Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka

Bc. Nikola Petříková

Analýza vybraných genetických markerů u pacientů po transplantaci srdce

Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Jaroslav Hubáček, CSc., DSc.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením pana Ing. Jaroslava Hubáčka, CSc., DSc., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne Bc. Nikola Petříková

Poděkování

Na tomto místě děkuji vedoucímu mé práce Ing. Jaroslavu Hubáčkovi, CSc., DSc. za čas, který mi věnoval, odborné vedení, trpělivost, cenné rady a korekci textu.
Děkuji RNDr. Daně Dlouhé, PhD., díky níž jsem se naučila samostatně pracovat v laboratoři, za zasvěcení do problematiky, vstřícnost, ochotu, trpělivost a milý přístup.
Dále bych chtěla poděkovat celému týmu Laboratoře pro výzkum aterosklerózy, jmenovitě Janě Mesányové, Radce Kramné a Vlastě Pinekerové za pomoc s praktickou částí této práce, podporu a vytvoření velmi příjemného pracovního prostředí.
Velké poděkování patří i mým nejbližším za veškerou pomoc.

Abstrakt

Transplantace srdce (TS) je prováděna u pacientů v terminální fázi srdečního selhání, u kterých všechny ostatní léčebné metody selhaly. Nejčastějšími příčinami takto závažného srdečního selhání jsou dilatační kardiomyopatie (DKMP) a ischemická choroba srdeční (ICHS). Osud pacientů po transplantaci srdce je velice variabilní. Predikce dlouhodobého přežívání pacientů není v současné době uspokojující a dosud nebyl nalezen spolehlivý marker. Řada pacientů zemře po transplantaci srdce v důsledku kardiovaskulárního onemocnění (KVO).

Tato práce je zaměřena na molekulárně genetickou a následně statistickou analýzu 4 jednonukleotidových polymorfismů (SNPs), konkrétně rs17817449 (16q12.2; gen *FTO*), rs2943634 (2q36.3; intergenová oblast), rs6922269 (6q25.1; gen *MTHFD1L*), a rs10757274 (9p21.3; intergenová oblast), u kterých byla na základě celogenomových asociačních studií (GWASs) odhalena příčinná souvislost s KVO nezávislá na tradičních rizikových faktorech. Genotypizovali jsme vzorky DNA 364 dárců a 364 příjemců srdce. Výsledky byly analyzovány pomocí odds ratio (OR) a Pearsonova χ^2 testu. Jako kontrolní soubor byly použity vzorky jedinců z populační studie MONICA. Zkoumali jsme zastoupení genotypů u pacientů, kterým selhalo srdce v důsledku dilatační kardiomyopatie či ischemické choroby srdeční, dále u pacientů s koronární nemocí srdečního štěpu (KNSŠ) a nakonec jsme se zaměřili na genotypy jedinců, kteří zemřeli do 10 let po transplantaci na KVO.

Klíčová slova: transplantace srdce, dilatační kardiomyopatie, ischemická choroba srdeční, jednonukleotidové polymorfismy, riziko selhání

Abstract

Heart transplantation is performed in patients with end-stage heart failure, in whom all other methods of treatment failed. The most common causes of end-stage heart failure are dilated cardiomyopathy and coronary artery disease. The destiny of these patients is highly variable. Prediction of long term survival in patients after heart transplantation is not satisfactory and up to now has not been found reliable marker. Most of the patients die after heart transplantation due to cardiovascular disease.

This thesis is focused on molecular genetics and statistical analysis of four single nucleotide polymorphisms, namely rs17817449 (16q12.2, FTO gene), rs2943634 (2q36.3; intergenic region), rs6922269 (6q25.1; *MTHFD1L* gene), and rs10757274 (9p21.3; intergenic region). According to genome wide association studies are these SNPs assosiated with cardiovascular diseases. We genotyped DNA samples of 364 heart donors and 364 heart recipients. The results were statistically compared (using OR and Pearson's χ^2 test) with the control group, which consisted of samples of individuals from the general population MONICA study. We examined the genotype in patients whose hearts failed due to dilated cardiomyopathy or coronary artery disease and then in patients with cardiac allograft vasculopathy. Furthermore, we focused on the genotypes of patients who died within 10 years after transplantation due to cardiovascular disease.

Key words: heart transplantation, dilated cardiomyopathy, coronary artery disease, single nucleotide polymorphisms, risk of failure

Seznam zkratek

DKMP	dilatační kardiomyopatie	
ICHS	ischemická choroba srdeční	
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny	
KNSŠ	koronární nemoc srdečního štěpu	
KVO	kardiovaskulární onemocnění	
TS	transplantace srdce	
ANRIL	antisense noncoding RNA in the INK4 locus	
BMI	body mass index	index tělesné hmostnosti
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium	Hardy-Weinbergova rovnováha
GWAS	genome-wide association study	celogenomová asociační studie
IL-10	interleukin-10	
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation	Mezinárodní společnost pro transplantaci srdce a plic
NYHA	New York Heart Association	
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man	
OR	odds ratio	poměr šancí
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
RFLP	restriction fragment length polymorphism	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
rpm	rounds per minute	otáčky za minutu
SNP	single nucleotide polymorphism	jednonukleotidový polymorfismus
TNF-α	tumor necrosis factor alpha	tumor nekrotizující faktor alfa
WTCCC	Welcome Trust Case Control Consortium	

Vysvětlení pojmů

heterotopická transplantace srdce	- poškozené srdce zůstane na svém místě a srdce dárce se implantuje na jiné místo
ortopická transplantace srdce	- srdce dárce se implantuje na místo poškozeného srdce (to se vyjme)

Obsah

1 PŘEHLED LITERATURY 8
1.1 Historie transplantace srdce 8
1.2 Indikace transplantace srdce 10
1.2.1 Kardiomyopatie 11
1.2.2 Ischemická choroba srdeční 13
1.3 Faktory ovlivňující přežívání pacientů 14
1.3.1 Koronární nemoc srdečního štěpu 14
1.3.2 Imunosupresivní terapie 14
1.3.3 Ischemický čas dárcovského orgánu 15
1.3.4 Věk dárce 15
1.4 Genetické aspekty 16
1.4.1 Současné využití genetických analýz v predikci přežívání pacientů po TS 16
1.5 Vyšetřované polymorfismy 17

2 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY 20
2.1 Cíle práce 20
2.2 Hypotézy 20

3 MATERIÁL 21
3.1 Sledovaný soubor 21
3.2 Použité chemikálie a přístroje 23
3.2.1 Chemikálie 23
3.2.2 Přístroje 26

4 METODIKA 27
4.1 Molekulárně genetická analýza 27
4.1.1 Izolace DNA 27
4.1.2 Měření koncentrace a kvality DNA 28
4.1.3 Genotypizace 29
4.2 Statistické vyhodnocení 37
4.2.1 Hardy-Weinbergova rovnováha 37
4.2.2 Studium asociace pomocí Pearsonova χ^2 testu 37
4.2.3 Odds ratio 37

5 VÝSLEDKY 39
5.1 Frekvence genotypů a alel analyzovaných polymofrismů 39
5.2 Analýza frekvencí genotypů vybraných skupin pacientů 42
5.2.1 Vliv analyzovaných polymorfismů na rozvoj ICHS 43
5.2.2 Vliv analyzovaných polymorfismů na rozvoj DKMP 44
5.2.3 Vliv analyzovaných polymorfismů na rozvoj KNSŠ po TS 46
5.2.4 Vliv analyzovaných polymorfismů na riziko úmrtí v důsledku KVO 48

6 DISKUZE 52
7 ZÁVĚR 55
8 REFERENČNÍ SEZNAM 56

Úvod

Každoročně se provede zhruba 5 000 transplantací srdce na celém světě. Přibližně ¼ pacientů se kvůli nedostatku dárců své transplantace nedožije.

K tomuto zákroku jsou indikováni pacienti, u nichž bylo selhání srdce natolik závažné, že všechny dostupné léčebné metody selhaly. Pacienti jsou zařazeni do Národního registru osob čekajících na transplantaci orgánů (tzv. „čekací listina“). Při těžkých selháních srdce je možné „přemostit“ období čekání na vhodného dárce zavedením mechanické srdeční podpory. Cílem transplantace srdce je zlepšení kvality života pacienta s co možná nejdelším přežíváním.

Co se týče dárců srdce, musí být s příjemcem kompatibilní v AB0 systému, hmotnostní rozdíl by neměl přesahovat 20%, měli by mít fyziologický nález na elektrokardiogramu a echokardiografickém vyšetření. Zpravidla jsou dárci orgánu lidé po tzv. mozkové smrti, kdy je příčinou poranění mozku a to traumatické (způsobené např. autonehodou) nebo netraumatické (např. mozková mrtvice).

Individuální vývoj stavu pacienta po transplantaci srdce je ovlivněn mnoha faktory jako je stav transplantovaného orgánu, užívání imunosupresiv a svoji roli by mohla hrát též genetická výbava příjemce či dárce orgánu.

Jedním z trendů poslední doby je analýza DNA polymorfismů typu SNP. Díky rozvoji techniky je možné analyzovat několik set tisíc těchto polymorfismů během jediné reakce. Získaná data jsou statistickými metodami zpracovávána a zjišťují se vztahy mezi jednotlivými genotypy a fenotypy.

Tato práce je zaměřena na genotypizaci příjemců a dárců srdce ve 4 vybraných polymorfismech, u kterých byla na základě GWASs prokázána souvislost s kardiovaskulárními onemocněními, a na zkoumání vztahů jednotlivých genotypů k diagnóze a prognóze pacientů po transplantaci srdce.

1 PŘEHLED LITERATURY

1.1 Historie transplantace srdce

Historii transplantace srdce můžeme rozdělit na experimentální, klinickou a moderní éru. Jak je pro vývoj typické, jednotlivé přínosy nestojí osamoceny, ale přidávají další poznatky k experimentům provedeným dříve. Práce několika týmů si však zaslouží speciální pozornost.

Experimentální éra

Za průkopníka transplantologie je považován Alexis Carrel, který v roce 1905 provedl první experimentální heterotopickou transplantaci srdce na psovi. Transplantované srdce po operaci obnovilo činnost, nicméně krátce poté v důsledku trombózy selhalo (Carrel & Guthrie, 1905). Dále se o rozvoj v oblasti TS zasloužil nadaný ruský chirurg Vladimir Petrovič Demikhov. Mimo jiných úspěchů provedl v roce 1951 první ortopickou TS bez použití mimotělního oběhu (Demikhov, 1962). Mimotělní oběh nahrazuje v organismu funkci srdce a plic během operačního výkonu a začal se používat až ve druhé polovině 50. let minulého století.

Nejvíce se o vývoj transplantace srdce v podobě, jaké je známe dnes, zasloužil tým vedený Normanem Shumwayem, který se nevzdával ani po tom, co ostatní instituce ztrácely naději. Postupně bylo dosaženo adekvátní chirurgické techniky a zvířata přežívala více než 2 roky. Jediné, co stále činilo problém, byla imunologická rejekce štěpu (Shumway & Lower, 1964)

Klinická éra

V polovině 60. let již byly položeny základy k zahájení klinického programu transplantace srdce a proběhl první pokus o nahrazení nemocného lidského srdce zdravým. Jednalo se o xenotransplantaci a bylo použito srdce šimpanze (Hardy & Chavez, 1968). Bylo však příliš malé a nedokázalo zabezpečit nároky na oběh lidského těla. Pacient zemřel hodinu a půl po odpojení mimotělního oběhu.

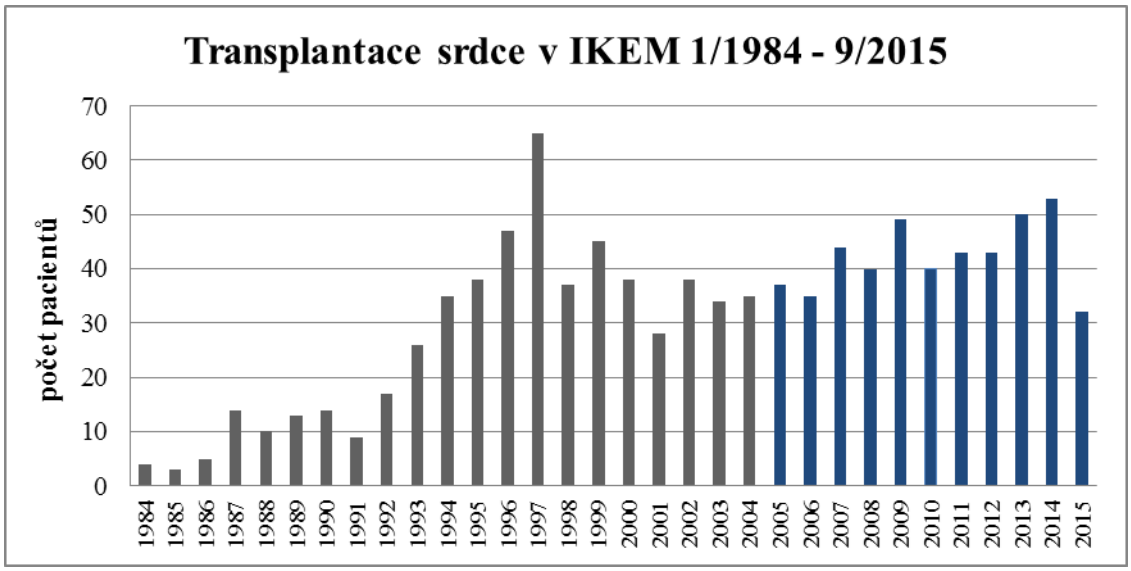
První alotransplantaci srdce u člověka provedl Christiaan Barnard v roce 1967 v Jihoafrické republice (Barnard, 1967). Příjemce cizího srdce Louis Washkansky (53 let) zemřel 18 dnů po operaci na zápal plic. Tři dny na to provedl další transplantaci srdce Adrian Kantrowitz ve Spojených státech amerických. Příjemcem byl tentokrát 18 denní

novorozenec, který ovšem zemřel 5 hodin po operaci na selhání srdce (Kantrowitz et al., 1968). Třetí TS provedl opět Christiaan Barnard. Pacient Philip Blaiberg (46 let) přežil téměř 20 měsíců a stal se tak prvním člověkem, který žil delší dobu s cizím srdcem. Osm měsíců po Barnardově prvním pokusu byla provedena první TS v Československu a to v Bratislavě. Pacientka Šarlota Horváthová (50 let) přežila jen 5 hodin po tom, co v jejím těle začalo bít srdce čtyřicetiletého dárce.

Moderní éra

Průlomový okamžik a moderní éra začala v 80. letech s příchodem imunosupresiv, konkrétně zavedením cyklosporinu A Normanem Shumwayem do klinické praxe. Dalším důležitým krokem bylo zavedení endomyokardiální biopsie jako metody zjišťování stupně rejekce transplantovaného srdce.

V České republice byla první úspěšná transplantace srdce provedena 31.1.1984 v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) v Praze týmem vedeným profesory Vladimírem Kočandrlem, Pavlem Firtem a Jaroslavem Hejnalem. Pacient přežil 13 let. Od té doby se v IKEM provedlo více než 1 000 transplantací srdce (viz *Obrázek 1*).



Obrázek 1: Graf zobrazující počty provedených TS v IKEM od ledna 1984 do září 2015. Modře vyznačené datové body znázorňují pacienty, jimiž jsme se zabývali v této práci. Viz kapitola 3.1.

Zdroj: IKEM.

1.2 Indikace transplantace srdce

K transplantaci srdce jsou indikováni pacienti v terminální fázi srdečního selhání, jehož tíže se určuje na základě dušnosti podle čtyřstupňové klasifikace NYHA (New York Heart Association) - viz *Tabulka 1*.

Tabulka 1: NYHA klasifikace dušnosti u srdečního selhání (převzato z Bydžovský, 2010).

NYHA I	dušnost při velké námaze (těžká fyzická práce, běh)
NYHA II	dušnost při běžné námaze (chůze do schodů)
NYHA III	dušnost i při lehčí než běžné námaze (stlaní lůžka, oblékání, chůze po bytě)
NYHA IV	klidová dušnost

Terminální fáze srdečního selhání je obvykle charakterizována výrazným omezením kvality života nemocného (NYHA III-IV), velmi pokročilým stupněm dysfunkce levé srdeční komory a přítomností známek špatné prognózy (Málek, 1993).

