

# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

## 2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav klinické biochemie a patobiochemie

**Michal Rataj**

Detekce genetických variant predikujících  
pravděpodobnost vzniku kardiovaskulárních  
komplikací u vybraných rizikových skupin  
pacientů (dyslipidémie, stabilní a nestabilní  
angina pectoris).

*Bakalářská práce*

Praha 2011

Autor práce: **Michal Rataj**  
Vedoucí práce: **Ing. Karel Kotaška Ph.D.**  
Oponent práce: **Ing. Eva Klapková Ph.D.**  
Datum obhajoby: **2011**

## **Bibliografický záznam**

Rataj, Michal. Detekce genetických variant predikujících pravděpodobnost vzniku kardiovaskulárních komplikací u vybraných rizikových skupin pacientů (dyslipidémie, stabilní a nestabilní angina pectoris). Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2011. s. 64, Vedoucí bakalářské práce Ing. Karel Kotaška Ph.D.

## ANOTACE

Kardiovaskulární onemocnění patří mezi nejčastější příčiny smrti v moderní společnosti. Riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění ovlivňují genetické varianty a environmentální faktory. Cílem práce je detekce polymorfizmů a mutací podílejících se na predikci rizika vzniku kardiovaskulárních příhod u dvou rizikových skupin pacientů (pacienti s kardiovaskulárním onemocněním – stabilní a nestabilní angina pectoris, a pacienti s poruchami lipidového spektra).

U pacientů s poruchami lipidového spektra byly vyšetřeny následující mutace a polymorfizmy: Endotelová syntáza oxidu dusnatého (eNOS) (G894T) a (T-786C), Lymfotoxin alfa (LTA) (C804A), Angiotensin konvertující enzym (ACE) (287 bp inserce/delece (I/D)), Antigen lidských krevních destiček 1 (HPA-1) (T196C; a/b),  $\beta$ -fibrinogen (G455A), Apolipoprotein B (ApoB) (R3500Q), Apolipoprotein E (ApoE) (E2/E3/E4). Bylo vyšetřeno 27 pacientů z toho 14 žen (31 – 89 let), 13 mužů (28 – 82 let).

U pacientů s kardiovaskulárními onemocněními byly vyšetřovány tyto varianty: Faktor V (FV) (G1691A), Faktor V (FV) R2 haplotyp (H1299R), Protrombin (PTH) (G20210A), 5,10 – Methylentetrahydrofolát reduktáza (MTHFR) (C677T) a (A1298C), Faktor XIII (FXIII) (V34L), Inhibitor aktivátoru plazminogenu – 1 (PAI-1) (4G/5G), Endoteliální receptor proteinu C (EPCR) (A4600G; A3 haplotyp) a (G4678C; A1 haplotyp). Bylo vyšetřeno 36 pacientů z toho 15 žen (55 – 89 let) a 21 mužů (41 – 83 let). Genetické varianty byly vyšetřovány metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) s reverzní hybridizace na reagenčních stripech ViennaLab CVD Strip assay. Nejčastějšími variantami ve skupině pacientů s dyslipoproteinémií byly ACE (ins/del) – 25 pacientů a eNOS (T-786C) – 19 pacientů.

Nejčetnějšími variantami ve skupině pacientů s kardiovaskulárními onemocněními byly - PAI-1 (4G/5G) – 36 pacientů a FXIII (V34L) – 31 pacientů.

Vyšetřené frekvence ve většině polymorfizmů korelují s publikovanými literárními zdroji.

## ANNOTATION

Cardiovascular diseases are the most frequent causes of death worldwide. Genetic variants and environmental factors play significant role in cardiovascular disease risk. The aim of presented work is investigation of genetic variants associated with cardiovascular diseases in two risk groups (patients with cardiovascular disease - stable and unstable angina pectoris, and patients with lipid disorders).

Patients with lipid disorders have been examined for following mutations and polymorphisms: Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (G894T) and (T-786C), lymphotoxin alpha (LTA (C804A), angiotensin-converting enzyme (ACE) (287 bp insertion/deletion (I / D)), human platelet antigen 1 (HPA-1) (T196C, A / B), beta-fibrinogen (G455A), apolipoprotein B (apoB) (R3500Q), apolipoprotein E (ApoE) (E2/E3 / E4). 27 patients (14 women (aged 31-89 years) and 13 men (aged 28-82 years) were examined.

Patients with cardiovascular disease were examined for following variants: factor V (FV) (G1691A), factor V (FV) R2 haplotype (H1299R) prothrombin (PTH) (G20210A), 5.10 - methylenetetrahydrofolát reductase (MTHFR) (C677T) and (A1298C), Factor XIII (FXIII) (V34L), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) (4G/5G), endothelial protein C receptor (EPCR) (A4600G; haplotype A3) and (G4678C, A1 haplotype). 36 patients including 15 women (aged 55-89 years) and 21 males (aged 41-83 years) were included. Genetic variants were examined by polymerase chain reaction (PCR) with reverse hybridization and enzymatic detection on the reagent strips ViennaLab CVD strip assay.

The most common variants in the group of patients with dyslipoproteinemia were ACE (ins. / del.) - 25 patients and eNOS (T-786C) - 19 patients. The most variants among patients with cardiovascular diseases were - FXIII (V34L). 31 patients and PAI-1 (4G/5G) - 36 patients.

In most of the cases acquired results of polymorphisms correlate with the other published studies.

## **Klíčová slova**

Kardiovaskulární onemocnění, genetické polymorfizmy, ateroskleróza, angina pectoris, dyslipidémie, PCR s reverzní hybridizací

## **Keywords**

Cardiovascular diseases, genetic polymorphisms, atherosclerosis, angina pectoris, dyslipidemia, PCR with reverse hybridization.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracoval(a) samostatně pod vedením Ing. Karla Kotašky Ph.D, uvedl(a) všechny použité literární a odborné zdroje a dodržel(a) zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 9.5.2011

Michal Rataj

## **Poděkování**

Na tomto místě bych rád chtěl poděkovat svému školiteli Ing. Karlovi Kotaškovi Ph.D za trpělivost, čas a cenné rady v průběhu celé práce, a také za vřelý přístup při řešení jakéhokoliv problému. Chtěl bych také poděkovat Pavle Kubešové a Radce Matějové a celému kolektivu laboratoře klinické biochemie za pomoc a rady v praktické části práce. Poděkování patří mé rodině, přátelům a skvělému kolektivu spolužáků, kteří mě podporovali v průběhu celého studia.



# OBSAH

ANOTACE .....	4
ANOTATION.....	5
ÚVOD.....	11
TEORETICKÁ ČÁST.....	12
<b>1 EPIDEMIOLOGIE KARDIOVASKULÁRNÍCH CHOROB.....</b>	<b>12</b>
<b>2 RIZIKOVÉ FAKTORY KARDIOVASKULÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ .....</b>	<b>16</b>
2.1 ATEROSKLERÓZA .....	16
2.1.1 PRINCIP TVORBY ATEROSKLEROTICKÉHO PLÁTU .....	17
<b>3 KARDIOVASKULÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ .....</b>	<b>18</b>
3.1 ANGINA PECTORIS.....	18
3.1.1 STABILNÍ ANGINA PECTORIS.....	18
3.1.2 NESTABILNÍ ANGINA PECTORIS.....	18
3.2 INFARKT MYOKARDU .....	19
<b>4 GENETICKÉ FAKTORY KARDIOVASKULÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ .....</b>	<b>21</b>
4.1 PROTEINY A GENETICKÉ VARIANTY RIZIKOVÉ PRO VZNIK ATEROSKLERÓZY .....	22
4.1.1 ENDOTELOVÁ SYNTÁZA OXIDU DUSNATÉHO (eNOS).....	22
4.1.1.1 eNOS (G894T).....	22
4.1.1.2 eNOS (T-786C).....	23
4.1.2 LYMFOTOXIN ALFA.....	24
4.1.2.1 LYMFOTOXIN ALFA (C804A) a (A252G).....	24
4.1.3 ANGIOTENZIN KONVERTUJÍCÍ ENZYM (ACE).....	25
4.1.3.1 ACE (287 bp INZERCE/DELECE (I/D)) .....	25
4.1.4 ANTIGEN LIDSKÝCH KREVNÍCH DESTIČEK 1 (HPA-1, GpIIIa;INTEGRIN $\beta$ 3)....	26
4.1.4.1 HPA-1 (T196C; fenotypy a/b).....	26
4.1.5 $\beta$ -FIBRINOGEN .....	27
4.1.5.1 $\beta$ -FIBRINOGEN (G455A).....	27
4.1.6 APOLIPOPROTEIN B (APO B).....	28
4.1.6.1 APOLIPOPROTEIN B (R3500Q) .....	28
4.1.7 APOLIPOPROTEIN E (APO E) .....	29
5.1.7.1 APOLIPOPROTEIN E (E2/E3/E4).....	29

4.2	PROTEINY A GENETICKÉ VARIANTY SPOJENÉ S RIZIKEM VZNIKU	
	TROMBÓZY .....	30
4.2.1	FAKTOR V (FV) .....	30
4.2.1.1	FAKTOR V LEIDEN (G1691A) .....	30
4.2.1.2	FAKTOR V R2 haplotyp (H1299R) .....	31
4.2.2	PROTROMBIN (PTH) .....	32
4.2.2.1	PROTROMBIN (G20210A) .....	32
4.2.3	METHYLENTETRAHYDROFOLÁT REDUKTÁZA (MTHFR) .....	33
4.2.3.1	MTHFR (C677T) .....	33
4.2.3.2	MTHFR (A1298C) .....	33
4.2.4	FAKTOR XIII (FXIII) .....	34
4.2.4.1	FAKTOR XIII (V34L) .....	34
4.2.5	INHIBITOR AKTIVÁTORU PLAZMINOGENU -1 (PAI-1, Serpin E1) .....	35
4.2.5.1	PAI-1 (4G/5G) .....	35
4.2.6	ENDOTELIÁLNÍ RECEPTOR PROTEINU C (EPCR) .....	36
4.2.6.1	EPCR (A4600G; haplotyp A3) .....	36
4.2.6.1	EPCR (G4678C; haplotyp A1) .....	37
<b>5</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>38</b>
	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>SOUBOR PACIENTŮ .....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>METODY .....</b>	<b>42</b>
7.1	PRINCIP METODY .....	42
7.2	POSTUP METODY .....	42
7.3	PŘÍSTROJE .....	46
7.4	SPOTŘEBNÍ MATERIÁL .....	46
7.5	CHEMIKÁLIE .....	46
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>48</b>
<b>9</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>52</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>55</b>
	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERENČNÍ SEZNAM .....</b>	<b>58</b>

## ÚVOD

Téma bakalářské práce jsem si vybral z důvodu svého zájmu o kardiovaskulární onemocnění, které se velmi blízce dotýkají mého osobního života. Zaujala mě i genetická podstata vyšetřovaných onemocnění, která se velmi komplexně věnuje genetickým predispozicím. Komplexní pohled na genetické polymorfizmy rozšířil mé vědomosti do oblasti fyziologie a patologie lidského těla. Důležitý je vývoj nových moderních, genetických a biologických metod, které mají v budoucnosti velké využití.

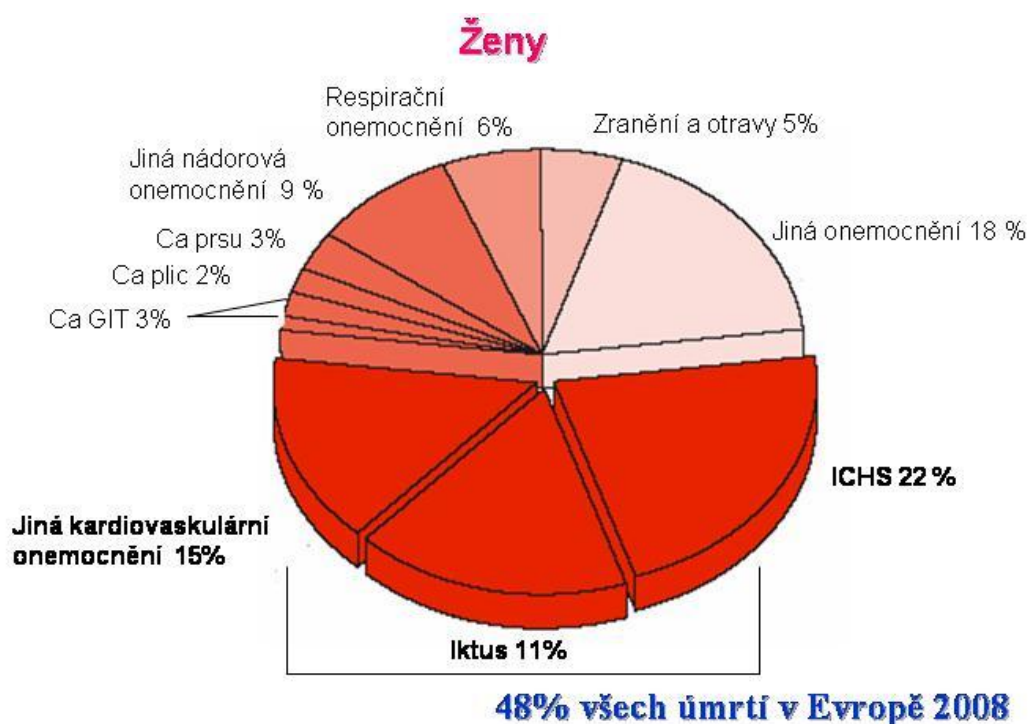
V dnešní době je nutné se věnovat problematice kardiovaskulárních chorob, jejich příčinám a důsledkům, protože vysoká úmrtnost a obtížná diagnostika je řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí na celém světě.

V mé práci se zabývám metodou vyšetřující polymorfizmy a mutace predikující riziko kardiovaskulárních příhod ve vybraných skupinách pacientů (pacienti s poruchami lipidového metabolismu a pacienti s kardiovaskulárními onemocněními).

