primer F (1 µM**)	20,0	20,0
primer R (6 µM**)	20,0	20,0
FRET sonda donor (5 µM***)	7,5	15,0
FRET sonda akceptor (5 µM***)	7,5	15,0
Taq DNA Polymerasa (5 U / 1 µl)	5,0	5,0
DNA (30 ng/µl)	á 2,0	á 2,0

Tab. č. 4: Složení reakčních roztoků pro množení úseků DNA obsahující polymorfismy MTHFR 677C/T a MTHFR 1298A/C

**uvedená množství odpovídají objemům reakčních roztoků na 10 vzorků*

*** primery jsou dodávány lyofilizované a rozpouští se v deionizované vodě*

**** fluorescenční sondy jsou dodávány lyofilizované a rozpouští se v TE pufru*

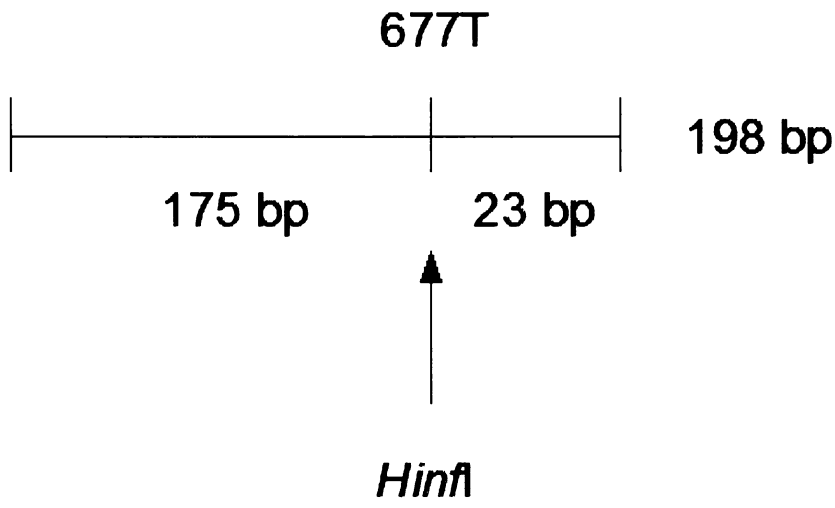
	polymorfismus 677C/T		*polymorfismus 1298A/C*	
úvodní denaturace	*95°C*	*120 s*	*95°C*	*120 s*
cyklická reakce (40 x)	*95°C*	*10 s*	*95°C*	*10 s*
	55°C	*20 s*	*55°C*	*20 s*
	72°C	*10 s*	*72°C*	*10 s*
denaturace	*95°C*	*10 s*	*95°C*	*10 s*
hybridizace sond na DNA	*45°C*	*20 s*	*45°C*	*20 s*
analýza teplot tání hybridu DNA-sonda	*zvyšování teploty 50°C → 80°C (po 1°C), při 1. kroku vyčkat 10 s, při dalších 5 s*		*zvyšování teploty 51°C → 76°C (po 1°C), při 1. kroku vyčkat 10 s, při dalších 5 s*	

Tab. č. 5: Nastavení polymerasové řetězové reakce pro polymorfismy 677C/T a 1298A/C

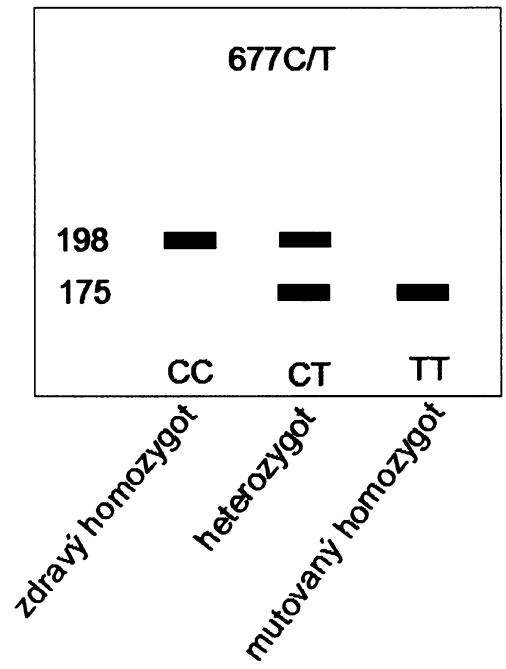
4.2.4 Metoda analýzy délkového polymorfismu restrikčních fragmentů

Metoda analýzy délkového polymorfismu restrikčních fragmentů (RFLP) využívá štěpení DNA enzymem restrikční endonukleasou. Tento enzym rozpoznává specifickou sekvenci DNA a v tomto místě ji pak štěpí. Nejprve je třeba namnožit polymerasovou řetězovou reakcí úsek DNA obsahující štěpné místo. Je nutné ověřit přítomnost PCR produktu gelovou elektroforézou. Potom se k PCR produktu přidá restrikční endonukleasa a reakční roztok se nechá přes noc inkubovat při 37°C. Po vizualizaci produktů štěpení na agarosovém gelu je možné provést analýzu genotypu.

Mutací enzymu MTHFR v poloze 677 sekvence DNA vznikne místo, které rozpoznává restrikční endonukleasa *Hinf*I z *Hemophilus influenzae* [9]. Metodou PCR se amplifikuje úsek DNA o velikosti 198 bp obsahující polymorfismus 677C/T. Restrikčním štěpením pak vzniknou úseky o velikosti 175 bp a 23 bp, viz obr. č. 13. Patří-li vzorek DNA nemutovanému homozygotovi (CC), DNA není štěpena a na agarosovém gelu je vidět pruh odpovídající 198 bp. Patří-li vzorek DNA mutovanému homozygotovi (TT), DNA se štěpí a na gelu je patrný pruh odpovídající 175 bp. Jsou-li na gelu viditelné dva pruhy, vzorek patří heterozygotovi (CT), viz obr. č. 14 (str. 35).

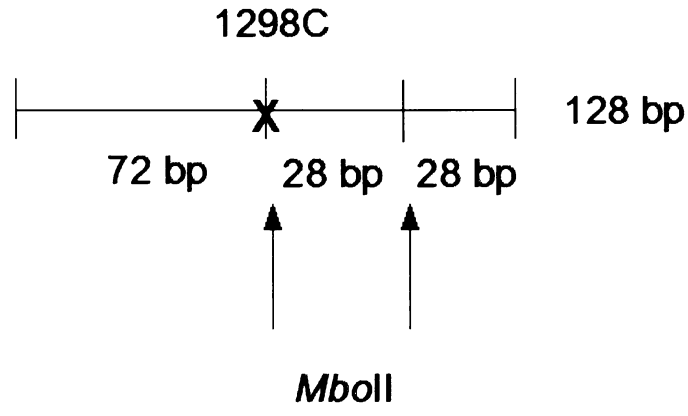


*Obr. č. 13: Úsek DNA obsahující polymorfismus 677C/T amplifikovaný metodou PCR a místo rozpoznávané restrikční endonukleasou Hinf*I

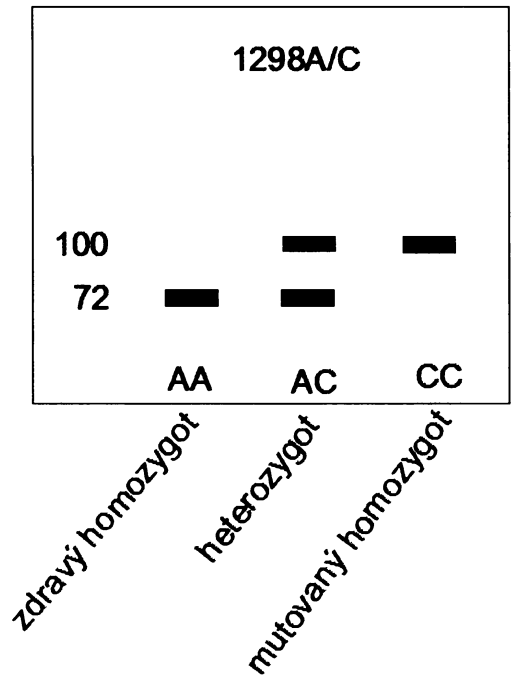


Obr. č. 14: Schéma restrikčního štěpení úseku DNA s polymorfismem 677C/T na agarosovém gelu po elektroforéze

Mutací genu enzymu MTHFR v poloze 1298 zanikne v sekvenci místo rozpoznávané restrikční endonukleasou *Mbo*II z *Moraxella bovis* [46]. PCR se amplifikuje úsek DNA o velikosti 128 bp obsahující polymorfismus 1298A/C, viz obr. č. 15. Patří-li vzorek DNA nemutovanému homozygotovi (AA), DNA je štěpena na dvou místech a na gelu je vidět pruh odpovídající 72 bp. Patří-li vzorek DNA mutovanému homozygotovi (CC), DNA se štěpí na jednom místě a na gelu je patrný pruh odpovídající 100 bp. Jsou-li na gelu viditelné dva pruhy, vzorek patří heterozygotovi (AC), viz obr. č. 16 (str. 36).