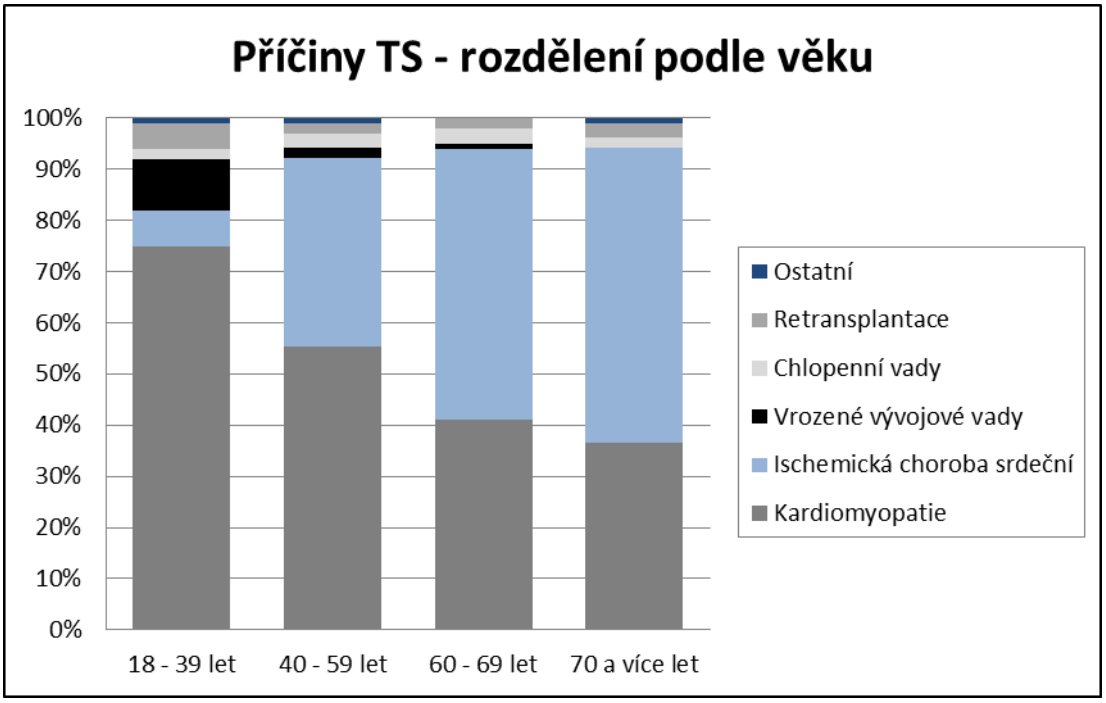
Nemocní ve IV. třídě funkční klasifikace splňují kritéria terminálního stupně jednoznačně a u těchto pacientů není o indikaci pochyb. Vyšetření pacienta se zaměřuje na vyloučení kontraindikací výkonu (viz *Tabulka 2*), případně se použije některá z metod potřebné k přemostění do doby operace.

U méně symptomatických pacientů (NYHA III) je pro stanovení indikace K TS důležitý odhad další prognózy (Pirk & Málek, 2008). Bylo popsáno až 150 znaků, které mohou přispět k odhadu prognózy (Málek & Lupínek, 1999).

Tabulka 2: Absolutní a relativní kontraindikace TS (převzato z Pirk & Málek, 2008).

Absolutní kontraindikace	probíhající nebo chronická infekce
	jiné závažné onemocnění (malignita v posledních 5 letech, v případě vyléčeného onemocnění lze onemocnění lze tuto dobu zkrátit)
	fixovaná plicní hypertenze
	závislost na alkoholu
	drogová závislost
	Psychóza
	BMI > 40 kg/m^2
Relativní kontraindikace	věk nad 60-65 let
	diabetes mellitus s orgánovými komplikacemi
	povšechná ateroskleróza
	předpoklad špatné spolupráce (nedodržování léčebného režimu a životosprávy, poruchy chování, deprese)
	špatné sociální zázemí
	BMI > 30 kg/m2

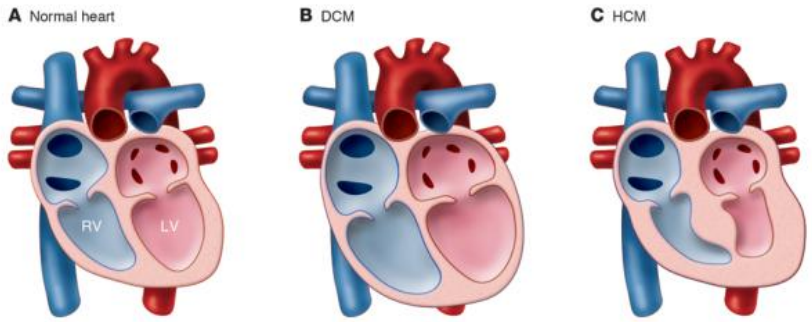
Nejčastějšími příčinami srdečního selhání jsou dilatační kardiomyopatie a ischemická choroba srdeční. Tato onemocnění se vyskytují u více než 80% nemocných, kteří jsou indikováni k TS. Méně častými jsou poté jiné kardiomyopatie, vrozené vývojové vady srdce, chlopenní vady a ostatní (Lund et al., 2014). Zvláštní skupinu indikovaných pacientů pak tvoří retransplantace (viz *Obrázek 2*).



Obrázek 2: Diagnózy dospělých příjemců srdce, rozděleno do věkových skupin (převzato a upraveno dle Lund et al., 2014)

1.2.1 Kardiomyopatie

Jedná se o strukturální a funkční poškození myokardu. Oslabené srdce nedokáže dostatečně zajistit krevní oběh v těle a udržovat normální rytmus, což vede k srdečnímu selhání či arytmiím. Kardiomyopatie mohou být vrozené nebo získané. Projevy jsou značně variabilní, někteří pacienti jsou asymptomatičtí a nepotřebují žádnou léčbu. V opačných případech se nemoc rychle rozvíjí a jedinou možností je právě transplantace srdce. Onemocnění je diagnostikováno pomocí echokardiografie nebo pomocí magnetické rezonance srdce. Nejčastější formou je dilatační kardiomyopatie, méně častá je hypertrofická (srovnání viz *Obrázek 3*) a restriktivní kardiomyopatie. Specifickou jednotkou je arytmogenní kardiomyopatie pravé komory a existuje i heterogenní skupina vzácných, neklasifikovaných kardiomyopatií.



Obrázek 3: Srovnání zdravého srdce (A), srdce postiženého DKMP (B) a srdce postiženého hypertrofickou kardiomyopatií (C) (převzato z McNally et al., 2013).

1.2.1.1 Dilatační kardiomyopatie

Dilatační kardiomyopatie je závažná porucha, jejíž prevalence je odhadována na 37/ 10000. Jedná se o nejčastější příčinu srdečního selhání (Kärkkäinen et al., 2007) a nejčastější indikaci k transplantaci srdce u střední věkové skupiny (Lund et at., 2014).

Dilatační kardiomyopatie je charakterizovaná dilatací levé a někdy i pravé srdeční komory provázené systolickou i diastolickou dysfunkcí. Levá komora má relativně slabou stěnu, chlopně morfologicky normální, ale dysfunkční. Stagnace krve uvnitř srdce vede často k tvorbě trombů a to hlavně v levé komoře a levé síni. Důsledkem dilatační kardiomyopatie je srdeční insuficience vedoucí ke snížení minutového výdeje a tkáňové hypoxii.

Téměř u poloviny pacientů s DKMP je příčinou onemocnění ischemická choroba srdeční (McNally et al., 2013). Dalšími získanými příčinami onemocnění mohou být neléčený vysoký tlak, myokarditidy způsobené virovou nebo bakteriální infekcí, nadměrné pití alkoholu a některá farmaka.

Většina familiárních DKMP vykazuje autozomálně dominantní typ dědičnosti s neúplnou penetrací a variabilní expresivitou a manifestují se ve 2. nebo 3. dekádě života (Levitas et al., 2010). Na základě zkoumání rodin s výskytem DKMP vyšlo najevo, že familiární forma tohoto onemocnění se vyskytuje až ve 35% případů. Kauzální mutace byly popsány ve více než 40 genech kódujících proteiny, které hrají roli ve formaci a funkci sarkomery, cytoskeletonu a jaderné membrány v buňkách srdečního svalu (Van Spaendonck-Zwarts et al., 2013).

Podle nejnovějších odhadů mutace v genu *TTN* na chromosomu 2 v oblasti 2q31 mohou být zodpovědné téměř za čtvrtinu případů familiární idiopatické DKMP a za 18% sporadických případů DKMP (Herman et al., 2012). Produktem tohoto genu je protein titin

(též konektin). Jedná se o nejdelší protein nacházející se v buňkách lidského těla. Skládá se z téměř 33 000 aminokyselin a spoluvytváří sarkomeru příčně pruhovaného svalstva, což je základní struktura svalové kontrakce. Navíc bylo zjištěno, že hraje též roli v chemické signalizaci a v sestavování nových sarkomer.

Dále byla popsána řada mutací u genu *LMNA* kódující proteiny lamin A a lamin C, které se vyskytují v jaderné lamině. Gen se nachází na chromosomu 1 v oblasti 1q21. Podle OMIM (*internetový odkaz 1*) byly do dnešní doby nalezeny desítky mutací různého typu v tomto genu zodpovědných za DKMP. Mutace v tomto genu způsobují též svalové dystrofie.

1.2.2 Ischemická choroba srdeční

I přes všechny pokroky zůstávají kardiovaskulární onemocnění a to především ICHS a ischemická mozková příhoda na prvním místě v příčinách úmrtnosti ve vyspělých státech (GBD, 2015).

Ischemická choroba srdeční je chronická degenerativní porucha vznikající nejčastěji v důsledku aterosklerózy, kdy dochází k ukládání lipidů a dalších komponent krve a fibrózní tkáně v intimě koronárních artérií (Štulc, 2016). Onemocnění může být klinicky bez příznaků nebo se může projevovat přechodnou ischémií - anginou pectoris, či akutním infarktem myokardu (Libby & Theroux, 2005). Chronickým omezením přítoku krve do myokardu dochází k trvalým změnám na srdci.

Patogeneze je komplexní a vedle životního stylu a environmentálních faktorů hrají genetické predispozice též důležitou roli v etiologii ICHS. V roce 1948 byla započata tzv. Framinghamská studie, která byla průlomová v problematice kardiovaskulárních chorob, co se týče odhalení rizikových faktorů. Na základě spolupráce klinické kardiologie, biostatistiky a epidemiologie byly v rámci této studie stanoveny rizikové faktory pro rozvinutí ICHS a to kouření, vysoký krevní tlak a zvýšená hladina cholesterolu v krvi (Kannel et al., 1961). Později byla mezi rizikové faktory zařazena obezita a diabetes mellitus.

Ve Švédsku byla v roce 1994 provedena rozsáhlá sourozenecká studie, do které byla zahrnuta dvojčata, z nichž jedno zemřelo před 55. rokem života v důsledku ICHS. Z výsledků této studie vyplývá, že dědičnost hraje významnou roli. U mužů je udáváno 8x vyšší riziko úmrtí na ICHS u druhého dvojčete v případě monozygotních dvojčat a 3,8x vyšší riziko u dizygotních dvojčat. U žen je udáváno 15x vyšší riziko u monozygotních dvojčat a 2,6x vyšší riziko u dizygotních dvojčat (Marenberg et al., 1994).

1.3 Faktory ovlivňující přežívání pacientů

V počátcích programu TS nebyly výsledky příliš uspokojivé - první rok po operaci přežívalo pouze 30% nemocných (Pirk & Málek, 2008). Zásadní bylo v tomto ohledu klinické využití cyklosporinu A jako základu imunosupresivní profylaxe.

Podle nejnovějších údajů z registru Mezinárodní společnosti pro transplantaci srdce a plic (ISHLT) je nejčastější příčinou smrti do 1 roku od TS akutní rejekce a 1-3 roky po transplantaci koronární nemoc srdečního štěpu, která po 3 letech způsobuje smrt u 17% pacientů.

Přežívání pacientů po transplantaci srdce je velice individuální a ovlivněné řadou faktorů. V následujících podkapitolách následuje stručný přehled některých z nich.

1.3.1 Koronární nemoc srdečního štěpu

Jedná se o akcelerovanou formu ischemické choroby srdeční determinující dlouhodobou životnost transplantovaného srdce. Po jednom roku od OTS představuje u příjemců společně s nádorovými onemocněními nejčastější příčinu smrti (Lund et al., 2014). Faktory jako dyslipidemie, oxidační stres, imunosupresiva a virová infekce významně přispívají k rozvinutí této choroby (Behrend et al., 2000).

KNSŠ byla původně definována jako difúzní koncentrické ztluštění intimy celého věnčitého řečiště na podkladě intimální proliferace s nízkým obsahem resp. nepřítomností lipidů a kalcia. Ze současného pohledu, kdy máme k dispozici lepší zobrazovací techniky, je zřejmé, že KNSŠ je kombinací morfologicky dvou odlišných jednotek: klasických aterosklerotických lézí a symetrických, koncentrických intimálních proliferací (Kocík, 2007). U experimentálních modelů bylo zjištěno, že se KNSŠ rozvíjí pouze u allograftů, u isograftů nikoliv, což dokazuje, že imunitní reakce proti dárcovskému štěpu hraje rozhodující roli v patofyziologii KNSŠ (Vassalli et al., 2003). Tato komplikace není výsadním problémem transplantace srdce, ale vyskytuje se též u jiných transplantovaných solidních orgánů.

1.3.2 Imunosupresivní terapie

Pacienti musí po transplantaci srdce užívat doživotně imunosupresiva, která potlačují imunitní reakci a zabraňují tak rejekci orgánu. Zlepšující se imunosupresivní terapií se snížila incidence rejekcí vyžadující hospitalizaci z 59% u všech pacientů během 5 let po transplantaci (v období mezi lety 1994 - 2000) na 44% (v období mezi lety 2001 -2009) (Lund et al., 2014).

S užíváním především cyklosporinu A jsou ovšem spojena rizika jako např. potransplantační systémová hypertenze, která je charakteristická abnormální cirkadiánní variabilitou krevního tlaku (Jandová & Fabián, 1990). Přetrvání hypertenze během 24 hodin podporuje též vznik hypertrofie myokardu srdečního štěpu (McKoy et al., 1988). Pokud se tato komplikace u pacientů vyskytne, je nutná farmakoterapie.

Imunosupresiva se uplatňují spolu s genetickou predispozicí a dalšími faktory i na poruše lipidového metabolismu, která se vyskytuje u 60-80% nemocných a je detekována již od 3. měsíce po transplantaci (Pirk & Málek, 2008). Základními léky této poruchy jsou statiny, které nejen účinně snižují cholesterol, ale ovlivňují i vývoj KNSŠ a zlepšují prognózu (Kobashigawa et al., 2005).

Další rizika, která přináší užívání imunosupresiv, jsou sepse, maligní nádorová onemocnění, renální selhání apod.

1.3.3 Ischemický čas dárcovského orgánu

Důležitým nezávislým rizikovým faktorem ovlivňující přežívání pacientů je ischemický čas dárcovského orgánu. Pokud je srdce dárce déle než 4 hodiny bez přísunu kyslíku a živin, zvyšuje se riziko mortality příjemce po transplantovaného srdce (Hong et al., 2011).

1.3.4 Věk dárce

V důsledku nedostatku dárců srdce přibývá starších dárců. Roig et al. (2015) retrospektivně analyzovali 2102 transplantací srdce v 8 nemocnicích ve Španělsku z let 1998 až 2010. Časná a celková úmrtnost byly porovnávány mezi pacienty, kteří dostali srdce od dárců nad a pod 50 let. Nebyly nalezeny žádné rozdíly v akutní rejekci mezi jednotlivými skupinami. Celková úmrtnost však byla vyšší u pacientů, kteří přijali srdce od starších dárců. Nicméně po zohlednění parametrů jako je příčina smrti dárce, věk příjemce, zda byl dárce kuřák nebo nekuřák apod., rozdíly ve výsledcích ztratily svou statistickou významnost. Skupina příjemců srdce od starších dárců měla však větší prevalenci KNSŠ po 5 letech od TS.

1.4 Genetické aspekty

Ačkoliv je po desetiletí udáváno 5 hlavních rizikových faktorů pro rozvoj kardiovaskulárního onemocnění - kouření, diabetes mellitus, abdominální typ obezity, vysoký krevní tlak a dyslipidemie, u značného počtu pacientů stále není zřejmá příčina výskytu KVO (Hemesniemi et al., 2015). Odhaduje se, že toto onemocnění je ze 40-60% otázkou genetických predispozic (Roberts & Stewart, 2012).

V poslední čtvrtině 20. století byly provedeny tisíce asociačních studií, kdy se na základě znalostí o daném onemocnění a znalostí o funkci genu usuzuje na jejich potenciální spojitost. Pozornost byla věnována primárně genům, které by mohly mít přímou souvislost s rozvojem aterosklerózy a polymorfismům měnícím aminokyselinové složení proteinů. Jednalo se především o geny kódující proteiny, které jsou zapojeny do metabolismu lipidů (Lusis et al., 2012). Výsledky těchto studií nebyly ovšem zcela uspokojivé a jednoznačné.

Velká naděje je v posledních letech vkládána do celogenomových asociačních studií („genome wide association study“ - GWAS), které detekují spojitost mezi genetickými markery a fenotypem bez jakýchkoli primárních informací o kauzalitě. Zkoumají se až statisíce SNPs na několika nezávislých populacích o velkém počtu jedinců. Frekvence genotypů se porovnávají mezi skupinou pacientů a vhodně zvolených kontrol. GWASs odhalily řadu variant SNPs, které jsou asociovány s vyšším rizikem rozvoje KVO (WTCCC, 2007). Celogenomové asociační studie jsou dnes velice hojně prováděny ve výzkumu všech polygenních chorob (tedy např. i diabetes mellitus 2. typu, obezita, atd.).

Vědci z Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) v roce 2007 publikovali GWAS za použití čipů GeneChip Human Mapping 500K Array Set (Affymetrix) na britské populaci, kde zkoumali téměř 1926 lidí pro 7 majoritních nemocí a jako kontrolu použili vzorky 2938 osob. Tato analýza identifikovala mimo jiné silnou asociaci mezi ICHS a oblastí p21.3 na chromosomu 9.