## TEORETICKÁ ČÁST

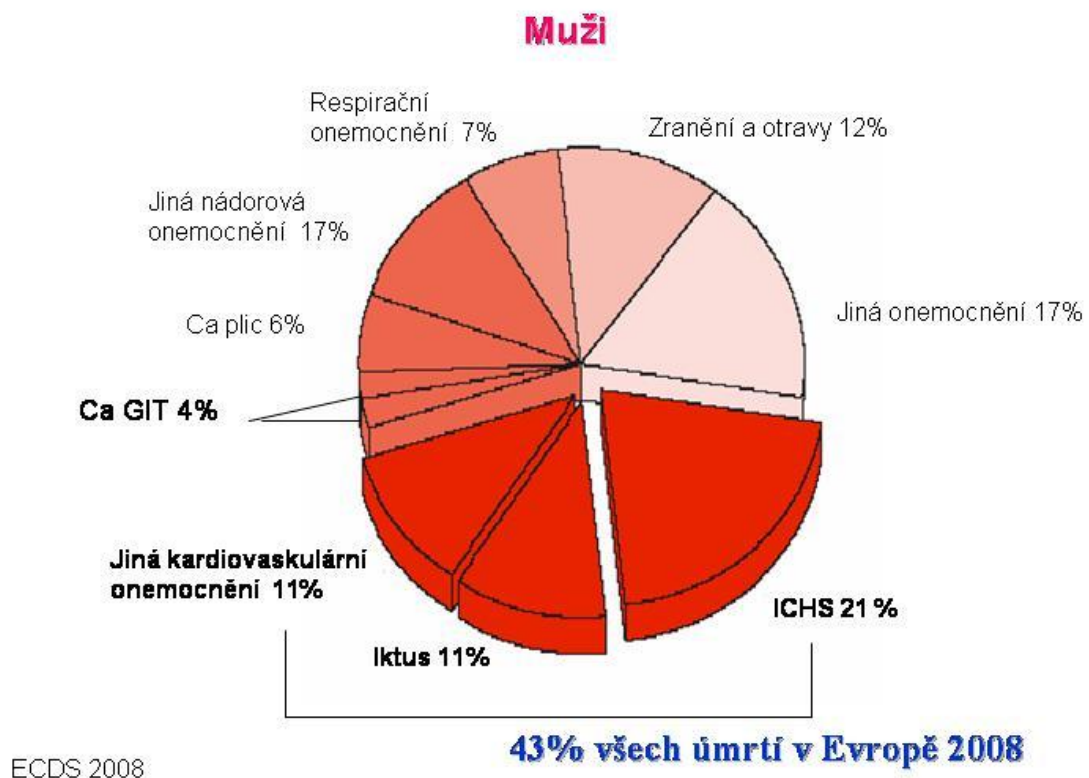
### 1 Epidemiologie kardiovaskulárních onemocnění

Kardiovaskulární choroby jsou v dnešní době jedny z nejsledovanějších a nejkoumanějších onemocnění světa. Podle Světové zdravotnické organizace zemřelo jen v roce 2004 17,1 milionu lidí, což je 29% všech úmrtí na celém světě. 7,2 milionu lidí zemřelo pouze na ischemickou chorobu srdeční a 5,7 milionu na cévní mozkovou příhodu. Dle WHO za rok 2002 v Evropě představovaly kardiovaskulární choroby více než 50% všech úmrtí [1, s. 1]. Podle údajů Evropské společnosti pro kardiovaskulární onemocnění (ECDS) za rok 2008 jsou kardiovaskulární onemocnění příčinou úmrtí u 43% mužů a u 48% žen v Evropě (Obr 1).



ECDS 2008

Obrázek 1: European heart network; European cardiovascular disease statistics; ehnheart.org, 2008.



**Obrázek 2: European heart network; European cardiovascular disease statistics; ehheart.org, 2008.**

V České republice patří kardiovaskulární onemocnění mezi hlavní příčinu úmrtí. V roce 2004 zemřelo v ČR 55 tisíc obyvatel, což představuje úmrtnost až 51% [2, s. 1]. V dalších letech se tento stav nemá zlepšovat, a tak zůstanou kardiovaskulární choroby na prvním místě příčin úmrtí na světě.

Kardiovaskulární choroby jsou závislé na genetických a environmentálních faktorech. Proto je velmi obtížné tyto onemocnění diagnostikovat a léčit. Základem by měla být prevence. Genetické aspekty se nedají ovlivnit na rozdíl od aspektů environmentálních. Obezita, kouření, nezdravý styl života, nedostatek pohybu a stres a také sociálním postavení jedinců. Každý se může alespoň z části věnovat životnímu stylu a pozitivně ho ovlivnit.

Už kvůli těmto závěrům je důležité se věnovat prevenci a samotné léčbě, tak abychom dokázali změnit negativní čísla, která představují opravdové životy lidí [3, s. 1], [4, s. 1]. Základní přehled kardiovaskulárních onemocnění shrnuje tabulka 1.

**Tabulka 1: Základní přehled kardiovaskulárních onemocnění**

Onemocnění	Charakteristika, rizikové faktory a příčiny onemocnění
<i>Hypertenze</i>	Vysoký krevní tlak, nejčastější kardiovaskulární onemocnění. Zvýšený krevní tlak v cévách. Rizikový faktor pro srdeční selhání, iktus, ischemickou chorobu srdeční.
<i>Ischemická choroba srdeční</i>	Nejčastější forma kardiovaskulárního onemocnění. Aterosklerotické onemocnění arterií zásobujících srdeční sval krví. Hlavní příčina infarktu a anginy pectoris. <u>Hlavní</u> vysoký krevní tlak, vysoké hladiny cholesterolu v séru, kouření, diabetes, věk >50 let, nadměrný příjem potravy, genetické dispozice <u>Jiné</u> chudoba, nízké vzdělání, deprese, zánětlivá onemocnění
<i>Infarkt myokardu</i>	Poškození srdečního svalu v důsledku nedostatečného přívodu krve, nejčastěji v důsledku obstrukce koronární artérie.
<i>Městnavá srdeční selhání</i>	Stav, kdy srdce není schopno přečerpávat dostatek krve do tkání. V důsledku toho dochází k častým dechovým nedostatečnostem, nadměrné únavě. Rozvíjí se náhle nebo v průběhu několika let. Rizikové faktory – kardiomyopatie, ischemická choroba srdeční
<i>Kardiomyopatie</i>	Onemocnění srdečního svalu. Mohou mít genetický podklad. Další typy – <u>ischemická kardiomyopatie</u> – poškození srdečního svalu v důsledku ischemie <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>dilatovaná kardiomyopatie</u> – rozšíření srdce</li> <li>- <u>hypertrofická kardiomyopatie</u> – zúžení srdečního svalu</li> <li>- <u>idiopatická kardiomyopatie</u> – neznámé příčiny</li> <li>- <u>idiopatická dilatovaná kardiomyopatie</u> – rozšíření srdce z neznámých příčin.</li> </ul>
<i>Srdeční arytmie</i>	Poruchy srdečního rytmu a nepravidelnosti v srdeční činnosti Rizikové faktory – ostatní srdeční onemocnění
<i>Revmatická srdeční onemocnění</i>	Následek revmatické horečky způsobené streptokokovými bakteriemi
<i>Vrozená srdeční onemocnění</i>	Vrozené malformace srdečních struktur způsobené genetickými faktory nebo vnějšími vlivy během těhotenství (vady síní a komor, koarktace aorty) Rizikové faktory – alkoholismus v těhotenství, nadměrné užívání léků (thallidomidy, warfarin), mateřské infekce, nedostatek folátu v potravě těhotných, pokrevní příbuzenství rodičů
<i>Onemocnění srdečních chlopní (Chlopenní srdeční vady)</i>	Onemocnění srdečních chlopní (stenózy-zúžení, regurgitace-rozšíření, prolapsy- nedostatečné uzavření). Mohou být vrozené. Rizikové faktory – revmatická horečka, infekční onemocnění (endokarditidy), nemoci pojivových tkání, stav po chemoterapii některých nádorů

<b><i>Aneurysma aorty</i></b>	Dilatace a ruptura aorty Rizikové faktory – dlouhodobě přetrvávající vysoký krevní tlak, Marfanův syndrom, věk >50 let, vrozená srdeční onemocnění, syfilis, jiná infekční a zánětlivá onemocnění
<b><i>Iktus</i></b>	Přerušení přívodu krve do mozku <u>Ischemický iktus</u> – zablokování přívodu v důsledku ischemie <u>Hemorragický iktus</u> – ruptura cévní stěny Rizikové faktory – vysoký krevní tlak, fibrilace síní a poruchy srdečního rytmu, vysoké koncentrace sérového cholesterolu, kouření, diabetes, věk >50 let, nadměrný příjem potravy
<b><i>Periferní onemocnění arterií</i></b>	Onemocnění arterií zásobujících končetiny (zúžení cév) Rizikové faktory stejné jako u ischemické choroby srdeční
<b><i>Hluboké cévní trombózy a plicní embolie</i></b>	Krevní sraženiny v žilách dolních končetin, které mohou putovat v krevním řečišti až do srdce a plic a tam způsobit embolii. Rizikové faktory – chirurgické zákroky, obezita, nádorová onemocnění, předcházející trombózy, užívání kontraceptiv, dlouhé omezení pohybu při cestování, vysoké hladiny homocysteinu v séru
<b><i>Jiná kardiovaskulární onemocnění</i></b>	Nádory srdce, cévní nádory v mozku, nemoci srdečního stromu, zánětlivá onemocnění (endokarditidy, perikarditidy)

Rizikové faktory podílející se na vzniku kardiovaskulárních onemocnění můžeme rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Jejich souhrn je znázorněn v tabulce 2.

**Tabulka 2: Rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění**

<b>Neovlivnitelné</b>	<b>Ovlivnitelné</b>
<p><i>Věk</i> (muži &gt;55 let, ženy &gt; 65 let)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Rodinná anamnéza předčasné aterosklerózy</i></li> </ul> <p>(u prvostupňových příbuzných : muži &gt;45 let, ženy &gt; 65 let)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>přítomnost onemocnění aterosklerotické etiologie</i></li> <li>- <i>genetické faktory</i></li> <li>- <i>mužské pohlaví</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>arteriální hypertenze</i></li> <li>- <i>dyslipidemie</i></li> <li>- <i>hladiny celkového cholesterolu v séru</i></li> <li>- <i>hladiny LDL cholesterolu v séru</i></li> <li>- <i>hladiny triacylglycerolů v séru</i></li> <li>- <i>hladiny HDL cholesterolu v séru</i></li> <li>- <i>diabetes mellitus 2. typu</i></li> <li>- <i>nadváha, obezita</i></li> <li>- <i>kouření</i></li> <li>- <i>nízká fyzická aktivita</i></li> <li>- <i>metabolický syndrom</i></li> <li>- <i>hladiny sérového hsCRP</i></li> <li>- <i>chronické onemocnění ledvin</i></li> <li>- <i>homocysteinemie</i></li> </ul>

## 2 Rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění

### 2.1 Ateroskleróza

Ateroskleróza je onemocnění endotelu cév, na kterém se podílí asi 400 genů a řada environmentálních faktorů, které více nebo méně zasahují do procesu aterosklerózy [5, s. 113]. Ateroskleróza je multifaktoriální onemocnění cév, projevujících se rozšířením cévy, protržením stěny, zúžením cévy nebo snížením průtoku krve [6, s. 162]. Vzniká hlavně při onemocnění cév velkého typu (například aorty, věnčitých artérií, karotid, artérií dolních končetin atd.)

Ateroskleróza je dlouhodobý proces. Postupným poškozováním endotelu ztrácí céva své fyziologické funkce (např. obrana proti agregaci trombocytů, vazba modifikovaných lipidů nebo adheze monocytů a jiné.) Vytvářejí se kalcifikované aterosklerózní pláty, které zúžují průsvit cévy, a hrozí riziko vzniku trombu. Trombus se může uvolnit do krevní cirkulace a může způsobit ischemii i na vzdáleném místě. Proto je ateroskleróza jedním z vážných příčin infarktu myokardu, plicní embolie nebo cévní mozkové příhody [7, s. 79].

Na vzniku aterosklerózy se podílí řada faktorů. Faktory můžeme rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné.

Souhrn rizik je uveden v následujícím přehledu:

#### Neovlivnitelná rizika

- věk- manifestace aterosklerózy stoupá s věkem
- pohlaví- častěji muži než ženy (do menopauzy)
- genetické faktory (familiární)- častěji jsou postiženi ti, kteří mají v rodinné anamnéze výskyt předčasné aterosklerózy nebo akutního infarktu myokardu

#### Ovlivnitelná rizika

- hyperlipoproteinémie- zvýšená hladina krevních tuků (především cholesterolu) - souvisí s dietními návyky
- kouření- výrazně vyšší výskyt ischemické choroby srdeční (IČS) a úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění.



- hypertenze- vysoký krevní tlak
- diabetes mellitus- urychluje vývoj aterosklerózy
- obezita
- nedostatek fyzické aktivity- sedavý způsob života
- stres, psychosociální faktory

### **2.1.1 Princip tvorby aterosklerotického plátu**

Tvorba aterosklerotického plátu je dlouhodobý vysoce komplexní patologický proces zahrnující tvorbu stabilního aterosklerotického plátu, jeho následnou destabilizaci s rupturou plátu a vznik trombu. Tvorba aterosklerotického plátu je zprostředkována expresí adhezivních molekul v buňkách cévního endotelu, které umožňují adhezi buněk na povrch cévní stěny, aktivaci proliferace buněk cévního endotelu s následnou expresí růstových faktorů. Dochází k akumulaci pěnových buněk, které pohlcují přebytečné lipoproteiny a mastné kyseliny a vytvářejí stabilní aterosklerotický plát. Lipoproteinové částice (zejména LDL (lipoproteiny s nízkou hustotou) a VLDL (lipoproteiny s velmi nízkou hustotou), jsou vázány na proteoglykany. Proteoglykany se podílejí na oxidativní fosforylaci a glykaci LDL a tyto modifikované lipoproteiny jsou ukládány ve stěně cévního endotelu. Hlavními mechanismy modifikace jsou glykace při diabetes mellitus, kdy dochází k modifikaci lipidů glukózou a vznikají tzv. AGE (konečné produkty glykace a oxidace volných mastných kyselin).

V důsledku pokračujícího zánětlivého procesu dochází k expresi a aktivaci mediátorů vyvolávajících trombózu (např. faktor VII, CD40L receptor), což vede k následné ruptuře aterosklerotického plátu a vzniku trombózy. Trombóza je hlavní příčinou akutních komplikací aterosklerózy. Vytvoření trombu vede k zastavení toku krve postiženou cévou a dochází ke vzniku akutní koronární příhody [8, s. 175, 9, s. 2].