*Obr. č. 15: Úsek DNA obsahující polymorfismus 1298A/C DNA amplifikovaný metodou PCR a místo rozpoznávané restrikční endonukleasou Mbo*II



Obr. č. 16: Schéma restrikčního štěpení úseku DNA s polymorfismem 1298A/C na agarosovém gelu po elektroforéze

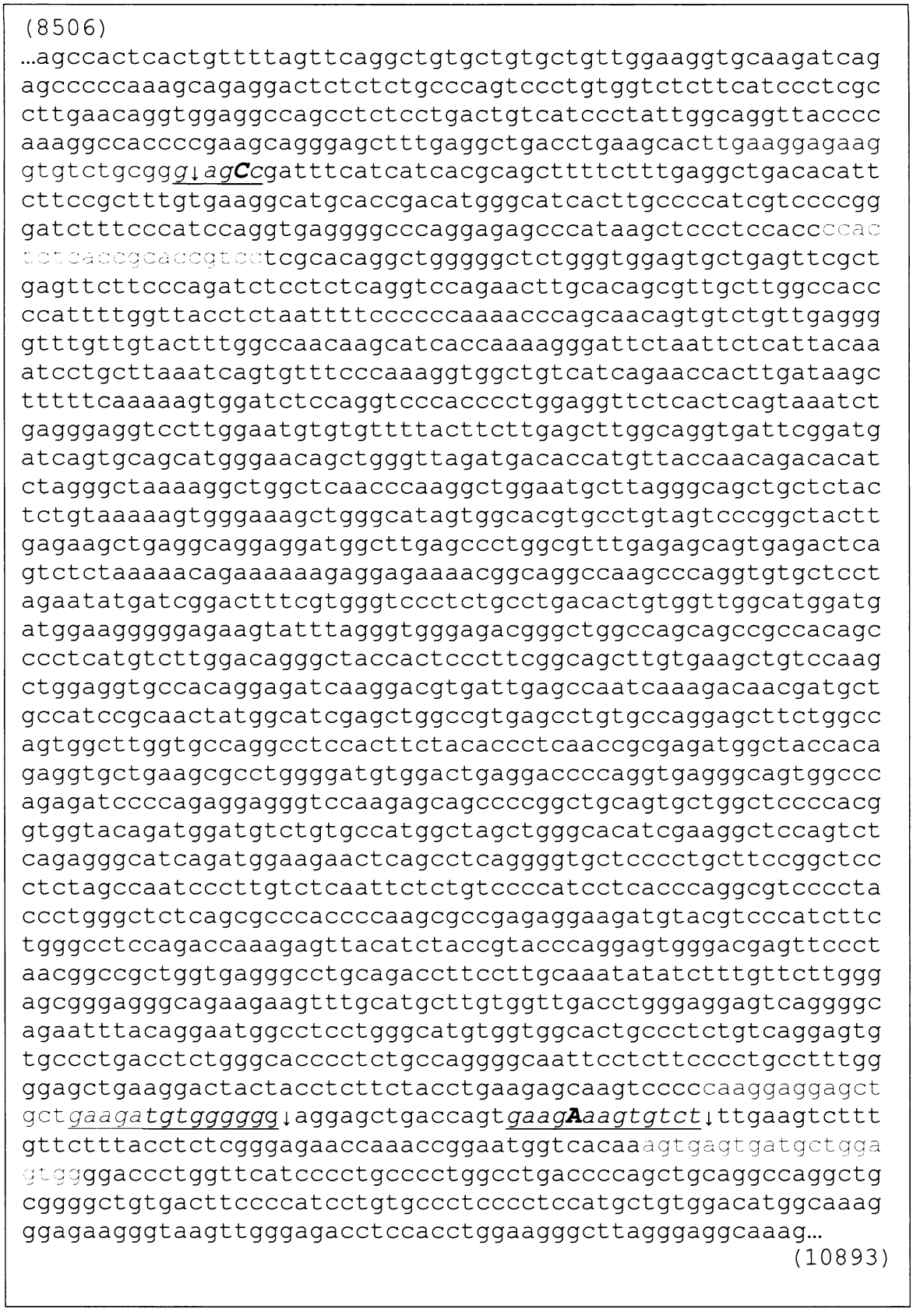
Sekvence genu pro MTHFR, primery pro PCR, restrikční endonukleasy

Metodou PCR byly amplifikovány úseky DNA obsahující polymorfismy MTHFR 677C/T a 1298A/C. Celý gen tvoří 15835 párů bází. Na obr. č. 17 (str. 37) je znázorněna část sekvence DNA genu pro MTHFR obsahující zkoumané polymorfismy [59]. Barevně jsou označena místa, na která se vážou primery. Podtržené části sekvence psané kurzivou značí místa rozpoznávaná restrikčními endonukleasami. Místa polymorfismů jsou označena velkými písmeny. Sekvence rozpoznávaných restrikčních míst a sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce č. 6, resp. 7 (str. 38).

restrikční enzym	*rozpoznávaná sekvence*
Polymorfismus 677C/T - *Hinf*I	5´ g a a g a 3´
Polymorfismus 1298 A/C - *Mbo*II	*5´ gaaga(8/7)↓ 3´*

Tab. č. 6: Restrikční enzymy - místo, kde dochází ke štěpení, je označeno šipkou (↓)

(pozn.: stejné barevné označení míst rozpoznávaných restrikčním enzymem je použito v obrázku č. 17 na straně 37)



Obr. č. 17: Část sekvence genu pro MTHFR, primery pro PCR, místa restrikčního štěpení

(pozn.: barevné značení míst restrikčního štěpení a primerů viz tab. č. 6 na str. 36, resp. tab. č. 7 na str. 38)

primer	*sekvence*
Polymorfismus 677C/T - Forward	5´ ttgaaggagaaggtgtctgcggga 3´
Polymorfismus 677C/T - Reverse	5´ ggacggtgcggtgagagtgg 3´
Polymorfismus 1298A/C - Forward	5´ caaggaggagctgctgaaga 3´
Polymorfismus 1298A/C - Reverse	5´ ccactccagcatcactcact 3´

Tab. č. 7: Sekvence primerů, použitých při PCR

(pozn.: stejné barevné označení primerů je použito v obrázku č. 17 na straně 35)

Klasická polymerasová řetězová reakce

Do sterilních mikrozkumavek byly pipetovány reagencie pro polymerasovou řetězovou reakci a nakonec byl do každé mikrozkumavky přidán odpovídající vzorek DNA ze zkoumaných souborů žen s komplikacemi gravidity (DNA izolované z buněk ústní sliznice). Tabulka č. 8 udává složení reakčních roztoků pro amplifikaci úseků DNA obsahující polymorfismy MTHFR 677C/T a 1298A/C. Mikrozkumavky byly umístěny do PCR termocykleru. Tabulka č. 9 (str. 39) popisuje podmínky, které byly pro polymerasovou řetězovou reakci nastaveny.

	polymorfismus 677C/T	*polymorfismus 1298A/C*
reagencie	*objem* (µl)*	*objem* (µl)*
deionizovaná voda	181,1	179,5
RedTaq PCR pufr (1 x)	25,0	25,0
dNTP (10 mM)	5,0	5,0
chlorid hořečnatý (25 mM)	0,0	1,7
primer F (20 µM**)	4,4	7,6
primer R (20 µM**)	4,4	7,6
RedTaq DNA Polymerasa (1 U / 1 µl)	12,5	12,5
DNA	á 2,2	á 2,2

Tab. č. 8: Složení reakčních roztoků pro množení úseků DNA obsahující polymorfismy MTHFR 677C/T, resp. 1298A/C

**uvedená množství odpovídají objemům reakčních roztoků na 10 vzorků*

*** primery jsou dodávány lyofilizované a rozpouští se v deionizované vodě*

	polymorfismus 677C/T		*polymorfismus 1298A/C*	
úvodní denaturace	*94°C*	*120 s*	*95°C*	*180 s*
cyklická reakce (35 x)	*94°C*	*30 s*	*95°C*	*60 s*
	57°C	*30 s*	*63°C*	*60 s*
	72°C	*30 s*	*72°C*	*60 s*
dokončení reakce	*72°C*	*300 s*	*72°C*	*420 s*
závěrečné ochlazení	*25°C*		*25°C*	

Tab. č. 9: Nastavení polymerasové řetězové reakce pro amplifikaci úseků DNA obsahující polymorfismy 677C/T, resp. 1298A/C

Elektroforéza produktů polymerasové řetězové reakce

Přítomnost produktu polymerasové řetězové reakce byla ověřena horizontální elektroforézou na 2% (w/v) agarosovém gelu. Suspenze TBE pufru a agarosy byla vařena do úplného rozpuštění agarosy. Potom byl přidán ethidium bromid o výsledné koncentraci 0,5 μg/ml. Takto připravený gel byl nalit do obdélníkové formy s hřebínkem tak, aby výška gelu byla 0,5 – 1 cm. Po utuhnutí gelu byl vyjmut hřebínek a gel byl vložen do aparatury pro horizontální elektroforézu a převrstven TBE pufrem. Do jamek v gelu byly naneseny vzorky PCR produktů (á 8 μl). Elektroforéza probíhala 10 min při 120 V. Po jejím ukončení byla ověřena přítomnost DNA ve vzorku vizualizací při UV světle.