1.4.1 Současné využití genetických analýz v predikci přežívání pacientů po TS

V posledních letech je trendem tzv. personalizovaná medicína, která si klade za cíl individualizovanou a maximálně účinnou léčbu pacientů na základě jejich genetického profilu. V transplantologii se hledají diagnostické i prediktivní markery selhání štěpu, které by mohly být využívány v personalizované léčbě pacientů.

Prozatím nebyla publikována žádná GWAS analyzující DNA pacientů po transplantaci solidních orgánů. Nicméně vědci z WTCCC nyní pracují na projektu odhalení role

genetických faktorů v časných a pozdních selhání transplantované ledviny. Co se týče transplantace srdce, byly provedeny asociační studie kandidátních genů CGAS pro identifikaci SNPs spojených s rejekcí. Zaměřovaly se na dvě hlavní oblasti a to na geny pro cytokiny (Girnita et al., 2008) a geny pro metabolismus léčiv. Turner et al. (1997) např. nalezli spojitost mezi SNPs v promotoru genu pro tumor nekrotizující faktor alfa (TNF-α) resp. promotoru genu interleukinu 10 (IL-10) a zvýšenou incidencí akutní rejekce.

1.5 Vyšetřované polymorfismy

V této diplomové práci jsme se zabývali 4 polymorfismy typu SNP. Tři z nich (rs2943634, rs6922269, rs10757274) byly vybrány na základě několika GWASs (viz *Tabulka 3*). Byla u nich opakovaně zjištěna asociace s KVO a tento vztah je nezávislý na tradičních rizikových faktorech, jako je vysoký krevní tlak, kouření, zvýšená hladina cholesterolu v krvi, nadváha a diabetes mellitus.

Čtvrtý polymorfismus (rs17817449, gen *FTO*) byl původně odhalen v souvislosti s vyššími hodnotami BMI a zvýšeným rizikem rozvoje diabetu druhého typu, nicméně byl též opakovaně prokázán jeho vliv na rozvoj KVO, který je též nezávislý na tradičních rizikových faktorech.

Tabulka 3: Přehled vybraných polymorfismů (převzato z Ding & Kullo,2009).

Autor	Pacienti	Kontroly	Chr.	Nejbližší gen(y)	SNP	P	OR (95% CI)
WTCCC	1926	2938	2q36.3	Neznámé	rs2943634	$1.2x10^{-5}$	1.22 (1.11-1.33)
			6q25.1	*MTHFD1L*	rs6922269	$6.3x10^{-6}$	1.23 (1.13-1.35)
Samani et al.	2801	4582	2q36.3	Neznámé	rs2943634	$4.0x10^{-3}$	1.20 (1.06 - 1.35)
			6q25.1	*MTHFD1L*	rs6922269	$1.0x10^{-3}$	1.23 (1.01 - 1.50)
McPherson et al.	4110	19600	9p21.3	*CDKN2A,2B*	rs10757274	$<1x10^{-5}$	1.38 (1.19 - 1.60)

1) Polymorfismus rs17817449

Polymorfismus rs17817449 se nachází v 1. intronu genu *FTO* („fat mass and obesity associated“, OMIM přístupový kód: 610966) na chromozomu 16 v pozici 16q12.2. Funkce FTO in vivo není zcela známá, avšak in vitro katalyzuje rekombinantní FTO protein oxidativní demetylaci 3-methylthyminu v ssDNA (Jia et al., 2008). Na základě celogenomových screeningů vykazuje tento gen nejsilnější asociaci s hodnotami BMI (Marinou et al., 2010; Bogardus, 2009).

Ve studii provedené v IKEM na české populaci mužů s akutním koronárním syndromem (AKS) byly analyzován polymorfizmus rs17817449. Genotyp GG se ve statisticky významně větším počtu vyskytoval u pacientů s AKS v porovnání s kontrolní skupinou (21,2% vs 15,9%) a mohlo by se tedy jednat o důležitý rizikový faktor AKS u mužů (Hubáček et al., 2010). Pozdější nezávislé studie potvrdily, že muži se dvěma alelami G mají signifikantně vyšší riziko infarktu myokardu než lidé se dvěma alelami T (Hubáček et al., 2016) a že tento vztah není zprostředkován pouze zvýšením tradičních rizikových faktorů KVO.

Vzhledem k tomu, že gen potenciálně ovlivní methylační status DNA, byly jeho varianty sledovány v souvislosti s řadou dalších civilizačních onemocnění. Byla prokázána kauzalita variant v prvním intronu např. s renálním selháním, Alzheimerovou chorobou, ale i s celkovou mortalitou (přehled viz Dlouhá & Hubáček, 2012).

2) Polymorfismus rs2943634

Polymorfismus rs2943634 se nachází na chromozomu 2 v oblasti 2q36.3. a leží v intergenové oblasti. Riziková alela C má v bělošské populaci prevalenci téměř 65% a každá kopie této alely zvyšuje riziko ICHS o přibližně 20% (Samani et al., 2007). Replikačních studií analyzujících tento polymorfismus je minimum.

V české populaci mají muži, homozygoti AA mají v porovnání s nosiči alespoň jedné alely C nižší riziko akutního infarktu myokardu *(*Hubáček et al., 2016).

3) Polymorfismus rs6922269

Polymorfismus se nachází v intronu genu *MTHFD1L* („methyleneterahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like“, OMIM přístupový kód: 611427) na chromozomu 6 v oblasti 6q25.1. Riziková alela A má prevalenci téměř 25% a každá kopie alely zvyšuje riziko ICHS o 23% (Samani et al., 2007). Nositelé jedné alely A mají průměrně 1,17x větší pravděpodobnost rozvinutí ICHS a homozygoti AA mají průměrně 1,65 větší pravděpodobnost rozvinutí ICHS (WTCCC, 2007). Navíc bylo zjištěno, že pacienti po akutním koronárním syndromu, kteří jsou homozygoti AA, mají větší riziko úmrtí na kardiovaskulární onemocnění než heterozygoti AG a homozygoti GG (Hubáček et al., 2015).

Aktivita proteinu tohoto genu by mohla mít vliv na hladiny homocysteinu v krvi, což by mohlo potvrzovat vztah mezi variantami v tomto genu a rizikovými faktory pro ICHS (Fruchart et al., 2004).

4) Polymorfismus rs10757274

První detekovanou a pravděpodobně nejvíce zkoumanou oblastí asociovanou s ICHS je oblast na 9. chromosomu 9p21.3 (Roberts & Stewart, 2012). Vybraný polymorfismus rs10757274, spadající do této oblasti, leží v nekódující oblasti mezi geny pro inhibitory cyklindependentních kináz CDKN2A (OMIM přístupový kód: 600160) a CDKN2B (OMIM přístupový kód: 600431). Jedná se o 58 kb dlouhou oblast s vysokou vazebnou nerovnováhou. Transkripcí této oblasti vzniká rozsáhlá nekódující RNA nazývaná ANRIL (antisense noncoding RNA in the INK4 locus, OMIM přístupový kód: 613149), která by se mohla mít podíl na vzniku aterosklerózy skrz regulační funkci na *CDKN2A-2B* genech (Visel et al., 2010). Gen je exprimován ve všech zkoumaných tkáních lidského těla, nejvíce ve vaječnících dospělých žen, srdci, průdušnici, plicích a slezině. Hladiny exprese ANRIL a *CDKN2A* byli v každé tkáni velmi podobné, což by mohlo naznačovat, že tyto dva geny jsou regulovány společným promotorem (Pasmant et al., 2007).

Studie provedená na české populaci mužů potvrdila, že se jedná o polymorfismus nejvíce spjatý s rizikem infarktu myokardu. Riziková alela je v populaci běžná a každá další kopie alely zvyšuje pravděpodobnost rozvinutí ICHS (Samani et al., 2007; Hubáček et al., 2016). Nosiči alespoň jedné alely G mají 1,51x vyšší riziko infarktu myokardu než AA homozygoti (95% CI, 1.19 - 1.84, p = 0.00001) (Hubáček et al., 2016). Výzkum, který provedl McPherson et al. (2007) též dokázal souvislost ve variantách tohoto polymorfismu a rozvinutím aterosklerózy, která je nejčastější příčinou ICHS.

2 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

2.1 Cíle práce

1) Izolovat vzorky DNA z dostupných srdečních tkání ex- a implantovaných srdcí.
2) Stanovit genotypy 4 vybraných polymorfismů u příjemců a dárců srdce.
3) Zjistit, zda rozložení genotypů nevybočuje z Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HWE).
4) Porovnat frekvence genotypů:
    - pacientů indikovaných k TS z důvodu ICHS s kontrolním souborem
    - pacientů indikovaných k TS z důvodu DKMP s kontrolním souborem
    - pacientů s KNSŠ s kontrolním souborem
5) U pacientů, kteří po TS zemřeli na KVO porovnat frekvence genotypů:
    - příjemců s frekvencemi genotypů kontrolní skupiny
    - dárcovských štěpů s frekvencemi genotypů kontrolní skupiny

2.2 Hypotézy

1) Frekvence genotypů se budou lišit mezi skupinou příjemců, dárců a kontrolním souborem.

2) Frekvence genotypů se budou lišit mezi pacienty s ICHS / DKMP a kontrolním souborem.

3) U pacientů s KNSŠ se budou častěji vyskytovat rizikové genotypy.

4) Ve skupině pacientů, kteří zemřeli po TS v důsledku KVO, bude vyšší výskyt rizikových genotypů analyzovaných polymorfismů.

3 MATERIÁL

Praktická část byla provedena v Laboratoři pro výzkum aterosklerózy Centra experimentální medicíny v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze.

Pro výzkum byly jako biologický materiál převážně použity vzorky aort odebrané za sterilních podmínek dárcům a příjemcům srdce během operačního výkonu. V 15 případech byla jako biologický materiál použita periferní žilní krev příjemců, která byla odebrána do zkumavek s protisrážlivým činidlem EDTA.

Všechny vzorky zahrnuté do studie byly poskytnuty s informovaným souhlasem příjemce / dárce nebo jejich zákonných zástupců s účastí na výzkumném projektu.

Protokol studie byl v souladu s Helsinskou deklarací a byl projednán a schválen etickou komisí.

3.1 Sledovaný soubor

Analyzovaný soubor tvořilo 364 příjemců a 364 dárců srdce, kteří byli operování v pražském IKEM v letech 2005 - 2015.

- Příjemci
  - průměrný věk: 51 let (18 - 74 let)
  - muži: 79,8%
  - ženy: 20,2%
- Dárci
  - průměrný věk: 38 let (16 - 68 let)
  - muži: 76,6%
  - ženy: 23,4%

Indikace k transplantaci srdce se mírně lišily v různých věkových skupinách pacientů. Nicméně k nejčastějším indikacím dle očekávání patřily dilatační kardiomyopatie ischemická choroba srdeční (viz *Tabulka 4*).

Tabulka 4: Příčiny selhání srdce u pacientů indikovaných k TS podle věkových skupin a celkově.

Diagnóza	18 - 39 let (N = 66)	40 - 59 let (N = 210)	60 - 69 let (N = 87)	70 a více let (N = 1)	celkem (N = 364)
kardiomyopatie (z toho DKMP)	51 (40)	86 (81)	38 (33)	-	175 (154)
ischemická choroba srdeční	3	101	43	1	148
vrozené vývojové vady srdce	8	8	-	-	16
chlopenní vady	1	2	4	-	7
retransplantace	1	2	-	-	3
ostatní	2	11	2	-	15

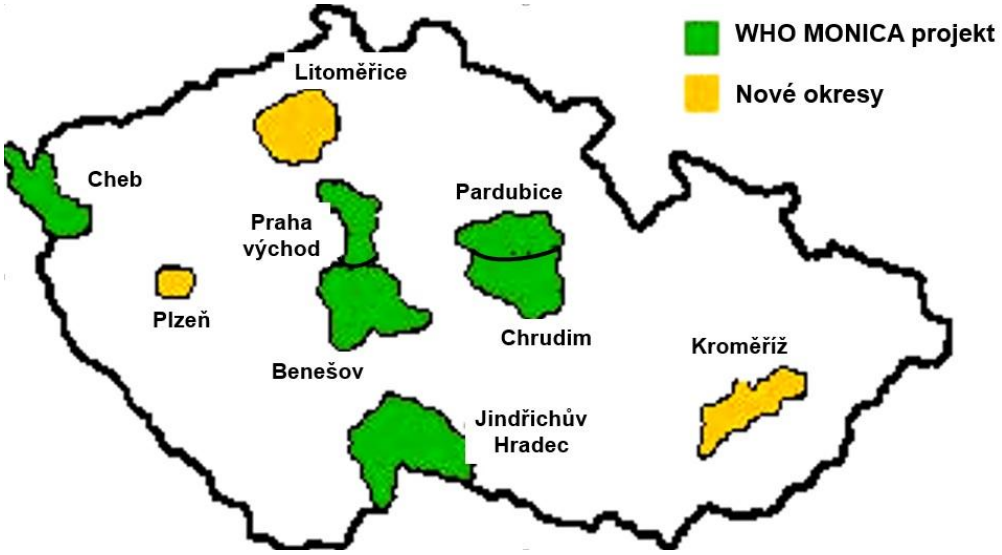
Od roku 2005, kdy jsou odebírány vzorky DNA od příjemců a dárců srdce v IKEM, zemřelo po transplantaci srdce celkem 64 pacientů. Z toho u 30 pacientů byla příčina smrti kardiovaskulární a u 36 nekardiovaskulární (další podrobnosti viz *Tabulka 5*). Pacienti s kardiovaskulární příčinou smrti průměrně přežívali 16 měsíců. Pacienti s nekardiovaskulární příčinou smrti průměrně přežívali 25 měsíců. Co se týče průměrného věku úmrtí, byl u pacientů s kardiovaskulární příčinou smrti stejný jako u pacientů s nekardiovaskulární příčinou smrti a to 51 let.

Tabulka 5: Příčiny smrti u pacientů po transplantaci srdce.

Kardiovaskulární příčina smrti (N = 30) † **25 - 66 let**	infarkt myokardu	1
	krvácení do mozku	2
	krvácení	1
	náhlá smrt	8
	plicní embolie	4
	ruptura aorty	2
	selhání štěpu	12
Nekardiovaskulární příčina smrti (N = 36) † **18 - 68 let**	sepse	8
	multiorgánové selhání	9
	malignita	6
	ostatní	6
	neznámá	7

Jako kontrolní soubor byly použity vzorky DNA ze studie MONICA (Multinational MONItoring of trends and determinants in CArdiovascular diseases). Jedná se o projekt světové zdravotnické organizace (WHO), který sleduje dlouhodobé trendy ve vývoji tradičních rizikových faktorů KVO. V souboru bylo zahrnuto 1191 mužů a 1368 žen bělošské populace ve věku 25 - 65 let z 9 okresů České republiky (viz *Obrázek 4*). Tento vzorek představuje reprezentativní vzorek 1% české populace (Cífková et al., 2010). Jelikož se jedná o náhodně vybrané osoby, jsou v tomto souboru zahrnuti pacienti s KVO i lidé, kteří tímto onemocněním netrpí.

Výsledky genetických analýz tohoto souboru byly získány z předešlých studií přímo nesouvisejících s touto prací.



Obrázek 4: Znázornění 9 okresů České republiky, odkud pocházejí lidé zahrnutí v projektu MONICA (převzato z internetový odkaz 2).