## **3 Kardiovaskulární onemocnění**

### **3.1 Angina pectoris**

Angina pectoris patří do skupiny kardiovaskulárních chorob. Je způsobená zúžením koronární arterie aterosklerotickým plátem nebo krevní sraženinou. Způsobuje nedostatečnou kontraktilitu myokardu, což má za následek nedostatečný přísun kyslíku do tkání v klidu a při fyzické námaze [6, s. 266]. Angina pectoris představuje vysoké riziko vzniku akutní ischemie a závažného ohrožení života. Hlavními klinickými příznaky anginy pectoris jsou tlak a svíravá bolest na hrudi, která se může rozšířit do levé horní končetiny, prstů a oblasti krku. Ve většině méně závažných případů tyto příznaky velmi záhy ustupují. Jsou známy dvě klinicky významné formy – stabilní a nestabilní angina pectoris.

#### **3.1.1 Stabilní angina pectoris**

U stabilní anginy pectoris lze předpokládat ataku ischemie při různých fyzicky náročných činnostech (rychlá chůze, běh, chůze do schodů, stres...) přibližně jedenkrát týdně. Je možné se těmito činnostem vyhnout, a tak se vyvarovat iniciačního podnětu [6, s. 266].

#### **3.1.2 Nestabilní angina pectoris**

Nestabilní angina pectoris je klinicky závažnější formou s předem obtížně předpověditelnými příznaky, které se často objevují opakovaně vícekrát (až 3x) denně. Jedinci s nestabilní anginou pectoris mají zvýšenou intenzitu obtíží. Nestabilní angina pectoris je vážným rizikem infarktu myokardu.

Hlavní diagnostika anginy pectoris spočívá v kardiologickém vyšetření (EKG a echokardiografie, rentgenové vyšetření věnčitých tepen) [6, s. 266].

### 3.2 Infarkt myokardu

Infarkt myokardu je nejběžnějším akutním kardiovaskulárním onemocněním s nejčastějším rizikem úmrtí. Například studie ze Spojených států amerických vypovídá o vysokém počtu, až 1,5 milionu postižených pacientů. Mezi evropskými státy má největší úmrtnost Německo. Zde je incidence o dvě třetiny nižší oproti USA. Ostatní evropské státy mají nižší hodnotu závisící na počtu, obyvatel a životním stylu [10, s. 161; 3, s. 1].

Koronární ischemie neboli snížení krevního zásobení části srdečního svalu závisí na velikosti a místě uzávěru koronární tepny a míře poškození myokardu. Infarkt je rozdělen do tří typů podle výše zmíněných faktorů. Pokud poškozené místo zasahuje ischemií celou šířku stěny komory, jedná se o transmurální infarkt. Pokud je ložisko uvnitř stěny myokardu, jedná se o intramurální infarkt, a třetím typem je ischemie v subendokardiální oblasti [7, s. 162].

Tabulka 3 shrnuje faktory ovlivňující vznik infarktu myokardu [11, s. 7.].

**Tabulka 3: Rizikové faktory infarktu myokardu**

Rizikové faktory infarktu myokardu	
<u>Kouření</u> – poškození endotelu a rozvoj aterosklerózy	<u>Obezita</u>
<u>Dyslipoproteinémie</u> – abnormální množství lipidů v krvi v důsledku abnormálních apolipoproteinů – Rizikový faktor aterosklerózy	<u>Hypercholesterolemie</u> – nadměrná koncentrace LDL v krvi způsobená geneticky podmíněnými mutacemi LDL receptoru
<u>Diabetes mellitus</u> – nadměrná koncentrace glukózy v krvi způsobuje modifikace LDL cholesterolu – rizikový faktor aterosklerózy	<u>Hypertenze</u> – poškození endotelu zapříčiněné turbulentním prouděním krve cévou – rozvoj aterosklerózy
<u>Infekce</u> - infekci mohou způsobit některé viry nebo gramnegativní bakterie. Indukují přeměnu monocytů na makrofágy. Některé bakterie produkují volné radikály, podílející se na vzniku aterosklerózy	<u>Věk</u>

V tabulce 4 jsou shrnuty dědičné choroby a riziko, vzniku infarktu myokardu.

**Tabulka 4: Procentuální zastoupení rizikových faktorů u pacientů s infarktem myokardu. (Kumar,2008)**

Hypercholesterolemie – zvýšená koncentrace cholesterolu v plazmě	(riziko okolo 50%)
snížený HDL cholesterol snižuje protektivní funkci aterosklerózy	(45-75%)
Zvýšená koncentrace triglyceridů	(40-80%)
body mass index – obezita	(25-60%)
krevní tlak – vysoký krevní tlak – rizikový faktor aterosklerózy	(50-70%)
Zvýšená koncentrace apolipoprotein (a) - rizikový faktor aterosklerózy	(90%)
Zvýšená koncentrace homocysteinu – poškození endotelu cév	(45%)
diabetes mellitus II. Typu – glykace LDL – vznik aterosklerózy	(40-80%)
Zvýšené koncentrace fibrinogenu – riziko trombofilie	(20-50%)

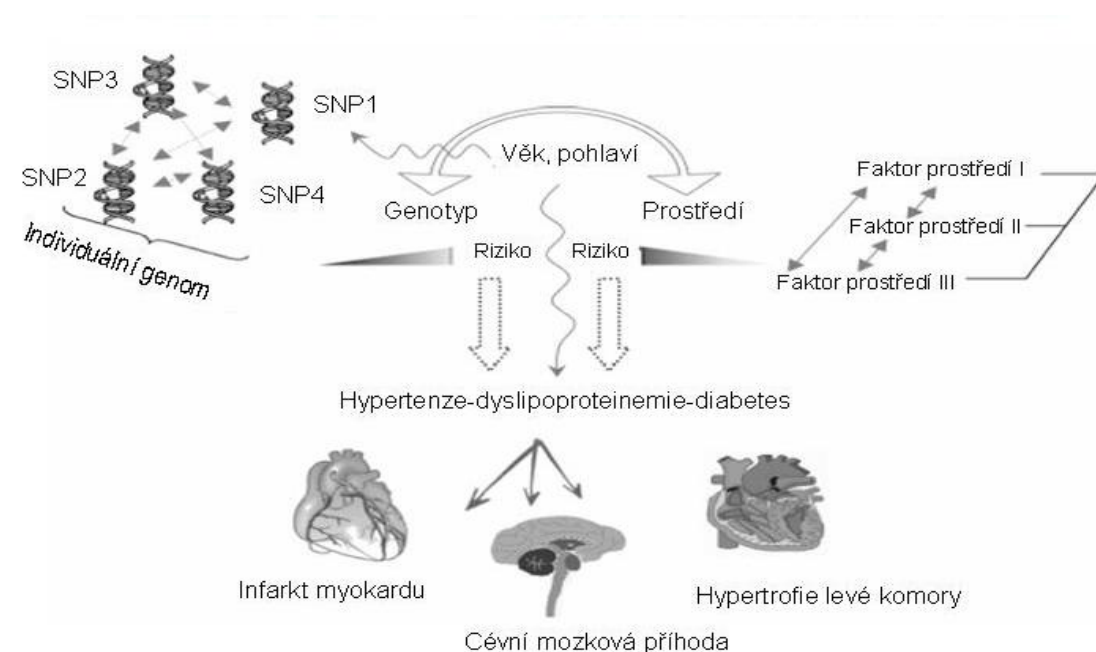
Akutní ischemie je způsobena ucpáním jedné ze dvou koronárních tepen, které zásobují srdce kyslíkem, na jehož snížené množství tkáň velmi rychle odumírá [10, s. 162]. Prognóza následků infarktu myokardu je různá, a závisí na mnoha faktorech, asi 25% jedinců náhle umírá. Bez komplikací v dalším životě po přežití infarktu je asi 10 – 20% pacientů. 80 - 90% pacientů s pozdějšími poinfarktovými komplikacemi: arytmií nebo poruchami kontraktility [7, s. 161].

## 4 Genetické faktory kardiovaskulárních onemocnění

Genetické faktory hrají významnou úlohu v rozvoji kardiovaskulárních onemocnění. Rozvoj kardiovaskulární příhody závisí zejména na vzájemném působení genetických variant a vlivů prostředí. Dědičnost rizikových faktorů a intraindividuálních rozdílů jako rizikových faktorů vzniku kardiovaskulárních příhod je odhadována mezi 30 – 50 %.

Na obrázku 3 je zobrazeno vzájemné působení faktorů podílejících se na vzniku kardiovaskulárních onemocnění.

**Obrázek 3: Vzájemné působení faktorů podílejících se na vzniku kardiovaskulárních onemocnění (upraveno dle Visvikis Siest et al, Curr Opin Lipidol, 2006.)**



V současné době je známo asi 20 000 – 25 000 genů kódujících proteiny majících významný vztah ke vzniku kardiovaskulárních onemocnění.

Další část práce se věnuje popisu významných proteinů a genetických variant, které se významným způsobem podílejí na vzniku kardiovaskulárních onemocnění.

## **4.1 Proteiny a genetické varianty rizikové pro vznik aterosklerózy**

### **4.1.1 Endotelová syntáza oxidu dusnatého (eNOS)**

Oxid dusnatý je velmi důležitou složkou správné funkce endotelu cév. Patří mezi ateroprotektivní látky. Podílí se na zpětné vazodilataci endotelu a uvolnění průtoku krve. Oxid dusnatý je uvolňován do hlubších vrstev hladké svaloviny, kde působí na svalové buňky. Hladká svalovina se dilataje a zvyšuje krevní průtok. Dalšími funkcemi oxidu dusnatého jsou antikoagulační, profibrinolytická funkce a inhibice agregace krevních destiček a jejich adheze. Je syntetizován v buňkách endotelu enzymem syntázou oxidu dusnatého reakcí L-argininu, kyslíku O<sub>2</sub> a NADPH. Syntéza NO probíhá i v dalších tkáních těla např. mozku, ledvinách, srdci atd. Poškození funkce syntézy NO v endotelu cév patří mezi rizika vzniku aterosklerózy. S významným rizikem aterosklerózy je asociován i s nedostatkem kofaktorů nebo samotných substrátů pro syntézu oxidu dusnatého. Jedná se o: (zvýšenou koncentraci asymetrického dimethylargininu, zvýšenou oxidaci tetrahydrobiopterinu a inaktivaci superoxidu.)

Endotelová syntáza NO je kódována geny na chromozómu 7 a lokusu q35-36. eNOS je složena ze dvou dimerů. C-terminální reduktázy s funkcí vazby NADPH, flavinmononukleotidu a flavinadenindinukleotidu. N-terminální oxidázy obsahující vazebná místa pro kofaktory, hemové železo, tetrabiopterin a L-arginin, který je v této části oxidován jako substrát.

#### **4.1.1.1 eNOS (G894T)**

Polymorfizmy v sekvenci genu pro eNOS se objevují zejména v intronech, v sekvencích transkripčních faktorů, exonech 6 a 7. Ze sekvence genu eNOS je translatován polypeptid o velikosti 1203 aminokyselin. Jednonukleotidové polymorfizmy (SNP), které jsou lokalizované v promotorové části a transkripčních faktorech, ovlivňují především transkripci genu. Druhým typem jsou SNP v intronech a třetím repetitivní sekvence v intronech. Polymorfizmy v exonech se nacházejí v 6. a 7. exonu a ovlivňují hlavně enzymovou aktivitu. Nahrazením guaninu za thymin vznikne

polypeptid s aminokyselinou aspartátem namísto glutamátu. Tento polymorfismus způsobuje zvýšené riziko ischemické choroby srdeční a možná je i souvislost se vznikem hypertenze [12, s. 511; 13, s. 1].

#### **4.1.1.2 eNOS (T-786C)**

V polymorfismu v pozici -786 jde o substituci cytosinu za thymin. Alela s polymorfismem -786C způsobuje snížení funkce enzymu eNOS. Polymorfismus v intronové a promotorové oblasti snižuje funkci a zvyšuje riziko koronárního onemocnění srdce, infarktu myokardu a anginy pectoris [14, s. 930].

### **4.1.2 Lymfotoxin alfa (LTA)**

Lymfotoxin alfa patří do skupiny cytokinů, které jsou secernovány aktivovanými lymfocyty. Protein se skládá ze tří shodných řetězců - homotrimerů. LTA patří do skupiny TNF (tumor nekrotizujících faktorů), a jejich hlavním úkolem je aktivovat zánětlivé a imunologické reakce. Rizikem vzniku infarktu myokardu je utržení aterosklerotického plátu na základě přítomnosti zánětlivých buněk mezi plátem a endotelem případně hladkou svalovinou. Tyto buňky secernují cytokiny, které poškozují buňky endotelu. Důsledkem je poškození stability a ruptúra aterosklerotického plátu. Uvolněný aterosklerotický plát může ucpat některou z koronárních cév a způsobit infarkt myokardu nebo ucpání jiných cév například v mozku nebo plicích [15, s. 650].

#### **4.1.2.1 Lymfotoxin alfa (C804A) a (A252G)**

Gen pro LTA je lokalizován na chromozómu 6 a lokusu 6p21.3. Substituce A252G byla prokázána u jedinců s infarktem myokardu. Substituce nukleotidů se nachází v nekódující intronové sekvenci. Polymorfizmy v sekvenci LTA ovlivňují fyziologickou rovnováhu funkce cytokinů, a tím může vzniknout autoimunita nebo zánětlivá reakce. Druhou možností vlivu polymorfizmů jsou změny ve funkci LTA, což má za následek vznik kardiovaskulárních chorob.

Polymorfizmus C804A je umístěn přímo v kódující sekvenci LTA v exonové části genu, exonu 3. Důsledkem substituce báze adeninu za cytosin, je vyšší - až dvojnásobná exprese vaskulárních adhezivních molekul VCAM 1 a selektinu E v endotelu cév [10, s. 165; 15, s. 650].



### **4.1.3 Angiotenzin konvertující enzym (ACE)**

Angiotenzin konvertující enzym je hlavní součástí systému renin-angiotenzin aldosteron [16, s. 584]. ACE je syntetizován a secernován v endotelových buňkách cév. Může být vázán na povrchu endotelových buněk nebo se volně cirkulovat v plazmě. Hlavní funkcí ACE je regulace krevního průtoku a krevního tlaku. ACE se podílí na přeměně angiotenzinu I na angiotenzin II. Podmiňuje vazokonstrikci, zúžení cévy a zvýšení krevního tlaku. Koncentrace ACE v plazmě je velmi závislá na mnoha vnějších faktorech. Hlavními faktory jsou vyšší věk, kouření, výška, váha, krevní tlak a rasa [10, s. 166,17, s. 576].