Enzymové štěpení

Pro analýzu polymorfismu 677C/T bylo do mikrozkumavky pipetováno vždy 13 μl PCR produktu a bylo přidáno 0,2 μl restrikčního enzymu *Hinf*I (10 U / 1 μl) a 1,5 μl 10x koncentrovaného pufru R+. Pro analýzu polymorfismu 1298A/C bylo do mikrozkumavky pipetováno vždy 13 μl PRC produktu a bylo přidáno 0,5 μl restrikčního enzymu *Mbo*II (5 U / 1 μl) a 2,6 μl pufru B+. Takto připravené vzorky byly přes noc inkubovány při 37°C.

Elektroforetická separace produktů enzymového štěpení

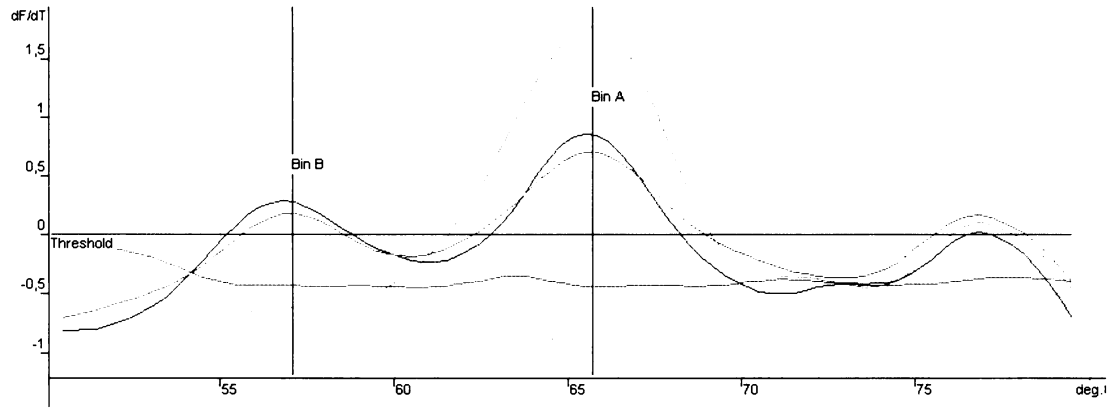
Separace produktů štěpení byla provedena horizontální elektroforézou na 3% (w/v) agarosovém gelu. Suspenze TBE pufru a agarosy byla vařena do úplného rozpuštění agarosy. Potom byl přidán ethidium bromid o výsledné koncentraci 0,5 μg/ml. Takto připravený gel byl nalit do obdélníkové formy s hřebínkem tak, aby výška gelu byla 0,5 – 1 cm. Po utuhnutí gelu byl vyjmut hřebínek a gel byl vložen do aparatury pro horizontální elektroforézu a převrstven TBE pufrem. Do jamek v gelu byly naneseny vzorky produktů polymerasové řetězové reakce (á 13 μl). Vzorky byly předem smíchány s bromfenolovou modří. Elektroforéza probíhala 30 min při napětí 120 V. Po vizualizaci produktů štěpení za UV světla byla provedena genotypizace jednotlivých vzorků.

5 Výsledky

5.1 Výsledky genotypizace polymorfismů 677C/T a 1298A/C metodou „real-time" PCR s fluorescenční detekcí a metodou analýzy délkového polymorfismu restrikčních fragmentů

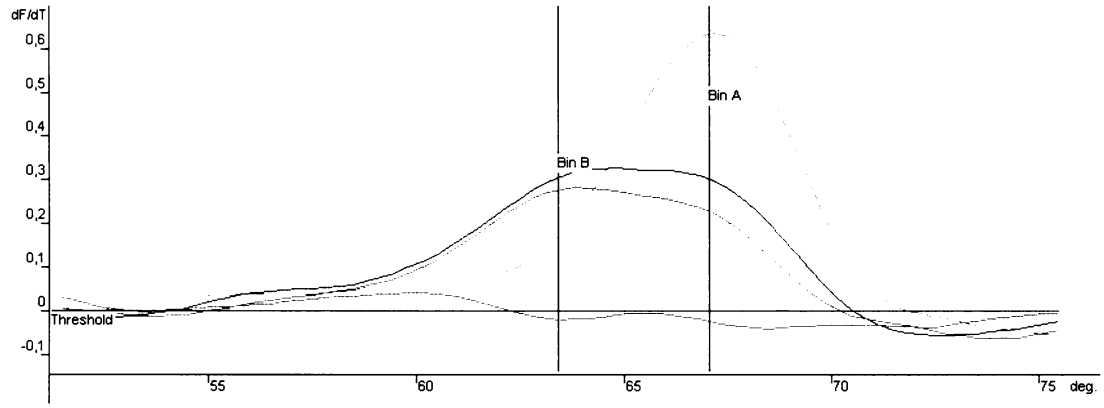
Výstupem analýzy genotypů metodou „real-time" PCR s fluorescenční detekcí byly grafy znázorňující první derivaci závislosti relativní změny fluorescence na teplotě tání hybridu DNA-sonda (dF/dT).

V případě polymorfismu MTHFR 677C/T byla teplota tání hybridu DNA-sonda 65,7°C a hybridu mutovaná DNA-sonda 57,0°C. Z důvodu velkého množství analyzovaných vzorků neuvádím všechny výstupní grafy. Na obrázku č. 18 je zobrazen příklad jednoho z takových grafů.



Obr. č. 18: Analýza genotypů polymorfismu MTHFR 677C/T – první derivace závislosti relativní změny fluorescence na teplotě tání hybridu DNA-sonda (dF/dT):
zelená křivka – „slepý" vzorek (bez DNA)
červená křivka – positivní kontrola (vzorek patřil heterozygotovi)
modrá křivka – vzorek č. MD07 – heterozygot 677CT
žlutá křivka – vzorek č. MD04 – mutovaný homozygot 677TT
oranžová křivka – vzorek č. MD05 – nemutovaný homozygot 677CC

Při analýze polymorfismu MTHFR 1298A/C byla teplota tání hybridu DNA-sonda 67,2°C a hybridu mutovaná DNA-sonda 63,5°C. Tyto teploty jsou si poměrně blízké, proto v případě heterozygotů nevznikaly po první derivaci závislosti relativní změny fluorescence na teplotě tání hybridu DNA-sonda dvě samostatná maxima, nýbrž tato maxima splynula v jedno, viz červená a modrá křivka na obr. č. 19. Z důvodu velkého množství analyzovaných vzorků uvádím opět jeden příklad výstupního grafu za všechny, viz obr. č. 19.



Obr. č. 19: Analýza genotypů polymorfismu MTHFR 1298A/C – první derivace závislosti relativní změny fluorescence na teplotě tání hybridu DNA-sonda (dF/dT):
zelená křivka – „slepý" vzorek (bez DNA)
červená křivka – positivní kontrola (vzorek patřil heterozygotovi)
modrá křivka – vzorek č. MD06 – heterozygot 1298AC
žlutá křivka – vzorek č. MD05 – mutovaný homozygot 1298CC
oranžová křivka – vzorek č. MD04 – nemutovaný homozygot 1298AA

Metodou analýzy délkového polymorfismu restrikčních fragmentů (RFLP) bylo analyzováno celkem 16 vzorků. Z toho tři vzorky nebyly analyzovatelné (MD43, MD44, MD48), pravděpodobně kvůli špatně provedenému stěru ústní sliznice. Tyto vzorky byly vyřazeny. Na obrázku č. 20 (str. 43), resp. 21 (str. 43), jsou fotografie agarosových gelů po elektroforéze produktů restrikčního štěpení pro polymorfismus MTHFR 677C/T, resp. 1298A/C. Jednotlivé vzorky jsou popsány čísly a genotypy.

Obr. č. 20: Agarosový gel po elektroforéze produktů restrikčního štěpení pro polymorfismus MTHFR 677C/T

K1 – kontrola 1 – mutovaný homozygot; K2 – kontrola 2 – nemutovaný homozygot

Obr. č. 21: Agarosový gel po elektroforéze produktů restrikčního štěpení pro polymorfismus MTHFR 1298A/C

K1 – kontrola 1 – nemutovaný homozygot; K2 – kontrola 2 – mutovaný homozygot

5.2 Souhrnné výsledky genotypizace polymorfismů 677C/T a 1298A/C u souborů žen s komplikacemi gravidity v porovnání s výskytem těchto polymorfismů v obecné populaci České Republiky

Výskyt jednotlivých genotypů v analyzovaných souborech žen, které prodělaly preeklampsii (dále soubor PEE), a žen, které opakovaně spontánně potrácejí (dále soubor SP), byl porovnán s výskytem genotypů v obecné populaci České Republiky (dále jen kontrolní soubor). Data popisující kontrolní soubor byla převzata ze studie, kterou prováděl Ústav dědičných metabolických poruch 1. LF UK ve spolupráci s Ústavem informatiky AV ČR, II. Interní klinikou 3. LF UK a oddělením Klinické biochemie, hematologie a imunologie nemocnice Na Homolce [60]. Při této studii bylo vyšetřeno 591 zdravých osob, z toho 284 mužů a 307 žen. Věk vyšetřovaných byl mezi 18 a 65 lety, žádná z osob nikdy neprodělala srdeční ani mozkovou příhodu, netrpí arteriosklerosou, u žádné z osob nebyl nikdy nalezen maligní nádor, všechny osoby byly psychicky zdravé. Žádná z vyšetřovaných žen nebyla v době vyšetření těhotná ani kojící.