3.2 Použité chemikálie a přístroje

3.2.1 Chemikálie

3.2.1.1 Izolace DNA

- destilovaná voda (dH_2O)
- 1 M Tris-HCl - 24,23 g Tris (Sigma-Aldrich, USA)
  - doplněno do 200 ml dH_2O
  - pH upraveno pomocí 1 M HCl na 7,6
- 1 M KCl - 7,46 g KCl (Lach-Ner s.r.o., ČR)
  - doplněno do 100 ml dH_2O
- 1 M $MgCl_2$ - 20,33 g $MgCl_2$ (Lach-Ner s.r.o., ČR)
  - doplněno do 100 ml dH_2O
- 0,5 M EDTA - 37,22 g EDTA (Sigma-Aldrich, USA)
  - doplněno do 200 ml destilovanou vodou
  - pH upraveno pomocí 1 M NaOH na 8,2
- TKM 1 - 10 ml 1 M Tris-HCl
  - 10 ml 1 M KCl
  - 10 ml 1 M $MgCl_2$
  - 4 ml 0,5 M EDTA
  - doplněno do 1 000 ml dH_2O

- IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich, USA)
- fyziologický roztok - 9 g NaCl (Lach-Ner s.r.o., ČR)
  - doplněno do 1 000 ml dH_2O
- 5% SDS - 5g lauryl sulfát (Sigma-Aldrich, USA)
  - doplněno do 100 ml dH_2O
- 1 M NaCl - 5,844 NaCl
  - doplněno do 100 ml dH_2O
- FASANO A - 10 ml 0,5 M EDTA
  - 10 ml 1 M Tris-HCl
  - 10 ml 5 M NaCl
  - doplněno do 225 ml dH_2O + 25 ml 5% SDS
- proteináza K - >600 U/ml ~ 20 mg/ml (Thermo Fisher Scientific, USA)
- nasycený roztok NaCl
- isopropanol (Ing. Petr Šved - PENTA s.r.o., ČR)
- 70% etanol (Ing. Petr Šved - PENTA s.r.o., ČR)
- 100% etanol (Ing. Petr Šved - PENTA s.r.o., ČR)
- TE pufr - 5 ml 1 M Tris-HCl
  - 1 ml 0,5 M EDTA
  - doplněno do 500 ml dH_2O

3.2.1.2 Odhad míry degradace a kvality DNA

1) Roztoky pro přípravu agarózového gelu:

- 10x koncentrovaný TBE pufr - 27,5 g H_3BO_3 (Sigma-Aldrich, USA)
  - 54 g Tris
  - 20 ml 0,5 M EDTA
  - doplněno do 500 ml dH_2O
- 0,5x koncentrovaný TBE pufr - 50 ml 10x koncentrovaný TBE pufr
  - 950 ml dH_2O
- agaróza (Sigma-Aldrich, USA)
- 0,5% ethidium bromid - 0,125 g ethidium bromid (Sigma-Aldrich, USA)
  - 25 ml dH_2O

2) Elektroforéza

- 0,5x koncentrovaný TBE pufr
- Low 100 bp ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)
- nanášecí barva - 0,01 g Orange II (Sigma-Aldrich, USA)
  - 10 µl 0,5 M EDTA
  - 40 ml glycerolu
  - doplněno do 50 ml dH_2O

3.2.1.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

- PCR H_2O
- 10x koncentrovaný DreamTaq pufr (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 25 mM $MgCl_2$ (Thermo Fisher Scientific, USA)
- dNTP mix (Thermo Fisher Scientific, USA)
- primery (East Port Scientific, ČR)
- DreamTaq DNA polymeráza - 5 U/µl (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.2.1.4 Štěpení produktů

1) Roztoky pro přípravu polyakrilamidového gelu:

- dH_2O
- 10x koncentrovaný TBE pufr
- Acrylamide 4K - Solution (30%) (Applichem GmbH, DE)
- TEMED - N,N,N´,N´- Tetramethylethylendiamine (Sigma-Aldrich, USA)
- APS - 4 g 10% amonium persulfát (Sigma-Aldrich, USA)
  - doplněno do 40ml dH_2O
- silan - 99 ml 100% etanol
  - 0,5 ml 99,5% CH_3COOH (Sigma-Aldrich, USA)
  - 0,5 ml methacryloxypropyltrimethoxysilane (Sigma-Aldrich, USA)

2) Elektroforéza

- 0,5x koncentrovaný TBE pufr
- 0,5% ethidium bromid
- nanášecí barva

3) Restrikční štěpení

- PCR H_2O
- pufry - 10x Buffer Tango^{Tm} (with BSA)
  - 10x Buffer G (with BSA) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- enzymy - CaiI (AlwNI) - 10 U/µl
  - Bsp1407I (BsrGI) - 10 U/µl
  - SspI - 10 U/µl
  - Alw26I (BsmAI) - 10 U/µl (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.2.1.5 Real-time PCR

- PCR H_2O
- 40x koncentrovaná TaqMan® Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific, USA)
  - ID: C__34511515_10
- TaqMan® Genotyping Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)
- TE pufr

3.2.2 Přístroje

- Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., USA
- centrifuga Hermle Z300K, Německo
- termocykler DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler, BIO-RAD
- Nanodrop 2000SW, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA
- Electronic Regulite Transiluminator, ULTRA LUM, Inc., USA
  + tiskárna Sony Video Graphic Printer UP-895 MD
- blokový termostat Grant QBA2, UK
- 7300 Real Time PCR System, Thermo Fisher Scientific, USA

4 METODIKA

Během transplantace srdce byl lékaři odebrán vzorek aorty (případně periferní krve) dárci i příjemci. V Laboratoři pro výzkum aterosklerózy jsme následně prováděli izolaci DNA ze vzorků. Dále jsme genotypyzovali DNA dárců a příjemců ve 4 následujících SNPs: rs17817449, rs2943634, rs6922269 a rs10757274 pomocí metody PCR-RFLP. U polymorfismu rs17817449 jsme u vybraných vzorků použili pro analýzu metodu Real-time PCR. Poslední součástí výzkumu bylo statistické zpracování získaných dat a jejich následná interpretace.

4.1 Molekulárně genetická analýza

4.1.1 Izolace DNA

DNA se z tkání izoluje pomocí fyzikálních a chemických metod. Za zlatý standard je považována fenol-chloroformová metoda izolace DNA, kde se využívá rozdílné rozpustnosti v roztocích. Další základní technikou izolace je vysolovací metoda založená na precipitaci proteinů pomocí NaCl.

V obou případech se dojde nejprve pomocí detergentů k rozrušení buněčné membrány a poté se DNA očišťuje během několika kroků od RNA, bílkovin a dalších nečistot, které by mohly při dalších analýzách interferovat. Nakonec se DNA precipituje etanolem a rozpouští se ve vodě či pufru.

V našich analýzách jsme vycházeli z protokolu Millera et al., 1988.

4.1.1.1 Izolace DNA z krve

Pacientům bylo odebíráno 5 ml krve do zkumavky s antikoagulačním činidlem EDTA. K plné krvi jsme přidali 5 ml TKM 1 a 50 µl IGEPAL, důkladně jsme promíchali a 20 min centrifugovali při 3500 otáčkách za minutu (rpm) v chlazené centrifuze. Následně jsme slili supernatant a peletu, která zůstala na dně, jsme 3x opakovaně resuzpendovali a centrifugovali v 5 ml TKM 1. Čistou peletu jsme smíchali s 0,5 ml fyziologického roztoku + 3 ml FASANA A + 25 µl proteinázy K. Směs jsme inkubovali 48 hodin při 37°C.

Po uplynutí této doby jsme přidali 1,5 ml nasyceného roztoku NaCl, protřepali a na 30 min uložili do lednice. Poté jsme vzorek 20 min centrifugovali při 3500 rpm v chlazené centrifuze. Přelili jsme obsah do čisté zkumavky a pomocí 3 ml isopropanolu jsme vyprecipitovali DNA. Vlákna DNA jsme přenesli do kepu s 0,5 ml 70% etanolu, stočili a

slili supernatant. Stejný postup jsme opakovali s 0,5 ml 100% etanolu, Na závěr jsme nechali odpařit zbytek 100% etanolu a rozpustili DNA v 300 µl TE pufru.

4.1.1.2 Izolace DNA z aort

Vzorky aort odebrané každému dárci a příjemci během transplantace byly uchovávány v mrazícím boxu při -20°C. Pro izolaci DNA byly vyjmuty a ponechány při pokojové teplotě. Pomocí skalpelu jsme odřízli vzorek o hmotnosti přibližně 100 mg a ve zkumavce jej smísili se 2 ml roztoku FASANA A a 200 µl proteinázy K. Důkladně jsme vše promíchali na vortexu a ponechali přes noc v termobloku při 56°C. Při této teplotě pracuje proteináza K nejúčinněji.

Druhý den jsme zkontrolovali stupeň rozpuštění tkáně v roztoku. Pokud byla tkáň dostatečně dispergovaná, pokračovali jsme dalším izolačním krokem. Nicméně ve většině případů bylo třeba ke vzorku přidat dalších 200 µl proteinázy K a ponechat při stejné teplotě v termobloku do dalšího dne.

Další izolační krok sestával v přidání 1 ml nasyceného roztoku NaCl, důkladném promíchání a uložení minimálně na 30 minut do chladničky. Poté jsme zkumavky centrifugovali při 5 000 rpm po dobu 20 min v chlazené centrifuze. Obsah zkumavky jsme následně přelili do čisté 10 ml zkumavky a přidali jsme 2 ml vychlazeného isopropanolu, čímž došlo k precipitaci DNA. Pokud nebyla ve zkumavce zřetelně viditelná DNA, bylo nutné stočení celého obsahu zkumavky do jedné mikrozkumavky, tedy nalití části obsahu zkumavky do mikrozkumavky, stočení 5 min na maximální otáčky, supernatant vylít, přidat další část roztoku a takto pokračovat do stočení celého objemu. Pokud byla vlákna DNA viditelná, přenesli jsme je do kepu s 0,5 ml 70% etanolu. V případě opakovaného stáčení vzorku jsme přidali do mikrozkumavky s DNA 0,5 ml 70% etanolu. Promýváním v 70% etanolu dojde k rozpuštění zbytků solí a bílkovin, přičemž DNA zůstává neporušena. DNA jsme v posledním kroku promyli ve 100% alkoholu a rozpustili v 200 µl TE pufru.

4.1.2 Měření koncentrace a kvality DNA

Koncentrace a kvalita izolované DNA se měří spektrofotometricky na nanodropu. Přístroj měří absorbanci ve třech vlnových délkách - 230, 260 a 280 nm. DNA absorbuje nejvíce záření o délce 260 nm, bílkoviny 280 nm a RNA 230 nm. Požadovaná koncentrace DNA ve vzorku měla být minimálně 100 ng/ µl. Ideální čistota DNA, tedy poměr absorbance DNA ku absorbanci bílkovin (A_{260}/A_{280}) by měl být v rozmezí 1,8 - 2.

Dále jsme pomocí elektroforézy analyzovali, zda není DNA degradovaná. Elektroforéza umožňuje působením elektrického proudu separaci nukleových kyselin na základě velikosti fragmentů. Nukleové kyseliny s kratším řetězcem putují v médiu (agarový či polyakrylamidový gel) rychleji než nukleové kyseliny s delším řetězcem.

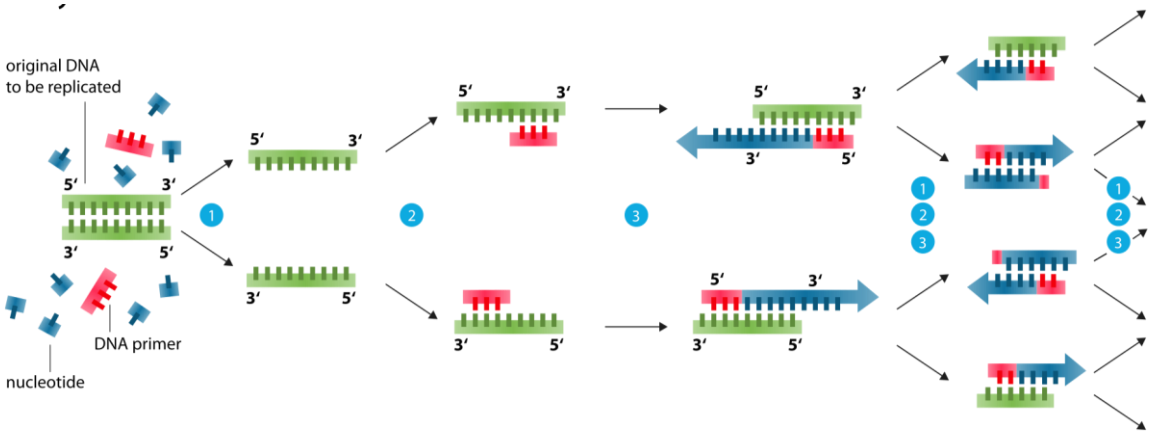
Elektroforézu jsme prováděli na 0,8% agarovém gelu, který jsme připravili rozpuštěním 0,8 g agarózy ve 100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru. Roztok jsme ohřívali cca 7 min v mikrovlnné troubě a po jejím rozpuštění jsme přidali 20 µl roztoku 0,5% ethidium bromidu. Takto připravenou směs jsme nalili do připravené formy, pomocí hřebínků vytvořili jamky a nechali gel ztuhnout. Po ztuhnutí a vložení gelu do elektroforetické vany s 0,5x koncentrovaným TBE pufrem jsme do první jamky nanesli hmotnostní marker Low 100 bp ladder. Do dalších jamek jsme nanášeli směs 5 µl vzorku DNA se 2,4 µl barvy. Po dobu 1 hodiny jsme nechali působit elektrický proud o napětí 70 V.

4.1.3 Genotypizace

Genotyp polymorfismů rs2943634, rs6922269 a rs10757274 byl stanoven pomocí PCR s následnou restrikční analýzou a genotyp u polymorfismu rs17817449 byl stanoven částečně též touto metodou a částečně metodou Real-time PCR.

4.1.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Tato metoda slouží k amplifikaci požadovaného úseku DNA. Reakce se skládá ze tří kroků, které se několikrát opakují: denaturace DNA, připojení primerů a syntéza nového řetězce. Každý z těchto kroků vyžaduje specifickou teplotu, a proto v průběhu reakce dochází k cyklickému střídání teplot. Syntéza požadovaného úseku je zajištěna postavením primerů proti sobě - jedním na 3´ → 5´řetězci a druhým na 5´ → 3´řetězci DNA polymeráza přidává volné deoxynukleotid trifosfáty (dNTP) na volné 3´ OH konce primerů a tím je syntetizován nový řetězec ve směru 5´ → 3´. Schéma průběhu reakce je zobrazeno na *Obrázku 5*.



Obrázek 5: Schéma průběhu polymerázové řetězové reakce. 1) denaturace při 95°C, 2) navázání primerů neboli annealing při cca 50-65 °C a 3) elongace při 72°C (převzato a upraveno z internetový odkaz 3).

Lyofilizované primery jsme rozpustili v PCR vodě nejprve na koncentraci 100 µM dle návodu. Inkubovali jsme při 37°C cca 15 min a promíchali na vortexu. Takto připravené primery jsme poté podle potřeby ředili na koncentraci 10 µM nebo 50 µM. Sekvence použitých primerů a jejich použité koncentrace jsou uvedeny v *Tabulce 6*.

Tabulka 6: Sekvence jednotlivých primerů a použité koncentrace.

SNP	forward / reverse primer	koncentrace
rs17817449	5′ GGT GAA GAG GAG GAG ATT GTG TAA CTG G 5′ GAA GCC CTG AGA AGT TTA GAG TAA ATT GGG	50 µM
rs2943634	5′ AAA GCA AGC ACA TCT GTG GCA TTA C 5′ TAC ACT TGA AAA TTG TAG TTG CTC C	10 µM
rs6922269	5′ TTT ACC ACT TCT CTC TGG ATA AGC C 5′ AAT GAT GTC TTT TTA AAG ATG AGT AAT A	10 µM
rs10757274	5′ TTG CTT GGT AGA TCT TCC TCC ATC CCT T 5′ TTC CCA GAT GCA CTG TAT TGT TTG CCT TAC	10 µM

V laminárním boxu jsme do sterilní zkumavky připravili Master Mix. V *Tabulce 7* je uveden přehled reagencií a jejich objemů použitých na přípravu Master Mixu na jednu reakci. Celkový objem Master Mixu a tím pádem i objem jednotlivých reagencií závisel na počtu reakcí. Standardně jsme připravovali Master Mix na 100 reakcí. Poměr jednotlivých reagencií se mírně lišil v závislosti na analyzovaném polymorfismu.

Tabulka 7: Přehled reagencií a jejich objemů v µl potřebných na jednu reakci pro jednotlivé SNPs.

reagencie	rs17817449	rs2943634	rs6922269	rs10757274
H_2O	18,45	17,4	17,45	17,45
pufr	2,5	2,5	2,5	2,5
$MgCl_2$	1,5	1,5	1,5	1,5
dNTP mix	0,5	0,5	0,5	0,5
5´ primer	0,5	1	1	1
3´ primer	0,5	1	1	1
DreamTaq DNA polymeráza	0,05	0,1	0,05	0,05

Připravený Master Mix jsme promíchali na vortexu a pomocí automatické pipety jsme rozpipetovali po 24 µl Master Mixu do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky určené pro PCR termocykler. Na závěr jsme přidali multikanálovou pipetou do jamek po 1 µl DNA. Do jamek na pozicích H11 a H12 jsme DNA nepřidávali, jelikož tyto jamky sloužily jako negativní kontrola. Před vložením do termocykleru jsme zakapali směs silikonovým olejem a přelepili fólií, aby nedošlo k vypaření vzorů během reakce. Na PCR termocykleru jsme nastavili schéma průběhu reakce (viz *Tabulka 8*).

Tabulka 8: Schéma PCR reakcí.

proces	teplota	čas	opakování
počáteční denaturace	96°C	3 min	1 x
denaturace	95°C	15 s	34x
annealing	**T**	30 s	
syntéza	72°C	30 s	

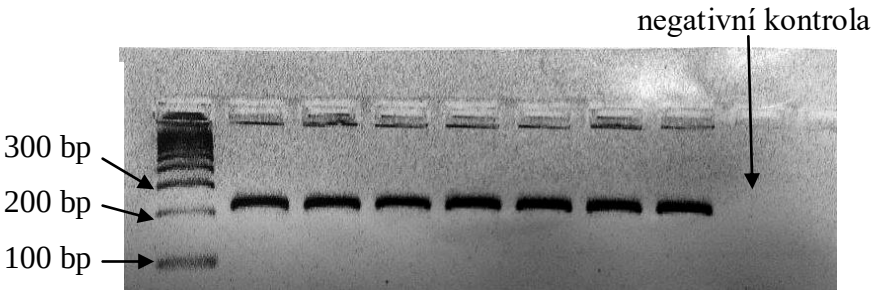
T	rs17817449	64,4 °C
	rs2943634	57,4 °C
	rs6922269	50 °C
	rs10757274	66 °C

Kontrola produktů

Úspěšnost amplifikace byla ověřena elektroforézou na agarovém gelu. Připravili jsme si 3% agarózový gel - rozpustili jsme 7,5 g agarózy v 250 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru, zahřívali v mikrovlnné troubě, poté přidali 20 µl 0,5% roztoku ethidium bromidu a promíchali. Takto připravenou směs jsme nalili do připravené formy, přidali hřebínek pro vytvoření jamek a nechali gel ztuhnout. Hotový agarózový gel jsme přenesli do elektroforetické vany s 0,5x koncentrovaným TBE pufrem.