#### **4.1.3.1 ACE (287 bp inzerce/delece (I/D))**

Gen pro ACE a polymorfismus I/D je lokalizován chromozómu 17 lokusu 17q23 a skládá se z 26 exonů a 25 intronů. I/D polymorfismus se projevuje jako delece nebo inzerce 287 bp - Alu repetitivní sekvence v 16. intronu genu ACE. Přítomnost polymorfismu způsobuje zvýšenou nebo sníženou expresi genu ACE a koncentraci ACE v plazmě. Alela D, zejména fenotyp DD je spojen s dvojnásobnou koncentrací plazmatického ACE, varianta II je naopak charakterizována nízkou hladinou plazmatického ACE. Dysfunkční enzym ACE se v případě fenotypu DD může projevit hypertrofií levé komory srdeční a rizikem infarktu myokardu. Naopak fenotyp II má protektivní účinek v prevenci kardiovaskulárních onemocnění [17, s. 577; 16, s. 584].

#### **4.1.4 Antigen lidských krevních destiček 1 (HPA 1, Gp IIIa; integrin $\beta$ 3)**

Integriny jsou skupina adhezivních molekul na povrchu buněk. HPA 1 jsou specifické integriny pro lidské krevní destičky. Tyto molekuly mají schopnost agregace destiček a vazby faktorů koagulace – především fibrinogenu. Geny antigenů lidských krevních destiček se nacházejí na chromozomu 17 v lokusu 17q21.32. Integriny se skládají ze dvou podjednotek. U trombocytů se skládají z alfa podjednotky - glykoprotein (GP IIb) kódován genem ITGA2B. Glykoprotein pro beta podjednotku (GP IIIa) je translatován ze sekvence genu ITGB3. Spojením těchto dvou podjednotek vzniká integrinový komplex IIb/IIIa [18, s. 1392].

##### **4.1.4.1 HPA 1 (T196C; fenotypy a/b)**

Polymorfismus HPA 1a je charakteristický pro normální typ integrinu. Fenotyp 1b je rizikovým faktorem infarktu myokardu a cévní mozkové příhody zejména u kuřáků. Jedinci s fenotypem HPA 1 ab a bb mají vyšší riziko než jedinci s fenotypem HPA 1 aa [19, s. 1].

### 4.1.5 $\beta$ -fibrinogen

Fibrinogen patří do skupiny koagulačních faktorů. Po aktivaci na fibrin se přímo účastní zacelení poškozeného místa cévy a vzniku koagula. Fibrinogen se vyskytuje v krvi v neaktivní formě. Kaskádou koagulačních faktorů, přímo trombinem, je aktivován na monomerní fibrin aktivní při vytvoření koagula a aktivace agregace krevních destiček, které agregují na síť vytvořenou fibrinem.

Fibrin se z fibrinogenu aktivuje i v trombech a aterosklerotických plátech. Patří mezi přímé původce vzniku hluboké žilní trombózy, infarktu myokardu nebo cévní mozkové příhody. Zvýšená koncentrace fibrinogenu je ovlivněna environmentálními faktory, jako je obezita, kouření, věk, pohlaví, zvýšený cholesterol a jiné. U žen se začíná zvyšovat koncentrace fibrinogenu až v menopauze. U mužů se zvyšuje postupně už od dřívějšího věku, poté se však nárůst u obou pohlaví s postupem života shoduje [20, s. 886].

Fibrinogen je tvořen třemi páry řetězců. Pro vznik aterosklerózy má největší význam beta-fibrinogen. Všechny tři řetězce navzájem ovlivňují svoji koncentraci [21, s. 3286]. Každý řetězec fibrinogenu je kódován jiným genem. Tyto geny se nacházejí na dlouhém raménku chromozomu 4 v lokusu 4q23. Pokud jeden z promotorů genu  $\beta$ -fibrinogenu obsahuje polymorfismus, je řetězec nadměrně exprimován, což má za následek vyšší koncentraci fibrinogenu v plazmě a zvýšené riziko trombofilie [22, s. 440].

#### 4.1.5.1 $\beta$ -fibrinogen (G-455A)

Substituce adeninu za guanin v pozici 455 se projeví nadměrnou koncentrací fibrinogenu v plazmě. Polymorfismus G-455A je umístěn v promotorové části. Gen pro beta-fibrinogen je nadměrně exprimován, což způsobí vyšší koncentrace fibrinogenu v séru. Dvoj- až trojnásobné zvýšení koncentrace fibrinogenu v plazmě vede ke zvýšenému riziku vzniku infarktu myokardu a cévní mozkové příhody [23, s. 755].

#### **4.1.6 Apolipoprotein B (apo B)**

Apolipoprotein B se skládá ze dvou typů apolipoproteinů apo B-100 a apo B-48. Apo B-48 je syntetizován v tenkém střevě, kde se váže na lipidové částice, které prošly trávením v duodenu. Apo B-100 je syntetizován v játrech. Apo B-48 udržuje tvar lipidové částice (chylomikronu) a umožňuje transport chylomikronu ze střeva lymfou do krve, kde jsou štěpeny triacylglyceroly lipoproteinovou lipázou (LPL). Lipidové částice zbavené triacylglycerolů jsou vychytávány játry. V játrech se tvoří částice s velmi malou hustotou (VLDL), na něž se váže apo B-100. Poté jsou tyto částice secernovány do krve. V krvi VLDL zbavují dalších triacylglycerolů, předávají apolipoproteiny apoE a apoC na lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL) a vznikají lipoproteiny o střední hustotě (IDL). IDL se dále přeměňují na částice obsahující estery cholesterolu lipoproteiny o nízké hustotě (LDL), na které je stále navázán apo B-100. LDL jsou vychytávány prostřednictvím apo B-100 buňkami jater a dalších tkání. Apo B-100 je v játrech odstraněn a cholesterol se ukládá nebo je vyloučen do žluči [8, s. 177].

##### **4.1.6.1 Apolipoprotein B (R3500Q)**

Gen apolipoproteinu B je lokalizován chromozomu 2 v lokusu 2p24. Oba typy apolipoproteinu B apo B-48 a apo B-100 jsou kódovány stejným genem [24 s. 4597].

Hypercholesterolemie je autozomálně dominantní porucha způsobena mutací R3500Q. Přítomnost varianty R3500Q vede ke špatné vazbě apolipoproteinu B na receptory a tím k nadměrné koncentraci LDL-cholesterolu v krvi, což má za následek hypercholesterolemii [24 s. 4597; 25, s. 79]. Přebytný cholesterol je modifikován a po vazbě na poškozený endotel cév a je inkorporován do pěnových buněk a podílí se na proliferaci cévní stěny a vzniku aterosklerotického plátu [8, s. 175].

#### **4.1.7 Apolipoprotein E (apo E)**

Apolipoprotein E je syntetizován v játrech a poté je secernován do krve. Patří mezi apolipoproteiny řídící metabolismus triacylglycerolů, které si tělo vstřebává z lipidových částic pomocí lipoproteinové lipázy [8, s. 177].

##### **4.1.7.1 Apolipoprotein E (E2/E3/E4)**

Gen pro apoE je lokalizován na 19. chromozomu s třemi možnými variantami. Polymorfizmy v genu pro apolipoprotein E jsou spojeny s rizikem vzniku aterosklerózy. Mutovaný apoE není schopen přenášet lipidové částice do jater, kde by měly tyto částice být za fyziologických podmínek secernovány do krve endocytózou. Přítomnost polymorfizmu v genu pro ApoE vede k poruše metabolismu chylomiker a VLDL jejichž dlouhodobé přetrvávání v cirkulaci je rizikovým faktorem aterosklerózy, hluboké žilní trombózy, ischemické choroby srdeční a cévní mozkové příhody. Dědičnost je autozomálně dominantní [10, s. 163].

Polymorfizmy apolipoproteinu E2, E3, E4 se liší v sekvenci aminokyselin ve dvou místech. Pozice A 112 a pozice B 158 se ve třech typech polymorfizmu E2,E3,E4 liší umístěním cysteinu a argininu. Polymorfizmus E2 kóduje v obou pozicích 112 a 158 aminokyselinu cystein. U varianty E3 je v pozicích 112 kódován cystein a v pozici 158 arginin. Polymorfizmus E4 kóduje v obou pozicích 112 a 158 formě arginin [26, s. 45-53].

E3 je nejfrekventovanější alela v populaci a je asociována s normálním apoE genotypem. E3 alela se vyskytuje u 83% populace [27, s. 1].

Apo E2 polymorfizmus je charakteristický pro vznik familiární dysbetalipoproteinemie. V populaci se objevuje v 8% [27, s. 1]. Toto onemocnění je vázáno pouze jako autozomálně recesivní a v populaci se projevuje s nízkou penetrancí. Proto není dysbetalipoproteinemie tolik frekventovaná, i když se v populaci objevují zdraví recesivní homozygoti.

Polymorfizmus apo E4 je v populaci ve frekvenci 10% [27, s. 1]. E4 je zodpovědný za zvýšené koncentrace LDL v krevním oběhu a je rizikovým faktorem aterosklerózy koronárních arterií a karotid [28, s. 1410].

## **4.2 Proteiny a genetické varianty spojené s rizikem vzniku trombózy**

### **4.2.1 Faktor V**

Faktor V je glykoprotein koagulační kaskády a v plazmě se vyskytuje v neaktivní formě. Při poškození cévy dochází k aktivaci FV, který spouští koagulační kaskádu v součinnosti s FVIII. Faktor V je kofaktorem aktivace trombinu faktorem X a polymeraci fibrinu. Funkce aktivního faktoru V je inaktivována proteinem C. Geneticky podmíněná nedostatečná funkce nebo rezistence faktoru V k proteinu C způsobuje trombofilii a žilní tromboembolii. Gen F5 pro koagulační faktor V je umístěn na chromozómu 1, v lokusu 1q23.

#### **4.2.1.1 Faktor V Leiden (G1691A)**

Název leidenská mutace vznikl pro genetickou vadu, která se projevuje zvýšenou koncentrací aktivovaného faktoru V, jenž není v dostatečné koncentraci inaktivován. Tato porucha je rizikovým faktorem trombofilie, žilní tromboembolie a cévní mozkové příhody zejména u těhotných žen. Míra závažnosti trombofilních stavů je také podmíněna přítomností mutace v heterozygotním nebo homozygotním stavu [29 s. 257]. U heterozygotů je riziko vzniku tromboembolické příhody 3krát až 6krát vyšší a u homozygotů až 80krát vyšší než u jedinců s normálními alelami. Možné jsou i dvě mutace tzv. pseudohomozygotizmus. Tento fenotyp má jednu alelu s mutací Leiden a druhou alelu s jinou mutací, která způsobuje nedostatek faktoru V [30 s. 64]. Jedinci s heterozygotním fenotypem mají v plazmě 50% normálního, tedy plně funkčního faktoru V, a 50% faktoru V s leidenskou mutací. Podstata leidenské mutace je v neschopnosti proteinu C inaktivovat faktor Va. Jde o genetickou mutaci (substituce adeninu za guanin v pozici 1691, G506R) přenášenou autozomálně dominantně. Přítomnost G506R je spolu s jinými mutacemi (gen pro protrombin – G20210A) u těhotných, obézních pacientů při podávání HAK významným rizikovým faktorem žilní trombózy [29, s. 257, 31, s. 94].

#### **4.2.1.2 Faktor V R2 haplotyp (H1299R)**

R2 haplotyp faktoru V má několik možných míst pro polymorfizmy. Hlavním polymorfizmem, který se vyšetřuje ve spojení s leidskou mutací na faktoru V, je H1299R. Tento polymorfizmus podmiňuje riziko vzniku žilní trombózy vzniklou mírnou rezistencí vůči proteinu C. Rozdíl mezi normálním faktorem V a haplotypem R2 je pouze v koncentraci a hemokoagulačních vlastnostech R2 haplotypu. R2 haplotyp mění poměr izoform faktoru V a tím zvyšuje tvorbu trombinu [32, s. 75].

## 4.2.2 Protrombin PTH

Protrombin je prekurzorem trombinu a patří mezi hlavní součásti koagulačního systému. Podílí se na přeměně fibrinogenu na vláknitý fibrin. Fibrin vytvoří síť, na které agregují krevní destičky a vyplňují poškozené místo. To je rizikem tvorby trombů a rozvoje hluboké žilní trombózy hlavně v dolních a horních končetinách. Tromby však mohou být v krvi transportovány až do plic, srdce a mozku, a způsobit ucpání cévy. Po první atace hluboké žilní trombózy se nasazuje terapie heparinem a warfarinem [33, s. 1347].

### 4.2.2.1 Protrombin (G20210A)

V genu F2 na chromozómu 11 a lokusu p11-q12, který kóduje protrombin je rizikovým faktorem kardiovaskulárních chorob varianta G20219A. Polymorfismus G20210A vede k zvýšení syntézy protrombinu a tvorbě trombinu. Přítomnost mutace v genu pro protrombin vede ke zvýšené koncentraci trombinu v séru, což má za následek rozvoj hluboké žilní trombózy. Zvýšení rizika u heterozygotů je dvou až čtyřnásobné. Homozygotní fenotyp je mnohem vzácnější a je spojován s vyšším – až dvanáctinásobným rizikem vzniku trombózy. Přítomnost polymorfizmu G20210A způsobuje opoždění fetálního vývoje. Ve výjimečných případech, zejména je-li polymorfismus G20210A přítomen v kombinaci s faktorem V Leiden nebo u jedinců s hyperhomocysteinémií dochází ke vzniku trombózy (až 20 násobné riziko u heterozygotů). Kombinace variant faktoru XIII a protrombinu představují 12x větší riziko vzniku akutního infarktu myokardu [34, s. 215].



### **4.2.3 5,10 – Methyltetrahydrofolát reduktáza MTHFR**

MTHFR je enzym, podílející se na ochraně cévního endotelu před nepříznivým vlivem homocysteinu. Homocystein je aminokyselina, která je pro tělo a hlavně endotel cév toxická. Homocystein je nutný při nitrobuňčném metabolismu aminokyselin a bílkovin. Hyperhomocysteinémie indukuje aterotrombózu řadou mechanismů, mezi které patří funkční a morfologické poškození endoteliálních buněk, zvýšená adhezivita a agregabilita destiček, poruchy koagulační kaskády a fibrinolýzy, modifikace lipoproteinu Lp(a) s poruchou fibrinolýzy, vznik modifikovaných LDL. Enzym MTHFR je hlavním proteinem podílejícím se na metabolismu homocysteinu a jeho přeměně na methionin. MTHFR přeměňuje 5,10-methyltetrahydrofolát na 5-methyltetrahydrofolát. Nadbytek homocysteinu může být způsoben genetickou mutací genu nebo nedostatkem vitamínů B12, B6 nebo kyseliny listové. Všechny tři vitamíny fungují při metabolismu jako kofaktory [35, s. 878]. Hyperhomocysteinémie – sérový homocystein způsobuje (žilní trombózu, cévní mozkovou příhodu) – představuje až 3x větší riziko vzniku akutního poškození cév [36, s. 1268].