Celkem bylo vyšetřeno 63 žen, které alespoň jednou prodělaly preeklampsii. Tabulka č. 10 udává distribuci polymorfismu 677C/T v souboru PEE a v kontrolním souboru. Tabulka č. 11 (str. 45) udává výskyt alel 677C a 677T v souboru PEE a v kontrolním souboru. Tabulka č. 12 (str. 45) udává distribuci polymorfismu 1298A/C v souboru PEE a v kontrolním souboru. Tabulka č. 13 (str. 45) udává výskyt alel 1298A a 1298C v souboru PEE a v kontrolním souboru.

	677C/C		677C/T		677T/T	
	počet	%	Počet	%	počet	%
soubor PEE	25	39,68	25	39,68	13	20,63
kontrolní soubor	26	41,46	31	48,56	6	9,98

Tab. č. 10: Distribuce polymorfismu 677C/T v souboru PEE a v kontrolním souboru

	677C		677T	
	počet	%	počet	%
soubor PEE	75	59,52	51	40,48
kontrolní soubor	83	65,74	43	34,26

Tab. č. 11: Výskyt alel 677C a 677T v souboru PEE a v kontrolním souboru

	1298A/A		1298A/C		1298C/C	
	počet	%	počet	%	počet	%
soubor PEE	28	44,44	29	46,03	6	9,52
kontrolní soubor	28	44,67	29	45,34	6	9,98

Tab. č. 12: Distribuce polymorfismu 1298A/C v souboru PEE a v kontrolním souboru

	1298A		1298C	
	počet	%	počet	%
soubor PEE	85	67,46	41	32,54
kontrolní soubor	85	67,34	41	32,66

Tab. č. 13: Výskyt alel 1298A a 1298C v souboru PEE a v kontrolním souboru

Celkem bylo vyšetřeno 132 žen, které prodělaly dva a více spontánní potraty do 20. týdne těhotenství nebo jeden spontánní potrat po 20. týdnu těhotenství. Tabulka č. 14 udává distribuci polymorfismu 677C/T v souboru SP a v kontrolním souboru. Tabulka č. 15 (str. 46) udává výskyt alel 677C a 677T v souboru SP a v kontrolním souboru. Tabulka č. 16 (str. 46) udává distribuci polymorfismu 1298A/C v souboru SP a v kontrolním souboru. Tabulka č. 17 (str. 46) udává výskyt alel 1298A a 1298C v souboru SP a v kontrolním souboru.

	677C/C		677C/T		677T/T	
	počet	%	počet	%	počet	%
soubor SP	59	44,70	54	40,91	19	14,39
kontrolní soubor	55	41,46	64	48,56	13	9,98

Tab. č. 14: Distribuce polymorfismu 677C/T v souboru SP a v kontrolním souboru

	677C		677T	
	počet	%	počet	%
soubor SP	172	65,15	92	34,85
kontrolní soubor	174	65,74	90	34,26

Tab. č. 15: Výskyt alel 677C a 677T v souboru SP a v kontrolním souboru

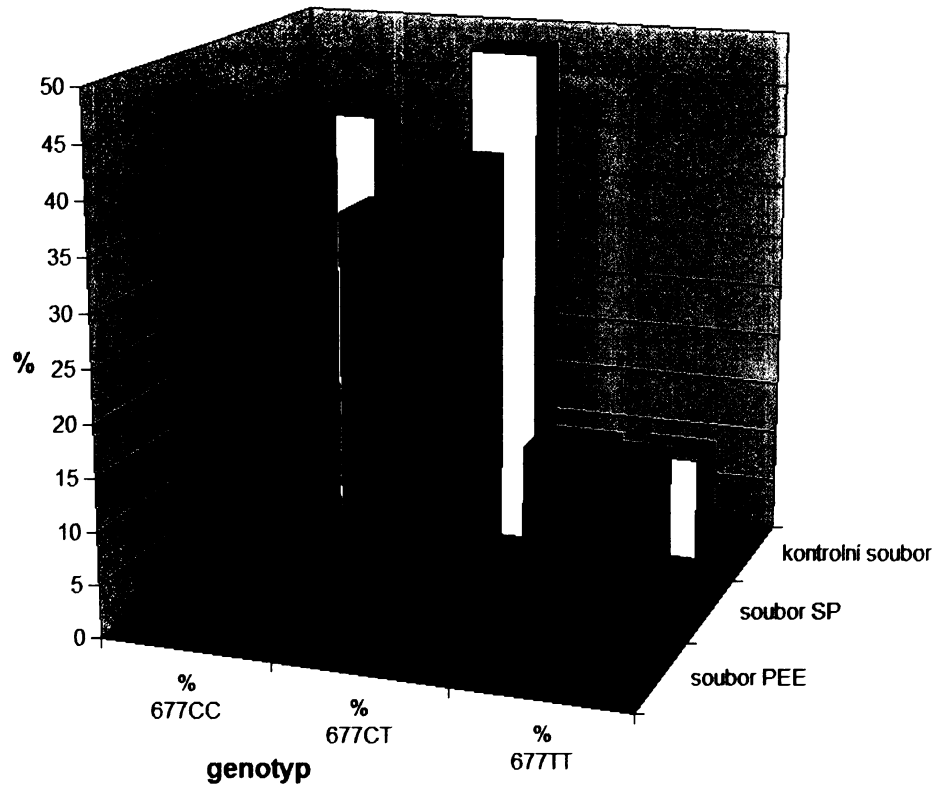
	1298A/A		1298A/C		1298C/C	
	počet	%	Počet	%	počet	%
soubor SP	58	43,94	62	46,97	12	9,09
kontrolní soubor	59	44,67	60	45,34	13	9,98

Tab. č. 16: Distribuce polymorfismu 1298A/C v souboru SP a v kontrolním souboru

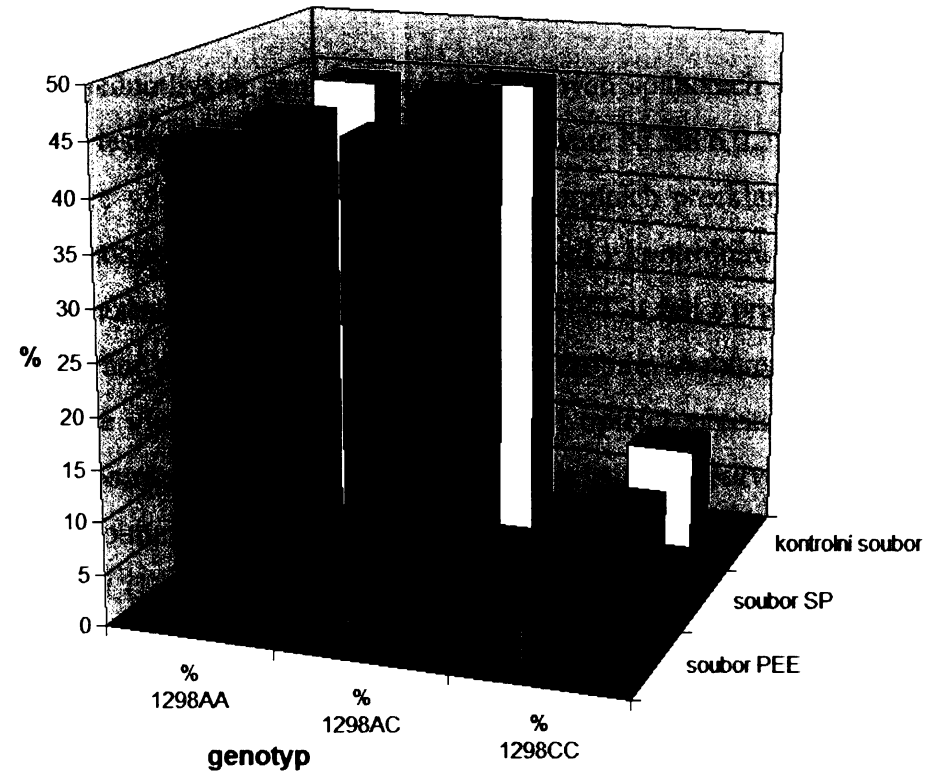
	1298A		1298C	
	počet	%	počet	%
soubor SP	178	67,42	86	32,58
kontrolní soubor	178	67,34	86	32,66