Pro kontrolu jsme si vždy vybrali vzorky z 12. sloupce mikrotitrační destičky, v němž se na poslední pozici (H12) nacházela i negativní kontrola. Mohli jsme tedy zároveň ověřit, zda nedošlo ke kontaminaci Master Mixu DNA. Smísili jsme 7 µl vzorku s 2,4 µl barvy a

nanášeli postupně na gel. Nechali jsme působit elektrický proud o napětí 130 V po dobu 20 minut a výsledky jsme odečítali na UV transiluminátoru (viz *Obrázek 6*).



Obrázek 6: Kontrola produktů PCR, polymorfismus rs10757274, délka produktu 225 bp.

Štěpení produktů

Produkty PCR jsou v analýze RFLP dále vystaveny působení restrikčních endonukleáz. Jedná se o enzymy produkované bakteriemi, které štěpí fosfodiesterové vazby v řetězci DNA. Pro rozlišení homozygotů pro jednotlivé alely a heterozygotů se využívá toho, že přítomnost určitého nukleotidu v řetězci vytváří štěpící místo a přítomnost jiného ho naopak ruší. Informace o restrikčním štěpení jsou uvedeny v *Tabulce 9*.

Tabulka 9: Restrikční štěpení produktů PCR.

	rs17817449	**rs2943634**	**rs6922269**	**rs10757274**
enzym	CaiI (AlwNI)	Bsp1407I (BsrGI)	SspI	Alw26I (BsmAI)
pufr	Tango	Tango	G	Tango
štěpená sekvence	5′…CAGNNN↓CTG…3′ 3′…GTC↓NNNGAC…5′	5′…T↓GTACA…3′ 3′…ACATG↓T…5′	5′…AAT↓ATT…3′ 3′…TTA↓TAA…5′	5′…GTCTC$(N)_1$↓…3′ 3′…CAGAG$(N)_5$…5′
nukleotid vytvářející štěpící místo	T	A	A	A
/ rušící štěpící místo	G	C	G	G
neštěpený PCR produkt (bp)	198	150	149	225
štěpené PCR produkty (bp)	99 + 99	26 + 124	121 + 28	125 + 100

Pro odlišení štěpených a neštěpených produktů jsme využívali elektroforézy na 10% polyakrylamidovém gelu. Gel byl připraven z následujících reagencií:

- 41,5 ml destilované vody
- 3,5 ml 10x koncentrovaný TBE pufr
- 20 ml Acrylamide 4K
- 65 µl TEMED
- 390 µl APS

Směs jsme nalili do formy pro přípravu polyakrylamidového gelu, překryli hladinu sklem, které bylo potažené silanem, a nechali gel cca 40 min tuhnout.
Připravili jsme si reakční směs, která se skládala z PCR vody, pufru a enzymu. Poměry jednotlivých reagencií se pro jednotlivé polymorfismy mírně lišily (viz *Tabulka 10*).

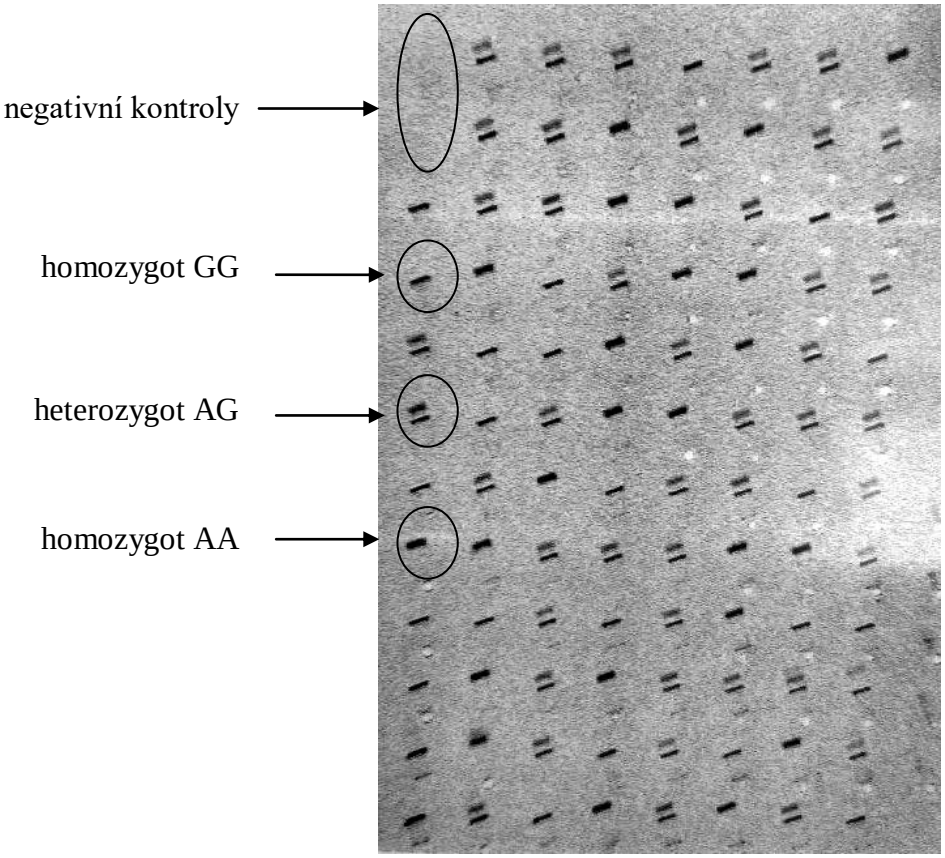
Tabulka 10: Přehled reagencií a jejich objemů v µl potřebných na jednu restrikční reakci.

reagencie	**rs17817449**	**rs2943634**	**rs6922269**	**rs10757274**
PCR H_2O	8,9	7,9	7,9	7,7
pufr	1	2	2	2
enzym	0,1	0,1	0,1	0,3

V mikrotitrační destičce jsme smísili pokaždé 10 µl vzorku PCR produktů s 10 µl reakční směsi a přes noc inkubovali v termostatu při teplotě 37°C.
Další den jsme připravený polyakrylamidový gel přenesli nejdříve do nádoby s 0,5x koncentrovaným TBE a 0,5% ethidium bromidem a po 5 min do elektroforetické vany s 0,5x koncentrovaným TBE pufrem. Smíchali jsme 7 µl vzorku s 2,4 µl barvy a nanesli na polyakrylamidový gel. Nechali jsme působit elektrický proud o napětí 130 V po různou dobu. Čas nutný pro separaci štěpených a neštěpených produktů se lišil v závislosti na jejich délce.

- rs17817449 - 50 min
- rs2943634 - 90 min
- rs6922269 - 70 min
- rs10757274 - 50 min

Výsledky jsme odečítali na UV transiluminátoru (viz *Obrázek 7*).



Obrázek 7: Genotypizace polymorfismu rs10757274. Výsledek elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Homozygot AA je detekován přítomností fragmentu o délce 100 bp a 125 bp (během průběhu elektroforézy nestihne dojít k úplnému oddělení těchto dvou fragmentů a jeví se jako jeden proužek), heterozygot AG je charakterizován přítomností fragmentů o délce 225 bp, 125 bp a 100 bp a homozygot GG je charakterizován přítomností fragmentu o délce 225 bp. Na pozicích H11 a H12 se nacházejí negativní kontroly.

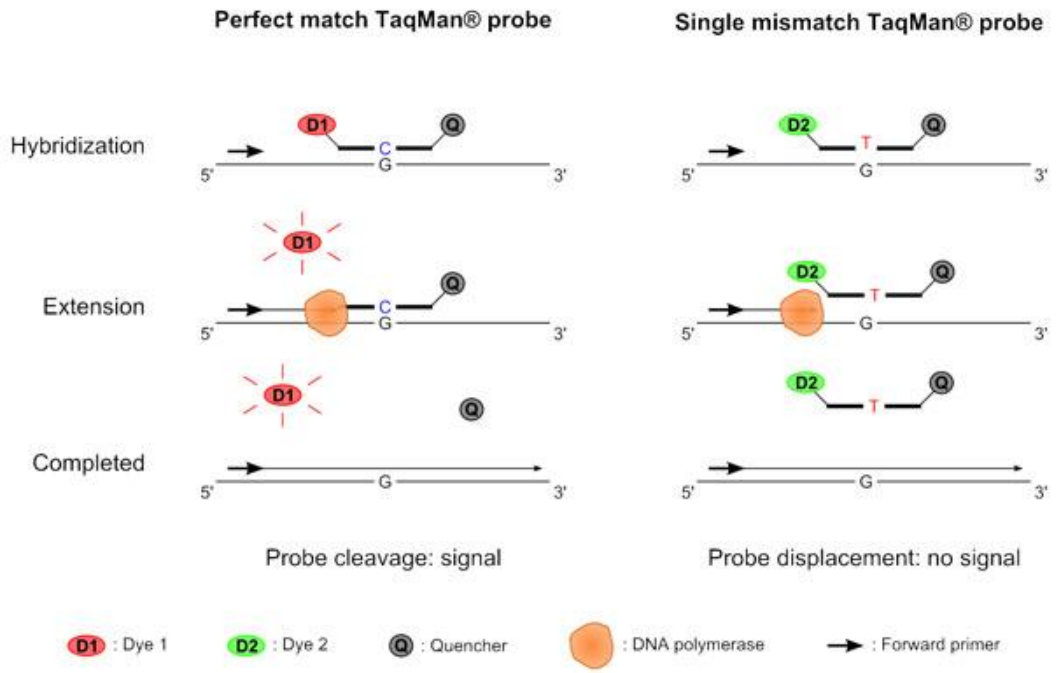
4.1.3.2 Real-time PCR

Jedná se o jednu z variant PCR umožňující zároveň amplifikaci, detekci a kvantifikaci produktu. Princip namnožení požadovaného úseku DNA je stejný jako u klasické PCR. Termocyklery jsou však navíc vybaveny zdrojem a detektorem fluorescenčního záření. Po každém cyklu je měřena fluorescence a na základě její intenzity je určováno množství vzniklých řetězců nukleových kyselin. Není tedy třeba elektroforézy.

Existuje více možností, jak lze detekovat fluorescenci. V našich experimentech jsme využívali TaqMan sondy, které jsou navrženy tak, aby se na základě komplementarity vázaly na úsek DNA mezi forward a reverse primery. Na 5´konci nesou sondy reportérový fluorofor (reporter, R) a na 3´konci molekulu zhášeče (quencher, Q), což je barvivo, které zabraňuje emisi fluorescence z fluoroforu na 5´ konci. Pokud jsou tyto dvě molekuly v blízkosti - jsou obě na molekule oligonukleotidu sondy, k fluorescenci nedochází. Taq

polymeráza s 5´exonukleázovou aktivitou během syntézy rozloží sondu komplementárně navázanou na DNA a tím se separuje molekula fluorochromu od zhášeče, přičemž následně dochází k emisi fluorescence. Pokud je vybraný úsek amplifikován, dochází během jednotlivých cyklů k postupnému zvyšování fluorescenčního záření.

K alelické diskriminaci se využívá dvou TaqMan sond. Každá z nich je specifická pro alelu zkoumaného polymorfismu a jsou od sebe odlišeny fluorescenční barvou reporteru (zpravidla VIC a FAM). Pokud je detekováno záření pouze jedné barvy, je jedinec homozygot pro danou alelu. Pokud je detekováno záření obou barev, jedná se o heterozygota pro daný SNP (viz *Obrázek 8*).



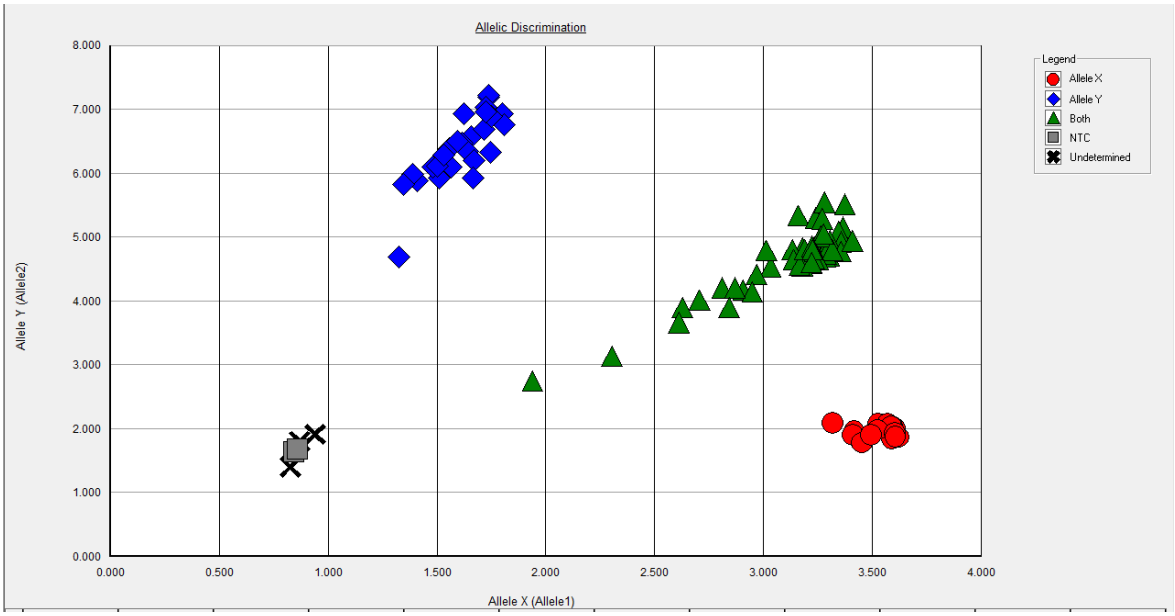
Obrázek 8: Princip alelické diskriminace u Real-time PCR (převzato z internetový odkaz 4)

Genotypizace byla provedena pomocí komerčně dostupné TaqMan Genotyping Assay od firmy Thermo Fisher Scientific. Assay, která je dodávána o koncentraci 40x jsme naředili na pracovní koncentraci 20x - smíchali jsme 25 µl 40x koncentrované assay s 25µl TE pufru. Připravili jsme si reakční směs (viz *Tabulka 11*). Objem závisel na počtu reakcí, přičemž jsme zpravidla připravovali směs na 100 reakcí.

Tabulka 11: Přehled reagencií a jejich objemů v µl na přípravu reakční směsi pro Real-time PCR

	1 reakce	100 reakcí
TaqMan® Genotyping Master Mix	5	500
20x koncentrovaná TaqMan® Genotyping assay	0,5	50
PCR H_2O	3,5	350
DNA	1	
Celkem	10	

Směs jsme převracením promíchali a stočili na stolní centrifuze. Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky MicroAmp určené pro Real-time PCR jsme napipetovali nejdříve po 9 µl reakční směsi a poté multikanálovou pipetou přidávali po 1µl vzorky DNA. Destičku jsme překryli speciální fólií, vložili do centrifugy a stočili. Tímto byly vzorky připraveny k analýze. Pracovali jsme v programu 7300 System SDS software a výsledek byl v konečné fázi zobrazen pomocí bodového diagramu (viz *Obrázek 9*).



Obrázek 9: Bodový diagram zobrazující výsledek genotypizace rs17817449 metodou Real-time PCR. Modré kosočtverce představují vzorky AA homozygotů, zelené trojúhelníky AG heterozygoty, červená kolečka GG homozygoty, šedé čtverce negativní kontroly a černé křížky vzorky, u nichž nebyl genotyp určen.

4.2 Statistické vyhodnocení

4.2.1 Hardy-Weinbergova rovnováha

Hardy-Weinbergova rovnováha určuje frekvence genotypů a alel v ideální, tzv. panmiktické populaci. V takové populaci dochází k náhodnému křížení, je nekonečně velká a na genofond nepůsobí vlivy jako mutace, selekce, migrace a genetický drift. Pro frekvenci alel platí $p + q = 1$ a z toho se odvíjí vztah pro frekvenci genotypů $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Ideální populace je ovšem pouze model a ve skutečnosti frekvence genotypů neodpovídají zcela přesně vzorci. Na základě χ^2 testu se porovnávají frekvence genotypů ve zvolené skupině osob s teoretickými frekvencemi genotypů v ideální populaci. Výrazná odchylka od HWE může značit metodický problém se stanovováním genotypu.

4.2.2 Studium asociace pomocí Pearsonova χ^2 testu

Pearsonův χ^2 test je základním testem nezávislosti v kontingenční tabulce. Nulovou hypotézou je, že pravděpodobnost nastání určité varianty jedné náhodné veličiny neovlivňuje nastání určité varianty druhé náhodné veličiny a tudíž že dvě náhodné veličiny jsou nezávislé.