#### **4.2.3.1 MTHFR (C677T)**

Polymorfismus MTHFR je umístěn na chromozómu 1 v lokusu 1p36.3. Gen MTHFR se skládá z jedenácti exonů. Mutace genu vede ke vzniku termolabilní formy enzymu, což má za následek sníženou funkci při vyšší teplotě. Přítomnost termolabilní formy enzymu způsobuje nedostatečný metabolismus homocysteinu. Termolabilita je způsobena substitucí jednoho páru bází v pozici 677 exonu 4. (substituce 1 bp v pozici 677 – substituce C667T) [35, s. 878]. Z některých analýz vyplývá, že by dostatečná koncentrace kyseliny listové mohla neutralizovat účinky mutace C677T [37, s. 619].

#### **4.2.3.2 MTHFR (A1298C)**

Polymorfismus (A1298C) je spojen s termolabilní formou MTHFR a nedostatečným metabolismem homocysteinu. Substituce adeninu za cytosin v pozici 1298 má za následek mutaci alaninu za glutamin v pozici 429. V kombinaci s výše

uvedeným polymorfizmem C677T představují 3 – 4 krát vyšší riziko vzniku žilní trombózy [35, s. 878; 37, s. 619].

#### **4.2.4 Faktor XIII (FXIII)**

Faktor XIII se skládá ze čtyř podjednotek, jejichž geny jsou umístěny na chromozomech 1 a 6. FXIII je heterodimer, ve kterém se spojují dvě A podjednotky a dvě B podjednotky. A podjednotky mají katalytickou funkci a B podjednotky jsou podpůrnými složkami faktoru. Faktor XIII je posledním členem skupiny koagulačních faktorů a je aktivován proteolyticky pomocí trombinu za přítomnosti kofaktoru vápníku. Je zodpovědný za pevnější spojování fibrinových vláken - vytváření příčných vláken (crosslinků) a nerozpustných koagul. Patří do skupiny transglutamináz a mezi vlákny fibrinu tvoří tzv. gamaglutamyl- $\epsilon$ -lysin crosslinky, a tím stabilizuje koagulum [38, s. 112].

##### **4.2.4.1 Faktor XIII (V34L)**

Polymorfismus se nachází v sekvenci podjednotky A1, v proteolytické části faktoru. Exony genu F13A1 jsou rozmístěny na chromozómu 6 v lokusu 6p25-p24 a kódují A1 podjednotku, v jejíž sekvenci se nachází substituce V34L. Mutace je způsobena substitucí thyminu za guanin v exonu 2 genu F13A1. Varianta V34L má protektivní účinek. Vzhledem k tomu, že v oblasti se také nachází vazebné místo pro trombin, má přítomnost alely 34L vliv na zvýšení aktivity faktoru XIII, a tím významně protektivní účinek vedoucí k významnému zvýšení procenta přežití u pacientů po infarktu myokardu [38, s. 112; 39, s. 112].

#### **4.2.5 Inhibitor aktivátoru plazminogenu - 1 (PAI - 1, Serpin E1)**

PAI-1 patří do skupiny inhibitorů serinových proteáz. Zdrojem produkce PAI-1 jsou buňky jaterní tkáně, endotelu cév a adipocyty. Sekrece PAI-1 je ovlivňována koncentrací endotoxinu, interleukinu 1 (IL-1) a růstového faktoru fibroblastů. Při poškození cévy se aktivují koagulační faktory, které aktivují fibrinogen na fibrin a následnou agregaci krevních destiček. V této kaskádě má svoji funkci faktor plazminogen, jenž je aktivován na plazmin aktivátory plazminogenu. Plazmin se podílí na degradaci fibrinu a jeho uvolnění z poškozené cévy. PAI-1 inhibuje aktivátory funkce plazminu (urokinázu a tkáňový aktivátor plazminogenu). PAI-1 reguluje množství aktivovaného plazminu a fibrinu a snižuje vznik trombů. PAI-1 hraje významnou protektivní roli před vznikem hluboké žilní trombózy a infarktu myokardu [40, s. 1453].

##### **4.2.5.1 PAI-1 (4G/5G)**

Gen inhibitoru aktivátoru plazminogenu je umístěn na dlouhém raménku chromozomu 7 v lokusu 7q21.3-q22. Polymorfismus se projevuje jako delece jedné guaninové báze 4G, nebo inserce guaninové báze 5G. Změna v sekvenci se nachází 675 bp od počátku translace. Tento polymorfismus je kódován v sekvenci promotoru genu PAI-1. Alela 4G je spojována s vyšší transkripcí genu PAI-1. V polymorfismu 5G je tato alela vázána s represorem. Pokud tato vazba není přítomna, je gen PAI-1 transkribován ve větší míře. Alela 4G je spojována s rizikem vzniku infarktu myokardu a hluboké žilní trombózy. Jedinci s genotypem 4G/4G a 4G/5G mají riziko trombózy o 25% vyšší než jedinci s genotypem 5G/5G [40, s. 1453; 41, s. 401; 42, s. 2609].

#### **4.2.6 Endoteliální receptor proteinu C (EPCR)**

Protein C je serinová proteáza, která je závislá na vitamínu K jako kofaktoru. Funkcí proteinu C je regulace koagulačního systému a to přímo inhibicí faktorů Va a VIIIa. Dochází k inhibici koagulační kaskády, protože faktory V a VIII jsou kofaktory koagulace. Kofaktor trombomodulin a EPCR se s trombinem podílejí na aktivaci proteinu C a zastavení koagulace. Pokud je exprese EPCR suprimována, dochází ke snížené funkci proteinu C s následným vznikem trombózy.

V cévách jsou přítomny 2 typy EPCR receptoru. Prvním z nich je membránový eEPCR, tedy vázaný na membránu. Tento typ podporuje aktivaci proteinu C a inhibici koagulace a jeho zvýšená exprese EPCR působí protektivně. Druhý typ sEPCR se volně váže v plazmě. Tento typ má funkci opačnou než typ eEPCR. sEPCR inhibuje funkci proteinu C a blokuje vazbu proteinu C na faktory Va a VIIIa. Nejvíce je zastoupen na endoteliálních buňkách cév v srdci a plicích. Receptor EPCR je kódovaný genem, který se nachází na 20 chromozomu v lokusu 20q11.2. Gen obsahuje 4 exony, druhý a třetí exon genu kódují extracelulární část receptoru a exon 4 kóduje transmembránovou část a cytoplazmatický konec [43, s. 1-267].

##### **4.2.6.1 EPCR (A4600G; haplotyp A3)**

Polymorfismus se projevuje v transmembránové doméně substitucí guaninu za adenin v pozici 4600 (A4600G, G219S, haplotyp A3). Přítomnost varianty G219S vede ke zvýšení koncentrace plazmatického EPCR u homozygotů i heterozygotů. Zvýšená koncentrace sEPCR snižuje aktivaci proteinu C a brání inhibici koagulace, a tím dochází ke vzniku trombózy a žilního tromboembolizmu a cévní mozkové příhody, která se velmi často objevuje již v raném dětském věku. Přítomnost haplotypu A3 představuje vysoké riziko potratů [44, s. 1; 43, s. 1-267].

#### **4.2.6.2 EPCR (G4678C; haplotyp A1)**

Polymorfismus se projevuje v membránové doméně substitucí cytosinu za guanin v pozici 4678 (haplotyp A1), což má za následek zvýšení koncentrace membránového EPCR a zvýšenou funkci aktivovaného proteinu C. Haplotyp A1 má protektivní účinek u pacientů s trombofilií, akutním infarktem myokardu, a cévní mozkovou příhodou. Protektivní účinek haplotypu A1 byl popsán i u přenašečů FV Leiden [44, s. 1; 43, s. 1-267].

## **5 CÍLE PRÁCE**

- 2 Stanovit genetické varianty polymorfizmů a mutací predikujících riziko kardiovaskulárních příhod u vybraných rizikových skupin pacientů. Pacienti s poruchami lipidového metabolismu, pacienti s kardiovaskulárními onemocněními – (nestabilní a stabilní angina pectoris, akutní infarkt myokardu)**
  
- 3 Posoudit frekvence alel ve vybraných rizikových skupinách**
  
- 4 Posoudit četnost výskytu genetických variant v rizikových skupinách**
  
- 5 Porovnat získané výsledky s hodnotami z literárních zdrojů**

## PRAKTICKÁ ČÁST

### 6 SOUBOR PACIENTŮ

Do studie bylo zařazeno celkem 63 pacientů. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin dle rizikových faktorů zahrnujících poruchy lipidového metabolismu a kardiovaskulární onemocnění. První skupina byla tvořena 27 pacienty s poruchami lipidového metabolismu. Do skupiny byli zařazeni pacienti před zahájením terapie s laboratorně diagnostikovanou hypercholesterolémií (hladiny sérového cholesterolu větší než 6 mmol/l, hladiny LDL větší než 3 mmol/l hladiny triacylglycerolů větší než 2 mmol/l v závislosti na věku a pohlaví. Základní charakteristika pacientů s poruchami lipidového metabolismu je shrnuta v tabulce 5.

**Tabulka 5: Základní charakteristika pacientů s poruchami lipidového metabolismu**

	Počet (pacienti)	Průměr (roky)	Věkové rozmezí (roky)
Muži	13	55	28 – 82
Ženy	14	70	31 – 89
Celkem	27	60	28 – 89

Ve skupině pacientů s poruchami lipidového metabolismu byly vyšetřeny následující mutace a polymorfizmy: Viz tabulka 6

**Tabulka 6: Polymorfizmy vyšetřované u pacientů s poruchami lipidového metabolismu**

Polymorfizmus	Substituce
eNOS	T-786C
eNOS	G894T
LTA	C804A
ACE	I/D
HPA-1	a/b
$\beta$ -fibrinogen	G455A
Apo B	R3500Q
Apo E	E2/E3/E4

Druhou skupinu tvořilo 36 pacientů s klinicky diagnostikovaným kardiovaskulárním onemocněním (nestabilní angina pectoris, stabilní angina pectoris, akutní infarkt myokardu.)

Pacienti s rizikovými polymorfizmy pro kardiovaskulární choroby byli vyšetřováni v kardiologických odděleních. Mezi kardiologická vyšetření diagnostikující kardiovaskulární choroby patří EKG, echokardiograf, zátěžové EKG, angiografie.

Základní charakteristika pacientů je shrnuta v tabulce 7.

**Tabulka 7: Základní charakteristika pacientů s klinicky diagnostikovaným kardiovaskulárním onemocněním**

	Počet pacientů	Věkový průměr (roky)	Věkové rozmezí (roky)
Muži	21	60	41 – 83
Ženy	15	71	55 – 89
Celkem	36	64	41 – 89

Ve skupině pacientů s poruchami lipidového metabolismu byly vyšetřeny následující mutace a polymorfizmy: Viz tabulka 8.



**Tabulka 8: Genetické polymorfizmy vyšetřované u pacientů s kardiovaskulárními chorobami.**

<b>Polymorfizmus</b>	<b>Substituce</b>
Faktor V Leiden	G1691A
Faktor V R2 haplotyp	H1299R
Protrombin	G20210A
MTHFR	C677T
MTHFR	A1298C
Faktor XIII	V34L
PAI-1	4G/5G
EPCR	A4600G
EPCR	G4678C

## **7 METODY**

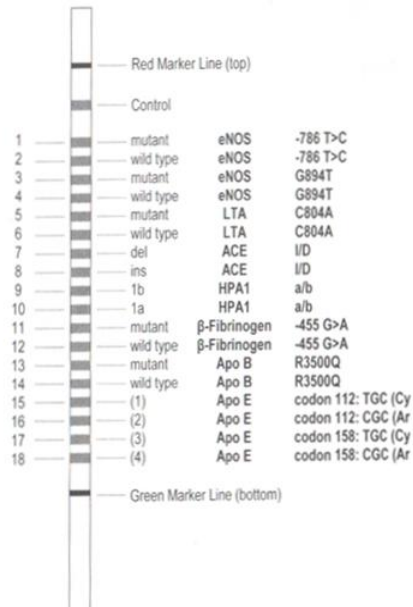
### **7.1 PRINCIP METODY**

Sledované mutace a polymorfizmy byly stanoveny metodou polymerázové řetězové reakce s reverzní hybridizací a enzymatickou detekcí (streptavidin a alkalická fosfatáza) na hybridizačních stripěch firmy Vienna Lab Strip essay.

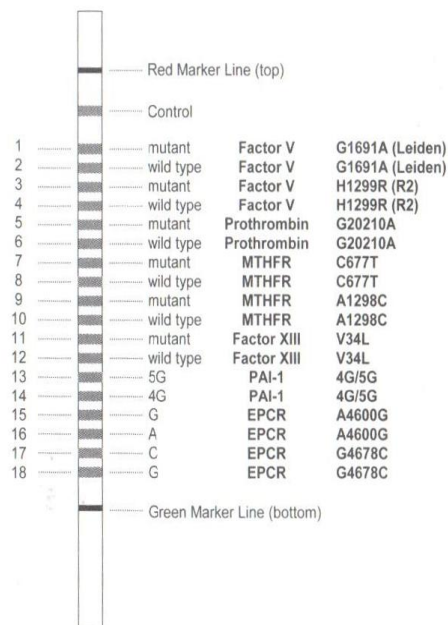
### **7.2 POSTUP METODY**

Pracovní postup se skládá z pěti základních kroků (izolace DNA, amplifikace pomocí PCR s biotinylovanými primery, hybridizace produktu na stripy s alelově specifickými oligonukleotidovými próbami na specifických pozicích reagenčních stripů, detekce a vyhodnocení pomocí softwaru Strip Assay Evaluator. K vyšetření genetických variant skupiny pacientů s poruchami lipidového metabolismu byly použity reagenční stripy určené pro detekci aterogenních variant (CVD A – viz tabulka 6). K vyšetření souboru pacientů s kardiovaskulárním onemocněním byly použity reagenční stripy pro detekci trombogenních variant (CVD T – viz. tabulka 8). Na obrázcích 4 A,B je znázorněno umístění vyšetřovaných polymorfizmů na reagenčních stripěch.