Tab. č. 17: Výskyt alel 1298A a 1298C v souboru SP a v kontrolním souboru

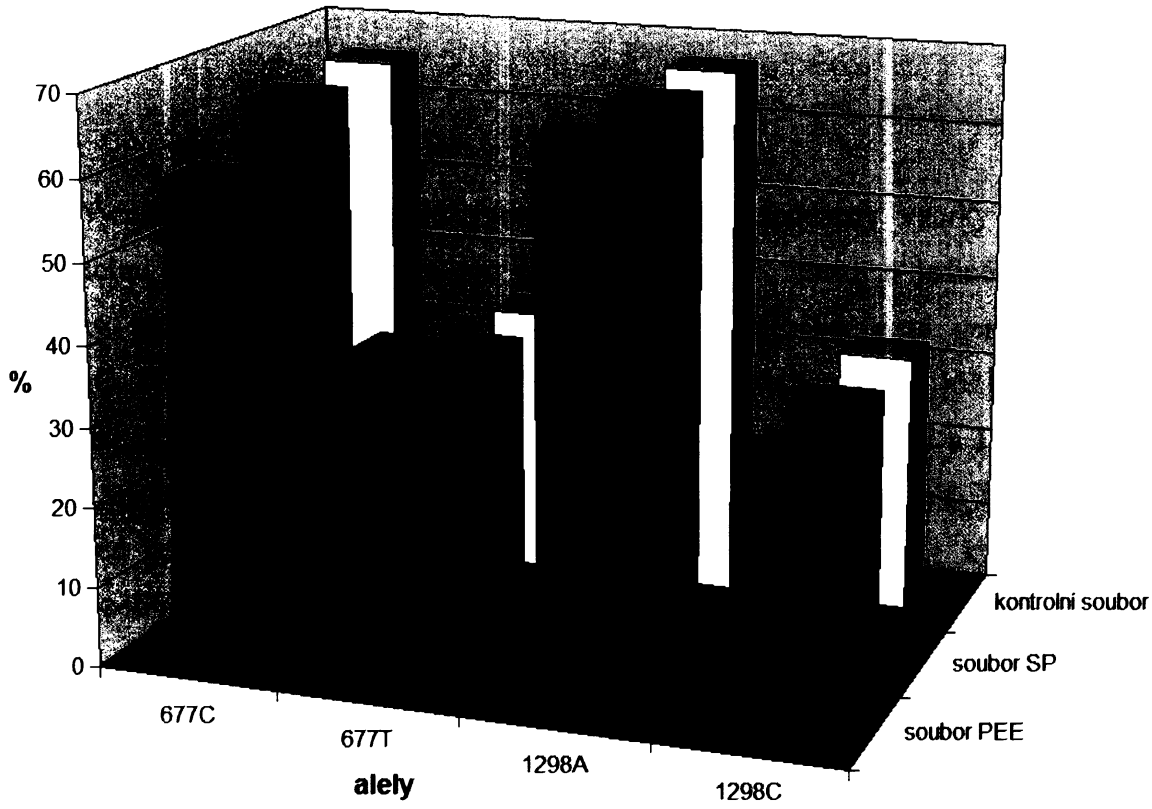
Graf č. 1 (str. 47), resp. č. 2 (str. 47), znázorňuje distribuci polymorfismu 677C/T, resp. 1298A/C, v obou analyzovaných souborech PEE i SP (soubor PEE zahrnuje ženy, které prodělaly preeklampsii, soubor SP zahrnuje ženy, které opakovaně spontánně potrácejí) v porovnání s kontrolním souborem. Z grafu č. 1 (str. 47) je patrné výrazně vyšší zastoupení mutovaného genotypu 677TT v souboru PEE a jen mírné zvýšení v souboru SP oproti kontrolnímu souboru. Mezi ženami trpícími preeklampsií bylo tedy nalezeno více nositelek genotypu 677TT. Distribuce polymorfismu 1298A/C je dle grafu č. 2 (str. 47) téměř shodná ve všech třech souborech (PEE, SP i kontrolním). Graf č. 3 (str. 48) znázorňuje procentuální výskyt alel 677A, 677T, 1298A a 1298C v souboru PEE, SP i kontrolním. Tento graf opět ukazuje zvýšený výskyt alely 677T v souboru PEE.



Graf č. 1: Distribuce polymorfismu 677C/T v souboru PEE, SP a v kontrolním souboru



Graf č. 2: Distribuce polymorfismu 1298A/C v souboru PEE, SP a v kontrolním souboru



Graf č. 3: Výskyt alel 677C, 677T, 1298A a 1298C v souboru PEE, SP a v kontrolním souboru

Výskyt jednotlivých genotypů v analyzovaných souborech a kontrolním souboru byl porovnán χ^2 testem. Pro výpočty byl použit software NCSS 6.0.21 Jr.

Frekvence výskytu genotypu 677TT u žen trpících preeklampsií (20,63 %), resp. žen opakovaně potrácejících (14,39 %), byla vyšší než v kontrolním souboru (9,98 %). Dle χ^2 testu byla nalezena korelace mezi genotypem 677TT u žen s preeklampsií ($p = 0,046$), resp. žen opakovaně potrácejících ($p = 0,018$), a kontrolním souborem.

Frekvence výskytu genotypu 1298CC u žen trpících preeklampsií (9,52 %), resp. žen opakovaně potrácejících (9,09 %), se výrazně nelišila od frekvence výskytu genotypu 1298CC v kontrolním souboru (9,98 %). Dle χ^2 testu nebyla nalezena korelace mezi genotypem 1298CC u žen s preeklampsií ($p = 1,000$), resp. žen potrácejících ($p = 0,572$), a kontrolním souborem.

6 Diskuse

V celkovém množství 195 vzorů DNA nebyly nalezeny vzorky s genotypy obsahujícími čtyři mutace v genu pro MTHFR současně. Pouze u jediné vyšetřované pacientky byl nalezen genotyp se třemi mutacemi současně, a to genotyp 677TT a 1298AC. To odpovídá závěrům Isolato a kol. [50] a Zetterberg a kol. [52] (viz kapitola 1.5 na str. 12), kteří uvádějí, že akumulace více mutací v polohách 677 a 1298 genu pro MTHFR snižuje životaschopnost plodu nesoucího tyto mutace. Tabulka č. 18 udává, jaké kombinace genotypů byly nalezeny v analyzovaných souborech žen, které prodělaly preeklampsii (dále soubor PEE), a žen, které opakovaně spontánně potrácejí (dále soubor SP).

		soubor PEE	*soubor SP*
počet mutací	*genotypová kombinace*	*počet vzorků*	*počet vzorků*
0	677C/C a 1298A/A	5	12
1	677C/C a 1298A/C	14	35
	677C/T a 1298A/A	10	28
2	677C/T a 1298A/C	15	26
	677T/T a 1298A/A	13	18
	677C/C a 1298C/C	6	12
3	677T/T a 1298A/C	0	1
	677C/T a 1298C/C	0	0
4	677T/T a 1298C/C	0	0
celkem vzorků		63	132

Tab. č. 18: Kombinace genotypů v analyzovaném souboru PEE a SP

Sohda a kol. [32] ve své studii vyšetřovali 67 pacientek, které prodělaly preeklampsii, 98 žen, jejichž těhotenství probíhalo bez komplikací, a 260 zdravých dospělých osob. V těchto souborech pacientek zjišťovali frekvenci výskytu alely 677T metodou analýzy délkového polymorfismu restrikčních fragmentů (RFLP). Zjistili, že ve skupině pacientek s preeklampsií byla alela 677T a homozygoté o genotypu 677TT výrazně častější než v kontrolních skupinách ($p < 0,02$). Tyto publikované výsledky se shodují s výsledky, uvedenými v této diplomové práci (v souboru žen s preeklampsií byl výskyt genotypu 677TT 20,63 % oproti kontrolnímu souboru 9,98 %).

Nicméně existují práce, které jakékoli souvislosti polymorfismu 677C/T s rizikem vzniku preeklampsie popírají. Laivuori a kol. [61] nenašli žádnou statisticky významnou závislost mezi výskytem alely 677T a vzniku preeklampsie u žen ve finské populaci, Rajkovic a kol. [62] v černošské populaci a Kobashi a kol. [33] v japonské populaci.

Souvislosti polymorfismu 1298A/C a preeklampsie se mnoho prací nevěnuje. Zdá se, že ani v kombinaci 1298CC není zdaleka tak významný jako polymorfismus 677C/T.

Wang a kol. [63] se zabývali zkoumáním vztahu mezi polymorfismy 677C/T a 1298A/C a opakovanými spontánními potraty v čínské populaci. Analyzovaly 148 pacientek a 82 žen bez komplikací v těhotenství. Našli výrazně zvýšený výskyt alely 677T v souboru pacientek, genotyp TT byl dvakrát častější (13,6 %) mezi pacientkami než mezi ženami v kontrolní skupině (6,1 %). Výskyt polymorfismu 1298A/C se zásadně nelišil mezi skupinami. Genotyp se dvěma a třemi mutacemi (677 (CT + TT) / 1298CC) byl nalezen pouze v souboru pacientek. Závěrem shrnuli, že polymorfismy 677C/T a 1298A/C genu pro MTHFR, hrají roli v mechanismu opakovaných spontánních potratů.

Unfried a kol. [64] opět analyzovali výskyt polymorfismu 677C/T a hladinu homocysteinu v krvi ve vztahu k opakovaným spontánním potratům v populaci střední Evropy. Zkoumaný soubor tvořilo 133 pacientek, které prodělaly tři a více spontánních potratů před 20. týdnem těhotenství. Kontrolní soubor obsahoval 74 žen, které nikdy nepotratily a které porodily minimálně dvě živé děti. Sérový homocystein byl evidentně vyšší u žen nesoucích mutovanou alelu. Frekvence výskytu alely 677T byla 34,6 % v analyzovaném souboru pacientek a 21,6 % v kontrolním souboru. Genotyp TT byl ve zkoumaném souboru nalezen v 17,3 %, zatímco v kontrolní skupině jen v 5,4 % případů. Z této práce tedy vyplývá zvýšené riziko spontánních potratů pro nositelky alely 677T.