Test je používán pro detekci rozdílů v distribuci genotypů u dvou různých skupin. Za statisticky významný rozdíl mezi dvěma porovnávanými skupinami byla stanovena hladina významnosti $p \leq 0,05$.

4.2.3 Odds ratio (OR)

Odds ratio neboli poměr šancí je statistická metoda používaná v tzv. case-control studiích a vyjadřuje poměr šance výskytu daného znaku v jedné skupině oproti druhé. V případě genotypů se volí vždy jeden genotyp - např. TT, u kterého se uvede relativní riziko onemocnění rovno 1. Do čtyřpolní tabulky se poté vkládají počty pacientů a kontrol podle genotypů. Vzhledem k tomu, že do tabulky lze zadat jen dvě možné skupiny, volí se u pacientů i kontrol mezi třemi možnými modely a vyhodnocuje se míra relativního rizika v porovnání se zvoleným „nerizikovým“ genotypem. Tyto modely lze aplikovat i při použití Pearsonova χ^2 testu.

- **kodominantní model**
  - nejobecnější, umožňuje určit míru relativního rizika samostatně pro každý genotyp - poskytuje dvě OR

- homozygoti pro jednu alelu (př. TT) vs heterozygoti (př. GT)
- homozygoti pro jednu alelu (TT) vs homozygoti pro druhou alelu (GG)
- u Pearsonova χ^2 testu lze tento model použít buď výše uvedeným způsobem, nebo při korelaci všech možných genotypů (GG vs GT vs TT)

- **dominantní model**

  - homozygoti pro jednu alelu (TT) + heterozygoti (GT) vs homozygoti pro druhou alelu (GG)
  - jediná kopie alely je dostačující ke změně míry relativního rizika

- **recesivní model**

  - homozygoti pro jednu alelu (GG) vs homozygoti pro druhou alelu (TT) + heterozygoti (GT)
  - ke změně míry relativního rizika jsou třeba dvě kopie alely

OR = 1 - šance, že se jev vyskytne u osob s genotypem TT je **stejná** jako šance, že se jev vyskytne u osob s genotypem GG

OR > 1 - šance, že se jev vyskytne u osob s genotypem GG je **větší** než šance, že se jev vyskytne u osob s genotypem TT

OR < 1 - šance, že se jev vyskytne u osob s genotypem GG je **menší** než šance, že se jev vyskytne u osob s genotypem TT

Výsledek OR je udáván v intervalu spolehlivosti (confidence interval, CI). Tento interval slouží k posouzení statistické významnosti OR pro zvolenou hladinu významnosti (tzn., pro 5% hladinu významnosti se používá 95% CI). Pro interval spolehlivosti je důležité, zda je v něm zahrnuto číslo 1.00. Pokud není, je výsledek statisticky významný.

Internetové odkazy na programy pro statistickou analýzu:

HWE:	http://www.had2know.com/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-2-alleles.html
Pearsonův χ^2 test:	http://vassarstats.net/tab2x2.html http://www.physics.csbsju.edu/cgi-bin/stats/contingency_form.sh?nrow=2&ncolumn=3
Odds ratio:	http://www.hutchon.net/ConfidOR.htm

5 VÝSLEDKY

V diplomové práci jsme analyzovali čtyři SNPs u 364 pacientů po transplantaci srdce a 364 dárců srdce. Jako kontrolu jsme použili 2559 vzorků osob zahrnutých ve studii MONICA. Metodou PCR-RFLP jsme genotypizovali následující polymorfismy: rs2943634 (2q36.3; intergenová oblast), rs6922269 (6q25.1; gen *MTHFD1L*), a rs10757274 (9p21.3; intergenová oblast). U polymorfismus rs17817449 (16q12.2; gen *FTO*) jsme zhruba polovinu vzorků genotypizovali metodou PCR-RFLP a zbylou část vzorů metodou Real-time PCR. Úspěšnost genotypizace je uvedena pro jednotlivé polymorfismy a soubory pacientů v *Tabulce 12*. Polymorfismy jsme vybrali na základě několika celogenomových asociačních studií, kde vykazovaly souvislost s kardiovaskulárními onemocněními.

Tabulka 12: Úspěšnost genotypizace.

	příjemci (N=364)	**dárci (N = 364)**	**kontroly (N = 2559)**
rs17817449	98,6%	97,0%	96,4%
rs2943634	98,6%	97,3%	97,9%
rs6922269	98,9%	99,7%	98,0%
rs10757274	99,5%	100%	98,4%

5.1 Frekvence genotypů a alel analyzovaných polymorfismů

Genotypové a alelické frekvence u jednotlivých polymorfismů byly hodnoceny zvlášť u souboru příjemců, dárců a kontrol.

1) Polymorfismus rs17817449

Frekvence genotypů a alel v jednotlivých souborech shrnuje *Tabulka 13*. Rozložení genotypů a alel v české populaci je podobné rozložení v ostatních bělošských populacích (viz *internetový odkaz 5*) a nevybočuje z HWE (P = 0,523 pro skupinu příjemců, P = 0,694 pro skupinu dárců, P = 0,375 pro kontrolní skupinu).

Rozdíly mezi frekvencemi alel v jednotlivých souborech nebyly statisticky významné.

- OR frekvence alel příjemci vs dárci = 0.92 (0.74 - 1.13)
- OR frekvence alel příjemci vs kontroly = 1.03 (0.88 - 1.21)
- OR frekvence alel dárci vs kontroly = 1.12 (0.96 - 1.32)

Tabulka 13: Frekvence alel a genotypů polymorfismu rs17817449. U genotypů jsou vždy u jednotlivých skupin uvedeny nejdříve naměřené frekvence genotypů (černě). Z těchto údajů byly následně vypočteny frekvence alel a hypotetické frekvence genotypů (modře).

	Genotypy						**Alely**			
	GG		**GT**		**TT**		**G**		**T**	
	N	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
Příjemci (N = 353)	59	16.4	190	52.9	110	30.6	308	42.9	410	57.1
	66	18.4	176	49.0	117	32.6				
Dárci (N = 353)	73	20.7	171	48.4	109	30.9	317	44.9	389	55.1
	71	20.2	175	49.5	107	30.4				
Kontroly (N = 2467)	426	17.3	1224	49.6	817	33.1	2076	42.1	2858	57.9
	437	17.7	1203	48.7	828	33.6				

2) Polymorfismus rs2943634

Frekvence genotypů a alel v jednotlivých souborech shrnuje *Tabulka 14*. Rozložení genotypů a alel v české populaci je podobné rozložení v ostatních bělošských populacích (viz *internetový odkaz 6*) a nevybočuje z HWE (p = 0,291 pro skupinu příjemců, p = 0,229 pro skupinu dárců, p = 0,959 pro kontrolní skupinu).

Rozdíly mezi frekvencemi alel v jednotlivých souborech nebyly statisticky významné.

- OR frekvence alel příjemci vs dárci = 1.08 (0.86 - 1.34)
- OR frekvence alel příjemci vs kontroly = 0.86 (0.73 - 1.02)
- OR frekvence alel dárci vs kontroly = 1.12 (0.96 - 1.32)

Tabulka 14: Frekvence alel a genotypů polymorfismu rs2943634.

	Genotypy						**Alely**			
	AA		**AC**		**CC**		**A**		**C**	
	N	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
Příjemci (N = 359)	47	13.1	153	42.6	159	44.3	247	13.4	471	65.6
	42	11.8	162	45.1	155	43.0				
Dárci (N = 354)	43	12.1	146	41.2	165	46.6	232	32.8	476	67.2
	38	10.7	156	44.1	160	45.2				
Kontroly (N = 2504)	358	14.3	1176	47.0	970	38.7	1892	37.8	3116	62.2
	357	14.3	1177	47.0	969	38.7				

3) Polymorfismus rs6922269

Frekvence genotypů a alel v jednotlivých souborech shrnuje *Tabulka 15*. Rozložení genotypů a alel v české populaci je podobné rozložení v ostatních bělošských populacích (viz *internetový odkaz 7*) a nevybočuje z HWE (p = 0,377 pro skupinu příjemců, p = 0,307 pro skupinu dárců, p = 0,784 pro kontrolní skupinu).

Rozdíly mezi frekvencemi alel v jednotlivých souborech nebyly statisticky významné.

- OR frekvence alel příjemci vs dárci = 0.95 (0.76 - 1.197)
- OR frekvence alel příjemci vs kontroly = 1.04 (0.88 - 1.24)
- OR frekvence alel dárci vs kontroly = 1.10 (0.92 - 1.31)

Tabulka 15: frekvence alel a genotypů polymorfismu rs6922269.

	Genotypy						**Alely**			
	AA		**AG**		**GG**		**A**		**G**	
	N	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
Příjemci (N = 360)	30	8.3	136	37.8	194	53.9	196	27.2	524	72.8
	27	7.4	143	39.6	191	53.0				
Dárci (N = 363)	25	6.9	155	42.7	183	50.4	205	28.2	521	71.8
	29	8.0	147	40.5	187	51.5				
Kontroly (N = 2509)	172	6.9	980	39.1	1357	54.1	1324	26.4	3694	73.6
	175	7.0	975	38.9	1360	54.2				

4) Polymorfismus rs10757274

Frekvence genotypů a alel v jednotlivých souborech shrnuje *Tabulka 16*. Rozložení genotypů a alel v české populaci je podobné rozložení v ostatních bělošských populacích (viz *internetový odkaz 8*) nevybočuje z HWE (p = 0,980 pro skupinu příjemců, p = 0,128 pro skupinu dárců, p = 0,547 pro kontrolní skupinu).

Rozdíly mezi frekvencemi alel v jednotlivých souborech nebyly statisticky významné

- OR frekvence alel příjemci vs dárci = 0.89 (0.73 - 1.10)
- OR frekvence alel příjemci vs kontroly = 0.99 (0.85 - 1.16)
- OR frekvence alel dárci vs kontroly = 1.12 (0.96 - 1.30)

Tabulka 16: Frekvence alel a genotypů polymorfismu rs10757274.

	Genotypy						Alely			
	AA		AG		GG		A		G	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Příjemci (N = 360)	97	26.8	181	50.0	84	23.2	375	51.8	349	48.2
	97	26.8	181	50.0	84	23.2				
Dárci (N = 363)	116	31.9	166	45.6	82	22.5	398	54.7	330	45.3
	109	29.9	180	49.6	75	20.6				
Kontroly (N = 2509)	687	27.3	1242	49.3	589	23.4	2616	51.9	2420	48.1
	679	27.0	1257	49.9	581	23.1				

5.2 Analýza frekvencí genotypů vybraných skupin pacientů

V následujících tabulkách jsou porovnávány frekvence genotypů jednotlivých polymorfismů vždy mezi kontrolním souborem a vybranou skupinou pacientů za účelem zjistit případný vliv genotypu na zkoumaný jev.

5.2.1 Vliv analyzovaných polymorfismů na rozvoj ICHS

V souboru pacientů se vyskytovalo celkem 146 jedinců, u nichž byla TS provedena po srdečním selhání způsobeném ICHS.

1) Polymorfismus rs17817449

Ve skupině pacientů po TS s diagnózou ICHS bylo 51 homozygotů TT, 73 heterozygotů GT a 22 homozygotů GG.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 17* je patrné, že genotyp polymorfismu rs17817449 nemá vliv na riziko onemocnění ICHS.

Tabulka 17: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs17817449. V prvním řádku tabulky uveden genotyp, který je dle dosavadních poznatků považován za nerizikový (OR = 1.00). V posledním sloupci uvedena hodnota p pro dominantní (^{D}), kodominantní (^{K}) a recesivní (^{R}) model analýzy.*

	Kontroly		Pacienti		OR	p	p*
	N	%	N	%			
TT	817	33.1	51	34.9	1.00		0.65 ^{D}
GT	1224	49.6	73	50.0	0.96 (0.66 - 1.38) $^{TT\ vs\ GT}$	0.81 $^{TT\ vs\ GT}$	0.77 ^{K}
GG	426	17.3	22	15.1	0.83 (0.50 - 1.38) $^{TT\ vs\ GG}$	0.47 $^{TT\ vs\ GG}$	0.49 ^{R}

2) Polymorfismus rs2943634

Ve skupině pacientů po TS s diagnózou ICHS bylo 17 homozygotů AA, 59 heterozygotů AC a 67 homozygotů CC. Genotyp se nepodařilo určit u 3 pacientů.

Vzhledem k nízkému počtu AA homozygotů, prakticky identickému OR pro AA homozygoty a AC heterozygoty (viz *Tabulka 18*) byl pro finální analýzu použit recesivní model CC vs nositelé alely A.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 19* je patrné, že homozygoti CC mají vyšší riziko onemocnění ICHS než nositelé alely A.

Tabulka 18: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs2943634.

	Kontroly		**Pacienti**		**OR**	**p**	**p***
	N	**%**	**N**	**%**			
AA	358	14.3	17	11.9	1.00		0.42 [D]
AC	1176	47.0	59	41.3	1.06 (0.61 - 1.84) [AA vs AC]	0.84 [AA vs AC]	0.15 [K]
CC	970	38.7	67	46.9	1.45 (0.84 - 2.51) [AA vs CC]	0.18 [AA vs CC]	**0.05** [R]

Tabulka 19: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs2943634 - recesivní model.

	Kontroly		**Pacienti**		**OR**	**p**
	N	**%**	**N**	**%**		
AA+AC	1534	61,3	76	53,1	1.00	
CC	970	38,7	67	46,9	**1.39 (1.00 - 1.96)**	**0,05**

3) Polymorfismus rs6922269

Ve skupině pacientů po TS s diagnózou ICHS bylo 85 homozygotů GG, 49 heterozygotů AG a 12 homozygotů AA.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 20* je patrné, že genotyp polymorfismu rs6922269 nemá vliv na riziko onemocnění ICHS.

Tabulka 20: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs6922269.

	Kontroly		**Pacienti**		**OR**	**p**	**p ***
	N	**%**	**N**	**%**			
GG	1357	54.1	85	58.2	1.00		0.33 [D]
AG	980	39.1	49	33.6	0.80 (0.56 - 1.15) [GG vs AG]	0.22 [GG vs AG]	0.39 [K]
AA	172	6.9	12	8.2	1.11 (0.60 - 2.08) [GG vs AA]	0.74 [GG vs AA]	0.53 [R]

4) Polymorfismus rs10757274

Ve skupině pacientů po TS s diagnózou ischemické choroby srdeční bylo 28 homozygotů AA, 71 heterozygotů AC a 47 homozygotů CC.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 21* je patrné, že alela G signifikantně zvyšuje riziko onemocnění ICHS. Homozygoti GG mají téměř 2x vyšší riziko onemocnění ICHS než homozygoti AA. Nositelé alely G mají 1,58x vyšší riziko onemocnění ICHS než homozygoti AA (viz *Tabulka 22*).

Tabulka 21: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs10757274.

	Kontroly		**Pacienti**		**OR**	**p**	**p ***
	N	**%**	**N**	**%**			
AA	687	27.3	28	19.2	1.00		**0.03** **D**
AG	1242	49.3	71	48.6	1.40 (0.90 - 2.19) AA vs AG	0.14 AA vs AG	**0.02** **K**
GG	589	23.4	47	32.2	**1.96 (1.21 - 3.17)** **AA vs GG**	**0.0054** **AA vs GG**	**0.02** **R**

Tabulka 22: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs10757274 - dominantní model.

	Kontroly		**Pacienti**		**OR**	**p**
	N	**%**	**N**	**%**		
AA	687	27.3	28	19.2	1.00	
AG + GG	1831	72.7	118	80.8	**1.58 (1.04 - 2.41)**	**0.03**

5.2.2 Vliv analyzovaných polymorfismů na rozvoj DKMP

V souboru pacientů se vyskytovalo celkem 145 jedinců, u nichž byla TS provedena po srdečním selhání způsobeném dilatační kardiomyopatií.

1) Polymorfismus rs17817449

Ve skupině pacientů po TS s diagnózou DKMP bylo 39 homozygotů TT, 79 heterozygotů GT a 23 homozygotů GG. Genotyp se nepodařilo určit u 4 pacientů.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 23* je patrné, že genotyp polymorfismu rs17817449 nemá vliv na riziko onemocnění DKMP.

Tabulka 23: Porovnání frekvencí genotypů u polymorfismu rs17817449.

	Kontroly		Pacienti		OR	p	p*
	N	%	N	%			
TT	817	33.1	39	27.7	1.00		0.18 [D]
GT	1224	49.6	79	56.0	1.35 (0.91 - 2.00) [TT vs GT]	0.13 [TT vs GT]	0.30 [K]
GG	426	17.3	23	16.3	1.13 (0.67 - 1.92) [TT vs GG]	0.65 [TT vs GG]	0.76 [R]

2) Polymorfismus rs2943634

Ve skupině pacientů po TS s diagnózou DKMP bylo 21 homozygotů AA, 61 heterozygotů AC a 59 homozygotů CC. Genotyp se nepodařilo určit u 4 pacientů.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 24* je patrné, že genotyp polymorfismu rs2943634 nemá vliv na riziko onemocnění DKMP.

Tabulka 24: Porovnání frekvencí genotypů u polymorfismu rs2943634.