**Obrázek 4 A: Reagenční stripy CVD A pro detekci sledovaných variant u pacientů s poruchami lipidového metabolismu**

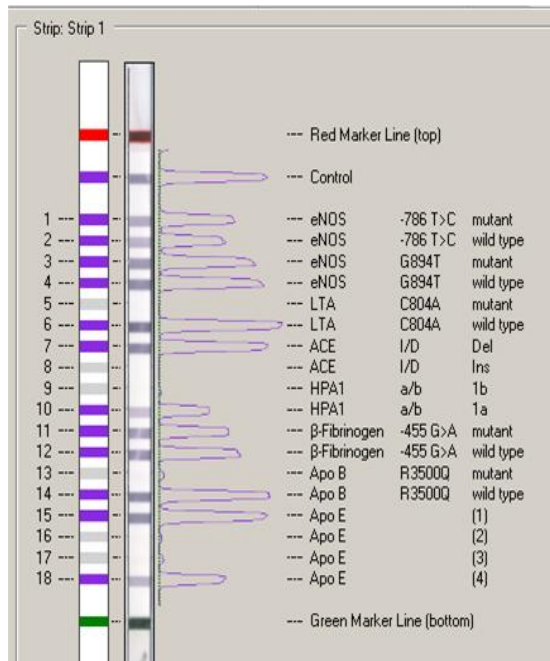


**Obrázek 4B: Reagenční stripy CVD T pro detekci sledovaných genotypů v souboru pacientů s kardiovaskulárním onemocněním.**



Na obrázcích 5A a 5B je znázorněn příklad vyhodnocení výsledku pomocí softwaru Strip Assay evaluator a příklad výsledkového listu.

**Obrázek 5A: Příklad vyhodnocení výsledku analýzy na reagenčním stripu CVD-A pomocí softwaru Strip Assay Evaluator verze 2.0**



**Obrázek 5B: Příklad výsledkového listu**

Assay Type	<b>CVD StripAssay T</b> Catalog No. 4-360, Revision 12/2007 Assay for the identification of mutations associated with cardiovascular disease																																																																								
Lot Number	-																																																																								
Assay ID	2010-12-02 10:57																																																																								
Assay Date	Thursday, December 02, 2010 - 10:57:10 AM																																																																								
Operator	-																																																																								
Sample ID	Strip 3																																																																								
Result	<b>MTHFR: A1298C homozygous; FXIII: V34L heterozygous; PAI-1: 4G/5G; EPCR: A2/A2 (H2/H2)</b>																																																																								
Details	<p>FV (Factor V): Leiden normal, R2 normal</p> <p>PTH (Prothrombin): G20210A normal</p> <p>MTHFR (5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase): C677T normal, A1298C homozygous</p> <p>FXIII (Factor XIII): V34L heterozygous</p> <p>PAI-1 (Plasminogen Activator-Inhibitor 1): 4G/5G</p> <p>EPCR (Protein C Receptor (endothelial)): A2/A2 (H2/H2)</p>																																																																								
Strip	<table border="0"> <tr> <td>1</td> <td>Factor V</td> <td>G1691A (Leiden)</td> <td>mutant</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>Factor V</td> <td>G1691A (Leiden)</td> <td>wild type</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>Factor V</td> <td>H1299R (R2)</td> <td>mutant</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>Factor V</td> <td>H1299R (R2)</td> <td>wild type</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>Prothrombin</td> <td>G20210A</td> <td>mutant</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>Prothrombin</td> <td>G20210A</td> <td>wild type</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>MTHFR</td> <td>C677T</td> <td>mutant</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>MTHFR</td> <td>C677T</td> <td>wild type</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>MTHFR</td> <td>A1298C</td> <td>mutant</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>MTHFR</td> <td>A1298C</td> <td>wild type</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>Factor XIII</td> <td>V34L</td> <td>mutant</td> </tr> <tr> <td>12</td> <td>Factor XIII</td> <td>V34L</td> <td>wild type</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>PAI-1</td> <td>4G/5G</td> <td>5G</td> </tr> <tr> <td>14</td> <td>PAI-1</td> <td>4G/5G</td> <td>4G</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>EPCR</td> <td>A4600G</td> <td>G</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>EPCR</td> <td>A4600G</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>17</td> <td>EPCR</td> <td>G4678C</td> <td>C</td> </tr> <tr> <td>18</td> <td>EPCR</td> <td>G4678C</td> <td>G</td> </tr> </table>	1	Factor V	G1691A (Leiden)	mutant	2	Factor V	G1691A (Leiden)	wild type	3	Factor V	H1299R (R2)	mutant	4	Factor V	H1299R (R2)	wild type	5	Prothrombin	G20210A	mutant	6	Prothrombin	G20210A	wild type	7	MTHFR	C677T	mutant	8	MTHFR	C677T	wild type	9	MTHFR	A1298C	mutant	10	MTHFR	A1298C	wild type	11	Factor XIII	V34L	mutant	12	Factor XIII	V34L	wild type	13	PAI-1	4G/5G	5G	14	PAI-1	4G/5G	4G	15	EPCR	A4600G	G	16	EPCR	A4600G	A	17	EPCR	G4678C	C	18	EPCR	G4678C	G
1	Factor V	G1691A (Leiden)	mutant																																																																						
2	Factor V	G1691A (Leiden)	wild type																																																																						
3	Factor V	H1299R (R2)	mutant																																																																						
4	Factor V	H1299R (R2)	wild type																																																																						
5	Prothrombin	G20210A	mutant																																																																						
6	Prothrombin	G20210A	wild type																																																																						
7	MTHFR	C677T	mutant																																																																						
8	MTHFR	C677T	wild type																																																																						
9	MTHFR	A1298C	mutant																																																																						
10	MTHFR	A1298C	wild type																																																																						
11	Factor XIII	V34L	mutant																																																																						
12	Factor XIII	V34L	wild type																																																																						
13	PAI-1	4G/5G	5G																																																																						
14	PAI-1	4G/5G	4G																																																																						
15	EPCR	A4600G	G																																																																						
16	EPCR	A4600G	A																																																																						
17	EPCR	G4678C	C																																																																						
18	EPCR	G4678C	G																																																																						

### 7.3 PŘÍSTROJE

Přesná nastavitelná mikropipeta 10 µl - 1000 µl

Termocykler GeneQ thermal Cycler (Hangzhou Bioer Technology)

Biohazardní box EBSCO Airstream Class II

Orbitální třepačka P60L Biosan

Vyhřívaný termoblok (Multiblock Lab Line)

Inkubátor (56°C a 98°C)

Centrifuga ALC 4214 (ALC International s r. o)

Centrifuga Varifuge 3.0 (Heareus)

Vakuový odsávací aparát

### 7.4 SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

Hybridizační vanička

Špičky, stopky

PCR zkumavky

Zkumavky

### 7.5 CHEMIKÁLIE

Taq Diluční pufr (průhledné víčko)- diluční pufr na přípravu správné koncentrace Taq DNA polymerázy - obsahuje 0,05% NaN<sub>3</sub>

**Tabulka 9: DNA Taq polymeráza**

Název	Balení
CVD A a CVD T Strip Assay	20 testů
SuperTaq DNA polymeráza	500 j (1000 jednotek)

Reagencie v kitu:

Taq Diluční pufr (průhledné víčko)- diluční pufr na přípravu správné koncentrace Taq DNA polymerázy - obsahuje 0,05%  $\text{NaN}_3$

1. Lysis solution 50 ml – lyzační roztok

2. Gen<sup>X</sup>Tract Resin – před každým použitím je nutné jej resuspendovat

3. Amplifikační mix (žluté víčko) – připraven k použití 0,05% azid sodný ( $\text{NaN}_3$ )

4. Hybridizační vaničky

5. Testovací proužky (stripy)

6. Hybridizační pufr – připraven k použití

7. Promývací roztok (Wash Solution A) – bílé víčko

8. Roztok konjugátu obsahuje 0,05%  $\text{NaN}_3$  a komplex streptavidin-alkalická fosfatáza

9. Promývací roztok (Wash Solution B) obsahuje 0,05%  $\text{NaN}_3$

10. barvicí roztok (Color developer) obsahuje tetrazoliovou modř (NBT – Nitro Blue Tetrazolium) a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát (BCIP)

DNAT (modré víčko) – obsahuje 1,6% NaOH (R36/38)

## 8 VÝSLEDKY

Provedli jsme vyhodnocení četností zastoupení jednotlivých genetických variant a vyhodnotili jsme frekvenci výskytu mutací v obou sledovaných skupinách.

Četnosti studovaných genetických variant u pacientů s poruchami lipidového metabolismu a jsou shrnuty v tabulkách 10 a 11.

**Tabulka 10: Četnosti genetických variant u pacientů s poruchami lipidového metabolismu**

Varianty	N	M/N	M/M
eNOS (T-786C)	8	13	6
eNOS (G894T)	12	11	4
LTA (C804A)	13	13	1
ACE (ins./del.)	2	17	8
HPA-1 (T196C)	18	9	0
β-fibr. (G455A)	17	8	2
ApoB(R3500Q)	27	0	0

**Tabulka 11: Četnost variant Apo E u pacientů s poruchami lipidového metabolismu**

Varianty	Četnost variant
E3/E3	9
E3/E4	4
E2/E3	6
E2/E4	7
E2/E2	1
E4/E4	0

Ve skupině pacientů s poruchami lipidového spektra se nejčastěji vyskytovala varianta ACE (ins/del) – 25 pacientů z nich 8 s homozygotním genotypem. Následovaly varianty eNOS (T-786C) - 19 pacientů, z nichž je 6 homozygotů. eNOS (G894T) - 15 pacientů (4 homozygoti), LTA C804A - 14 pacientů (1 homozygot), β-fibrinogen (G455A) – 10 pacientů (2 homozygoti), HPA-1 (T196C)- 9 pacientů (pouze heterozygoti). Varianta ApoB R3500Q nebyla ve sledovaném souboru nalezena. Nejčastěji zastoupeným polymorfizmem ApoE byla varianta E3/E3 – 9 pacientů,



následovaly varianty E2/E4 - 7 pacientů, E2/E3 – 6 pacientů, E3/E4 - 4 pacienti, E2/E2 1 pacient. Varianta E4/E4 nebyla nalezena u žádného z pacientů.

Frekvence výskytu mutací ve skupině pacientů s poruchami lipidového spektra je znázorněna v tabulce 12.

**Tabulka 12: Frekvence výskytu mutací v souboru pacientů s poruchami lipidového metabolismu**

Polymorfismus	Frekvence v procentech
eNOS (T-786C)	46%
eNOS (G894T)	34%
LTA (C804A)	28%
ACE (ins./del.)	61%
HPA-1 (T196C)	16%
β-fibr. (G455A)	22%
Apo-B (R3500Q)	0%
Apo-E (E4)	20%

Nejfrekventovanější mutací v souboru pacientů s poruchami lipidového metabolismu byla delece v genu pro ACE (61%), následovaly varianty eNOS (T-786C) - 46%, eNOS (G894T)- 34%, LTA (C804A) - 28%, β-fibrinogen (G455A) - 22%, Apo E (E4)- 20%. Varianta Apo B R3500Q nebyla nalezena.

Četnost vyšetřovaných polymorfizmů a mutací ve skupině pacientů s kardiovaskulárním onemocněním je shrnuta v tabulce 13.

**Tabulka 13: Četnost variant u pacientů s kardiovaskulárními onemocněními**

Varianty	N	M/N	M/M
Leiden(G1691A)	35	1	0
FV R2 (H1299R)	27	9	0
PTH (G20210A)	25	11	0
MTHFR (C677T)	13	18	5
MTHFR(A1298C)	17	17	2
FXIII (V34L)	5	30	1
PAI-1 (4G/5G)	0	25	11
EPCR (A4600G)	24	11	1
EPCR (G4678C)	13	18	5

Nejčetněji zastoupenou variantou u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním je polymorfismus PAI-1 (4G/5G), který byl nalezen u 36 pacienty, z nichž bylo 11 homozygotů. Následovaly varianty FXIII (V34L) - 31 pacientů (1 homozygot), EPCR (G4678C) a MTHFR (C677T)- 23 pacientů (5 homozygotů), MTHFR (A1298C) - 19 pacientů (2 homozygoti), EPCR (A4600G) – 12 pacientů (1 homozygot), (G20210A)- 11 pacientů (pouze heterozygoti), FV R2 (H1299R)- 9 pacientů (pouze heterozygoti). Nejméně četným polymorfismem je FV Leiden (G1691A) – 1 heterozygotní pacient.

Frekvence výskytu mutací v souboru pacientů s kardiovaskulárním onemocněním shrnuje tabulka 14.

**Tabulka 14: Frekvence výskytu mutací v souboru pacientů s kardiovaskulárním onemocněním.**

Polymorfismus	Frekvence v procentech
FV Leiden (G1691A)	1%
FV R2 haplotyp (H1299R)	13%
PTH (G20210A)	15%
MTHFR (G677T)	39%
MTHFR (A1298C)	29%
FXIII (V34L)	44%
PAI-1 (4G/5G)	65%
EPCR (A4600G)	18%
EPCR (G4678C)	39%

Nejfrekventovanější mutací v souboru pacientů s kardiovaskulárními onemocněními byla varianta PAI-1 4G - 65%, následovaly varianty FXIII (V34L) - 44%, MTHFR (G677T) a EPCR (G4678C) – 39%, MTHFR (A1298C) - 29%, EPCR (A4600G) – 18%, PTH (G20210A) - 15%, FV R2 haplotyp (H1299R) - 13% a FV Leiden (G1691A) – 1%.

## 9 DISKUZE

Metody využívající polymerázovou řetězovou reakci s reverzní hybridizací na reagenčních stripách s následnou enzymatickou detekcí jsou vysoce komplexní metody, které umožňují více genetických variant na jednom stripu, a tím predikci rizika kardiovaskulárních příhod v rizikových skupinách pacientů. V naší práci jsme sledovali dvě rizikové skupiny pacientů. První skupina byla tvořena pacienty s poruchami lipidového metabolismu. Druhou skupinu tvořili pacienti s kardiovaskulárním onemocněním. Cílem práce bylo zjistit četnost variant a frekvenci mutací ve sledovaných skupinách pacientů s potenciálním rizikem vzniku kardiovaskulárních komplikací (pacienti s dyslipidemií a pacienti se stabilní a nestabilní anginou pectoris). U pacientů s poruchami lipidového metabolismu byly vyšetřovány varianty asociované se vznikem aterosklerózy. U souboru pacientů s kardiovaskulárními onemocněními byly vyšetřovány varianty asociované se vznikem trombózy.