S těmito závěry souhlasí i práce [23], [34] a [35]. Rovněž výsledky této diplomové práce jsou zcela v souladu a výše uvedenými závěry. V souboru žen, které opakovaně spontánně potrácejí, byl výskyt genotypu 677TT 14,39 % oproti kontrolnímu souboru 9,98 %

Je zcela prokázáno, že alela 677T snižuje aktivitu enzymu MTHFR, čímž vzniká nedostatek N^5-methyl-THF v organismu. N^5-methyl-THF se pak nemůže dostatečně podílet na přeměně homocysteinu na methionin. Tím dochází ke zvýšení hladiny homocysteinu v krevní plasmě. To má řadu závažných zdravotních důsledků. Zvýšená koncentrace homocysteinu v krvi zvyšuje expresi tkáňového faktoru, aktivitu prothrombinu a množství koagulačních faktorů. To tedy vede ve zvyšování krevního tlaku a potenciálnímu nebezpečí vzniku thrombosy. V těhotenství jsou tato rizika obzvláště závažná. Může totiž docházet ke vzniku thrombů uvnitř placenty a tím snižovat zásobení plodu živinami a kyslíkem. To potom samozřejmě může vést až ke spontánnímu potratu plodu.

Díky výzkumům souvislostí polymorfismů 677C/T a 1298A/C v genu pro methylentetrahydrofolátreduktasu a komplikacemi gravidity byla již do medicínské praxe zavedena některá preventivní opatření. Rizikovým skupinám pacientek, nositelkám alely 677T, jsou v průběhu těhotenství i před ním podávány vitaminové přípravky obsahující vitaminy skupiny B (kyselina listovou, vitamin B6 a B12). Doporučená denní dávka kyseliny listové je pro ženy 677CT heterozygotní 400 μg a pro ženy 677TT homozygotní 5 mg [31]. Z důvodů prevence ztráty těhotenství jsou rovněž rizikovým skupinám pacientek podávány léky, které předcházejí vzniku trombů, např. nízkomolekulární hepariny. Nosičství polymorfismů genu pro MTHFR je dalším důvodem pro nekuřáctví a snahu o udržení optimální hmotnosti.

Závěrem lze říci, že genotyp 677TT je jedním z genetických rizikových faktorů opakovaných spontánní potratů a preeklampsie. Polymorfismus 1298A/C zřejmě velký význam nemá.

7 Souhrn

V této diplomové práci byly řádně splněny všechny cíle, které byly na počátku vytýčeny (cíle diplomové práce jsou uvedeny v kapitole č. 3 na str. 19).

- Byla zavedena genotypizace mutací 677C/T a 1298A/C genu pro methylentetrahydrofolátreduktasu metodou „real-time" PCR s detekční metodou fluorescenčního resonančního energetického transferu (FRET).

- Byl stanoven procentuální výskyt sledovaných genotypů ve vyšetřovaných souborech žen s komplikacemi gravidity.

- Distribuce genotypů v analyzovaných souborech žen s komplikacemi gravidity byla porovnána s distribucí těchto genotypů v obecné populaci České Republiky.

- Byla provedena analýza kombinovaného výskytu polymorfismů 677C/T a 1298A/C ve studovaných souborech žen s komplikacemi gravidity.

- Byla ověřena statisticky významná závislost mezi výskytem mutace 677T v genu pro MTHFR a výskytem komplikací gravidity ve sledovaných souborech. Tato závislost nebyla potvrzena pro mutaci 1298C.

8 Seznam použité literatury

[1]	Úhrnná plodnost v letech 1950-2004; czso.cz [online]; URL: <http://www.czso.cz/csu/redakce.nsf/i/uhrnna_plodnost_v_letech_1950_2004> [cit. 2006-03-20]
[2]	Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W.: Struktura a funkce vitaminů rozpustných ve vodě, v knize Harperova biochemie, Nakladatelství a vydavatelství H&H, Jinočany, str. 601-617 (1998)
[3]	Smithells, R. W., Sheppard, S., Schorah, C..J.: *Arch Dis Child* 51, 944-950 (1976)
[4]	Group MRC Vitamin Study Research: *Lancet* 338, 131-137 (1991)
[5]	Czeizel, A. E., Dudas, I.: *N Engl J Med* 327, 1832-1835 (1992)
[6]	Kirke, P. N., Molloy, A. M., Daly, L. E., Burke, H., Weir, D. G., Scott, J. M.: *Q J Med* 86, 703-708 (1993)
[7]	Goyette, P., Sumner, J. S., Milos, R., Duncan, A. M. V., Rosenblatt, D. S., Matthews, R. G., Rozen, R.: *Nat Genet* 7, 195-200 (1994)
[8]	Goyette, P., Pai, A., Milos, R., Frosst, P., Tran, P., Chen, Z., Chan, M., Rozen, R.: *Mamm Genome* 9, 652-656 (1998)
[9]	Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., Matthews, R. G., Boers, G. J. H., den Heijer, M., Kluijtmans, L. A. J., van den Heuvel, L. P., Rozen, R.: *Nat Genet* 10, 111-113 (1995)
[10]	Wilcken, B., Bamforth, F., Li, Z., Zhu, H., Ritvanen, A., Redlund, M., Stoll, C., Alembik, Y., Dott, B., Czeizel, A. E., Gelman-Kohan, Z., Scarano, G., Bianco, S., Ettore, G., Tenconi, R., Bellato, S., Scala, I., Mutchinick, O. M., López, M. A., de Walse, H., Hofstra, R., Joutchenko, L., Kavteladze, L., Bermejo, E., Martínez-Frías, M. L., Gallagher, M., Ericsson, J. D., Vollset, S. E., Mastroiacovo, P., Andrea, G., Botto, L. D.: *J Med Genet* 40, 619-625 (2003)
[11]	McAndrew, P. E., Brandt, J. T., Pearl, D. K., Prior, T. W.: *Thromb Res* 83, 195-198 (1996)
[12]	Schneider, J. A., Rees, D. C., Liu, Y.-T., Clegg, J. B.: *Am J Hum Genet* 62, 1258-1260 (1998)

[13]	Guttormsen, A. B., Ueland, P. M., Nesthus, I., Nygard, O., Schneede, J., Vollset, S. E., Refsum, H.: *J Clin Invest* 98, 2174-2183 (1996)
[14]	Malinow, M. R., Nieto, F. J., Kruger, W. D., Duell, P. B., Hess, D. L., Gluckman, R. A., Block, P.C., Holzgang, C.R., Anderson, P. H., Seltzer, D., Upson, B., Lin, Q. R.: *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 17, 1157-1162 (1997)
[15]	Jacques, P. F., Bostom, A. G., Williams, R. R., Ellison, R. C., Eckfeldt, J. H., Rosenberg, I. H., Selhub, J., Rozen, R.: *Circulation* 93, 7-9 (1996)
[16]	Motulsky, A. G.: *Am J Hum Genet* 58, 17-20 (1996)
[17]	Kluijtmans, L. A. J.; van den Heuvel, L. P. W. J.; Boers, G. H. J.; Frosst, P.; Stevens, E. M. B.; van Oost, B. A.; den Heijer, M.; Trijbels, F. J. M.; Rozen, R.; Blom, H. J.: *Am J Hum Genet* 58, 35-41 (1996)
[18]	Zalavras, C. G., Giotopoulou, S., Dokou, E., Mitsis, M., Ioannou, H. V., Tzolou, A., Kolaitis, N., Vartholomatos, G.: *Int Angiol* 21, 268-271 (2002)
[19]	Keijzer, M. B. A. J., den Heijer, M., Blom, H. J., Bos, G. M. J., Willems, H. P. J., Gerrits, W. B. J., Rosendaal, F. R.: *Thromb Hemost* 88, 723-728 (2002)
[20]	Morita, H., Taguchi, J., Kurihara, H., Kitaoka, M., Kaneda, H., Kurihara, Y., Maemura, K., Shindo, T., Minamino, T., Ohno, M., Yamaoki, K., Ogasawara, K., Aizawa, T., Suzuki, S., Yazaki, Y.: *Circulation* 95, 2032-2036 (1997)
[21]	Klerk, M., Verhoef, P., Clarke, R., Blom, H. J., Kok, F. J., Schouten, E. G., MTHFR Studies Collaboration Group: *JAMA* 288, 2023-2031 (2002)
[22]	Wouters, M. G., Boers, G. H., Blom, H. J., Trijbels, F. J., Thomas, C. M., Borm, G. F., Steegers-Theunissen, R. P., Eskes, T. K.: *Fertil Steril* 60, 820-825 (1993)
[23]	Nelen, W. L., Blom, H. J., Steegers, E. A., den Heijer, M., Eskes, T. K.: *Fertil Steril* 74,1196-1199 (2000)
[24]	George, L., Mills, J. L., Johansson, A. L., Nordmark, A., Olander, B., Granath, F., Cnattingius, S.: *JAMA* 288, 1867-1873 (2002)
[25]	Gris, J. C., Perneger, T. V., Quere, I., Mercier, E., Fabbro-Peray, P., Lavigne-Lissalde, G., Hoffet, M., Dechaud, H., Boyer, J. C., Ripart-Neveu, S., Tailland, M. L., Daures, J. P., Mares, P., Dauzat, M.: *Blood* 102, 3504-3513 (2003)
[26]	de Franchis, R., Buoninconti, A., Mandato, C., Pepe, A., Sperandeo, M. P., Del Gado, R., Capra, V., Salvaggio, E., Andria, G., Mastroiacovo, P.: *J Med Genet* 35, 1009-1013 (1998)