	Kontroly		Pacienti		OR	p	p*
	N	%	N	%			
AA	358	14.3	21	14.9	1.00		0.84 [D]
AC	1176	47.0	61	43.3	0.88 (0.53 - 1.47) [AA vs AC]	0.64 [AA vs AC]	0.69 [K]
CC	970	38.7	59	41.8	1.04 (0.62 - 1.73) [AA vs CC]	0.89 [AA vs CC]	0.46 [R]

3) Polymorfismus rs6922269

Ve skupině pacientů po TS s diagnózou DKMP bylo 39 homozygotů TT, 79 heterozygotů GT a 23 homozygotů GG. Genotyp se nepodařilo určit u 3 pacientů.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 25* je patrné, že genotyp polymorfismu rs6922269 nemá vliv na riziko onemocnění DKMP.

Tabulka 25: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs6922269.

	Kontroly		Pacienti		OR	p	p*
	N	%	N	%			
GG	1357	54.1	82	57.7	1.00		0.39 [D]
AG	980	39.1	49	34.5	0.83 (0.58 - 1.19) [GG vs AG]	0.31 [GG vs AG]	0.54 [K]
AA	172	6.9	11	7.7	1.06 (0.55 - 2.03) [GG vs AA]	0.86 [GG vs AA]	0.68 [R]

4) Polymorfismus rs10757274

Ve skupině pacientů po TS s diagnózou DKMP bylo 40 homozygotů AA, 80 heterozygotů AG a 24 homozygotů GG. Genotyp se nepodařilo určit u 1 pacienta.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 26* je patrné, že genotyp polymorfismu rs10757274 nemá vliv na riziko onemocnění DKMP.

Tabulka 26: Porovnání frekvencí genotypů u polymorfismu rs10757274.

	Kontroly		Pacienti		OR	p	p*
	N	%	N	%			
AA	687	27.3	40	27.8	1.00		0.89 [D]
AG	1242	49.3	80	55.6	1.11 (0.75 - 1.64) [AA vs AG]	0.61 [AA vs AG]	0.15 [K]
GG	589	23.4	24	16.7	0.70 (0.42 - 1.17) [AA vs GG]	0.17 [AA vs GG]	0.06 [R]

5.2.3 Vliv analyzovaných polymorfismů na rozvoj KNSŠ po TS

V souboru pacientů po transplantaci srdce se vyskytovalo celkem 46 jedinců, u kterých byla diagnostikovaná koronární nemoc srdečního štěpu.

1) Polymorfismus rs17817449

Ve skupině pacientů s diagnózou KNSŠ bylo 14 homozygotů TT, 24 heterozygotů GT a 8 homozygotů GG.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 27* je patrné, že genotyp polymorfismu rs17817449 nemá vliv na riziko onemocnění KNSŠ.

Tabulka 27: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs17817449.

	Kontroly		Pacienti		OR	p	p*
	N	%	N	%			
TT	817	33.1	14	30.4	1.00		0.69 [D]
GT	1224	49.6	24	52.2	1.14 (0.59 - 2.23) [TT vs GT]	0.69 [TT vs GT]	0.92 [K]
GG	426	17.3	8	17.4	1.10 (0.46 - 2.63) [TT vs GG]	0.84 [TT vs GG]	1.00 [R]

2) Polymorfismus rs2943634

Ve skupině pacientů s diagnózou KNSŠ byli pouze 4 homozygoti AA, 19 heterozygotů AC a 22 homozygotů CC. Genotyp se nepodařilo určit u 1 pacienta.

Vzhledem k nízkému počtu AA homozygotů byl pro finální analýzu použit recesivní model CC vs nositelé alely A.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 28* je patrné, že genotyp polymorfismu rs2943634 nemá vliv na riziko onemocnění KNSŠ.

Tabulka 28: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs294363 - recesivní model.

	Kontroly		**Pacienti**		**OR**	**p**
	N	**%**	**N**	**%**		
AA + AC	1534	14.3	23	8.9	1.00	
CC	970	38.7	22	48.9	1.51 (0.84 - 2.73)	0.17

3) Polymorfismus rs6922269

Ve skupině pacientů s diagnózou KNSŠ bylo 27 homozygotů GG, 17 heterozygotů AG a pouze 2 homozygoti AA.

Vzhledem k nízkému počtu GG homozygotů byl pro finální analýzu použit recesivní model GG vs nositelé alely A.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 29* je patrné, že genotyp polymorfismu rs6922269 nemá vliv na riziko onemocnění KNSŠ.

Tabulka 29: Porovnání frekvencí genotypů u polymorfismu rs692269 - recesivní model.

	Kontroly		**Pacienti**		**OR**	**p**
	N	**%**	**N**	**%**		
GG	1357	54.1	27	58.7	1.00	
AG + AA	1152	45.9	19	41.3	0.8289 (0.4585 - 1.4985)	0.53

4) Polymorfismus rs10757274

Ve skupině pacientů s diagnózou KNSŠ bylo 10 homozygotů AA, 19 heterozygotů AG a 17 homozygotů GG. U X pacientů se genotyp nepodařilo určit.

Vzhledem k nízkému počtu AA homozygotů, prakticky identickému OR pro AA homozygoty a AG heterozygoty (viz *Tabulka 30*) byl pro finální analýzu použit recesivní model CC vs nositelé alely A.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 31* je patrné, že homozygoti GG mají vyšší riziko onemocnění ICHS než nositelé alely A.

Tabulka 30: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs10757274.

	Kontroly		Pacienti		OR	p	p*
	N	%	N	%			
AA	687	27.3	10	21.7	1.00		0.40 [D]
AG	1242	49.3	19	41.3	1.05 (0.49 - 2.73) [AA vs AG]	0.89 [AA vs AG]	0.10 [K]
GG	589	23.4	17	37.0	1.98 (0.90 - 4.36) [AA vs GG]	0.08 [AA vs GG]	**0.03** [R]

Tabulka 31: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs10757274 - recesivní model.

	Kontroly		Pacienti		OR	p
	N	%	N	%		
AA+AG	1929	76.6	29	63.0	1.00	
GG	589	23.4	17	37.0	**1.92 (1.05 - 3.52)**	**0.03**

5.2.4 Vliv analyzovaných polymorfismů na riziko úmrtí v důsledku KVO

V souboru pacientů se vyskytovalo celkem 30 jedinců, kteří zemřeli po TS v důsledku KVO. Nejdříve je uvedeno porovnání frekvencí genotypů příjemců s kontrolním souborem a následuje porovnání frekvencí genotypů dárcovských štěpů s kontrolním souborem.

Analýza genotypu příjemců

1) Polymorfismus rs17817449

Ve skupině pacientů, kteří zemřeli po TS v důsledku KVO, bylo 12 homozygotů TT, 13 heterozygotů GT a 5 homozygotů GG.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 32* je patrné, že genotyp polymorfismu rs17817449 nemá u pacientů po transplantaci srdce vliv na riziko úmrtí v důsledku KVO.

Tabulka 32: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs17817449.

	Kontroly		Pacienti		OR	p	p*
	N	%	N	%			
TT	817	33.1	12	40.0	1.00		0.43 [D]
GT	1224	49.6	13	43.3	0.72 (0.33 - 1.59) [TT vs GT]	0.42 [TT vs GT]	0.72 [K]
GG	426	17.3	5	16.7	0.80 (0.28 - 2.28) [TT vs GG]	0.67 [TT vs GG]	0.92 [R]

2) Polymorfismus rs2943634

Ve skupině pacientů, kteří zemřeli po TS v důsledku KVO, byli pouze 3 homozygoti AA, 11 heterozygotů AC a 15 homozygotů CC. Genotyp se nepodařilo určit u 1 pacienta.

Vzhledem k nízkému počtu AA homozygotů byl pro finální analýzu použit recesivní model CC vs nositelé alely A.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 33* je patrné, že genotyp polymorfismu rs2943634 nemá u pacientů po transplantaci srdce vliv na riziko úmrtí v důsledku KVO.

Tabulka 33: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs2943634 - recesivní model.

	Kontroly		**Pacienti**		**OR**	**p**
	N	**%**	**N**	**%**		
AA + AC	1534	61.3	14	48.3	1.00	
CC	970	38.7	15	51.7	1.6944 (0.8143 - 3.5258)	0.15

3) Polymorfismus rs6922269

Ve skupině pacientů, kteří zemřeli po TS v důsledku KVO, bylo 15 homozygoti GG, 12 heterozygotů AG a pouze 3 homozygoti AA.

Vzhledem k nízkému počtu AA homozygotů byl pro finální analýzu použit recesivní model GG vs nositelé alely A.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 34* je patrné, že genotyp polymorfismu rs6922269 nemá u pacientů po transplantaci srdce vliv na riziko úmrtí v důsledku KVO.

Tabulka 34: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs6922269 - recesivní model.

	Kontroly		**Pacienti**		**OR**	**p**
	N	**%**	**N**	**%**		
GG	1357	54.1	15	50.0	1.00	
AG + AA	1152	45.9	15	50.0	1.178 (0.57 - 2.42)	0.65

4) Polymorfismus rs10757274

Ve skupině pacientů, kteří zemřeli po TS v důsledku KVO, bylo 6 homozygotů AA, 16 heterozygotů AG a 8 homozygotů GG.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 35* je patrné, že genotyp polymorfismu rs10757274 nemá u pacientů po transplantaci srdce vliv na riziko úmrtí v důsledku KVO.

Tabulka 35: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs10757274 .

	Kontroly		Pacienti		OR	p	p*
	N	%	N	%			
AA	687	27.3	6	20.0	1.00		0.37 [D]
AG	1242	49.3	16	53.3	1.48 (0.57 - 3.79) [AA vs AG]	0.42 [AA vs AG]	0.67 [K]
GG	589	23.4	8	26.7	1.56 (0.54 - 4.51) [AA vs GG]	0.41 [AA vs GG]	0.67 [R]

Analýza genotypů dárců

1) Polymorfismus rs17817449

Ve skupině pacientů, kteří zemřeli po TS v důsledku KVO, mělo celkem 6 štěp s genotypem TT, 15 štěp s genotypem GT a 9 štěp s genotypem GG.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 36* je patrné, že pacienti, kterým byl voperován štěp s genotypem GG, mají téměř 3x vyšší riziko úmrtí v důsledku KVO než ti, kterým byl voperován štěp s genotypem AA.

Tabulka 36: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs17817449.

	Kontroly		Pacienti		OR	p	p*
	N	%	N	%			
TT	817	33.1	6	20.0	1.00		0.19 [D]
GT	1224	49.6	15	50.0	1.67 (0.65 - 4.32) [TT vs GT]	0.37 [TT vs GT]	0.12 [K]
GG	426	17.3	9	30.0	**2.88 (1.02 - 8.14) [TT vs GG]**	**0.05 [TT vs GG]**	**0.07 [R]**

2) Polymorfismus rs2943634

Ve skupině pacientů, kteří zemřeli po TS v důsledku KVO, mělo celkem 6 štěp s genotypem AA, 12 štěp s genotypem AC a 12 štěp s genotypem CC.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 37* je patrné, že genotyp polymorfismu rs2943634 dárcovského štěpu nemá u pacientů po transplantaci srdce vliv na riziko úmrtí v důsledku KVO.

Tabulka 37: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs2943634.

	Kontroly		Pacienti		OR	p	p*
	N	%	N	%			
AA	358	14.3	6	20.0	1.00		0.37 [D]
AC	1176	47.0	12	40.0	0.61 (0.23 - 1.63) [AA vs AC]	0.39 [AA vs AC]	0.61 [K]
CC	970	38.7	12	40.0	0.74 (0.28 - 1.98) [AA vs CC]	0.59 [AA vs CC]	0.89 [R]

3) Polymorfismus rs6922269

Ve skupině pacientů, kteří zemřeli po TS v důsledku KVO, mělo celkem 17 štěp s genotypem GG, 7 štěp s genotypem AG a 6 štěp s genotypem AA.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 38* je patrné, že pacienti, kterým byl voperován štěp s genotypem AA, mají téměř 3x vyšší riziko úmrtí v důsledku KVO než ti, kterým byl voperován štěp s genotypem GG.

Tabulka 38: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs6922269.

	Kontroly		**Pacienti**		**OR**	**p**	**p***
	N	**%**	**N**	**%**			
GG	1357	54.1	17	56.7	1.00		0.78 [D]
AG	980	39.1	7	23.3	0.57 (0.24 - 1.38) [GG vs AG]	0.29 [GG vs AG]	**0.01** [K]
AA	172	6.9	6	20.0	**2.78 (1.08 - 7.16)** [**GG vs AA**]	**0.02** [**GG vs AA**]	**0.005** [R]

4) Polymorfismus rs10757274

Ve skupině pacientů, kteří zemřeli po TS v důsledku KVO, mělo celkem 15 štěp s genotypem AA, 10 štěp s genotypem AG a 5 štěp s genotypem GG.

Z výsledků uvedených v *Tabulce 39* je patrné, že pacienti, kterým byl voperován štěp s genotypem AG anebo GG, mají snížené riziko úmrtí v důsledku KVO než ti, kterým byl voperován štěp s genotypem AA. Alela A se zde jeví tedy jako riziková a pacienti, kterým byl voperován štěp s genotypem AA, mají téměř 3x vyšší riziko úmrtí v důsledku KVO než ti, jejichž štěp má genotyp s alespoň jednou alelou G (viz *Tabulka 40*).

Tabulka 39: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs10757274.

	Kontroly		**Pacienti**		**OR**	**p**	**p***
	N	**%**	**N**	**%**			
AA	687	27.3	15	50.0	1.00		**0.01** [D]
AG	1242	49.3	10	33.3	**0.37 (0.16 - 0.83)** [**AA vs AG**]	**0.02** [**AA vs AG**]	**0.02** [K]
GG	589	23.4	5	16.7	0.37 (0.14 - 1.08) [AA vs GG]	0.07 [AA vs GG]	0.39 [R]

Tabulka 40: Porovnání frekvencí genotypů polymorfismu rs10757274 - recesivní model.

	Kontroly		**Pacienti**		**OR**	**p**
	N	**%**	**N**	**%**		
AG+GG	1831	72.7	15	50.0	1.00	
AA	687	27.3	15	50.0	**2.67 (1.30 - 5.48)**	**0.006**

6 DISKUZE

V této diplomové práci jsme se zabývali analýzou DNA pacientů po transplantaci srdce, kteří byli operování v letech 2005 - 2015 v pražském IKEM. Celkem jsme do studie zahrnuli vzorky DNA od 364 příjemců a jejich párových 364 dárců srdce.

Naše studie je tímto rozsahem zcela unikátní. Z dostupné literatury je jasné, že dosud nebyla nikde ve světě provedena genetická asociační studie na takovémto počtu pacientů po TS.

U všech jedinců jsme provedli genotypizaci čtyř jednonukletotidových polymorfismů, které byly vybrány na základě dostupných výsledků GWASs. Konkrétně se jednalo o SNPs rs17817449 (16q12.2; gen *FTO*), rs2943634 (2q36.3; intergenová oblast), rs6922269 (6q25.1; gen *MTHFD1L*), a rs10757274 (9p21.3; intergenová oblast). U těchto polymorfismů byla opakovaně v různých studiích potvrzena asociace se zvýšeným rizikem KVO, která byla nezávislá na tradičních rizikových faktorech.

Pomocí OR a Pearsonova chí kvadrát testu jsme porovnávali frekvence alel mezi jednotlivými analyzovanými skupinami. Dle dostupných literárních údajů jsme očekávali, že u příjemců srdce, tedy u pacientů s velmi vážným srdečním selháním se budou ve větší míře vyskytovat rizikové alely oproti kontrolní skupině. Dále jsme předpokládali, že skupina dárců srdce, jakožto „extrémně zdravá“ část populace bude mít nižší výskyt rizikových alel oproti příjemcům a kontrolní skupině. Ani jedna domněnka ovšem nebyla potvrzena. Zastoupení alel nebylo ani u jednoho z vybraných polymorfismů statisticky významně odlišné mezi jednotlivými skupinami.

Z důvodu dvou klinicky zcela odlišných příčin transplantace srdce, jsme se v další podrobnější analýze zaměřili separátně na pacienty, kteří měli před TS diagnostikovanou dilatační kardiomyopatii a dále na pacienty s diagnózou ischemické choroby srdeční.

V případě polymorfismu rs10757274 byl signifikantně vyšší výskyt genotypu GG u pacientů s ICHS. Tento náš výsledek je v souladu s dříve publikovanými pracemi (WTCC, 2007; Samani et al. 2007; Hubáček et al., 2016) spojující tento polymorfismus s vyšším rizikem KVO, i když ve studii s odlišným a jedinečným protokolem.

Dle našich výsledků mají jedinci s genotypem GG téměř 2x častější diagnózu ICHS vedoucí k TS a obecně nositelé alely G 1,6x vyšší riziko tohoto onemocnění oproti homozygotům AA. Zmíněný polymorfismus se nachází na chromozomu 9p21. V této oblasti je několik polymorfismů detekovaných jako nejsilnější dosud známí prediktoři

rizika rozvoje KVO. Tyto varianty jsou v různé míře vazebné nerovnováhy a jedním z dalších příkladů je např. polymorfismus rs1333049, kdy jedinci s genotypem CC mají též téměř 2x větší riziko onemocnění ICHS (WTCCC, 2007) v obecné, neselektované populaci.