Z výsledků získaných ve skupině pacientů s poruchami lipidového metabolismu vyplývá, že nejčetněji zastoupenou variantou je ACE (I/D), která se vyskytovala u 25 z celkového počtu 27 pacientů, což představuje 93% všech pacientů. Z 25 pacientů bylo 8 homozygotů, což představuje 32% ze všech pacientů nesoucích tento genotyp a 30 % všech pacientů ve sledovaném souboru. Tyto výsledky korelují s výsledky udávajícími četnost homozygotů u 35 % rizikové populace [45, s. 3; 17, s. 1]. Delece 287 bp v genu pro ACE je zároveň nejfrekventovanější mutací ve sledovaném souboru (61% všech alel). Tyto výsledky korelují s výsledky analýz publikovaných v jiných zemích [45, s. 3; 46, s. 179]. Naopak četnost genotypu I/I, který je asociován s protektivní funkcí proti vzniku kardiovaskulárních onemocnění byla významně nižší oproti výsledkům jiných srovnávacích analýz (7% vs. 16%) [45, s. 3]. Rozdíl může být vysvětlen malým počtem pacientů ve sledovaném souboru.

Vzhledem k tomu, že angiotenzin konvertující enzym je významným enzymem podílejícím se na regulaci renin angiotenzin aldosteronovém systému hrajícím klíčovou roli v regulaci hypertenze, představuje vysoká četnost a frekvence delecí v genu pro angiotenzin konvertující enzym vysoké riziko vzniku kardiovaskulárních příhod. Je však nutné sledovat vzájemný vztah genotypu a ostatních faktorů (zvýšené koncentrace sérového cholesterolu, LDL-cholesterolu a triacylglycerolů, kouření,

obezita, metabolický syndrom) [17, s. 1].

Druhou nejčastější variantou byly polymorfizmy v genu kódující enzym endotelovou syntázu oxidu dusného eNOS (T-786C) a (G894T), které se vyskytovaly u 19 a u 15 pacientů. Frekvence genotypů u obou polymorfizmů (22% a 15% korelovaly s literárními údaji) [47, s. 930; 48, s. 516; 49, s. 930; 50, s. 1166].

Polymorfizmus  $\beta$ -fibrinogenu (G455A) byl vyšetřen u 10 pacientů z toho 2 homozygotů. Procentuální zastoupení heterozygotů 29% a homozygotů 6% koreluje s výsledky dalších studií [51, s. 3034].

Nejmenší četnost ve skupině pacientů s poruchami lipidového metabolismu představuje varianta ApoB R3500Q. Genotyp Apo B R3500Q v homozygotním stavu je spojen s výskytem familiární hypercholesterolemie s fatálními důsledky již v dětském věku. Tyto výsledky korelují s výsledky frekvencí a četností uváděných v různých populačních skupinách pacientů s hyperlipidemií, kde jsou uváděny frekvence výskytu do 5% [52, s. 241; 53, s. 7]. Četnosti a frekvence výskytu ostatních alel korelovaly s výsledky uvedenými v literatuře.

Významné rozdíly byly nalezeny u variant apolipoproteinu E. Genotyp E3/E3 byl nalezen u 33% pacientů z vyšetřované skupiny, tato frekvence nekoreluje s dostupnými literárními údaji uvádějícími frekvenci 60-70%. Obdobně genotyp E3/E4 byl nalezen u 4 pacientů s frekvencí 15%, zatímco dostupné literární údaje udávají frekvenci až 22% [54, s. 571; 28, s. 1; 25, s. 79]. Rozdíly ve frekvencích variant ve sledovaném souboru pacientů oproti literárním údajům můžeme vysvětlit malým počtem pacientů zařazených do sledovaného souboru.

Ve skupině pacientů s kardiovaskulárními onemocněními byla nejčastěji zastoupena varianta PAI-1 (4G/5G). Alela 4G je spojena se vznikem infarktu myokardu a hluboké žilní trombózy. Alela 4G byla nalezena u 36 pacientů, z nichž bylo 11 homozygotů zastoupených 30% pacientů, což se významně neshoduje s literárními zdroji, kde byla frekvence 3%. Četnost heterozygotů ve skupině je 69% což představuje 26% rozdíl s literárními zdroji. Neshodu vysvětlujeme nulovým zastoupením wild type homozygotů ve skupině [55, s. 1513 43, s. 1; 40, s. 1453].

Druhým nejčastějším polymorfizmem je FXIII (V34L). Alela L spojená s protektivní funkcí v přežití pacientů s infarktem myokardu byla nalezena u 31 pacientů včetně 1 pacienta s homozygotním genotypem. Četnost homozygotů je 3%, což koreluje s literárními zdroji [56, s. 1; 38, s. 1].

U polymorfizmu EPCR (A4600G) a bylo nalezeno u 12 pacientů. Frekvence heterozygotů 30% a homozygotů 3% koreluje s výsledky v nalezených literárních zdrojích. Naopak vyšší četnost má polymorfismus EPCR (G4678C). V analýze bylo nalezeno 23 pacientů (z nich 5 homozygotů). Zastoupení homozygotů ve skupině bylo 14% a u heterozygotů 50%. Oba výsledky vycházejí shodně s hodnotami v literárních zdrojích. Frekvence homozygotů korelují s výsledky jiných studií [57, s. 885; 44, s. 1].

Mezi polymorfizmy s vyšší frekvencí patří také MTHFR (C677T) a MTHFR (A1298C). Varianta MTHFR (C677T) je ve skupině zastoupena 23 pacienty a mezi nimi 5 homozygotů. Heterozygoti mají frekvenci 50%, což se shoduje s literárními zdroji [58, s. 587; 35, s. 878; 59, s. 33; 37, s. 619]. Shoda analýz vychází také ve 14% pacientů s homozygotním genotypem. 19 pacientů je spojeno s polymorfizmem MTHFR (A1298C), který v kombinaci s MTHFR (C677T) způsobuje žilní trombózu. Z 19 pacientů byli nalezeni 2 pacienti s homozygotním genotypem. Homozygoti jsou ve skupině zastoupeni 5%, které korelují s výsledkem dalších analýz. Shoda vyplývá i z porovnání frekvencí heterozygotů [58, s. 587; 35, s. 878; 37, s. 619].

Četnost polymorfizmu PTH je 11 pacientů-heterozygotů. Frekvence 30% stanovená ve skupině pacientů se liší od údajů v literárních zdrojích, kde je frekvence heterozygotů 7%. Rozdíl může být způsoben malým počtem jedinců ve sledovaném souboru [34, s. 215; 60, s. 237].

Nejméně frekventovanými polymorfizmy ve vyšetřované skupině byly FV leiden, FV R2 haplotyp. Četnost pacientů s FV leiden představovala pouze 1 pacienta v heterozygotním genotypu. Frekvence 6% korelující s literárními údaji naznačuje velmi nízkou prevalenci mutace, která zapříčiňuje poruchy inhibice aktivovaného koagulačního faktoru V proteinem C a zvyšuje riziko tromboembolické příhody [31, s. 94; 58, s. 587; 61, s. 1].

Nejmenší četnost ve skupině má polymorfismus FV R2 haplotyp, který je zastoupen 9 pacienty v heterozygotním genotypu. Tento haplotyp faktoru V způsobuje mírnější formu rezistence FV na proteinu C stejně jako u FV leiden. Frekvence heterozygotů ve skupině je 25%, což je o 10% vyšší hodnota než dostupné literární údaje [61, s. 1599; 32, s. 75].

## ZÁVĚR

Ve skupinách pacientů s dyslipidemií a kardiovaskulárními onemocněními jsme zjistili četnosti polymorfizmů. Nejčastějšími variantami analyzovanými ve skupině pacientů s dyslipidemií byly nalezeny ACE (ins./del.) – 25 pacientů s frekvencí alely D 61%. Ve skupině pacientů s kardiovaskulárními onemocněními se nejčastěji objevovala varianta PAI-1 (4G/5G) – 36 pacientů s frekvencí alely 4G 65%.

Z výsledků získaných v obou skupinách lze usoudit, že distribuce genetických variant ve sledovaných skupinách pacientů je srovnatelná s literárními údaji. Případné rozdíly jsou dány malým počtem pacientů zařazených do sledovaných souborů. K přesnějšímu odhadu rizika kardiovaskulárních příhod bude nutné provést korelaci genotypů s dalšími rizikovými faktory ovlivnitelnými i neovlivnitelnými (dieta, věk, obezita, jiná onemocnění – diabetes mellitus, jiná kardiovaskulární onemocnění, rodinná anamnéza) a případně rozšířit spektrum analýzy posuzovaných rizikových genotypů.

## Seznam zkratek

<b>ACE</b>	Angiotensin konvertující enzym
<b>AGE</b>	Konečné produkty glykace a oxidace volných mastných kyselin
<b>Apo B</b>	Apolipoprotein B
<b>apo E</b>	Apolipoprotein E
<b>Bp</b>	počet párů bazí
<b>CVD</b>	Kardiovaskulární choroby
<b>ČR</b>	Česká republika
<b>eEPCR</b>	Membránový endoteliální receptor proteinu C
<b>EKG</b>	Elektrokardiografie
<b>eNOS</b>	Endotelová syntáza oxidu dusnatého
<b>EPCR</b>	Endoteliální receptor proteinu C
<b>FXIII</b>	Faktor XIII
<b>Gp</b>	Glykoprotein
<b>HDL</b>	Lipoproteiny s vysokou hustotou
<b>HAK</b>	Hormonální antikoncepce
<b>HPA 1</b>	Antigen lidských krevních destiček 1
<b>hsCRP</b>	Vysoce senzitivní C reaktivní protein
<b>ICHS</b>	Ischemická choroba srdeční
<b>I/D</b>	Inzerce/delece
<b>IDL</b>	Lipoproteiny se střední hustotou
<b>IL-1</b>	Interleukin 1
<b>LDL</b>	Lipoproteiny s nízkou hustotou
<b>LPL</b>	Lipoproteinová lipáza
<b>LTA</b>	Lymfotoxin alfa
<b>mRNA</b>	Mediátorová ribonukleotidová kyselina
<b>MTHFR</b>	Methylentetrahydrofolát reduktáza
<b>NADPH</b>	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
<b>NBT</b>	Nitro Blue Tetrazolium
<b>NO</b>	Oxid dusnatý
<b>PAI – 1</b>	Inhibitor aktivátoru plazminogenu – 1



<b>PROCR</b>	Protein C receptor
<b>PTH</b>	Protrombin
<b>sEPCR</b>	Plazmatický endoteliální receptor proteinu C
<b>SNP</b>	Jednonukleotidové polymorfizmy
<b>TNF</b>	Tumor nekrotizující faktor
<b>USA</b>	Spojené státy americké
<b>aV</b>	Aktivovaný koagulační faktor V
<b>VCAM-1</b>	Vaskulární buněčné adhezivní molekuly
<b>VIIIa</b>	Aktivovaný koagulační faktor VIII
<b>VLDL</b>	Lipoproteiny s velmi nízkou hustotou
<b>WHO</b>	Světová zdravotnická organizace

## REFERENČNÍ SEZNAM

1. *World health organization* [online]. 1st edition . Geneva: 2007 [cit. 2011-04-16]. 1 s. Environment and Health Information System (ENHIS). Dostupné z WWW: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>.

2. CÍFKOVÁ, Renata. *Zdn.cz* [online]. 2006 [cit. 2011-04-18]. Epidemiologie kardiovaskulárních onemocnění. Dostupné z WWW: <<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/epidemiologie-kardiovaskularnich-onemocneni-172591>>.

3. *World health organization* [online]. 1st edition . Geneva: 2011 [cit. 2011-04-16]. 1 s. Cardiovascular diseases (CVDs). Dostupné z WWW: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>.

4. *World health organization* [online]. 1st edition . Geneva: 2011 [cit. 2011-04-16]. 1 s. Cardiovascular diseases. Dostupné z WWW: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>.

5. DZAU, Victor J.; LIEW, Choong-Chin . *Cardiovascular genetics and genomics for the cardiologist*. Edited by Victor J. Dzau, Choong-Chin Liew . 1st edition . Oxford: Wiley-Blackwell, 2008. 672 s. ISBN 978-1-4051-3394-4.

6. NEČAS A SPOL., Emanuel. *Patologická fyziologie orgánových systémů : část I*. Vyd.1. Praha: Karolinum, 2003. 379 s. ISBN 80-246-0615-1.

7. MAČÁK, Jirka; MAČÁKOVÁ, Jana. *Patologie*. Vyd.1. Praha: Grada, 2004. 348 s. ISBN 80-247-0785-3.

8. RACEK ET AL., Jaroslav. *Klinická biochemie*. Vyd.2. Praha : Galén, 2006. 329 s. ISBN 80-7262-324-9.

9. ČEŠKA, Richard, et al. *Dyslipidémie : Doporučený diagnostický a léčebný postup* [online]. Vyd.1. Praha: Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře, 2004 [cit. 2011-04-15]. Dostupné z WWW: <[http://www.svl.cz/Files/nastenka/page\\_4766/Version1/Dyslipidemie.pdf](http://www.svl.cz/Files/nastenka/page_4766/Version1/Dyslipidemie.pdf)>. ISBN 80-903573-4-2.

10. KUMAR, Dhavendra; WEATHERALL, David. *Genomics and clinical medicine*. 1st edition. New York: Oxford univerzity press, 2008. 672 s. ISBN 978-0-19-518813-4.