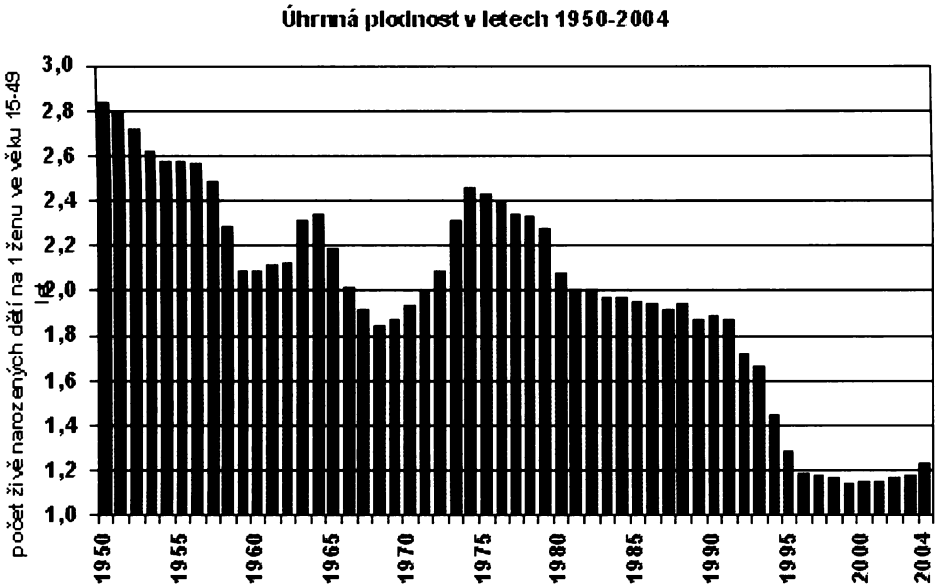
[27]	Christensen, B., Arbour, L., Tran, P., Leclerc, D., Sabbaghian, N., Platt, R., Gilfix, B. M., Rosenblatt, D. S., Gravel, R. A., Forbes, P., Rozen, R.: *Am J Med Genet* 84, 151-157 (1999)
[28]	Ou, C. Y., Stevenson, R. E., Brown, V. K., Schwartz, C. E., Allen, W. P., Khoury, M. J., Rozen, R., Oakley, G. P., Jr., Adams, M. J., Jr., *Am J Med Genet* 63, 610-614 (1996)
[29]	van der Put, N. M. J., Steegers-Theunissen, R. P. M., Frosst, P., Trijbels, F. J. M., Eskes, T. K. A. B., van den Heuvel, L. P., Mariman, E. C. M., den Heyer, M., Rozen, R., Blom, H. J. : *Lancet* 346, 1070-1071 (1995)
[30]	Whitehead, A. S., Gallagher, P., Mills, J. L., Kirke, P. N., Burke, H., Molloy, A. M., Weir, D. G., Shields, D. C., Scott, J. M.: *Q J Med* 88, 763-766 (1995)
[31]	Polymorfismy genu pro MTHFR; gennet.cz [online]; URL: <http://www.gennet.cz/gennet - DNA testy.htm> [cit. 2004-02-29]
[32]	Sohda, S., Arinami, T., Hamada, H., Yamada, N., Hamaguchi, H., Kubo, T.: *Med Genet* 34, 525-526 (1997)
[33]	Kobashi, G., Yamada, H., Asano, T., Nagano, S., Hata, A., Kishi, R., Fujimoto, S., Kondo, K.: *Am J Med Genet* 93, 122-125 (2000)
[34]	Lissak, A., Sharon, A., Fruchter, O., Kastel, A., Sanderovitz, J., Abramovici, H.: *Am J Obstet Gynecol* 181, 126-130 (1999)
[35]	Kumar, K. S., Govindaiah, V., Naushad, S. E., Devi, R. R., Jyothy, A.: *J Obstet Gynaecol* 23, 55-58 (2003)
[36]	Foka, Z. J., Lambropoulos, A. F., Saravelos, H., Karas, G. B., Karavida, A., Agorastos, T., Zournatzi, V., Makris, P. E., Bontis, J., Kotsis, A.: *Hum Reprod* 15, 458-462 (2000)
[37]	Holmes, Z. R., Regan, L., Chilcott, I., Cohen, H.: *Br J Haematol* 105, 98-101 (1999)
[38]	Kutteh, W. H., Park, V. M., Deitcher, S. R.: *Fertil Steril* 71, 1048-1053 (1999)
[39]	Murphy, R. P., Donoghue, C., Nallen, R. J., D'Mello, M., Regan, C., Whitehead, A. S., Fitzgerald, D. J.: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 266-270 (2000)
[40]	Pihusch, R., Buchholz, T., Lohse, P., Rubsamen, H., Rogenhofer, N., Hasbargen, U., Hiller, E., Thales, C. J.: *Am J Reprod Immunol* 46, 124-131 (2001)
[41]	O'Leary, V. B., Parle-McDermott, A., Molloy, A. M., Kirke, P. N., Johnson, Z., Conley, M., Scott, J. M., Mills, J. L.: *Am J Med Genet* 107, 151-155 (2002)

[42]	Hobbs, C. A., Sherman, S. L., Yi, P., Hopkins, S. E., Torfs, C. P., Hine, R. J., Pogribna, M., Rozen, R., James, S. J.: *Am J Hum Genet* 67: 623-630 (2000)
[43]	Stuppia, L., Gatta, V., Gaspari, A. R., Antonucci, I., Morizio, E., Calabrese, G., Palka, G.: *Eur J Hum Genet* 10, 388-390 (2002)
[44]	Boduroglu, K., Alanay, Y., Koldan, B., Tuncbilek, E.: *Am J Med Genet* 127A, 5-10 (2004)
[45]	Castro, R., Rivera, I., Ravasco, P., Camilo, M. E., Jakobs, C., Blom, H. J., de Almeida, I. T.: *J Med Genet* 41, 454-458 (2004)
[46]	van der Put, N. M. J., Gabreels, F., Stevens, E. M. B., Smeitink, J. A. M., Trijbels, F. J. M., Eskes, T. K. A. B., van den Heuvel, L. P., Blom, H. J.: *Am J Hum Genet* 62, 1044-1051 (1998)
[47]	Weisberg, I., Tran, P., Christensen, B., Sibani, S., Rozen, R.: *Mol Genet Metab* 64, 169-172 (1998)
[48]	Chango, A., Boisson, F., Barbe, F., Quilliot, D., Droesch, S., Pfister, M., Fillon-Emery, N., Lambert, D., Fremont, S., Rosenblatt, D. S., Nicolas, J. P.: *Br J Nutr* 83, 593-596 (2000)
[49]	Yamada, K., Chen, Z., Rozen, R., Matthews, R. G.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14853-14858 (2001)
[50]	Isotalo, P. A., Wells, G. A., Donnelly, J. G.: *Am J Hum Genet* 67, 986-990 (2000)
[51]	Volcik, K. A., Blanton, S. H., Northrup, H.: *Am J Hum Genet* 69, 1150-1152 (2001)
[52]	Zetterberg, H., Regland, B., Palmer, M., Ricksten, A., Palmqvist, L., Rymo, L., Arvanitis, D. A., Spandidos, D. A., Blennow, K.: *Eur J Hum Genet* 10, 113-118 (2002)
[53]	Roztočil, Aleš: Porodnictví. NCO NZO, Brno, Česká Republika (2001)
[54]	Cross, J. C.: *Clin Genet* 64, 96-103 (2003)
[55]	Chesley, L. C., Cooper, D. W.: *Br J Obstet Gynaecol* 93(9), 898-908 (1986)
[56]	Arngrimsson, R., Bjornsson, S., Geirsson, R. T., Bjornsson, H.; Walker, J. J., Snaedal, G.: *Brit J Obstet Gynaecol* 97, 762-769 (1990)
[57]	Esplin, M. S., Fausett, M. B., Fraser, A., Kerber, R., Mineau, G., Carrillo, J., Varner, M. W.: *New Engl J Med* 344, 867-872 (2001)