V případě polymorfismu rs2943634 mají dle našich výsledků homozygoti CC 1.4x vyšší riziko onemocnění ICHS než nositelé alely A, což je opět v souladu s dříve publikovanými studiemi.

U ostatních vyšetřovaných polymorfismů rs17817449 a rs6922269 jsme nepotvrdili předpokládaný vliv na zvýšené riziko onemocnění vedoucích k TS. Tato skutečnost může být ovlivněna dvěma skutečnostmi.

První z nich je relativně „nízký“ počet jedinců zahrnutých do studie. Přestože je náš soubor, vzhledem k analyzované diagnóze, jeden z nejrozsáhlejších v srdeční transplantologii, nedosahuje počtů běžných v asociačních studiích jiných onemocnění, kde bývají zahrnovány i desítky tisíc jedinců. Shromáždění většího množství pacientů po transplantaci srdce je však z objektivních důvodů velice obtížné a řešením by zde byla pouze rozsáhlá mezinárodní multicentrická studie.

Druhou příčinou zde může být značný klinický extrém analyzovaných pacientů. Pacienti indikovaní k transplantaci srdce trpí pochopitelně mnohem závažnější klinickou poruchou, než „normální“ pacienti s infarktem myokardu, kteří bývají hospitalizováni obvykle po 65. roce. Vliv analyzovaných polymorfismů tak může být v časnějším věku našich pacientů nedostatečný a nesnadno detekovatelný.

Velmi častou komplikací je u pacientů po transplantaci srdce koronární nemoc srdečního štěpu, jakožto akcelerovaná forma ICHS. Etiologie tohoto onemocnění nebyla dosud zcela objasněna. V našem souboru pacientů byla KNSŠ diagnostikována u 46 jedinců. Ze 4 analyzovaných polymorfismů se nám podařilo prokázat vliv u jednoho z nich a to rs10757274. Dle našich výsledků jsou homozygoti GG více ohroženi tímto onemocněním než nositelé alely A. Jak již bylo zmíněno, tento polymorfismus se nachází v oblasti s nejsilnější asociací ke KVO a tudíž je náš výsledek v souladu s již dříve zjištěnými poznatky.

V poslední řadě jsme se zaměřili na analýzu mortality pacientů, kteří zemřeli po TS. Z důvodu heterogennosti příčin úmrtí a primárního vlivu analyzovaných variant na KVO jsme analyzovali odděleně skupinu pacientů, kde byly příčinou úmrtí kardiovaskulární komplikace. Doposud nebyla publikována žádná studie zabývající se vlivem genetických

markerů rs17817449, rs2943634, rs6922269, rs10757274 asociovaných s KVO na přežívání pacientů po transplantaci srdce a tato práce je tedy první svého druhu.

Naším předpokladem bylo, že pacienti s touto diagnózou úmrtí by mohli být častěji nositelé rizikových genotypů. V našem souboru bylo 30 takovýchto pacientů. Po analýze DNA příjemců a porovnání frekvencí genotypů 4 vybraných polymorfismů s kontrolní skupinou jsme ovšem dospěli k závěru, že se zastoupení genotypů mezi těmito dvěma skupinami statisticky významně neliší. I zde může být jednou z příčin nízký počet dostupných vzorků a tedy nedostatečná síla studie.

Kromě DNA příjemců jsme též genotypizovali DNA dárcovských štěpů pacientů, kteří zemřeli v důsledku KVO. Z výsledků analýz jsme dospěli k závěru, že genotyp štěpu má na mortalitu pacientů větší vliv než samotný genotyp příjemců. U polymorfismu rs17817449 jsme zjistili, že pacienti, kterým byl voperován štěp s genotypem GG, mají téměř 3x vyšší riziko úmrtí na KVO po transplantaci srdce než ti, jejichž štěp má genotyp TT. U polymorfismu rs6922269 jsme dospěli k obdobnému závěru pro genotyp AA. Ke kontroverznímu zjištění jsme dospěli v případě polymorfismu rs10757274. Štěp, který má alespoň jednu alelu G v tomto polymorfismu, je méně ohrožen KVO po transplantaci srdce. Tato alela je přitom v populačních studiích označována jako riziková.

Přežívání pacientů je ovlivněno mnoha faktory. Ačkoliv pacienti mohou dodržovat zdravou životosprávu, je třeba počítat s možností řady komplikací vyvolaných převážně užíváním imunosupresiv. Především cyklosporin A a v menší míře kortikosteroidy vyvolávají potranplantační systémovou hypertenzi, která negativně působí na kardiovaskulární systém příjemce stejně tak jako hyperlipidémie, na které se též podílí vliv imunosupresiv. Dlouhodobý osud nemocných s transplantovaným srdcem značně závisí na zdravé životosprávě a intensivní léčbě, kterou zpravidla pacienti dodržují a tím dochází k eliminaci rizikových faktorů rozvoje KVO. Je tedy rovněž možné, že množství a kombinace léků potlačí v tomto případě vliv genů.

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci jsme se zabývali analýzou 4 SNPs u pacientů po transplantaci srdce - rs17817449 (16q12.2; gen *FTO*), rs2943634 (2q36.3; intergenová oblast), rs6922269 (6q25.1; gen *MTHFD1L*), a rs10757274 (9p21.3; intergenová oblast), vybraných na základě GWASs zaměřených na kardiovaskulární onemocnění. Genotypizovali jsme celkem 364 dárců a 364 příjemců. Transplantaci srdce předcházely především dvě diagnózy a to dilatační kardiomyopatie (145 pacientů) a ischemická choroba srdeční (146 pacientů). U 46 pacientů byla po TS diagnostikována koronární nemoc srdečního štěpu. Celkem 30 pacientů zemřelo po TS na kardiovaskulární onemocnění.

Po statistickém zpracování získaných dat jsme dospěli k následujícím závěrům:

- U polymorfismů rs17817449 a rs6922269 jsme nezjistili asociaci jednotlivých genotypů s DKMP či ICHS, vedoucí k transplantaci srdce.
- U polymorfismu rs2943634 mají homozygoti CC 1.4x vyšší riziko onemocnění ICHS než nositelé alely A.
- U polymorfismu rs10757274 alela G významně zvyšuje riziko onemocnění ICHS - homozygoti GG mají 2x vyšší riziko a nositelé alely G 1.6x vyšší riziko než homozygoti AA.
- Po TS mají homozygoti GG v polymorfismu rs10757274 téměř 2x vyšší riziko onemocnění KNSŠ než nositelé alely A.
- Kardiovaskulární mortalita pacientů po transplantaci srdce není ovlivněna genotypem příjemce u žádného ze sledovaných polymorfismů.
- Genotyp dárcovského štěpu má na kardiovaskulární mortalitu pacientů větší vliv než samotný genotyp příjemce.
- U polymorfismu rs17817449 mají pacienti, kterým byl voperován štěp s genotypem GG, téměř 3x vyšší riziko úmrtí na KVO po transplantaci srdce než ti, jejichž štěp má genotyp TT.
- U polymorfismu rs6922269 mají pacienti, kterým byl voperován štěp s genotypem AA, téměř 3x vyšší riziko úmrtí na KVO po transplantaci srdce než ti, jejichž štěp má genotyp CC.
- Paradoxně pacienti s genotypem AA v polymorfismu rs10757274 mají vyšší riziko úmrtí na KVO než nositelé alely G, která je v publikovaných studiích označována jako riziková.

8 REFERENČNÍ SEZNAM

Barnard C. N. (**1967**). A human cardiac transplant: an interim report of a succesful operation performed at Groot Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J*, 41, 1271-1274.

Behrendt, D., Ganz, P., Fang, J. (**2000**). Cardiac allograft vasculopathy. *Current Opinion in cardiology*, 78229, 10–16.

Bogardus C. (**2009**). Missing heritability and GWAS utility. *Obesity (Silver Spring)*, 17, 209-210.

Bydžovský J. (**2010**). Tabulky pro medicínu prvního kontaktu. Praha : Triton. 240 s. ISBN: 978-80-7387-351-6.

Carrel A. & Guthrie C. C. (**1905**). The transplantation of veins and organs. *Am Med*, 10, 1101-1102.

Cífková R., Škodová Z., Bruthans J., et al. (**2010**). Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. Czech MONICA and Czech post-MONICA. *Atherosclerosis*, 211(2), 676-681.

Demikhov V. P. (**1962**). Experimental Transplantation of Vital Organs. New York, Consultants Bureau. 285 s.

Ding K. & Kullo I. J. (**2009**). Genome-Wide Association Studies for Atherosclerotic Vascular Disease and Its Risk Factors. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2(1), 63-72.

Dlouhá D. & Hubáček J. A. (**2012**). Gen pro FTO a jeho role v genetické determinaci obezity. *Vnitř Lék*, 58(3), 208-215.

Do R., Bailey S. D., Desbiens K. et al. (**2008**). Genetic Variants of FTO Influence Adiposity, Insulin Sensitivity, Leptin Levels, and Resting Metabolic Rate in the Quebec Family Study. *Diabetes*, 57(4), 1147-1150.

Frazer K. A., Ballinger D. G., Cox D. R. et al. (**2007**). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*, 449(7164), 851-861.

Friedrichs F., Zugck C., Rauch G-J., et al. (**2008**). HBEGF, SRA1, and IK: Three cosegregating genes as determinants of cardiomyopathy.*Genome Research*, 19(3), 395-403.

Fruchart J. C., Nierman M. C., Stroes E. S., Kastelein J. J., Duriez P. (**2004**). New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation*, 109(Suppl I):III-15–III-9.

GBD 2013 Mortality and Cause sof Death Collaborators. (**2015**). Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 385(9963), 117-171.

Girnita D. M., Webber S. A., Zeevi A. (**2008**). Clinical impact of cytokine and growth factor genetic polymorphisms in thoracic organ transplantation. *Clin Lab Med.*, 28(3), 423–440.

Hardy J. D. & Chavez C. M. (**1968**). The first heart transplant in man. *Am J Cardiol*, 22, 772-781.

Hemesniemi J. A., Tynkkynen J., Havulinna A. S., Oksala N., Vartianen E., Laatikainen T., Salomaa V. (**2015**). Significant interaction between traditional risk factors affect cardiovascular risk prediction in health general population, *Ann. Med*., 47, 53–60.

Herman D. S. et al. (**2012**). Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.*, 366(7), 619–628.

Hong K. N., Iribarne A., Worku B., et al. (**2011**). Who is the high-risk recipient? Predicting mortality after heart transplant using pretransplant donor and recipient risk factors. *Ann Thorac Surg*, 92, 520-527.

Hubáček J. A., Staněk V., Gebauerová M. et al. (**2015**). Rs6922269 marker at the MTHFD1L gene predict cardiovascular mortality in males after acute coronary syndrome. *Molecular Biology Reports*, 42(8), 1289-1293.

Hubáček J. A., Staněk V., Gebauerová M. et al. (**2010**). A FTO variant and risk of acute coronary syndrome. *Clinica Chimica Acta*, 411(15-16), 1069-1072.

Hubáček J. A., Vrablík M., Dlouhá D. et al. (**2016**). Gene variants at FTO, 9p21, and 2q36.3 are age-independently associated with myocardial infarction in Czech men. *Clinica Chimica Acta*, 454, 119-123.

Jandová R. & Fabián J. (**1990**). Výskyt systémové hypertense po ortopické transplantaci srdce. Čas Lék Čes, 129, 16-19.

Jia C., Yang C., Yang S., Jian X., Yi C., Zhou Z., He C. (**2008**). Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Letters*, 582(23-24), 3313-3319.

Kannel W. B., Dawber T. R., Kagan A., Revotskie N., Stokes J. III. (**1961**). Factors of risk in the development of coronary heart disease - six-year follow-up experience: the Framingham Study. *Ann Intern Med*, 55, 33-50.

Kantrowitz A., Huller J. D., Joos H., Cerruti M. M., Carstensen H.E. (**1968**). Transplantation of the heart in an infant and an adult. *AM J Cadriol*, 22, 782-790.

Kärkkäinen S. & Peutkurinen K. (**2007**). Genetics of dilated cardiomyopathy. *Annals of Medicine*, 39(2), 91-107.

Kirklin J. K., Byoung J., McGiffin D. (**2002**). Heart transplantation. New York : Churchill Livingstone, 883 p., ISBN 0443076553.

Kobashigawa J. A., Moriguchi J. D., Laks H. et al. (**2005**). Ten-year follow-up of a randomized trial of pravastatin in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*, 24, 1736-1740.

Kocík M. (**2007)** Výskyt, rizikové faktory výskytu a prognostický dopad časně po transplantaci srdce detekované koronární nemoci srdečního štěpu. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze. 1. lékařská fakulta.

Levitas A., Muhammad E., Harel G. et al. (**2010**). Familial neonatal isolated cardiomyopathy caused by a mutation in the flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase. *European Journal of Human Genetics*, 18(10), 1160-1165.

Libby P. & Theroux P. (**2005**). Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, 111, 3481– 3488.

Lund L. H., Edwards L. B., Kucheryavaya A. Y., et al. (**2014**). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-first Official Adult Heart Transplant Report 2014. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 33(10), 996-1008.

Lusis A. J. (**2012**). Genetics of atherosclerosis. *Trends in Genetics*, 28(6), 267-275.

Málek, I. (**1993**). Indikace k transplantaci srdce. *Cor Vasa*, 35, 240-242.

Málek I. & Lupínek P. (**1999**). Chronické srdeční selhání. *Postgrad Med*, 1, 95-100.

Marinou K., Tousoulis D., Antonopoulos A. S. et al. (**2010**). Obesity and cardiovascular disease from pathophysiology to risk stratification. *Int J Cardiol*, 138, 3-8.

Marenberg M. E., Risch N., Berkman L. F., Floderus B. De Faire U. (**1994**). Genetic Susceptibility to Death from Coronary Heart Disease in a Study of Twins. *New England Journal of Medicine*, 330(15), 1041-1046.

McKoy R. C., Uretsky B. F., Kormos R. et al. (**1988**). Left ventricular hypertrophy in cyklosporin induced systemic hypertension after cardiac transplantation. *Am J Cardiol*, 62, 1140-1142.

McNally E. M., Golbus J. R., Puckelwartz M. J. (**2013**). Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 19-26.

McPherson R., Pertsemlidis A., Kavaslar N., Stewart A., Roberts R., Cox D. R., Hinds D. A., Pennacchio L. A., Tybjaerg-Hansen A., Folsom A. R., Boerwinkle E., Hobbs H. H., Cohen J. C. (**2007**). A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. Science, 316, 1488–1491.

Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F. (**1988**). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*., 16:1215.

Pasmant E., Laurendeau I., Heron D., Vidaud M., Vidaud D., Bieche I. (**2007**). Characterization of a Germ-Line Deletion, Including the Entire INK4/ARF Locus, in a Melanoma-Neural System Tumor Family: Identification of ANRIL, an Antisense Noncoding RNA Whose Expression Coclusters with ARF. *Cancer Research*, 67(8), 3963-3969.

Pirk J. & Málek I. (**2008**). Transplantace srdce. Praha : Karolinum. 287 s. ISBN: 978-80-246-1606-3.

Roberts R. & Stewart A. F. R. (**2012**). Genes and Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 60(18), 1715-1721.

Roig E., Almenar L., Crespo-Leiro M. et al. (**2015**). Heart transplantation using allografts from older donors: Multicenter study results. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* , 34(6), 790-796.

Samani N. J., Erdmann J., Hall A. S., Hengstenberg C., Mangino M., Mayer B., Dixon R. J., Meitinger T., Braund P., et al. (**2007**). Genomewide Association Analysis of Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*, 357(5), 443-453.

Shumway N. E. & Lower R. R. (**1964**). Special problems in transplantation of the heart. *Ann NY Acad Sci*, 120, 773-777.

Štulc T. (**2006**). Aterogeneze a její patogenetické mechanismy. *Kardiologické fórum*, 4, 14–15.

Turner D., Grant S. C., Yonan N. *et al.* (**1997**). Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection.*Transplantation*, 64(5),776–779.

Van Spaendonck-Zwarts K. Y., Van Rijsingen I. A. W., Van Den Berg M. P. et al. (**2013**). Genetic analysis in 418 index patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: overview of 10 years' experience. *European Journal of Heart Failure*, 15(6), 628-636.

Vassalli G., Gallino A., Weis M., W von Scheidt, Kappenberger L., LK von Segesser, Goy J. J. et al. (**2003**). Alloimmunity and nonimmunologic risk factors in cardiac allograft vasculopathy. *Eur Heart J*, 24, 1180-1188.

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

Wellcome **T**rust **C**ase **C**ontrol **C**onsortium. (**2007**). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 447(7145), 661-678.

Internetové odkazy:

- Internetový odkaz 1: http://www.omim.org/entry/115200?search=dilated%20cardiomyopathy&highlight=dilated%20cardiomyopathy

- Internetový odkaz 2: http://www.zdravotnickydenik.cz/2015/11/na-litomericku-startuje-studie-ktera-proveri-prevenci-a-lecbu-nemoci-srdce-a-cev-v-cr/

- Internetový odkaz 3: https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction

- Internetový odkaz 4: http://www.applied-maths.com/applications/taqman-based-snp-genotyping

- Internetový odkaz 5: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=17817449

- Internetový odkaz 6: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2943634

- Internetový odkaz 7: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6922269

- Internetový odkaz 8: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=10757274