- 11.** CHATTERJEE, Kanu, et al. *Cardiology: an illustrated text/reference*. 1st edition. New York: Gower Medical Pub, 1991. xi, 833 s. ISBN 0-397-44611-X.
- 12.** CAI, H.; WILCKEN, DE; WANG, XL. The Glu-298-->Asp (894G-->T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. *Journal of molecular medicine*. 1999, roč. 77, č. 6, s. 511-4. ISSN 0946-2716.
- 13.** DIAS, Rodrigo Gonçalves; NEGRÃO, Carlos Eduardo; KRIEGER, Marta Helena. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2009, roč. 96, č. 1. ISSN 0066-782X.
- 14.** ROSSI GP.; CESARI M.; ZANCHETTA M.; COLONNA S.; MAIOLINO G.; PEDON L.; CAVALLIN M.; MAIOLINO P.; PESSINA AC. The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study. *Journal of the american college of cardiology*. 2003. roč. 41, č. 6, s. 930-7. PMID 12651036.
- 15.** OZAKI, Kouichi; OHNISHI, Yozo; IIDA, Aritoshi et al. Functional SNPs in the lymphotoxin- $\alpha$  gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nature genetics*. 2002, roč. 32, s. 650 -4. ISSN 1061-4036.
- 16.** ARBUSTINI, E.; GRASSO, R.; FASANI, R. et al. Angiotensin converting enzyme gene deletion allele is independently and strongly associated with coronary atherosclerosis and myocardial infarction. *British heart journal*. 1995, roč. 74, č. 6, s. 584-591. PMC484110.
- 17.** KARUNAKAR, Venkata et al. *Smj.sma.org* [online]. 2010 [cit. 2011-04-16]. Angiotensin-converting enzyme gene. Dostupné z WWW: <<http://smj.sma.org.sg/5107/5107a5.pdf>>.
- 18.** CARLSSON, Lena E.; GREINACHER, A.; SPITZER, C. et al. Polymorphisms of the Human Platelet Antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3, and HPA-5 on the Platelet receptors for fibrinogen (GPIIb/IIIa), von Willebrand factor (GPIb/IX), and collagen (GPIa/IIa) are not correlated with an increased risk for stroke. *Journal of the american heart association*. 1997, roč 28, č. 7, s. 1392-5. PMID 9227689.
- 19.** BRAY, Paul F.; SHUMAN, Marc A. *Bloodjournal.hematologylibrary.org* [online]. 1989 [cit. 2011-04-25]. Identification of an Abnormal Gene for the GPIIIa Subunit of the Platelet. Dostupné z WWW: <<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/75/4/881.long>>.
- 20.** MARTISKAINEN, M. et al. Fibrinogen Gene Promoter -455 A Allele as a Risk Factor for Lacunar Stroke. *Journal of the american heart association*. 2003, roč. 3, s. 886-891. ISSN 1524-4628.

- 21.** BROWN, Erika T.; FULLER, Gerald M. Detection of a Complex That Associates With the B $\beta$  Fibrinogen G-455A Polymorphism. *Journal of the american society of hematology*. 1998, roč. 92, č. 9, s. 3286-3293. ISSN 1528-0020.
- 22.** BEHAGUE, Isabelle; POIRIER, O.; NICAUD, V. et al.  $\beta$  Fibrinogen Gene Polymorphisms Are Associated With Plasma Fibrinogen and Coronary Artery Disease in Patients With Myocardial Infarction. *Circulation*. 1996, roč 93, č. 3, s. 440-9. PMID 8565160.
- 23.** RENNER, W.; CICHOCKI, L.; FORJANICS, A. et al. G-455A polymorphism of the fibrinogen beta gene and deep vein thrombosis. *European journal of clinical investigation*. 2002, roč. 32, č. 10, s. 755-758. ISSN 1365-2362.
- 24.** LUSIS, Aldons J., et al. *Pnas.org* [online]. 1985 [cit. 2011-04-25]. Cloning and expression of apolipoprotein B, the major protein of low and very low density lipoproteins. Dostupné z WWW: <<http://www.pnas.org/content/82/14/4597.long>>.
- 25.** PILAI, JI.; NUEMAN, RJ.; WU, J. et al. Genetic heterogeneity in familial hypobetalipoproteinemia: linkage and non-linkage to the apoB gene in Caucasian families. *American journal*. 1998, roč. 76, č. 1, s. 79-86. PMID 9508071.
- 26.** DE KNIJFF, Peter, et al. *Jlr.org* [online]. 1990 [cit. 2011-04-25]. Genetic heterogeneity in familial dysbetalipoproteinemia. Dostupné z WWW: <<http://www.jlr.org/content/31/1/45.long>>.
- 27.** STRANDHAGEN, Elisabeth. *Lipidworld.com* [online]. 2004 [cit. 2011-04-29]. The apolipoprotein E polymorphism and the cholesterol-raising effect of coffee. Dostupné z WWW: <<http://www.lipidworld.com/content/3/1/26>>.
- 28.** VEGA, Gloria; GRUNDY, Scott M. *Jci.org* [online]. 1986 [cit. 2011-04-25]. In vivo evidence for reduced binding of low density lipoproteins to receptors as a cause of primary moderate hypercholesterolemia. Dostupné z WWW: <<http://www.jci.org/articles/view/112729>>.
- 29.** CASTAMAN, Giancarlo; LUNGI, B.; MISSIAGLIA, E. et al. Phenotypic homozygous activated protein C resistance associated with compound heterozygosity for Arg506Gln (factor V Leiden) and His1299Arg substitutions in factor V. *British journal of hematology*. 1997, roč. 99, č. 2, s. 257-61. PMID 93 75735.
- 30.** BERTINA, Rogier M.; KOELEMAN, BP.; KOSTER, T. et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994, roč. 369, č. 6475, s. 64-7. PMID 8164741.

**31.** ORNSTEIN, Deborah L.; CUSHMAN, Mary. Factor V Leiden. *Circulation*. 2003, roč. 107, č. 15, s. 94-97. PMID 12707252.

**32.** HOEKEMA, Lico, et al. *Schattauer.de* [online]. 2001 [cit. 2011-04-25]. Functional Properties of Factor V and Factor Va Encoded by the R2-gene. Dostupné z WWW: <<http://www.schattauer.de/en/magazine/subject-areas/journals-a-z/thrombosis-and-haemostasis/contents/archive/issue/815/manuscript/2646.html>>.

**33.** AKHAVAN, Sink; De CRISTFARO, Raimondo ; PEYVANDI Flora et al. Molecular and functional characterization of a natural homozygous Arg67His mutation in the prothrombin gene of a patient with a severe procoagulant defect contrasting with a mild hemorrhagic phenotype. *Journal of the american society of hematology*. 2002, roč. 100, č. 4, s. 1347-1353. ISSN 0006-4971.

**34.** MILES, J. Shawn; MILETICH, Joseph P. MD; GOLDHABE, Samuel Z. r MD et al. G20210A mutation in the prothrombin gene and the risk of recurrent venous thromboembolism. *Journal of the american college of cardiology*. 2001, roč. 37, č. 1, s. 215-218. ISSN 0735-1097.

**35.** WILCKEN, David E.L.; WANG, Xing L.; SIM, Ah Siew et al. Distribution in Healthy and Coronary Populations of the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C<sub>677</sub>T Mutation. *Ahajournals*. 1996, roč. 16, č. 7, 878-882. PMID 8673563.

**36.** GOYETTE, Philippe; CHRISTENSEN, B.; ROSENBLATT, D.S. et al. Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. *The american journal of human genetics*. 1996, roč. 58, č. 6, s. 1268-1275. PMCID: PMC1914869.

**37.** ZHU, Heng; WILCKEN, B.; BAMFORTH, F. et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *Journal of medical genetics*. 2003, roč. 40, č. 8, s. 619-625. PMCID: PMC1735571.

**38.** GEMMATI, Donato, et al. *Molmed.org* [online]. 2007 [cit. 2011-04-17]. Factor XIII A-V34L and Factor XIII B-H95R Gene Variants. Dostupné z WWW: <<http://www.molmed.org/pdfstore/112-120.Gemmati.00049.PDF>>.

**39.** GEMMATI, Donato, et al. *Molmed.org* [online]. 2007 [cit. 2011-04-17]. Factor XIII A-V34L and Factor XIII B-H95R Gene Variants. Dostupné z WWW: <<http://www.molmed.org/pdfstore/112-120.Gemmati.00049.PDF>>.

40. PASTINEN, Tomi; PEROLA, M.; NIINI, P. et al. Array-Based Multiplex Analysis of Candidate Genes Reveals Two Independent and Additive Genetic Risk Factors for Myocardial Infarction in the Finnish Population. *Oxford journals*. 1998, roč. 7, č. 9, s. 1453-1462. ISSN 1460-2083.
41. FRANCIS, Charles W. *Archivesofpathology.org* [online]. 2002 [cit. 2011-04-16]. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Levels and polymorphisms. Dostupné z WWW: <[http://www.archivesofpathology.org/doi/pdf/10.1043/00039985\(2002\)126%3C1401%3APAILAP%3E2.0.CO%3B2](http://www.archivesofpathology.org/doi/pdf/10.1043/00039985(2002)126%3C1401%3APAILAP%3E2.0.CO%3B2)>.
42. CRANDALL, David L.; BUSLER D. E.; KRAL, John G. et al. Autocrine Regulation of Human Preadipocyte Migration by Plasminogen Activator Inhibitor-1. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000, roč. 85, č. 7, s. 2609-2914. PMID 10902815.
43. MEDINA BADENES, PILAR . *Detección de nuevas mutaciones en componentes de la vía de la proteína C, asociadas con un mayor riesgo trombótico* [online]. Valencia, 2005. 267 s. Diplomová práce. Universitat de Valencia, departamento de bioquímica. Dostupné z WWW: <[http://www.tdr.cesca.es/TESIS\\_UV/AVAILABLE/TDX-0405106-141941/medina.pdf](http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UV/AVAILABLE/TDX-0405106-141941/medina.pdf)>.
44. ULU, Arzu; et al. EPCR gene A3 haplotype and elevated soluble. *Science journal*. 2002, roč. 296, č. 5574. ISSN 1095-9203.
45. MARKOULA, S.; GIANNOPOULOS, S.; KOSTOULAS, C. et al. Gender association of the angiotensin-converting enzyme gene with ischaemic stroke. *Journal of the renin-aldosterone system*. 2011. roč. 20, č. 6, s 3-6. ISSN 1752-8976.
46. WIWANITKIT, V. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism: I and D alleles from some different countries. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004. Roč. 10, č. 2, s. 179-82. PMID 15094939.
47. ROSSI, GP.; CESARI, M.; ZANCHETTA, M. et al. The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study. *J Am Coll Cardiol*. 2003. roč. 41, č. 6, s. 930-7. PMID 12651036.
48. FATINI, C.; SOFI, F.; STICCHI, E.; GENSINI, F.; GORI, AM.; FEDI, S.; LAPINI, I.; ROSTAGNO, C.; COMEGLIO, M.; BROGI, D.; GENSINI, G.; ABBATE, R. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *Am Heart J*. 2004, roč.147, č. 3, s. 516-21. PMID 14999203.

- 49.** ROSSI, GP.; CESARI, M.; ZANCHETTA, M.; COLLONA S.; MAIOLINO G.; PEDON, L.; CAVALLIN, M.; MAIOLINO, P.; PESSINA, AC. The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study. *J Am Coll Cardiol.* 2003. roč. 41, č. 6, s. 930-7. PMID 12651036.
- 50.** ROSSI, GP.; MAIOLINO, G.; ZANCHETTA, M. et al. The T(-786)C endothelial nitric oxide synthase genotype predicts cardiovascular mortality in high-risk patients. *Journal of the American College of Cardiology.* 2006, roč. 48, č. 6, s. 1166-1174. PMID 16979000.
- 51.** TYBJAERG-HANSEN, A.; AGERHOLM-LARSEN, B. et al. A common mutation (G-455--> A) in the beta-fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. A study of 9,127 individuals based on the Copenhagen City Heart Study. *The journal of clinical investigation* 1997. roč. 99, č. 12, s. 3034-3039. ISSN 0021-9738.
- 52.** HORVATH A, GANEV V. The mutation APOB-100 R3500Q in Eastern Europe. *Atherosclerosis* 2001;156:241-2. ISSN 0021-9150.
- 53.** EROGLU, Z.; SELVI, N.; KOSOVA, B.; BIRAY, C. et al. Absence of apolipoprotein B-3500 mutation in Turkish patients with coronary and cerebrovascular atherosclerosis. *Anatolian journal of cardiology.* 2008, roč. 8, č. 1, s. 7-9. PMID 18258526.
- 54.** SCHWANKE, C.H.A.; MANICA DA CRUZ, I.B. et al. Analysis of the Association Between Apolipoprotein E Polymorphism and Cardiovascular Risk Factors in an Elderly Population with Longevity. 2002, roč. 78, č. 6, s. 571-579. ISSN 0066-782X.
- 55.** KATRANCIOGLU, N.; MANDUZ, S.; OZEN, F. et al. Type I plasminogen activator inhibitor 4G allele frequency is associated with chronic venous insufficiency. *The journal of international medical research.* 2010. roč. 38, č. 4, s. 1513-8. PMID 20926026.
- 56.** BRUHN, H. D.; EICHINGER, Kiel S.; HARENBERG, Wien I. et al. Diagnostik, Therapie und Grundlagenforschung hamostaseologie. *Haematologica.* 2004, roč. 48, č. 24, s. 1-83. ISSN 0720-9355.
- 57.** NAVARRO, Silvia; MEDINA, Pilar; MIRA Yolanda et al. Haplotypes of the *EPCR* gene, prothrombin levels, and the risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A mutation. *Haematologica.* 2008, roč. 93, č. 6, s. 885 – 891. ISSN 1592-8721.

**58.** SPIROSKI, I.; KEDEV, S.; SLOBODAN, A. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR-677 and MTHFR-1298) genotypes and haplotypes and plasma homocysteine levels in patients with occlusive artery disease and deep venous thrombosis. *The journal of the polish biochemical society*. 2008, roč. 55, č. 3, s. 587-594. ISSN 0001-527X.

**59.** HERRMANN, F.H.; SALAZAR-SANCHEZ, Lisbeth; SCHRODER, Winnie et al. Prevalence of molecular risk factors F V Leiden, FV HR2, FII 20210G>A and MTHFR 677C>T in different populations. *International journal of human genetics*. 2001, roč. 1, č. 1, s. 33-39. ISSN 0972 3757.

**60.** ERCAN, Bahadır; TANER, Lülüfer; SUCU, Nehir et al. Factor V Leiden and prothrombin G20210A Gene Polymorphisms in Patients with Coronary Artery Disease . *Yonsei medical journal*. 2008, roč. 49, č. 2, s. 237-43. PMID 18452260.

**61.** HAMEDANI, Ali G. BS; COLE, John W.; BRAXTON, D. Mitchell PhD, MPH et al. Meta-analysis of factor V Leiden and ischemic stroke in young adults the importance of case ascertainment. *American Heart Association*. 2010, roč. 41, č. 8, s. 1599-603. PMID: 20616326.

Obrázek 1a 2: European heart network; European cardiovascular disease statistics; ehnhheart.org, 2008.

Obrázek 3: Vzájemné působení faktorů podílejících se na vzniku kardiovaskulárních onemocnění (upraveno dle Visvikis Siest et al, Curr Opin Lipidol, 2006.)