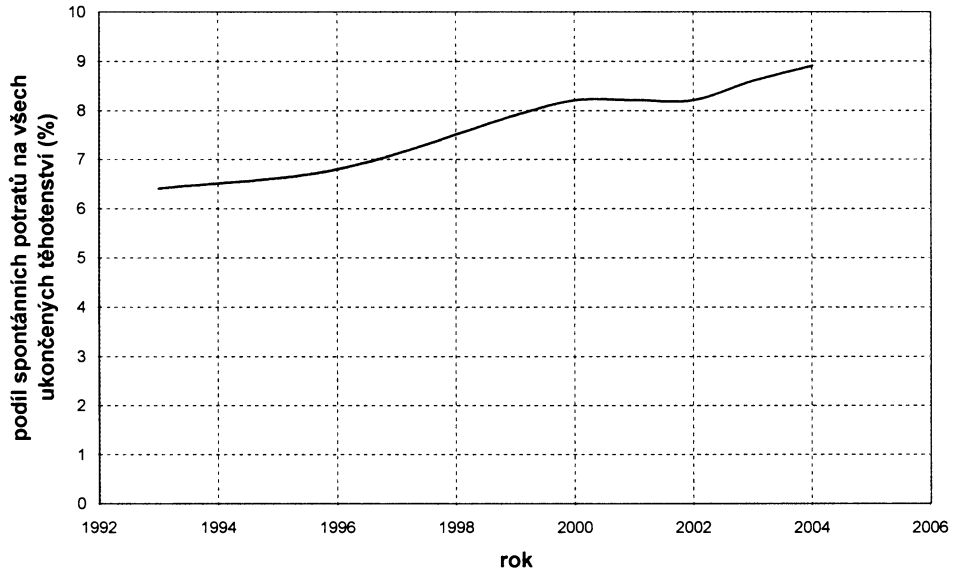
[58]	Genomic DNA purification with NucleoSpin® Blood; mn-net.com [online]; URL: <https://www.mn-net.com/web/MN-WEB-BioKatalog.nsf/web/BLOOD11/$File/GenomicDNABlood_R04.pdf> [cit. 2006-03-20]
[59]	NIEHS-SNPs, Environmental Genome Project, NIEHS ES15478, Department of Genome Sciences, Seattle, WA; egp.gs.washington.edu [online]; URL: <http://egp.gs.washington.edu/data/mthfr/mthfr.ColorFasta.html> [cit. 2006-03-20]
[60]	Janošíkova, B., Pavlikova, M., Kocmanova, D., Vitova, A., Vesela, K., Krupkova, L., Kahleova, R., Krijt, J., Kraml, P., Hyanek, J., Zvarova, J., Andel, M., Kozich, V.: *Mol Genet Metab* 79, 167-175 (2003)
[61]	Laivuori, H., Kaaja, R., Ylikorkala, O., Hiltunen, T., Kontula, K.: *Obstet Gynecol* 96(2), 277-80 (2000)
[62]	Rajkovic, A., Mahomed, K., Rozen, R., Malinow, M. R., King, I. B., Williams, M. A.: *Mol Genet Metab* 69, 33-39 (2000)
[63]	Wang, X. P., Lin, Q. D., Ma, Z. W., Zhao, A. M.: *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 39(4), 238-241(2004)
[64]	Unfried, G., Griesmacher, A., Weismuller, W., Nagele, F., Huber, J. C., Temper, C. B.: *Obstet Gynecol* 99(4), 614-9 (2002)
[65]	Úvod: vývoj obyvatelstva v roce 2004; czso.cz [online]; URL: <http://www.czso.cz/csu/edicniplan.nsf/t/3B0023DE75/$File/4007rra.pdf> [cit. 2006-03-20]

9 Přílohy

Příloha č. 1: Údaje českého statistického úřadu



Úhrnná plodnost v letech 1950-2004 [1] – úhrnná plodnost je definována jako průměrný počet živě narozených dětí připadajících na jednu ženu ve věku 15-49 let



Podíl spontánních potratů na všech ukončených těhotenství, 1993-2004 [65]

Příloha č. 2: Dopis kontaktující pacientky hospitalizované na GPK LF UK a FN Plzeň v letech 2000 až 2003

Vážená paní, vážená slečno!

Obracíme se na Vás, protože v roce <rok> jste byla hospitalizována na Gynekologicko-porodnické klinice Fakultní nemocnice v Plzni pro komplikace v těhotenství.

V současnosti se pozornost zaměřuje na spojitost výskytu rizikových genových kombinací a komplikací těhotenství. Toto je také náplň výzkumného projektu, na němž se podílí Gynekologicko-porodnická klinika, Ústav lékařské genetiky LF UK a FN v Plzni a studentka Přírodovědecké fakulty UK, která tento problém zpracovává ve své diplomové práci na téma *Výskyt mutací genu pro methylentetrahydrofolátreduktasu u žen s komplikovaným průběhem gravidity.*

Obracíme se na Vás proto se žádostí o spolupráci spočívající v odběru malého množství krve či slin. Tímto pomůžete nejen nám, ale i lékařům na celém světě, lépe poznat příčiny rizikových těhotenství a způsoby, jak těmto komplikacím předcházet. Ujišťujeme Vás, že získané vzorky budou využity zcela anonymně a to pouze pro výzkumné účely v rámci Ústavu lékařské genetiky LF UK a FN v Plzni a nebudou předávány jiným osobám či organizacím.

Prosíme Vás proto, abyste kontaktovala pracovnici výzkumného týmu Markétu Dajbychovou na tel. č. 724028493, kde s Vámi bude dohodnut způsob odběru, případně zašlete svoje kontaktní údaje na následující adresu a my se s Vámi spojíme.

Kontaktní adresa: Markéta Dajbychová, studentka PřF UK
Ústav lékařské genetiky LF UK a FN
E. Beneše 13, 305 99 Plzeň
nebo e-mail: marketka@dajbych.cz

Předem děkujeme za Vaši spolupráci

Doc. MUDr. Zdenka Ulčová-Gallová, DrSc.
Gynekologicko-porodnická klinika LF UK a FN Plzeň

MUDr. Ivan Šubrt
Ústav Lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň

Příloha č. 3: Dopis, ve kterém byl pacientkám zaslán set určený ke stěru sliznice ústní dutiny

Vážená paní, vážená slečno!

Na základě Vašeho souhlasu s účastí na výzkumném projektu Gynekologicko-porodnické kliniky a Ústavu lékařské genetiky LF UK a FN v Plzni týkajícího se komplikací v těhotenství Vám zasíláme set určený ke stěru sliznice ústní dutiny. Z technických důvodů jsme se rozhodli pro stěr sliznice ústní dutiny místo odběru krve. Věříme, že tato změna bude i pro Vás příjemnější.

V obálce naleznete sterilní zkumavku, malý kartáček, obálku se zpáteční adresou, informovaný souhlas s analýzou DNA a stručný návod ke stěru sliznice ústní dutiny. Proveďte prosím stěr sliznice ústní dutiny podle návodu. V obálce se zpáteční adresou nám prosím zašlete vyplněný informovaný souhlas a zkumavku, v níž bude vložen kartáček se vzorkem sliznice ústní dutiny.

V případě jakékoli nejasnosti se obraťte na pracovnici výzkumného týmu Markétu Dajbychovou na tel. č. 724028493 nebo e-mailu marketka@dajbych.cz

Děkujeme za Vaši spolupráci

Doc. MUDr. Zdenka Ulčová-Gallová, DrSc.
Gynekologicko-porodnická klinika LF UK a FN Plzeň

MUDr. Ivan Šubrt
Ústav Lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň

Příloha č. 4: Návod k provedení stěru sliznice ústní dutiny

Návod k odběru biologického materiálu z ústní sliznice:

1) v obálce naleznete malý kartáček a sterilní zkumavku
2) ráno před čištěním zubů a jídlem kartáčkem důkladně setřete vnitřní stranu tváří a dásně
3) dbejte, aby se štětinky kartáčku nedotkly něčeho jiného než ústní dutiny
4) otevřete zkumavku, kartáček vložte dovnitř, přebytečnou část odstřihněte a zkumavku pečlivě uzavřete
5) zkumavku vložte do přiložené obálky se zpáteční adresou a spolu s informovaným souhlasem s analýzou DNA odešlete co nejdříve poštou

Příloha č. 5: Informovaný souhlas s molekulárně genetickým vyšetřením

Informovaný souhlas s molekulárně genetickým vyšetřením

infertilita, preeklampsie, reprodukční ztráty

Příjmení, jméno: .....

1) Souhlasím, aby mně byl odebrán biologický materiál na molekulárně genetické vyšetření.
2) Souhlasím s tím, že vzorky izolované DNA mohou být skladovány i několik let v závislosti na pokroku výzkumu v této oblasti. Potvrzuji, že jsem byla poučena o významu vyšetření.
3) Potvrzuji tímto, že má účast na výzkumných projektech, ve kterých budou analyzovány moje vzorky DNA, je dobrovolná.
4) Souhlasím s tím, že mně nebudou sděleny výsledky genetického testování. Pokud budoucí výzkum objeví některé další zásadní informace o nových možnostech genetického vyšetření, souhlasím, abych byla o těchto možnostech informována.
5) Jsem si vědoma, že individuálně rozpoznatelný vzorek DNA zůstává mým majetkem a mohu žádat jeho vrácení nebo zničení, i toho, že kterýkoli z výše uvedených souhlasů mohu kdykoli odvolat.

Datum Podpis

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka