



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Různé přístupy genetického testování Leidenské
mutace

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Markéta Hájková

Vedoucí práce: Mgr. Dagmar Bystřická, PhD.

České Budějovice 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Různé přístupy genetického testování Leidenské mutace jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

3. 5. 2017

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Dagmar Bystřické, PhD. za trpělivost a rady zejména při praktickém zvládnutí použitých metod a též při psaní rešerše. Dále bych ráda poděkovala především svému manželovi a celé své rodině za podporu po celou dobu mých studií.

Různé přístupy genetického testování Leidenské mutace

Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce se zabývá různými přístupy genetického testování Leidenské mutace. Leidenská mutace (faktor V Leiden) je v současné době jedna z nejčastějších hereditárních příčin trombofilních stavů a její vyšetření jedno z nejčastěji požadovaných v rámci trombofilních mutací. Trombofilní stavy jsou vážnou zdravotní komplikací, kdy dochází nejčastěji k hluboké žilní trombóze – tedy tvorbě sraženiny v hlubokém žilním systému dolních končetin. Tento stav může způsobovat komplikace zejména v těhotenství, ale může mít vážné následky i pro jinak zdravého člověka. Vyšetření Leidenské mutace je buď indikováno za určitých podmínek lékařem, a v tomto případě je hrazeno z veřejného zdravotního pojištění, nebo si jej pacient hradí sám jako samoplátce.

Cílem teoretické části této práce je podat ucelenou informaci o fyziologii hemostázy, aby bylo možné pochopit mechanismus tohoto systému, dále o dědičnosti Leidenské mutace, rizicích, které jsou s ní spojeny a o pravidlech indikace ke genetickému vyšetření této mutace. Je zde popsáno i riziko související s užíváním hormonální antikoncepce a vznikem trombofilních stavů. V neposlední řadě se zabývá různými genetickými metodami, které lze pro detekci Leidenské mutace použít. Praktická část obsahuje vlastní postup genetických metod a výsledky takto získané. V rámci bakalářské práce byly použity metody RFLP-PCR, real-time PCR a reverzní hybridizace na stripech. Součástí výsledků je také statistické zpracování rozdílné koncentrace DNA získané izolací z periferní krve nebo z bukalního stěru a statistický přehled o záchytu Leidenské mutace během několika let v laboratoři GENLABS s. r. o.

Nosiči této mutace mají větší riziko vzniku trombóz, které mohou mít závažné následky, včetně plicní embolie nebo infarktu myokardu. Jedinci s touto mutací mohou být jak heterozygoti, tak homozygoti. Heterozygoti jsou rizikem trombóz postiženi 5x – 10x více než zdravý jedinec, zatímco homozygoti mají toto riziko 80x – 100x vyšší. Ve světové populaci je Leidenská mutace rozprostřena nerovnoměrně, obecně můžeme říct, že v bílé populaci je její výskyt až 15%, zatímco v černošské a asijské populaci se nevyskytuje téměř vůbec. V České republice je její výskyt odhadován asi na 5%.

Klíčová slova: hemostáza, hemokoagulace, Leidenská mutace, genetické testování

Abstract

This thesis is about various approaches to genetical testing of Factor V Leiden. Factor V Leiden is currently one of the mostly occurred hereditary causes of thrombosis. It's examination is one of the mostly required among the thrombophilic mutations. Thrombophilic conditions are serious health complications when most oftenly deep venous trombosis occurs, which means formation of blood clot in deep vein system of legs. This condition may cause health complications especially during gravidity, but it may have serious consequences even for healthy person. If examination for Factor V Leiden is recommended by medical specialist then it is paid from the health insurance otherwise it is payed by person who requests the examination.

Purpose of theoretical part of the thesis is to offer information about physiology of hemostasis and to understand mechanism of this system, further is about hereditary of Factor V Leiden and associated hazards and about rules of indication of genetic examination of this disorder. There is also description of risks related with use of hormonal anticonception and formation of thrombophilic conditions. And lastly this thesis concernes about various genetical methods which are useable for detection of factor V Leiden.

Practical part consists of procedures of genetical methods and obtained results. Used methods were RFLP-PCR, real-time PCR and reverse hybridization on the stripes. Part of the results is statistical processing of different concentrations of DNA obtained by isolation from peripheral blood or from buccal swab and statistical overview of factor V Leiden identifications throughout the years in laboratories of company GEBLABS s.r.o.

Carriers of this mutation have increased risk of occurrence of thrombosis which can cause serious health conditions like pulmonary embolism or myocardial infarction. Individualls with such mutation can be heterozygotes aswell as homozygotes. Heterozygotes have five to ten times higher chance of mutation occurance then healthy person but homozygotes have this chance eighty to one hundred times higher. In human population factor V Leiden is spread unequally. In white population is estimated occurrence around 15% on the other hand occurrence on humans with African or Asian descent is very rare.

Key words: hemostasis, hemocoagulation, Factor V Leiden, genetic testing

Obsah

1	ÚVOD.....	4
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Hemostáza.....	9
2.1.1	Mechanismy hemostatických procesů.....	9
2.1.2	Primární hemostáza.....	10
2.1.3	Plasmatický koagulační systém.....	11
2.1.4	Původní model koagulace.....	13
2.1.4.1	Tvorba aktivátoru protrombinu.....	13
2.1.4.2	Zevní systém.....	13
2.1.4.3	Vnitřní systém.....	13
2.1.4.4	Přeměna protrombinu na trombin.....	14
2.1.4.5	Přeměna fibrinogenu na fibrin.....	14
2.1.5	Nový model koagulace.....	14
2.1.5.1	Iniciace.....	15
2.1.5.2	Amplifikace.....	15
2.1.5.3	Propagace.....	15
2.2	Fibrinolýza.....	16
2.2.1	Přeměna plasminogenu na plasmin.....	16
2.2.2	Štěpení fibrinogenu.....	17
2.2.3	Štěpení nerozpustného fibrinu.....	17
2.2.4	Inhibitory hemostázy.....	18
2.2.5	Inhibitory plasmatického koagulačního systému.....	18
2.2.5.1	Antitrombin.....	19
2.2.5.2	Heparinový faktor II.....	19
2.2.5.3	Protein S.....	20
2.2.5.4	Protein C.....	20
2.3	Trombofilní stavy.....	22
2.3.1	Získané trombofilní stavy.....	22
2.3.2	Vrozené trombofilní stavy.....	22
2.4	Gen pro faktor V.....	24
2.4.1	Faktor V Leiden a trombofilie.....	24
2.4.2	Molekulární základ.....	25
2.4.3	Dědičnost faktoru V Leiden.....	26
2.4.4	Prevalence v populaci.....	27
2.5	Indikace pro vyšetření Leidenské mutace.....	28

2.6	Rizikové faktory pro vznik žilní a arteriální trombózy	28
2.6.1	Zevní rizikové faktory	29
2.6.2	Vnitřní rizikové faktory	29
2.7	Klinické projevy trombofilních stavů	30
2.7.1	Hluboká žilní trombóza	30
2.7.2	Plicní embolie	30
2.7.3	Cévní mozková příhoda	30
2.7.4	Infarkt myokardu	31
2.8	Žilní trombóza a užívání hormonální antikoncepce	31
2.8.1	Žilní trombóza a těhotenství	31
2.9	Metody detekce Leidenské mutace	32
2.9.1	PCR - Polymerázová řetězová reakce	32
2.9.2	Real-time PCR	33
2.9.3	RFLP-PCR – Polymorfismus délky restrikčních fragmentů	35
2.9.4	AS-PCR – Alelově specifická PCR	37
2.9.5	ARMS-PCR – Amplification refractory mutation detection systém	37
2.9.6	Multiplex PCR	38
2.9.7	Reverzní hybridizace	38
2.9.7.1	Reverzní hybridizace na stripech	39
3	CÍL PRÁCE	40
4	METODIKA	41
4.1	Izolace DNA	41
4.2	Měření koncentrace DNA	44
4.3	Real-time PCR	44
4.4	RFLP-PCR	46
4.5	Reverzní hybridizace na stripech	50
5	VÝSLEDKY	53
5.1	Metoda real-time PCR	53
5.2	Metoda RFLP-PCR	53
5.3	Metoda reverzní hybridizace na stripech	54
5.4	Statistika	55
6	DISKUSE	57
7	ZÁVĚR	59
8	POUŽITÉ ZDROJE	60

1 ÚVOD

Leidenská mutace se řadí do trombofilních stavů, které jsou dědičné neboli hereditární. Nosiči této mutace mají větší riziko vzniku trombózy, tedy krevních sraženin a to především v hlubokém žilním systému dolních končetin. Vznik těchto sraženin může mít závažné následky, včetně plicní embolie nebo infarktu myokardu. Jedinci s touto mutací mohou být jak heterozygoti, tak homozygoti. Heterozygoti jsou rizikem trombózy postiženi 5x – 10x více než zdravý jedinec, zatímco homozygoti mají toto riziko 80x – 100x vyšší.

Ve světové populaci je Leidenská mutace rozprostřena nerovnoměrně, obecně můžeme říct, že v bělošské populaci je její výskyt až 15%, zatímco v černošské a asijské populaci se nevyskytuje téměř vůbec. V České republice je její výskyt odhadován asi na 5%.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hemostáza

Cirkulace krve má za fyziologických podmínek dvě charakteristiky – jednak nesmáčivost endotelií cévní stěny a jednak o fluiditu krve. Proces hemostázy tyto dvě charakteristiky mění. Hemostáza je ochranný mechanismus, který zaceluje poškození v cirkulaci krve a pokud tento mechanismus nefunguje, může to mít fatální následky (fbt.cz). Při poškození cévního povrchu endotelu, ať už chemickým, mechanickým nebo biologickým, je zahájen proces srážení. Toto srážení je kombinovanou adhezivní reakcí, která zahrnuje krevní destičky i ostatní buňky nebo látky podílející se na hemostáze. Zástava krvácení je téměř okamžitá – tvorbou primární hemostatické zátky, která se díky dalším procesům zpevní a smrští. Vzniká tak definitivní krevní zátka (Pecka, 2004).

Mohou ovšem nastat i situace, kdy se setkáme s dysbalancí hemostázy. Tato dysbalance může být způsobena různými faktory – například sepse, nádory atd. Hemostáza zahrnuje všechny fáze zástavy krvácení (fbt.cz).

2.1.1 Mechanismy hemostatických procesů

Mezi základní mechanismy hemostatických procesů patří:

- Primární hemostáza.
- Plasmatický koagulační systém.
- Fibrinolytický systém.
- Inhibitory krevního srážení a fibrinolýzy.

V primární hemostáze hrají důležitou roli trombocyty, v sekundární fázi je důležitá tvorba trombinu vedoucí k polymeraci fibrinogenu. Obě fáze se vzájemně prolínají a tvoří tak jeden celek. Konečnou fází hemostázy je fibrinolýza, která umožňuje rozpuštění trombu, rekanalizaci poškozeného úseku a plné obnovení průtoku (tab. 1). Současně s tím dochází k procesům, jež vedou k proliferaci poškozených tkání a k celkovému zhojení poškozené cévy (Colman et al., 2001).

Tab. 1 Průběh hemostázy a hemokoagulace

<p>Primární hemostáza</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vazokonstrikce (bezprostředně) • Adheze destiček (desetiny až jednotky sekund) • Agregace destiček (sekundy až minuty) 	<p>Koagulační systém</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aktivace faktorů (sekundy až minuty) • Formace fibrinu (minuty) 	<p>Fibrinolýza</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aktivace fibrinolýzy (minuty) • Lýza sraženiny (hodiny)
--	--	--

(Pecka, 2004)

2.1.2 Primární hemostáza

Primární hemostáza má za úkol vytvořit primární hemostatickou zátku, jež uzavírá narušené místo a zastavuje krvácení. Hlavními komponenty primární hemostázy jsou trombocyty a cévní stěna (Levy-Toledano et al., 1997).

Proudící trombocyty, které jsou neaktivní, mají oválný diskoidní tvar a na nenarušenou a nezměněnou endotelovou výstelku cévní stěny nereagují. Pokud dojde k narušení endotelové výstelky (způsobeno poraněním, zánětlivým nebo degenerativním procesem), obnaží se pojivová tkáň pod endotelem v místě poškození cévní stěny a dojde k obnažení kolagenních vláken v subendoteliálním prostoru. Dochází tak k adhezi trombocytů – tzn. k jejich přichycení ke kolagenovým vláknům za pomoci receptorů glykoproteinové povahy. Spojení je umožněno těmito bivalentními proteiny – von Willebrandovým faktorem (vWF) a fibronektinem (Colman et al., 2001).

Adheze destiček s aktivací receptorů navodí kaskádu biochemických a metabolických pochodů – tzv. aktivaci trombocytů. Dochází tím ke změně tvaru a centralizaci granulí. Děj je provázen uvolněním proagregačních a chemických faktorů. Za pomoci mezibuněčných signálů se kontaktují další trombocyty, jelikož u aktivovaných destiček probíhá sekrece adenosindifosfátu (ADP) a metabolismem kyseliny arachidonové vzniká tromboxan A₂ (TXA₂). Tyto dvě látky se vážou na příslušné receptory destiček vyskytujících se v okolí, aktivují je a destičky tak mění tvar na kulovitý s výběžky. Zároveň dochází ke změně struktury receptorů a k aktivaci jejich vazebných míst.

Změna struktury receptorů a jejich aktivace umožňuje vazbu trombocytů bivalentními proteiny – vWF, fibrinogenem a vitronektinem. Následuje tzv. agregace

destiček, která se rozděluje na primární, vyvolána uvolněným ADP z poškozených buněk a tkání a sekundární způsobená uvolněním ADP a TXA₂ z granulí trombocytů a trombospondinu. Trombospondin vytváří můstky mezi destičkami a agregace destiček je tak nevratná.

Závěrem fáze primární hemostázy je přesunutí fosfolipidů z vnitřní membránové dvojvrstvy do vnějších membránových struktur trombocytů čímž posilují další fázi hemostázy a tedy polymeraci rozpustného fibrinu na nerozpustný fibrin (Colman et al., 2001).

Během tvorby destičkové zátky se prosazuje i tkáňový faktor pocházející z poškozených tkání. Povrch destičky je dostupný pro vzájemné působení koagulačních faktorů, které má za následek tvorbu fibrinové zátky. Do fibrinové sítě, která byla vytvořena, jsou zachytávány erytrocyty a leukocyty. Tzv. „bílý“ trombus se mění na „červený“ (Pecka, 2004).

2.1.3 Plasmatický koagulační systém

Plasmatický koagulační systém zahrnuje několik dějů, které mají za následek vytvoření nerozpustného fibrinu. Postupně se fibrinogen přeměňuje na fibrin a fibrinové monomery, které spontánně polymerují. Tyto polymery se pak spojují kovalentními vazbami a působením aktivovaného faktoru XIII (XIIIa) – vzniká tak nerozpustný fibrin. Ten vytvoří vláknitou síť zachycující krevní buňky. Vzniká tzv. stabilní fibrinová zátka na jejímž stažení se podílejí krevní destičky (Sussman, 1992).

Hemokoagulace se účastní velké množství látek jako jsou plasmatické proteiny, fosfolipidy a ionty, souhrnně řečeno koagulační faktory (tab. 2). Koagulační faktory se většinou tvoří v játrech, některé z nich jsou vitamin K dependentní (jejich tvorba závisí na přítomnosti vitamínu K), konkrétně jde o protrombin, FVII, FIX a FX.

Tab. 2 Koagulační faktory

Číselné značení	Slovní značení	Závislost na vit. K	Katalytická aktivita	Cesta	Funkce
I	fibrinogen	ne	ne	obě	tvorba fibrinové sítě
II	protrombin	ano	ano	obě	aktivace fibrinogenu, V, VII, VIII, XI, XIII, proteinu C, destiček
III	tkáňový faktor	ne	ne	zevní	buněčný kofaktor FVII, aktivuje FIX a FX
IV	vápenaté ionty	ne	ne	obě	nezbytný pro vznik vazby mezi koagulačními faktory a fosfolipidy
V	proakcelerin	ne	ne	obě	plasmatický kofaktor FX (vytváří aktivátor protrombinu)
VII	prokonvertin	ano	ano	zevní	aktivace FIX a FX
VIII	antihemofilický faktor A	ne	ne	vnitřní	plasmatický kofaktor FIX
IX	Christmas faktor	ano	ano	vnitřní	vytváří komplex s FVIII a aktivuje FX
X	Stuart-Prowerové faktor	ano	ano	obě	aktivuje protrombin (v komplexu s FV)
XI	plasmatický předchůdce tromboplastinu	ne	ano	vnitřní	aktivuje FIX
XII	Hagemanův faktor	ne	ano	vnitřní	aktivuje FXI
XIII	fibrin stabilizující faktor	ne	ne	obě	transglutamináza, stabilizuje fibrinovou síť prostřednictvím tvorby peptidových vazeb mezi C-konci peptidů
vWF	von Willebrandův faktor	ne	ne		váže a transportuje FVIII (ochrana před degradací) usnadňuje agregaci a adhezi trombocytů v místě poranění
Prekalikrein	Fletcherův faktor	ne	ano	vnitřní	časná fáze koagulace, aktivuje FXII a HMWK (vnitřní cesta)
Vysokomolekulární kininogen	Fitzgeraldův faktor	ne	ne	vnitřní	kofaktor, časná fáze koagulace s FXII a kalikreinem (vnitřní cesta)

(Chottová Dvořáková, 2015)

Obecně se uvádí dvě cesty přeměny protrombinu na trombin, a to cesta vnitřní a vnější. Tento model byl popsán v šedesátých letech minulého století a funguje dobře při srážení krve *in vitro*. V lidském těle se koagulace účastní nejen látky přítomné v krvi

či tkáňový faktor (TF), nýbrž i látky na povrchu některých buněk nebo látky těmito buňkami uvolňované (Pecka, 2004). Díky tomuto poznání vznikl nový model hemokoagulace vycházející ze starého modelu, který bere v potaz i tyto interakce. Pro úplnost jsou v této práci uvedeny oba modely.

2.1.4 Původní model koagulace

Proces hemokoagulace probíhá ve třech fázích:

1. Tvorba aktivátoru protrombinu.
2. Přeměna protrombinu na trombin.
3. Přeměna fibrinogenu na fibrin a následná tvorba fibrinové sítě (obr. 1).

2.1.4.1 Tvorba aktivátoru protrombinu

Aktivátor protrombinu je tvořen komplexem FXa, FVa, vápenatých iontů a fosfolipidů buněčné membrány trombocytů nebo subendotelových buněk. Nazývá se také protrombináza nebo tenáza je vytvořen buď v zevním systému, nebo ve vnitřním systému koagulační kaskády (Chottová Dvořáková, 2015).

2.1.4.2 Zevní systém

Zevní systém se aktivuje tehdy, pokud dojde k poškození cévní stěny v rozsahu, kdy krev opouští cévní řečiště a vytéká do okolních tkání, případně ven z těla. Krev se tak dostane do kontaktu s buňkami pod endotelem a buňkami v okolí poškozené cévy. Buňky mají na svém povrchu TF, glykoproteinový receptor. Z krve se na tento receptor naváže FVII, vzniká tak komplex a spolu s vápenatými ionty aktivuje FX na FXa (Weiss et al., 1989).

2.1.4.3 Vnitřní systém

Pokud je poškození takové, že krev neopouští řečiště a je tak poškozena pouze endotelová vrstva, která se dostává do kontaktu s kolagenem uloženým pod endotelem. Nedojde tedy ke styku krve s TF a v procesu srážení se uplatní pouze faktory přítomné

v krvi. Kaskáda je započata aktivací FXII, ke které dochází při styku krve s povrchem kolagenu, jenž má negativní náboj. Podílí se na tom zároveň také vysokomolekulární kininogen a kalikrein. FXIIa aktivuje FXI na FXIa, který aktivuje FIX na FIXa. FIXa vytváří komplex s FVIII a destičkovými fosfolipidy a pomocí vápenatých iontů aktivuje FX na FXa. FXa vytvoří komplex s FVa díky účasti fosfolipidů a vápenatých iontů. Výsledkem je vznik aktivátoru protrombinu (Heimark et al., 1980).

2.1.4.4 Přeměna protrombinu na trombin

Protrombin se přemění na trombin díky účinku vytvořeného aktivátorem protrombinu. Trombin katalyzuje reakce související s hemokoagulací.

2.1.4.5 Přeměna fibrinogenu na fibrin

Účinkem trombinu na fibrinogen se odštěpují peptidové řetězce A a B (fibrinopeptidy) z jeho molekuly a vzniká fibrin monomer. Fibrinová vlákna se následně polymerují. Vlákna jsou nestabilní, ovšem působením FXIIIa dojde ke vzniku kovalentních vazeb mezi vlákny fibrinu. Tím vzniká fibrinová síť. FXIII je fyziologicky přítomen v plasmě a je aktivován působením trombinu za přítomnosti vápenatých iontů (Dyr et al., 1989).

2.1.5 Nový model koagulace

Jak bylo zmíněno výše, tento model vychází z původního modelu, ovšem zahrnuje i činnost buněk během celého procesu. Pro správný průběh koagulace je důležité, aby se faktory nacházely v místě poranění, kde má koagulum vzniknout a nestačí jen vznik jejich potřebného množství v aktivovaném stavu. Některé koagulační reakce probíhají na povrchu buněk, konkrétně na aktivovaných trombocytech a buňkách nesoucích TF. Koagulace proběhne pouze v situaci, kdy v důsledku poškození cévní stěny dojde k interakci TF, destiček a plasmatických faktorů (Galajda et al., 1998).

2.1.5.1 Iniclace

Celý proces je zahájen kontaktem plasmy a TF. Tento kontakt je zapříčiněn poškozením cévní stěny, jelikož buňky nesoucí na povrchu TF se za fyziologických okolností nacházejí ve stěně cévy pod endotelem nebo v blízkém okolí cév.

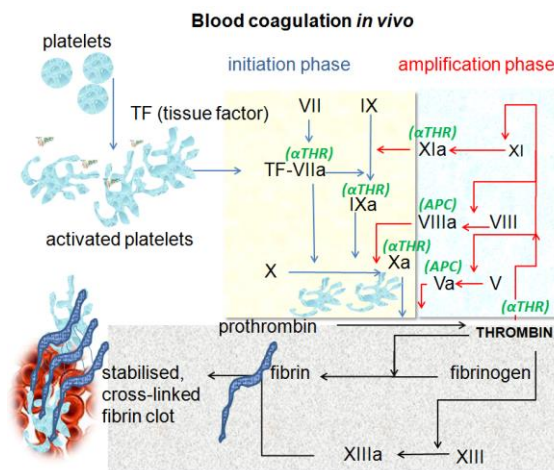
Při kontaktu TF s FVIIa, jehož malé množství neustále přítomno v krvi, vzniká komplex, který aktivuje malé množství FIX a FX na jejich aktivní formy. FXa se pojí s FVa a společně vytváří protrombinázu na povrchu buněk s TF. Sotva se FXa uvolní z buněčného povrchu, je rychle inaktivován. Tímto je zajištěno, že koagulace probíhá pouze v místě poškození cévy.

2.1.5.2 Amplifikace

Trombin vytvořený ve fázi iniciace má řadu funkcí. Aktivuje destičky, které díky tomu získávají vyšší prokoagulační aktivitu. Trombinem je též aktivován FV, FVIII a FXI, které jsou umístěny na povrchu trombocytů.

2.1.5.3 Propagace

Probíhá na povrchu aktivovaných destiček. FIXa vytvořený během iniciační fáze se naváže na FVIIIa, který je lokalizován na povrchu trombocytů. Další FIXa vzniká činností FXIa, který je taktéž vázán na povrchu destiček. FXa je v této fázi tvořen pomocí komplexu FIXa/VIIIa. Vytvořený FXa se ihned spojuje s FVa (obr. 1). Tento komplex je zodpovědný za tvorbu dostatečného množství trombinu pro vznik fibrinové sítě (Miller et al., 1996).



Obr. 1 Schéma hemokoagulace; převzato z wikipedia.org

2.2 Fibrinolýza

Fibrinolytický systém odpovídá za lýzu koagula, ovšem uplatňuje se taktéž při degradaci kolagenu, angiogenezi nebo u metastáz tumoru.

Koagulum omezuje krevní tok, při nekontrolovatelné aktivaci může dojít i k uzavření cévy. Hlavní složku fibrinolytického systému tvoří plasminogen, který je prekurzorem plasminu. Nejdůležitějšími aktivátory plasminogenu jsou prekurzory serinových proteáz tkáňový aktivátor plasminogenu (t-PA) a urokináza (u-PA). Na přítomnost fibrinových vláken nebo přítomnost fibrinového koagula organismus reaguje aktivací fibrinolytického systému (Davie et al., 1991). Na krevní koagulum se váže plasminogen a působením uvolněných aktivátorů z endotelu je aktivován na plasmin. Ten proteolyticky působí na koagulum a je inaktivován cirkulujícími antiplasminy.

Fibrinolýza je vázána na místo poranění, plasmin je aktivován jen na povrchu koagula. Schopnost plasminogenu specificky štěpit fibrin a ne fibrinogen je dána jeho zvýšenou afinitou k fibrinu, stejnou vlastnost má i aktivátor plasminogenu t-PA.

2.2.1 Přeměna plasminogenu na plasmin

Ihned po vytvoření prvních fibrinových struktur se aktivuje fibrinolytický systém. Na povrch fibrinu se váže plasminogen a t-PA. Tím se vytváří ternární komplex mezi t-PA, plasminogenem a lysinovými strukturami na C-řetězci fibrinu. Takto je plasminogen účinně přeměňován na plasmin. Jako kofaktor v této reakci slouží fibrin.

Plasmin pak štěpí fibrinové koagulum na jednotlivé fragmenty, tzv. fibrin degradační produkty. Zpětnou vazbou se zesiluje účinek. Během štěpení fibrinu plasminem se vytváří koncové karboxylové lysinové řetězce degradovaného fibrinu, které váží další plasminogen a t-PA. Díky tomu se zvyšuje tvorba plasminu a taktéž účinnost celé fibrinolýzy.

Aktivátory přeměny plasminogenu na plasmin se rozdělují do dvou kategorií:

- vyšší specifita pro fibrin – aktivace plasminogenu na povrchu fibrinu
- nižší nebo žádná specifita pro fibrin – vedou k systémové aktivaci plasminogenu, při které se štěpí například fibrinogen, faktor V nebo faktor VIII (Spraggon et al., 1995)

2.2.2 Štěpení fibrinogenu

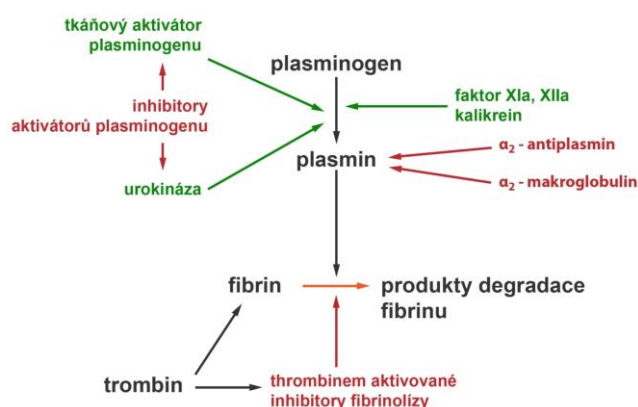
Štěpením fibrinogenu vznikají dva typy štěpných fragmentů vysokomolekulární (X, Y) a nízkomolekulární (D, E) štěpy.

Štěpy X a Y tvoří s monomery fibrinogenu rozpustné komplexy a zabraňují tak monomerům fibrinu v jejich polymeraci – a tedy vzniku fibrinové sítě. Jedná se o antikoagulační účinek. Mají schopnost inhibice agregace trombocytů.

Štěpy D a E jsou odbourávány mononukleárním fagocytárním systémem (MFS) (Amiral et al., 1990).

2.2.3 Štěpení nerozpustného fibrinu

Proteolytická degradace nerozpustného fibrinu plasminem probíhá podobným způsobem jako předchozí štěpení fibrinogenu. Odštěpují se fragmenty X a Y, které se od sebe ovšem neoddělují. Konečným fragmentem tohoto štěpení jsou takzvané D-dimery, jež jsou odplavovány do periferní krve (obr. 2). Molekuly D-dimeru jsou spojeny kovalentní vazbou, což zajišťuje jejich odolnost proti štěpení plasminem (Pecka, 2004).



Obr. 2 Schéma fibrinolýzy, převzato z www.fblt.cz

2.2.4 *Inhibitory hemostázy*

Inhibitory hemokoagulace a fibrinolýzy tvoří jeden ze základních regulačních mechanismů hemokoagulace. Po celém procesu koagulační kaskády se značně zesílí prvotní aktivační podnět. Posloupnost těchto reakcí by v krátké době mohla vést k masivnímu srážení krve, ucpání cév a smrti. Díky těmto inhibitorům se udržuje dynamická hemokoagulace a je tak základním principem průběhu hemokoagulace.

Inhibitory krevního srážení tvoří přirozenou součást krve a tlumí její srážení svými antikoagulačními mechanismy, které je vyvoláno plasmatickým koagulačním systémem a fibrinolýzou (Pecka, 2004).

2.2.5 *Inhibitory plasmatického koagulačního systému*

Během srážení krve se tvoří proteolytický enzym trombin, který je v nadbytku a následně musí být účinně a rychle inhibován, aby hemokoagulace nepokračovala. Inhibice není cílená pouze na trombin, ale i jiné aktivované prvky hemokoagulace.

Inhibitory jsou přítomny v plasmě a jejich specifita je velmi nízká. Vedle trombinu inhibují i ostatní serinové proteázy.

Jako inhibitor trombinu se nejvíce uplatňuje antitrombin a alfa2 – makroglobulin. V plasmě jsou oba obsaženy ve vysoké koncentraci.

2.2.5.1 Antitrombin

Jedná se o glykoprotein, který se tvoří v játrech, ovšem byla zjištěna jeho přítomnost i v endotelových buňkách. Má schopnost neutralizovat účinek trombinu, avšak působí až po 15 – 30 minutách (opožděný účinek). Syntéza antitrombinu souvisí se syntézou fibrinogenu, štěpení fibrinogenu je signálem pro následnou syntézu antitrombinu (Barrowcliff a Thomas, 1987).

2.2.5.1.1 Funkce antitrombinu

Antitrombin je nejdůležitější fyziologický inhibitor serinových proteáz. Váže trombin a ostatní plasmatické proteázy a vzniklý komplex je následně odbouráván v mononukleárním fagocytárním systému (Lechner a Kyrle, 1995). Vznik tohoto komplexu může být uspíšen navázáním heparinu nebo proteoglykanů z endotelových buněk. Interakce mezi antitrombinem a heparinem způsobí konformační změnu, při které se zpřístupní sekvence sulfátových nebo nesulfátových monosacharidových útvarů na heparinu a rezidua lysinu na molekule antitrombinu. Na rezidua lysinu se váže molekula heparinu.

Hlavní význam pro reakci trombinu s antitrombinem má sérinové aktivní centrum trombinu. Trombin štěpí argininové vazby v bílkovinách především v molekule fibrinogenu. Bazické oblasti antitrombinu přitahují záporně nabitě oblasti molekuly heparinu (Pecka, 2004).

2.2.5.2 Heparinový faktor II

Stejně jako u antitrombinu se jedná o inhibitor serinových proteáz. Nachází se hlavně na cévním endotelu. Je syntetizován endotelovými buňkami.

2.2.5.2.1 Funkce heparinového faktoru II

Jedná se o homologní inhibitor k antitrombinu. Na rozdíl od antitrombinu ovšem inhibuje pouze trombin. Blokuje jeho účinek i v jiných oblastech jeho působení, než jen v hemostáze. Účinek heparinového faktoru II se zvyšuje v přítomnosti heparinu, dermatansulfátu, heparansulfátu a jiných glykosaminoglykanů.

Heparinový faktor II se prosazuje v inhibici pouze v případě, klesne-li hladina antitrombinu pod 30% (Tollefsen, 1995).

2.2.5.3 Protein S

Protein S je vitamin K dependentní glykoprotein vznikající v játrech. Taktéž může vznikat v megakaryocytech a endoteliálních buňkách. Většinová část proteinu S je uložena v alfa-granulích trombocytů a také v endotelu. Odtud se uvolňuje do krve působením protrombinázy a tenázy.

2.2.5.3.1 Funkce proteinu S

Působí jako kofaktor k aktivovanému proteinu C. Protein S ulehčuje vazbu aktivovaného proteinu C k fosfolipidovým povrchům trombocytů a endotelií. Činnost proteinu S je ukončena trombinem proteolytickým štěpením.

Ve volné i vázané formě má vlastní inhibiční aktivitu nezávislou na aktivovaném proteinu C. Forma vázaná inhibuje FXa. Volná forma se pojí s FV, FVa, PS a s FVIII (zde i forma vázaná). Napojením na tyto faktory protein S blokuje vznik tenázy a protrombinázy, čímž inhibuje aktivaci FXa a trombinu (Esmon, 1992).

2.2.5.4 Protein C

Systém proteinu C je spolu s antitrombinem a inhibitorem tkáňového faktoru (TFPI) nejúčinnějším inhibičním systémem hemokoagulace. Je tvořen proteinem C, proteinem S a trombomodulinem (Esmon, 1992). Jedná se o klíčovou složku přirozené antikoagulační cesty, která je aktivována na povrchu endotelových buněk trombinem navázaným k trombomodulinu (Pecka, 2004).

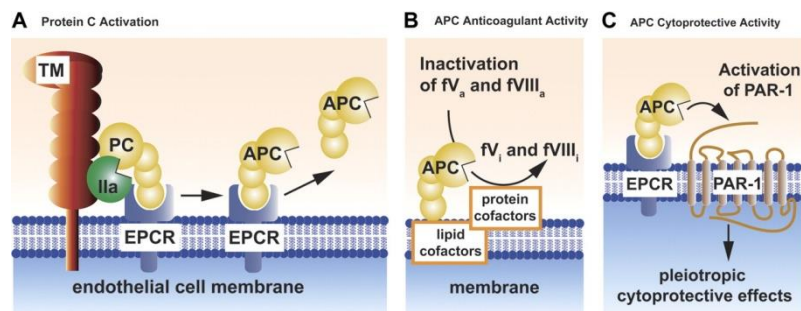
Systém proteinu C má schopnost inaktivovat faktory krevního srážení (VIIIa a Va), tím reguluje tvorbu trombinu (Debize et al., 1995).

Protein C vzniká v játrech za účasti vitaminu K (jedná se tedy o K dependentní protein) a v endotelu.

2.2.5.4.1 Aktivace proteinu C

Aktivovaný protein C (APC) inaktivuje faktory Va, VIIIa a reguluje tvorbu trombinu. V poslední době bylo také zjištěno, že APC má přímý charakteristický cytoprotektivní efekt, který zahrnuje změny genové exprese, dále protizánětlivé účinky, anti-apoptotické aktivity a stabilizaci endoteliální bariéry. Tyto aktivity vyžadují endoteliální receptor proteinu C (EPCR) a proteázou aktivovaný receptor-1.

K aktivaci proteinu C dochází na povrchu cévních endotelií, kde je navázán specifický endoteliální receptor trombinu trombomodulin (Esmon et al., 1982). Trombomodulin moduluje trombinovou prokoagulační aktivitu. Takový trombin není již koagulačně aktivní, ovšem umožňuje aktivaci proteinu C. Tento způsob aktivace, vazba trombin – trombomodulin, je mnohonásobně rychlejší než aktivace samotným trombinem. Protein C se váže na EPCR, který zvyšuje aktivační účinek komplexu trombin – trombomodulin (obr. 3). Aktivací proteinu C vzniká aktivovaný protein C (APC) (Pecka, 2004).



Obr. 3 Aktivace proteinu C, převzato z www.bloodjournal.org

2.2.5.4.2 Funkce aktivovaného proteinu C

Aktivovaný protein C proteolyticky štěpí a inaktivuje na membráně navázané plasmatické faktory Va a VIIIa. Inhibice těchto faktorů blokuje či zpřičiňuje nižší produkci aktivních komplexů tenázy a protrombinázy a vede k potlačení aktivovaného koagulačního procesu. Kofaktory v tomto procesu jsou protein S a zřejmě i neaktivovaná forma faktoru V (Debize et al., 1995).

Kromě výše zmíněných inhibičních faktorů existují ještě další, např. inhibitor APC, který jak už z názvu vyplývá, inhibuje APC, ale také komplex trombin – trombomodulin nebo jiné složky koagulace - (F II a, Xa, tPA, kalikrein, trypsin).

Dále je to inhibitor tkáňového faktoru (TFPI), který přímo inhibuje faktor Xa a tvoří neaktivní koagulační komplex [TFPI - Xa – Vila - TF]. Existují i inhibitory fibrinolýzy, jsou to: α_2 – antiplasmin, PAI – 1 a PAI – 2. Poslední skupinou inhibitorů jsou inhibitory získané, kam patří například antifosfolipidové protilátky a lupus antikoagulans. Poslední zmíněné inhibitory jsou zde uvedené pouze pro příklad.

2.3 Trombofilní stavy

Trombofilie je vrozená či získaná porucha hemostázy, která zapříčiňuje zvýšené tendence k trombóze (Pecka, 2004).

Trombofilní stavy mohou být:

- získané (sekundární)
- vrozené (kongenitální)

2.3.1 Získané trombofilní stavy

1. Antifosfolipidový syndrom
 - jedná se o autoprotilátky proti fosfolipidům v rámci koagulačních procesů
2. Sekundární (přidružené) trombofilní stavy
 - objevují se při patobiologických stavech (např. těhotenství) nebo jsou následkem patologického procesu - nefrotický syndrom, hepatopatie, maligní onemocnění (Pecka, 2004)

2.3.2 Vrozené trombofilní stavy

1. Dysfibrinogemie
 - mutace genu fibrinogenu α , β 3 a γ
 - nejznámější mutace β 3-fibrinogenu (455 G-A)

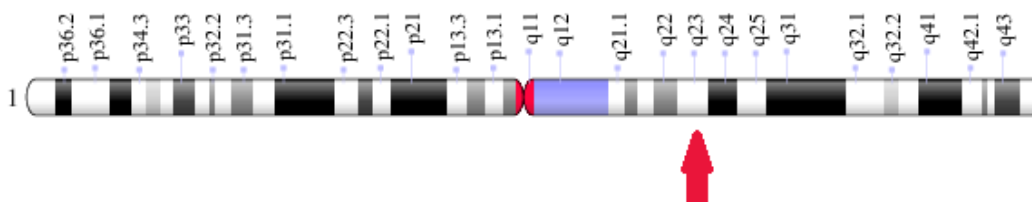
- zvýšení hladiny fibrinogenu v plasmě, zvýšení viskozity krve, větší agregace erytrocytů
2. Deficience antitrombinu
 - autosomálně dominantní porucha dělí se na tři typy podle kvantity, aktivity a schopnosti vázat heparin
 - projevuje se hlubokými žilními trombózami, plicní embolií
 3. Deficience proteinu C
 - je známo více než 160 mutací genu proteinu C (Reitsma et al., 1995)
 - klinické projevy jsou žilní i arteriální trombózy, purpura fulminans u novorozenců homozygotů (Devine et Brigden, 1996)
 4. Deficience proteinu S
 - známo kolem 70 mutací genu (Aiach et al., 1995)
 5. Mutace protrombinu
 - záměna nukleotidu G za A na pozici 20210 v genu pro faktor II (Poort et al., 1996)
 6. Homocystein
 - hyperhomocystémie – zvýšení hladiny homocysteinu v krvi

Existují ještě další polymorfismy, které jsou příčinou venózní nebo arteriální trombózy, např.: GP Ia, TFPI, PAI 1.

Dalším z vrozených trombofilních stavů, který je jednou z nejčastějších příčin žilní trombofilie je tzv. Leidenská mutace (faktor V Leiden), což je mutace v genu pro faktor V.

2.4 Gen pro faktor V

Gen F5 se nachází na pozici 1q21 – 1q25, což znamená, že se ho najdeme na dlouhém raménku (q) chromosomu 1, v pozici 21 – 25 (obr 4).



Obr. 4 Lokalizace genu F5 na chromosomu 1 (vlastní zdroj)

Gen F5 kóduje koagulační faktor V. Koagulační faktor V je primárně produkován buňkami v játrech, po aktivaci faktoru V na FVa interaguje s FXa a společně vytváří komplex, který přeměňuje protrombin na jeho aktivní formu trombin. Ten pak mění rozpustný fibrinogen na nerozpustný fibrin a díky tomu vzniká sraženina.

Další úlohou faktoru V je regulace koagulačního systému prostřednictvím jeho interakce s APC. APC za fyziologických podmínek inaktivuje koagulační faktor V štěpením na specifických místech. Tato inaktivace zpomaluje proces srážení a zabraňuje vzniku nadměrných trombů.

Pokud je koagulační faktor V štěpen na určitém místě (pozice 506), může spolu s APC inaktivovat faktor VIIIa (ghr.nlm.nih.gov/gene/F5).

2.4.1 Faktor V Leiden a trombofilie

Hluboká žilní trombóza a plicní embolie patří mezi závažné zdravotní komplikace, které každoročně postihují přibližně jednoho člověka z tisíce (Kujovich, 2011). Přibližně u poloviny pacientů s žilní trombózou byla diagnostikována trombofilní porucha. Zděděná trombofilie je geneticky podmíněná tendence k rozvoji žilní trombózy, která se často během života opakuje. Dědičné deficiencie antitrombinu, proteinu C a proteinu S jsou relativně výjimečné a společně se vyskytují asi u 10 % pacientů s žilní trombózou.

V roce 1993 Dahlbäck a kolektiv objevili u několika rodin postižených trombózou dědičnou slabou odpověď na aktivovaný protein C, respektive na jeho antikoagulační

efekt (Dahlbäck et al., 1993). APC resistance byla převažující u většiny pacientů s žilní trombózou a následně bylo prokázáno, že tato žilní trombóza v důsledku bodové mutace v genu pro faktor V (Bertina et al., 1994). Faktor V Leiden je nejčastějším rizikovým faktorem žilní trombózy a vyskytuje se u 20 – 25 % pacientů s žilní trombózou a u 50 % pacientů s familiární trombofilií (Riedker et al., 1995) Testování Leidenské mutace je v současné době jedno z nejžádanějších molekulárně genetických vyšetření.

2.4.2 Molekulární základ Leidenské mutace

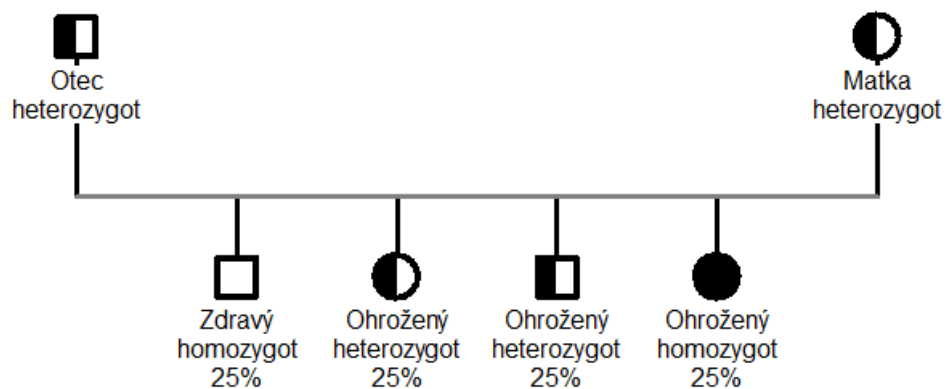
Faktor V Leiden je genetická porucha charakterizovaná slabou odpovědí k APC – tzv. resistance na aktivovaný protein C (Segers et al., 2007). APC inaktivuje faktor Va štěpením na třech místech - R (arginin) 306, R 506 a R 679. Termín „faktor V Leiden“ neboli „Leidenská mutace“ vyjadřuje substituci nukleotidu guaninu za adenin (pozice 1691, exon 10) v genu pro faktor V, čímž dochází k záměně glutaminu za arginin v peptidickém řetězci. Dochází tedy ke ztrátě proteolytického místa R 506 důsledkem záměny aminokyseliny, a následně se tím komplikuje proteolytické štěpení v místech 306 a 679.

Vzhledem k této substituci je faktor Va odolný vůči APC a jeho inaktivace je desetkrát pomalejší než je obvyklé, což vede ke zvýšení produkce trombinu. Tento mírný protrombotický stav se projevuje zvýšenou hladinou D-dimeru, protrombinového fragmentu F1 + 2 a dalšími aktivovanými koagulačními markery (Martinelli et al., 1996)

Leidenská mutace nese název podle nizozemského města Leiden, kde byla objevena (Bertina et al., 1994).

2.4.3 Dědičnost faktoru V Leiden

Faktor V Leiden je autosomálně intermediárně dědičné onemocnění, což znamená, že projevy onemocnění se objevují odlišně u mutovaných homozygotů (s oběma mutovanými alelami) i u heterozygotů (s jednou mutovanou alelou). Pokud se tedy sejdou dva heterozygoti (obr. 5), jejich potomek může být ohroženým homozygotem, ohroženým heterozygotem, ale i naprosto zdravým jedincem – homozygotem s oběma alelami nemutovanými - tzv. wild type (Trávník, 2012).



Obr. 5 Dědičnost Leidenské mutace (vlastní zdroj)

2.4.4 Prevalence v populaci

Faktor V Leiden je jedna z nejčastějších dědičných forem trombofilie, zahrnuje asi 40 – 50 % případů dědičných trombofilií. Rozšíření mutace se liší v různých populacích (tab. 3).

Tab. 3 Rozšíření faktoru V Leiden ve světě

Rozšíření faktoru V Leiden ve světě ^{a, b}	
Populace	Prevalence (%)
Bílí Evropané	3,0 – 15,0
Španělsko	3,3
Francie	3,8
Německo	4,0
Island	5,2
Velká Británie	8,8
Řecko	15,0
Švédsko	11,0
Afrika	Nepřítomný
Jihovýchodní Asie	Nepřítomný
Malá Asie	1,2
Austrálie (domorodci)	Nepřítomný
Japonsko	Nepřítomný
Jordánští Arabové	12,2
Libanon	14,0
Západní Írán	2,97
Kanada	5,3
Spojené státy	
Běloši	5,2
Hispanci	2,2
Afroameričané	1,2
Asijští Američané	0,45
Indiáni	1,25
a) Zdraví jedinci s dědičnou predispozicí k trombofiliím	
b) Zahnuje heterozygoty a homozygoty	

Rees et al., 1995

2.5 Indikace pro vyšetření Leidenské mutace

Vyšetření je indikováno ošetřujícím lékařem (především z těchto odborností - interna, hematologie, gynekologie a porodnictví, lékařská genetika nebo praktický lékař) a to zejména:

1. před zahájením podávání perorální hormonální antikoncepce nebo hormonální substituční léčby u žen s pozitivní rodinnou anamnézou pro výskyt tromboembolické nemoci (matka, otec, vlastní sourozenci, děti) nebo s osobní pozitivní anamnézou tromboembolické nemoci
2. po prodělané tromboembolické nemoci
3. po třech opakovaných potratech v 1. trimestru nebo u každého potratu v dalších obdobích gravidity
4. u těhotných žen s pozitivní rodinnou anamnézou tromboembolické nemoci nebo s komplikacemi v graviditě jako – těžké formy preeklampsie, růstové retardace plodu nebo abrupce placenty
5. jiné důvody – indikace lékařem trombotického centra nebo ÚHKT Praha

Při pozitivním nálezu mutací lze provést vyšetření u příbuzných v první linii, u kterých jsou přítomna i další rizika vzniku trombofilních stavů.

2.6 Rizikové faktory pro vznik žilní a arteriální trombózy

V současné době je známa celá řada rizikových faktorů, které způsobují žilní trombózu. Rizikové faktory zapříčiňující žilní trombózu se většinou liší od faktorů způsobující trombózu arteriální (Penka, Buliková, 2009). Kromě vrozených faktorů, které již byly v této práci popsány, existují obecné faktory, které přispívají ke vzniku žilní trombózy. Bylo zjištěno, že ke klinické manifestaci trombózy je zapotřebí vícero rizikových faktorů najednou (na rozdíl od krvácivých stavů). Riziko žilní trombózy se například zvyšuje v případě, že žena užívá hormonální antikoncepci a pokud je tato

žena zároveň nositelkou Leidenské mutace, toto riziko je až třicetkrát vyšší než u ženy, která tato kontraceptiva neužívá (Penka , Buliková, 2009).

Tyto faktory trombofilních stavů dělíme na zevní rizikové faktory a na faktory vnitřní (Musil, 2009).

2.6.1 Zevní rizikové faktory

1. Silně provokující

- Operace – především onkologická, ortopedická a abdominální chirurgie (kromě miniinvazivních technik)
- Úrazy – polytraumata, spinální léze, poranění dolních končetin a pánve
- Imobilizace a další faktory jako paréza končetin, sepse, trauma, malignita, srdeční nebo respirační nedostatečnost
- Chemoterapeutické režimy – zejména obsahující vysokodávkované kortikoidy (Poul, 2006)

2. Ostatní faktory

- Sádrová fixace dolních končetin
- Imobilizace nad 3 dny
- Let delší než 6 hodin
- Dlouhodobě zavedený centrální žilní katétr
- Hormonální antikoncepce
- Estrogenní substituce
- Terapie antiestrogeny
- Terapie kortikoidy
- Gravidita a šestinedělí (Poul, 2006)

2.6.2 Vnitřní rizikové faktory

- Obezita
- Aktivní nádor
- Zánětlivá onemocnění

- Chronické srdeční a plicní selhání
- Nefrotický syndrom (Musil, 2009)

2.7 Klinické projevy trombofilních stavů

2.7.1 Hluboká žilní trombóza

Hluboká žilní trombóza označuje přítomnost trombu ve venózním systému, přičemž nejčastěji se sraženina nalézá v žilách dolních končetin, zejména v oblasti třísel, zadní části kolen a lýtek (obr. 6). Důsledkem hluboké žilní trombózy může být plicní embolie. Příznaky zahrnují bolest postiženého místa, otok a sníženou citlivost (Musil, 2009).

2.7.2 Plicní embolie

Při plicní embolii dochází k obstrukci plicnice (tepna přivádějící krev do plic) nebo některé z jejích větví zejména krevní sraženinou. Embolie znamená uvolnění trombu z místa vzniku a jeho přemístění do plicnice. Vzácně embolii způsobují např. tuk nebo kostní dřev při vážných úrazech, plodová voda nebo například vzduch při potápění (www2.ikem.cz/www?docid=1005973).

2.7.3 Cévní mozková příhoda

U cévní mozkové příhody dochází k přerušení zásobování části mozku krví. Tato část pak není schopna své fyziologické funkce a dochází k rychlému odumírání mozkových buněk. Důvodem bývá trombus v cévách, popřípadě prasknutí cévy a krvácení do mozku (obr. 8). Následky bývají různé – invalidita, snížená schopnost řeči, oslepnutí, v nejhorších případech smrt (www.ikta.cz/index.php?pg=home--cevní-mozkova-prihoda-iktus).

2.7.4 Infarkt myokardu

Jde o ischemické ložiskové odumření části srdečního svalu, jenž vzniká při uzavření nebo výrazném zúžení levé či pravé věnčité tepny. Zúžení, resp. uzavření je způsobeno krevní sraženinou v místě zúžené věnčité tepny. Ve vzácných případech je na vině zánět tepny, embolus nebo spasma. Infarkt myokardu postihuje pravou i levou komoru srdeční (<http://www2.ikem.cz/www?docid=1005912>).

2.8 Žilní trombóza a užívání hormonální antikoncepce

V polovině 90. let se objevují studie, které dokazují vyšší riziko žilní trombózy u kombinované hormonální antikoncepce obsahující gestoden a desogestrel v porovnání s pilulkami obsahující levonorgestrel. Riziko podobné tomuto bylo pozorováno i u kombinované hormonální antikoncepce obsahující drospirenon. V pozdějších letech byla tato data znovu zkoumána a v případě přípravků obsahujících drospirenon bylo Výborem pro humánní léčivé přípravky doporučeno je používat pouze k léčbě akné a hirsutismu a nekombinovat s jinou hormonální antikoncepcí.

V konečném důsledku je tedy doporučeno informovat ženy o riziku těchto přípravků a důsledcích tromboembolie s individuálním přístupem ke každé pacientce.

Riziko trombózy se zvyšuje do čtyř měsíců po zahájení užívání a snižuje se do tří měsíců po ukončení.

Při preskripci je nutné dbát na rizikové faktory pro žilní trombózu – vyšší věk, obezita, operace atd. (vlastní zdroj).

2.8.1 Žilní trombóza a těhotenství

V graviditě je obecně vyšší riziko rozvoje trombózy, která může být způsobena mechanickou obstrukcí žilního návratu zvětšující se dělohou nebo z hyperkoagulačního stavu spojeného s těhotenstvím. Hlubokou žilní trombózou je v tomto období ohrožena nejen žena, ale i plod.

Trombóza se může projevit pouze na dolních končetinách jako hluboká žilní trombóza nebo se může trombus uvolnit a způsobit plicní embolii. Prevalence žilní trombózy v těhotenství je poměrně nízká (vlastní zdroj).

2.9 Metody detekce Leidenské mutace

2.9.1 PCR - Polymerázová řetězová reakce

PCR je metodou, která využívá princip replikace nukleových kyselin a umožňuje tak snadné a rychlé namnožení specifického úseku DNA *in vitro*. Díky této metodě je možné získat prakticky neomezené množství kopií definované sekvence DNA (např. genu nebo jeho části). Amplikon neboli amplifikovaný úsek DNA je ohraničen z obou stran tzv. primery, což jsou koncové oligonukleotidy, které jsou začátkem nových molekul DNA. Tyto nové molekuly DNA jsou syntetizovány podle původních denaturovaných řetězců a mají tedy stejnou sekvenci. Amplifikací jedné molekuly DNA vznikají dvě další molekuly. Počet syntetizovaných molekul s každým cyklem exponenciálně roste, to znamená, že v n -tém cyklu lze získat až 2^n molekul, které budou shodné s původním templátem. Úseky amplifikované za pomoci PCR mohou být různě dlouhé – od několika desítek po tisíce nukleotidů. Většina produktů PCR amplifikace má velikost několika stovek nukleotidů (Penka, Bulikova, 2009).

Samotná amplifikace probíhá v přístroji zvaném termocycler, kde se teplota mění přesně a regulovaně během jednotlivých cyklů. Do termocycleru se vkládají plastové zkumavky o objemu 0,5 nebo 0,2 ml.

PCR amplifikace je tvořena třemi cykly:

1. Denaturace dvouřetězcové DNA

Denaturace se provádí za teploty 94 – 98 °C a probíhá rozpletení dvouřetězcové DNA. Tato rozpletená DNA následně slouží jako templát pro nově vznikající komplementární DNA. Tento cyklus trvá 1 – 10 minut. Iniciální denaturace je zpravidla delší, v dalších cyklech trvá zhruba 1 minutu.

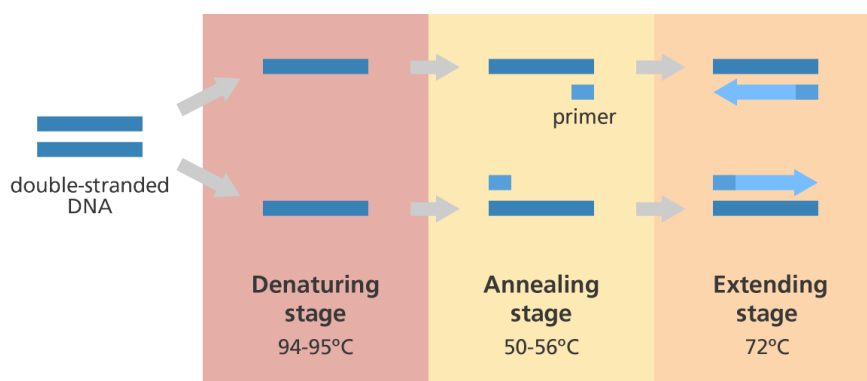
2. Navázání primerů na jednořetězcové templátové molekuly DNA

Vhodná teplota pro navázání primerů je v rozmezí 55 – 65°C. Toto nasedání (annealing) trvá přibližně 15 – 60 s. Teplota i doba jsou závislé na sekvenci primerů a je tedy potřeba provést optimalizační reakce. Primery nasedají na příslušnou komplementární sekvenci DNA templátů.

3. Prodlužování řetězců DNA

Teplota posledního cyklu závisí na použité DNA polymeráze, obvykle však bývá přibližně 72 °C. K PCR jsou využívány termostabilní polymerázy, například *Taq* polymeráza, která pochází z bakterie *Thermus aquaticus*. Délka elongace závisí na typu použité DNA polymerázy a také na délce amplifikovaného úseku, obvykle je to však 20 – 60 s. DNA polymeráza přidává k existujícímu úseku DNA nové nukleotidy ve směru 5' → 3' od navázaných primerů.

Vznikající jednořetězcové molekuly DNA se párují na principu komplementarity a vznikají dvouřetězcové molekuly, které vstupují jako templát do dalšího cyklu PCR. Asi po 30 – 35 cyklech se obvykle získá dostatečné množství PCR produktu (obr. 6). Vzniklé PCR produkty lze detekovat elektroforézou (Penka, Bulikova, 2009).

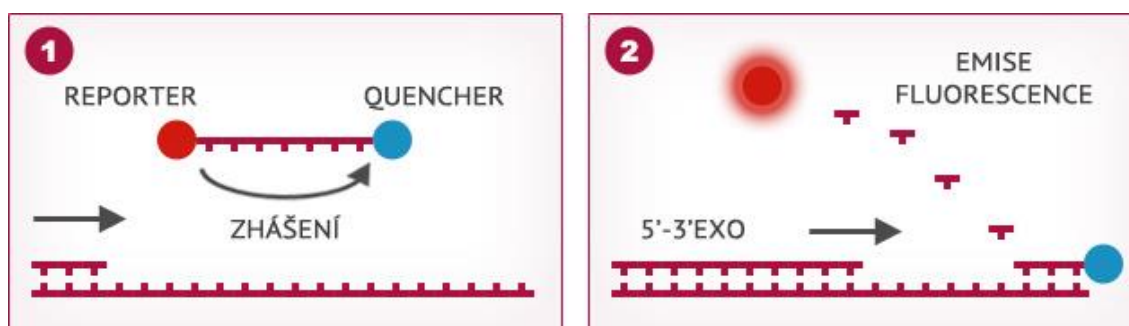


Obr. 6 Průběh PCR, převzato z <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction>

2.9.2 Real-time PCR

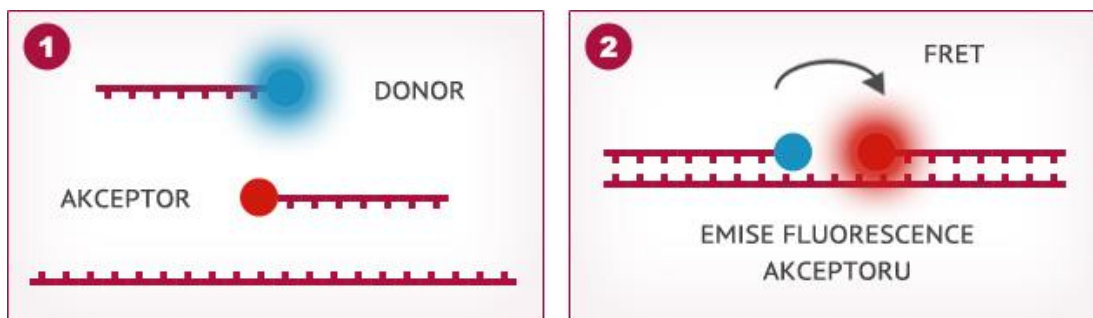
Real-time PCR je založena na pozorování kinetiky polymerázové řetězové reakce. Detekce je umožněna díky barvivům, které mají schopnost interkalace do dvouřetězcové DNA. Jsou to například ethidium bromid nebo SYBR Green. Častěji se používají fluorescenčně značené jednořetězcové sondy tvořené oligonukleotidy, které specificky hybridizují s amplifikovanou sekvencí v uvnitř analyzované oblasti ohraničené použitými primery.

Hydrolyzační sondy (TaqMan) - jsou značeny dvěma fluorochromy – na konci 5' je navázán „reportér“, který po ozáření vyzařuje energii s kratší vlnovou délkou, zatímco na konci 3' je navázán tzv. „zhášec“ (quencher), který přijímá energii od reportéru a emituje energii s delší vlnovou délkou. Prodlužování řetězce probíhá ve směru 5' → 3' od primeru k sondě a zároveň štěpí navázanou sondu díky své 5' exonukleázové aktivitě. Zhášec přestane pohlcovat energii vyzařovanou reportérem a narůstající fluorescence odpovídá emitovanému světlu rozštěpené sondy (obr. 7) (Penka, Bulikova, 2009).



Obr. 7 Princip TaqMan, převzato z <http://www.generi-biotech.com/sondy-dualne-znacene>

FRET sondy (fluorescence resonance energy transfer) – v tomto případě dochází k přenosu energie mezi dvěma fluorofory při jejich přiblížení. Systém značených sond sestává ze dvou oligonukleotidů, z nichž jeden je značen na 3' konci donorovým a druhý na 5' konci akceptorovým fluoroforem. Sondy jsou navrženy tak, aby hybridizovaly na templátovou DNA přilehle vedle sebe (obr. 8). Pokud sondy hybridizují s cílovou sekvencí, dojde k přenosu energie mezi donorem a akceptorem za zvýšení aktivity akceptorového fluoroforu. Ta je potom detekována přístrojem - cyclerem umožňujícím provedení real-time PCR (<http://www.generi-biotech.com/sondy-hybridizacni-sondy>).

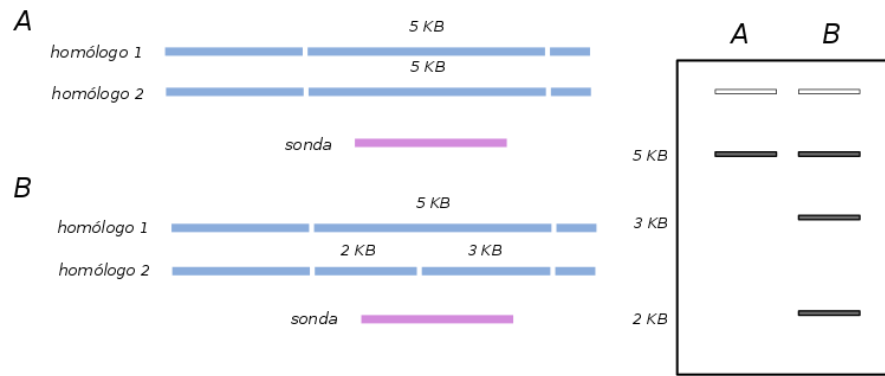


Obr. 8 Princip FRET, převzato z <http://www.generi-biotech.com/sondy-hybridizacni-sondy>

2.9.3 RFLP-PCR – Polymorfismus délky restričních fragmentů

Restriční analýza je jednou ze základních metod charakterizace DNA, kdy se nejprve amplifikují určité úseky DNA pomocí PCR a následně se štěpí za pomoci restričních endonukleáz (restriktáz) na definované fragmenty. Identifikace produktů restriční analýzy se provádí za pomoci elektroforézy. Používá se velké množství restričních endonukleáz, které se odlišují schopností specificky rozeznávat různě dlouhé sekvence nukleotidů. Tyto endonukleázy štěpí DNA na různě dlouhé fragmenty podle rozpoznané sekvence a podle individuálního počtu bazí. Při správných podmínkách tak vzniká reprodukovatelný počet restričních fragmentů, které mají určitou a reprodukovatelnou délku (počet párů bazí – pb). Počet a délka těchto fragmentů jsou specifické pro určitý genotyp. Odlišnost různých DNA fragmentů je založena na základě polymorfismu délky štěpných segmentů. Polymorfismus se vytváří díky přítomnosti nebo nepřítomnosti rozpoznávacích a štěpných míst pro restriční endonukleázy (Zima, 2007).

Rozpoznáný úsek DNA je dlouhý většinou jen několik párů bazí a často se jedná o tzv. palindromickou sekvenci (stejně pořadí nukleotidů ve směru 3' i 5'). Pokud je v genu přítomna alela, která rozpoznávací sekvenci obsahuje a druhá nikoliv, bude DNA první alely rozštěpena, zatímco DNA druhé alely ne (obr. 9) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>).



Obr. 9 Princip RFLP-PCR, převzato z

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:RFLP_mapping.svg

2.9.4 AS-PCR – Alelově specifická PCR

Jedná se o metodu, která je založena na principu PCR a slouží k detekci bodových mutací. Jde o dvě paralelně probíhající reakce, které se liší v primerech. V jedné reakci je přítomen primer odpovídající wild-type (nemutované) DNA, ve druhé je primer pozměněn a je tak komplementární pouze k mutované DNA. Zpětný primer je u obou DNA stejný z důvodu zachování stejné velikosti amplikonů. Primery nasednou na vyšetřovanou templátovou DNA, pokud obsahuje odpovídající sekvenci. Pak proběhne elongace a dojde k amplifikaci potřebného množství produktu. Pokud takovou sekvenci neobsahuje, k vazbě primerů na sekvenci DNA nedojde a PCR neproběhne (Penka, Bulikova, 2009).

2.9.5 ARMS-PCR – Amplification refractory mutation detection systém

ARMS-PCR je varianta AS-PCR, jejíž podstatou je přesná komplementarita bází na 3' konci primeru. Ta je klíčová pro správnou amplifikaci. Pokud dojde k nesouladu komplementarity, tzv. „mismatch“, k amplifikaci nedojde. Je nutné použít vnitřní kontroly reakce, aby se odlišilo selhání samotné PCR a specificky chybějící amplifikace (tab. 4). Metoda zřetelně odliší heterozygoty ve sledovaném lokusu a homozygoty pro jednu nebo druhou alelu (Ferrie et al., 1992).

Tab. 4 Princip hodnocení ARMS-PCR a AS-PCR

Genotyp	Oligonukleotidy	Produkt reakce
Homozygot nebo hemizygot normální	s + n	ano
	s + m	ne
Heterozygot	s + n	ano
	s + m	ano
Homozygot nebo hemizygot mutantní	s + n	ne
	s + m	ano

s – společný primer n – normální primer m – mutantní primer

Zima, 2007

2.9.6 Multiplex PCR

Multiplexní polymerázová řetězová reakce se používá pro amplifikaci několika různých sekvencí DNA současně. Důležitou fází je fáze přípravná, kdy je potřeba optimalizovat podmínky tak, aby se nevytvářely nežádoucí produkty. Multiplex PCR se skládá z několika sad primerů v jednom PCR mixu pro výrobu amplikonů různých velikostí, které jsou specifické pro různé sekvence DNA. Zaměření na více sekvencí najednou je možné získat výsledky pouze z jedné reakce. Teplota pro nasedání primerů musí být optimalizována tak, aby byly primery schopné pracovat v jedné reakci (Hayden et al., 2008). Metoda je využívána k testování mnoha delecí a bodových mutací v jedné amplifikační reakci (Zima, 2007).

2.9.7 Reverzní hybridizace

Během reverzní hybridizace dochází ke vzniku dvouvláknové molekuly nukleové kyseliny na základě sekvenční komplementarity hybridizované jednovláknové molekuly DNA. Jedno vlákno je tvořeno vyšetřovanou DNA a druhé je referenční úsek DNA se známou sekvencí.

Reverzní hybridizace probíhá ve třech krocích – nejprve se izoluje DNA, poté se amplifikují analyzované genové sekvence a následně se hybridizují k referenčním sekvenčně specifickým sondám imobilizovaným na pevném podkladě. Pro vizualizaci hybridizace se používá například radioaktivní značení, které patří mezi nejstarší postupy. Neradioaktivní nukleotidy se vymění za nukleotidy s navázaným radioizotopem. V dnešní době se od tohoto způsobu upouští, a to především z důvodů bezpečnostních a hygienických. Toto radioaktivní značení bylo nahrazeno fluorescenčními nebo také nefluorescenčními molekulami, které se váží na nukleové kyseliny. Tyto molekuly interkalují do nukleotidového vlákna (např. během PCR) nebo se nukleotidy obsahující vazebný protein začlení do nově vznikajícího vlákna. Tento protein se váže s partnerskou molekulou (ligandem, protilátkou, jiným proteinem) s vysokou afinitou. Partnerská molekula je spojena s fluorescenčním barvivem nebo enzymem, který zprostředkuje chemiluminiscenci (např. alkalická fosfatáza).

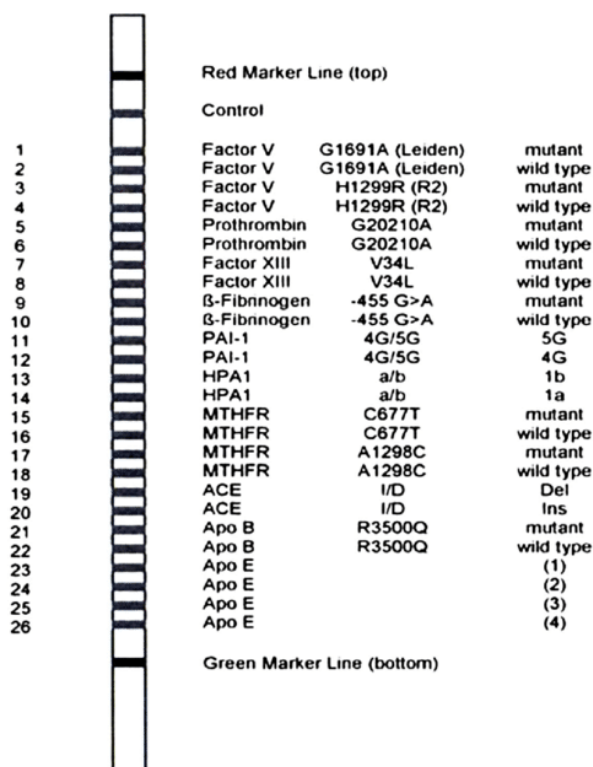
Další možností detekce je metoda SABC (streptavidin – biotin komplex) nebo ABC metoda (avidin – biotin komplex). Princip obou těchto metod je označení sekundární protilátky biotinem, na který se naváže SABC nebo ABC označený

křenovou peroxidázou. Enzymatická aktivita křenové peroxidázy způsobí vizualizaci hybridizace komplementárních genomových sekvencí (Zima, 2007).

Hybridizačních metod na pevných nosičích je celá řada, například hybridizace DNA či RNA na stripech, Northern blot, Southern blot, microarrays, hybridizace *in situ* atd.

2.9.7.1 Reverzní hybridizace na stripech

U této metody se jako pevný nosič využívá např. nitrocelulózový proužek – strip. Sondy jsou na proužku zobrazeny jako horizontální linky. Každá z těchto sond obsahuje mutovanou nebo běžnou sekvenci DNA. Produkt, který je hybridizován, je během PCR značen biotinem. Hybridizované produkty PCR se zbarví fialově po přidání alkalické fosfatázy konjugované se streptavidinem a chromogenního substrátu (obr. 10). Výsledek je viditelným pouhým okem (Matýšková, Čech, 2009).



Obr. 10 Strip Assay, převzato z <https://www.researchgate.net/>

3 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo zpracování rešerše a tím i práce s odbornou literaturou a vědeckými články na dané téma. To s sebou přináší prohloubení znalostí v této problematice. Neméně důležitou částí bylo i praktické zvládnutí popsaných metod – izolace DNA, PCR, RFLP-PCR, real-time PCR, reverzní hybridizace na stripech a seznámení se tak s chodem genetické laboratoře.

4 METODIKA

Laboratorní část této bakalářské práce byla vykonána v genetické laboratoři Genlabs s. r. o. pod odborným vedením mé školitelky Mgr. Dagmar Bystřické, PhD.

První část se věnuje izolaci DNA z bukalního stěru a periferní krve, přípravě gelové elektroforézy a druhá samotnému testování vzorků na faktor V Leiden. K testování byly použity metody RFLP – PCR, real-time PCR a reverzní hybridizace na stripech.

Přístroje použité u těchto metod - chladnička pro laboratorní použití, termostat, chlazená centrifuga, stolní minicentrifuga/vortex, mikrovlnná trouba, sada pipet, termocycler, fluorometr, laminární box, elektroforetický systém, iluminátor k pozorování elektroforézy a detekční systém na focení gelu.

4.1 *Izolace DNA*

Před každou výše jmenovanou metodou je nutné nejprve izolovat DNA. Tato izolace je nejčastěji prováděna z bukalního stěru nebo z lymfocytů periferní krve pacienta. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením a dali svolení pro použití jejich DNA k výzkumným účelům.

1. Izolace DNA z bukalního stěru

K izolaci genomové DNA z bukalního stěru byl použit DNA Isohelix DNA Isolation kit: DDK-3/DDK-50 dle doporučení výrobce.

Reagencie

- Lysis Buffer
- Proteinase K
- Capture Buffer
- Re-hydration Buffer

Spotřební materiál

- 1,5 ml mikrozkušavky

- Pipety, rukavice

Před počátkem izolace DNA bylo nutné připravit tři 1,5 ml zkumavky, Proteinase K vyndat z mrazicího boxu a nechat ji roztát při pokojové teplotě. Suchá lázeň byla nastavena na teplotu 60 °C. Zkumavky byly označeny číslem vzorku.

Postup izolace DNA z bukálního stěru

Do zkumavky s tamponem bukálního stěru bylo přidáno 500 µl Lysis Buffer a 20 µl Proteinase K. Takto připravený vzorek byl krátce zvortexován a zcentrifugován (DNA stabilizovanou tímto způsobem lze skladovat až tři a půl roku). Poté byl vzorek 60 minut inkubován v suché lázni temperované na 60 °C. Po skončení inkubační doby se zkumavka se vzorkem znovu krátce zvortexuje a zcentrifuguje a následně se 400 µl vzorku přepipetuje do jiné 1,5 ml zkumavky.

V dalším kroku bylo přepipetováno 400 µl supernatantu k již odebranému vzorku a přidáno 500 µl Capture buffer. Následovala centrifugace při 13 tisících ot./min po dobu 7 minut. Po této centrifugaci se odebere supernatant takovým způsobem, aby nebyla narušena vzniklá peleta DNA a zkumavka se znovu krátce zcentrifuguje. Po centrifugaci byl znovu odebrán zbylý supernatant a k peletě DNA bylo přidáno 30 - 150 µl Re-hydration buffer (podle potřebné koncentrace DNA – platí zde nepřímá úměra).

Vzorek byl poté inkubován 5 minut při pokojové teplotě. V dalším kroku následovalo krátké zvortexování zkumavky se vzorkem a centrifugace při 13 tisících ot./min. po dobu 15 minut a odebrání supernatantu obsahujícího DNA do 1,5 ml zkumavky. Izolovaná DNA byla uložena do mrazicího boxu a skladována při -20 °C.

2. Izolace DNA z plné krve

K izolaci genomové DNA z plné krve byl použit Genomic DNA Mini Kit dle doporučení.

Reagencie

- 96% ethanol
- GT Buffer
- W1 Buffer

- Wash Buffer
- Elution Buffer
- RBC Lysis Buffer

Spotřební materiál

- GD Column (kolonka)
- 2 ml Collection Tube (sběrná zkumavka)
- 1,5 ml mikrozkušavky
- Pipety, rukavice

Pro jeden vzorek byly připraveny dvě 1,5 ml mikrozkušavky – jedna pro lyzační reakci, druhou pro finální eluci. Zkušavky byly označeny.

Nejdříve bylo do označené 1,5 ml mikrozkušavky napipetováno 300 μ l plné krve a poté přidáno 900 μ l RBC Lysis Buffer. Zkušavka byla promíchána převrácením, nikoliv vortexováním. Následovala inkubace 10 minut při pokojové teplotě a centrifugace při 3 tis. ot./min. po dobu 5 minut. Z mikrozkušavky byl odstraněn supernatant a k peletě DNA bylo přidáno 100 μ l RBC Lysis Buffer. Dále bylo přidáno 200 μ l GB Buffer a vzorek byl zvortexován a krátce stočen. Opět následovala inkubace, tentokrát v termostatu při 60 °C po dobu 10 – 15 minut. Během inkubace je nutné zkušavku převracet každé tři minuty. Z chladicího boxu vyndáme 96% ethanol a přidáme ke vzorku, vortexujeme 10 s a krátce centrifugujeme. Obsah mikrozkušavky (lyzát) byl následně převeden na kolonku (GD Column), která je umístěna v čisté 2 ml sběrné zkušavce. Sběrná zkušavka s kolonkou byla centrifugována při 14 – 16 tis. ot./min. po dobu 5 minut. Po centrifugaci byla kolonka přendána do nové sběrné zkušavky a předchozí zkušavka byla vyhozena. Na kolonku bylo napipetováno 400 μ l W1 Buffer a poté byla se sběrnou zkušavkou centrifugována při 14 – 16 tis. ot./min po dobu 30 s. Poté byla ze sběrné zkušavky vylita tekutina, kolonka se vrátila zpět a bylo přidáno 600 μ l Wash Buffer. Kolonka se sběrnou zkušavkou byla centrifugována opět při 14 – 16 tis. ot./min. po dobu 30 s. Ze sběrné zkušavky byla vylita tekutina a kolonka se vrátila zpět a následovala zase centrifugace při 14 – 16 tis. ot./min. po dobu 3 min. Centrifugaci bylo nutné opakovat dokud nebyla kolonka úplně suchá.

Suchá kolonka s navázanou DNA byla převedena do 1,5 ml zkušavky a přímo na filtr bylo přidáno 100 μ l Elution Buffer přehřátého na 60 °C. Kolonka byla

inkubována po dobu tří minut při pokojové teplotě a opět zcentrifugována při 16 tisících ot./min. 30 s.

Následovalo měření koncentrace DNA. DNA byla uložena v chladícím boxu pro pozdější použití, a to maximálně po dobu 24 hodin nebo v mrazícím boxu při -20 °C k archivaci.

4.2 Měření koncentrace DNA

Koncentrace izolované DNA byla provedena na přístroji Qubit® 2.0 Fluorometer. Naměřené hodnoty jsou udávány v ng/μl a příklad hodnot izolace z bukálního stěru vs. periferní krev je vidět v tabulce č. 5. Z tabulky je patrné, že způsob odběru biologického materiálu nemá vliv na výslednou koncentraci izolované DNA.

Tab. 5 Koncentrace DNA ve vybraných vzorcích

Číslo vzorku	Typ vzorku	Koncentrace DNA (ng/μl)
1/16	Periferní krev	21,2
2/16	Periferní krev	12,9
24/16	Bukální stěr	91,2
25/16	Bukální stěr	19,3
30/16	Periferní krev	34,6
33/16	Periferní krev	14,8
38/16	Bukální stěr	16,2
39/16	Bukální stěr	27,2
40/16	Bukální stěr	26,8
76/16	Periferní krev	43,0

4.3 Real-time PCR

Metoda byla provedena za pomoci soupravy GeneProof Factor V Leiden PCR Kit dle doporučení výrobce.

Reagencie

- Master Mix FV Leiden
- Positive Control – FV Leiden wild type

- Positive Control – FV Leiden mutant
- Positive Control – FV Leiden heterozygote

Příprava PCR

Do PCR zkumavek bylo napipetováno 18 μ l MaterMixu a 2 μ l izolátu nukleových kyselin. Zkumavky s reakční směsí byly uzavřeny, krátce zcentrifugovány a vloženy do přístroje LightCycler, kde probíhala amplifikace dle následujícího:

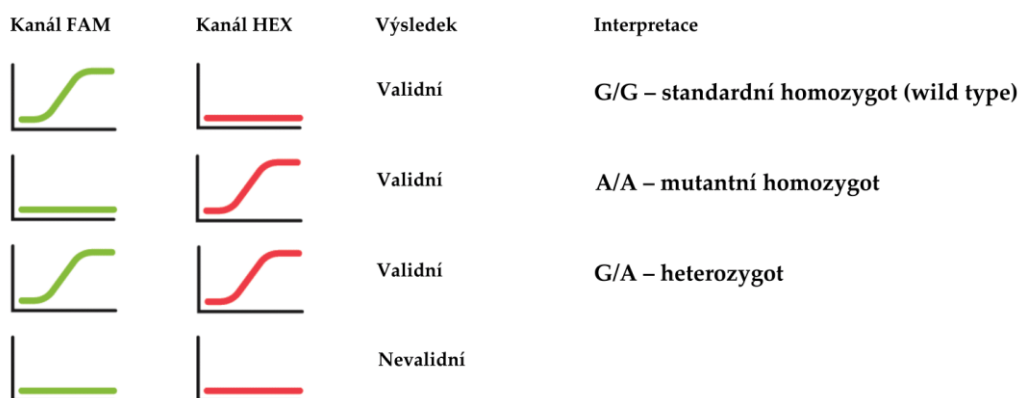
Tab. 6 Amplifikační program

Stupeň	Teplota	Čas	Sběr dat	Cykly
1. Hold	95 °C	10 min		1
2. PCR	95 °C	10 s	FAM + HEX	40
	64 °C	20 s		
	72 °C	20 s		

(GeneProof Factor V Leiden Kit příbalový leták, 2015)

Vyhodnocení výsledků

Po uplynutí doby amplifikace byly výsledky zhodnoceny za pomoci počítačového programu.



Obr. 11 Vyhodnocení výsledků amplifikačního programu, převzato z GeneProof Factor V Leiden Kit příbalový leták, 2015

4.4 RFLP-PCR

Pro přípravu PCR reakce byl použit kit MyTaqTM Red DNA Polymerase a PCR BIO HS Taq Mix, oba dle doporučení výrobce. Pro zvýšení výtěžnosti PCR reakce byl použit dimethylsulfoxid (DMSO).

Reagencie

- MyTaqTM Red DNA Polymerase
- Primer LEI_for
- Primer LEI_rev
- H₂O Aqua pro injectione
- DMSO

Sekvence primerů

FVL forward: 5'-GGA ACA ACA CCA TGA TCA GAG CA-3'
FVL reverse: 5'-TAG CCA GGA GAC CTA ACA TGT TC-3'

Příprava mixu pro PCR reakci probíhala v laminárním boxu, aby se zamezilo jakékoliv kontaminaci. Reagencie a izoláty DNA byly předem vyndány z mrazicího boxu, aby roztály a mohly být použity pro master mix. Do chladicího stojanu bylo připraveno potřebné množství mikrozkušavek (0,2 ml), které byly označeny číslem vzorku (LIČ) a k tomuto množství ještě dvě mikrozkušavky, které sloužily jako pozitivní a negativní kontrola PCR reakce a dále zkumavka (případně zkumavky) o objemu 1,5 ml. Do této zkumavky byl namíchán master mix za použití příslušného množství reagensů.

Reakční PCR mix

- | | |
|--------------------------------|---------|
| • H ₂ O | 33,3 µl |
| • 5x MyTaq Red Reaction Buffer | 10 µl |
| • MyTaq Polymerase (1U/ µl) | 0,2 µl |
| • DMSO 5% | 2,5 µl |
| • Primer LEI_for (20 pmol/µl) | 1 µl |
| • Primer LEI_rev (20 pmol/µl) | 1 µl |

• 46

•

•

•

- Celkem 48 μ l
- DNA 2 μ l

V případě master mixu byl ještě použit 2x PCRBIO HS Taq Mix od společnosti PCR Biosystems Ltd. Množství reagensů je uvedeno níže.

Reakční PCR mix

- 2x PCRBIO HS Taq Mix 12,5 μ l
- Forward primer 0,5 μ l
- Reverse primer 0,5 μ l
- H₂O Doplnit do 25 μ l
- DNA 2 μ l

Ze zkumavky, kam byl namíchán konkrétní master mix bylo do připravených zkumavek na vzorky rozpipetováno 48 μ l master mixu (v případě použití 2x PCRBIO HS Taq Mix 25 μ l). Do každé této mikrozkušavky byly přidány ještě 2 μ l DNA včetně pozitivní kontroly a v případě negativní kontroly 2 μ l H₂O. Zkušavky byly pečlivě uzavřeny, krátce zvortexovány a stočeny. Poté byly vloženy do termocycleru a byl spuštěn příslušný reakční program Leiden (viz tab. 7 a 8).

Tab. 7 Reakční protokol PCR MyTaqTM Red DNA Polymerase

	Čas	Teplota
1 cyklus		
Počáteční denaturace	5 min	95 °C
35 cyklů		
Denaturace	15 s	95 °C
Annealing	15 s	55 °C
Extenze	10 s	72 °C
1 cyklus		
Terminální extenze	5 min	72 °C

Tab. 8 Reakční protokol PCR PCRBIO HS Taq Mix

	Čas	Teplota
1 cyklus		
Počáteční denaturace	5 min	95 °C
40 cyklů		
Denaturace	15 s	94 °C
Annealing	15 s	55 °C
Extenze	60 s	72 °C
1 cyklus		
Terminální extenze	5 min	72 °C

Přečištění PCR produktu

Reagencie

- 96% ethanol
- 70% ethanol
- H₂O

K 45 µl PCR produktu bylo přidáno 250 µl 96% ethanolu a výsledná směs byla inkubována při pokojové teplotě dvě hodiny (je možné i déle). Následně byla provedena centrifugace při 13500 ot./min. po dobu 30 minut. Poté byl ze zkumavky odpipetován ethanol tak, aby peleta DNA nebyla narušena. K peletě bylo přidáno 100 µl 70% ethanolu a znovu následovala centrifugace při 13500 ot./min. po dobu 5 minut. Po vyndání z centrifugy byl ethanol znovu pečlivě odpipetován a peleta se nechala při pokojové teplotě vysušit. Následně byla peleta rozpuštěna v 10 – 20 µl H₂O.

Restrikční štěpení

Reagencie

- Restrikční enzym Mnl I (5U/µl)
- 10x NEBuffer (restrikční pufr)

Než byla započata práce, z mrazicího boxu byl vyndán restrikční pufr a nechal se při pokojové teplotě rozmraznout.

Pro restriční štěpení byly připraveny nové mikrozkušavky, do kterých bylo napipetováno 8 μ l přečištěného PCR produktu. K PCR produktu byl přidán 1 μ l restriční enzym Mnl I (5 U/ μ l) a 1 μ l 10x NEBuffer.

Zkušavky byly inkubovány v termostatu, který byl temperován na teplotu 37 °C, po dobu 45 – 60 minut.

Po restričním štěpení byla provedena elektroforéza. Množství 10 – 15 μ l štěpeného PCR produktu bylo promícháno s 2 μ l vkladacího pufru a napipetováno do jamek v gelu. Elektroforéza probíhala při napětí 135 V, po dobu 15 minut. Průběh elektroforézy byl sledován díky iluminátoru. Po uplynutí času se elektroforéza automaticky vypne a gel je vložen do detekčního systému, kde probíhá vyhodnocení (tab. 9).

Tab. 9 Referenční hodnoty faktoru V Leiden

PCR produkt	Štěpený PCR produkt	Výsledný genotyp
287 bp	157 + 130 + 93 + 37 bp	Heterozygot
287 bp	157 + 93 + 37 bp	Nemutovaný homozygot (wild type)
287 bp	157 + 130 bp	Mutovaný homozygot

Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je důležitou součástí použitých metod, kdy se používá nejen ke kontrole velikosti produktů PCR, ale v případě metody RFLP-PCR slouží k zobrazení výsledků restričního štěpení.

Principem gelové elektroforézy je pohyb v elektrickém poli. Záporně nabitě molekuly DNA se pohybují směrem k anodě. Nositel náboje u nukleových kyselin je především fosfátová skupina. V případě gelové elektroforézy se molekuly oddělují na základě jejich velikosti – malé postupují rychleji, velké pomaleji – nezávisle na tom, jaká je koncentrace DNA v jednotlivých vzorcích.

Reagencie

- Crystal 10xTBE Buffer – prášek
- 10x TBE – roztok připravený z 10xTBE Buffer
- Pracovní roztok 1x TBE (50 ml 10x TBE a 450 ml destilované vody)

- Agarózový prášek
- DNA Loading Buffer Blue
- Midori Green Advanced DNA Stain*
- 100 bp DNA LADDER H3RTU*

Příslušný počet agarózových tablet (1 tableta = 0,5 g agarózy) byl vhozen do min. 100 ml kádinky a dolito 1x TBE pufrem. Množství roztoku záleží na požadované velikosti gelu, tzn. pro malý gel bylo použito 50 ml roztoku, pro velký gel 100 ml. Počet vhozených agarózových tablet určuje koncentraci gelu – 1 tableta/50 ml = 1% gel, 2% tablety/50 ml = 2% gel atd. Pro účely této práce byl připravován 4% gel. Tablety bylo zapotřebí úplně rozpustit a kádinku poté zahřát v mikrovlnné troubě po dobu 3 minut na maximální ohřev. Proces zahřátí byl minimálně dvakrát opakován do doby, než bylo dosaženo co nejmenšího počtu bublin a tablety úplně rozpuštěny.

Do roztoku byla přidána Midori Green Advanced DNA Stain a to 12 μ l, gel se s barvičkou rozmíchal a nechal krátce zchladnout. V průběhu byla připravena elektroforetická podložka s hřebeny, které určují počet jamek v agarózovém gelu. Připravený gel byl nalit na tuto podložku. Po 10 – 15 minutách byly hřebeny vyndány a gel byl vložen do elektroforetické vany s 1x TBE pufrem. Gel musí být zcela ponořen.

Do první nebo poslední jamky bylo napipetováno 5 μ l 100 bp DNA LADDER H3RTU, který slouží jako marker pro kontrolu velikosti PCR produktů.

Samotná elektroforéza probíhala při 100 – 135 V, 10 – 15 minut. Za pomoci iluminátoru MUPIDTM Led bylo možno sledovat průběh celé elektroforézy, a to díky použité barvě Midori Green.

Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen na detekční systém FastGene® GelPic LED Box. Díky tomuto světelnému boxu můžeme výsledek elektroforézy vyfotografovat a pomocí paměťové karty přenést do počítače k dalšímu zhodnocení.

4.5 Reverzní hybridizace na stripech

Reagencie

- Amplification mix
- Taq DNA polymerase

- Taq Dilution Buffer
- DNAT
- Hybridization Buffer
- Wash Solution Buffer A
- Conjugate Solution
- Wash Solution Buffer B
- Color Developer

Před samotnou hybridizací bylo potřeba izolovanou DNA amplifikovat za pomoci PCR. Pro každý vzorek byly do chladícího stojánku připraveny dvě mikrozkušavky. Do těchto mikrozkušavek byl namíchán PCR mix A a B (tab. 10 a 11).

Tab. 10 Reakční mix A

Reagencie	Množství pro jednu reakci
Amplification Mix A (žluté víčko)	15 μ l
Taq DNA polymerase (naředěná)	5 μ l
DNA	5 μ l

Tab. 11 Reakční mix B

Reagencie	Množství pro jednu reakci
Amplification Mix B (zelené víčko)	15 μ l
Taq DNA polymerase (naředěná)	5 μ l
DNA	5 μ l

Zkušavky s PCR mixem byly pečlivě uzavřeny, zvortexovány, krátce stočeny a následně vloženy do termocycleru, který byl temperován na 94 °C. Byl spuštěn příslušný reakční protokol (tab. 12).

Tab. 12 Reakční protokol PCR

	Čas	Teplota
1 cyklus		
Denaturace	2 min.	94 °C
35 cyklů		
Denaturace	15 s	94 °C
Annealing	30 s	58 °C
Extenze	30 s	72 °C
1 cyklus		
Terminální extenze	3 min.	72 °C

Po skončení PCR byla provedena kontrola PCR produktů na 4% agarózovém gelu. Do jamek v gelu bylo napipetováno 5 µl každého vzorku, do první nebo poslední jamky marker a byla spuštěna elektroforéza při napětí 135 V po dobu 10 minut.

Mezitím byla přehřáta lázeň na 45 °C a na stejnou teplotu bylo nutné zahřát i Hybridization Buffer a Wash Solution A. Do promývacího korýtka, které se k hybridizaci používá, bylo napipetováno 10 µl DNAT a 10 µl PCR produktu. Směs byla pipetou promíchána a inkubována při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Poté byl do každého korýtka přidán 1 ml Hybridization Buffer a testovací strip čárkami nahoru. Podnos s promývacími korýtky byl vložen do vyhřáté lázně se třepačkou a inkubován při teplotě 45 °C po dobu 30 minut.

Následovalo promývání, kdy byl z každého korýtka odpipetován všechnen roztok a bylo přidáno 1 ml Wash Solution A. Roztok byl znovu odpipetován a přidán opět Wash Solution A. Podnos byl opět vložen do lázně se třepačkou a inkubován po dobu 15 minut při 45 °C. Tento krok byl proveden ještě jednou.

Pro barvení proužků bylo nutné odpipetovat všechnen Wash Solution A a poté byl přidán 1 ml Conjugate Solution. Inkubace probíhala za pokojové teploty po dobu 15 minut za stálého míchání. Po skončení inkubace byl konjugát odpipetován a testovací proužky promyty za pomoci Wash Solution B. Po promytí byl do každého korýtka přidán 1 ml Wash Solution B a následovala inkubace po dobu 5 minut. Tento krok byl ještě jednou zopakován a pak byl přidán 1 ml Color Developer. Inkubace probíhala 15 minut za pokojové teploty na temném místě. Testovací stripy byly opláchnuty destilovanou vodou a osušeny ve tmě.

Pokud došlo k hybridizaci k cílové sondě umístěné na stripu, proužek zfialověl. Výsledky bylo možné odečítat po srovnání testovaného proužku s šablonou.

5 VÝSLEDKY

Vzorky určené k diagnostice Leidenské mutace byly testované za pomoci tří metod uvedených v praktické části této práce. Konkrétně se jednalo o metodu real-time PCR, RFLP-PCR a reverzní hybridizaci na stripech.

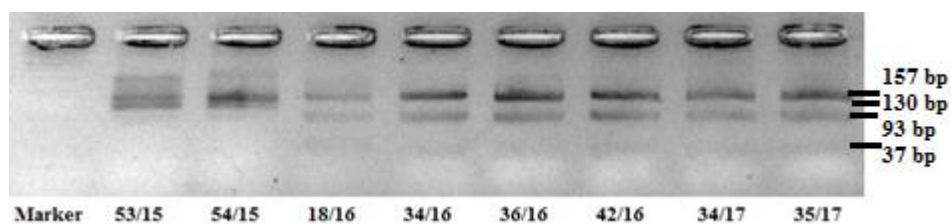
Vzorky určené k detekci Leidenské mutace byly použity také jako materiál pro statistické zpracování.

5.1 Metoda real-time PCR

Touto metodou byly vyšetřeny čtyři vzorky. Výsledek této metody byl odečten za pomoci počítačového softwaru, který zobrazuje výsledky PCR v reálném čase.

5.2 Metoda RFLP-PCR

Výsledky této metody jsou zobrazovány pomocí gelové elektroforézy. Nejdříve se zkontroluje PCR produkt a posléze výsledek restriční štěpení tohoto produktu (obr 12, tab. 13). Metodou RFLP-PCR bylo testováno celkem 31 vzorků.



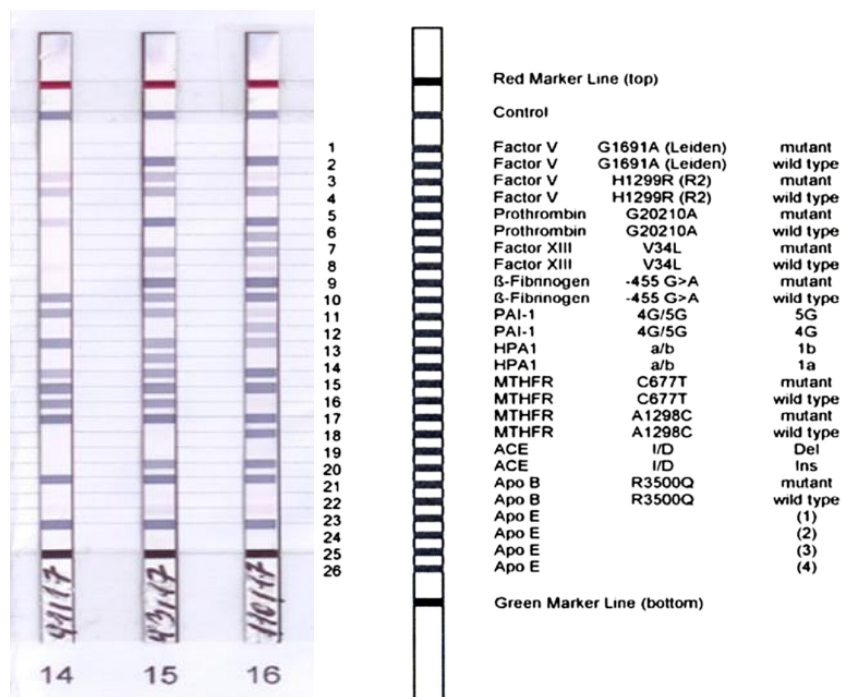
Obr. 12 Kontrola restriční štěpení na 4% agarózovém gelu

Tab. 13 Výsledek RFLP-PCR

Vzorek	Výsledek restrikčního štěpení	Genotyp
53/15	157 + 130 + 93 + 37 bp	Heterozygot
54/15	157 + 130 + 93 + 37 bp	Heterozygot
18/16	157 + 93 + 37 bp	Nemutovaný homozygot (wild type)
34/16	157 + 93 + 37 bp	Nemutovaný homozygot (wild type)
36/16	157 + 93 + 37 bp	Nemutovaný homozygot (wild type)
42/16	157 + 93 + 37 bp	Nemutovaný homozygot (wild type)
34/17	157 + 93 + 37 bp	Nemutovaný homozygot (wild type)
35/17	157 + 93 + 37 bp	Nemutovaný homozygot (wild type)

5.3 Metoda reverzní hybridizace na stripech

Reverzní hybridizací byly vyšetřovány tři vzorky. Testovací proužky, které jsou používány k této metodě, se při hybridizaci zabarví fialově a výsledky jsou tak pozorovatelné pouhým okem (obr. 13).



Obr. 13 Výsledky reverzní hybridizace na stripech

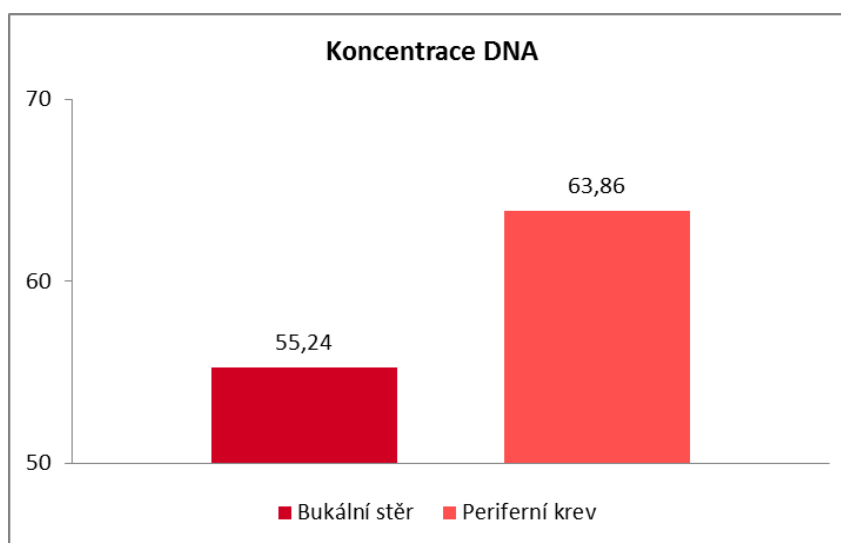
5.4 Statistika

Tato práce shrnuje data testování Leidenské mutace z období leden 2014 – leden 2017.

Nejprve byly porovnány výsledky měření koncentrace DNA z bukálního stěru a z periferní krve. Počet vzorků odebraných bukálním stěrem byl 61, počet vzorků z periferní krve činil 48. V grafu níže můžeme vidět, že koncentrace DNA byla ve vzorcích z periferní krve průměrně vyšší téměř o 10 ng/μl (graf 1). Tabulka 15 také shrnuje naměřené minimum a maximum koncentrace DNA u jednotlivých odběrů.

Tab. 14 Statistické hodnoty koncentrace DNA

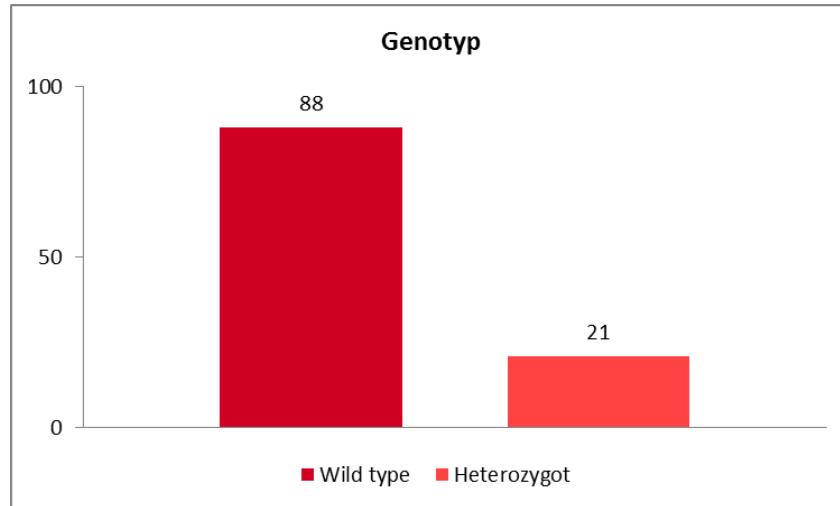
	Bukální stěr	Periferní krev
Počet	61	48
Průměr	55,24	63,86
Minimum	0,50	5,56
Maximum	600	600



Graf 1 Průměr koncentrace DNA

Dalším statistickým údajem, který je použit v této práci, je výsledný genotyp všech testovaných vzorků. Počet vzorků, které byly testovány, je z období leden 2014 – leden 2017. Celkem se jedná o 109 vzorků, kdy většina z nich byla primárně testována na Leidenskou mutaci a u některých se Leidenská mutace prokázala například při reverzní hybridizaci na stripech, kde je možné vidět více mutací najednou. Třetí část z této

skupiny byly vzorky, které byly testovány například pro polymorfismy v genu pro MTHFR, avšak byly použity pro účel této bakalářské práce a otestovány též na Leidenskou mutaci (graf 2).



Graf 2 Výsledný genotyp

Z grafu je patrné, že tzv. záchyt Leidenské mutace notně převyšuje celorepublikový a dalo by se říci i celoevropský průměr. Zatímco v ČR je prevalence onemocnění cca 5% (v literatuře se uvádí rozpětí 5 – 15%, někde až 20%), v případě této statistiky je 22,89%.

6 DISKUSE

Faktor V Leiden neboli Leidenská mutace se poprvé objevil v kavkazské populaci asi před 30 000 – 40 000 lety. Předpokládá se, že mutace měla v severských podmínkách, kdy hrozí větší riziko hemoragického šoku určitý důvod, a to především ochranu před vykrvácením při zranění a u žen zase menší ztrátu krve při porodu. V dnešní době má tato mutace také svou geografickou specifitu. Ve větší míře se vyskytuje v severských zemích, a čím jižněji - například Španělsko nebo Itálie, tím je její výskyt nižší. Výjimku tvoří Řecko. V černošské a asijské populaci se téměř nevyskytuje.

V současné době se jedná o jednu z nejčastějších hereditárních trombofilních mutací a vyšetření této mutace jsou velmi frekventovaná. Ačkoliv jsou indikační kritéria poměrně přísná, přichází spousta pacientů – samoplátců s požadavkem na vyšetření právě Leidenské mutace. Vzhledem ke komplikacím, které může způsobit, je tento trend příznivý.

Testování Leidenské mutace je v různých laboratořích odlišné, podle údajů z Národní referenční laboratoře je nejvíce zastoupena metoda alelické diskriminace s fluorescenční detekcí (39%), dále alelově specifická PCR s různou detekcí (31%), RFLP-PCR (17%), HRM analýza (7%) a nakonec real-time PCR (5%).

V případě metody RFLP-PCR v této práci bylo nutné některé vzorky testovat dvakrát, protože při prvním odečtení výsledků na agarózovém gelu nebylo patrné, zda se jedná o alelu wild type, heterozygota, či mutovaného homozygota. Při posledním pokusu, kdy se opakovala detekce mutace v některých již testovaných vzorcích, došlo také ke změně použitého PCR mixu. Výsledky byly poté jasně čitelné.

Ve výsledcích této bakalářské práce je zakomponována statistika, která zpracovává data sesbíraná v období leden 2014 – leden 2017 v laboratoři GENLABS s. r. o. Celkově bylo ve statistice použito 109 vzorků, u kterých byla testována Leidenská mutace. Byl porovnán způsob odběru a jeho vliv na koncentraci DNA. V případě bukalního stěru záleží na kvalitě odběru, která může ovlivnit koncentraci DNA. Dále byl sledován výsledný genotyp u testovaných vzorků. Co se týká rozdílu prevalence v populaci a počtu pozitivních záchytů z laboratoře, důvodem může být nízký počet testovaných vzorků a celorepublikové číslo také nemusí být přesné.

Metody použité pro detekci Leidenské mutace v této práci se v několika ohledech liší. Pokud tyto metody srovnáme z hlediska časového a finančního, nejdelší

metoda je reverzní hybridizace na stripech, kdy je potřeba nejprve amplifikovat izolovanou DNA, zkontrolovat PCR produkt na agarózovém gelu a pak provést hybridizaci samotnou. Výhodou metody je její citlivost a široké spektrum použití - v jedné reakci můžeme otestovat více mutací. Metoda je ovšem poměrně drahá.

Oproti tomu metoda real-time PCR je rychlejší alternativou, ale nevýhoda této metody spočívá ve vyšších nákladech a nárocích na technické vybavení laboratoře, z porovnávaných metod je nejdražší.

RFLP-PCR je časově náročnější, je zapotřebí izolovanou DNA amplifikovat pomocí PCR, produkt zkontrolovat elektroforeticky, provést štěpení a výsledek tohoto štěpení odečíst za pomoci elektroforézy. Metoda je ovšem nejpřesnější a také nejlevnější ze všech tří porovnávaných.

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo sepsat rešerši na dané téma a následně praktické zvládnutí molekulárně-biologických metod, které se zcela běžně používají k detekci Leidenské mutace.

V teoretické části mé bakalářské práce jsem se nejprve soustředila na popis fyziologie hemostázy, aby bylo zřetelné, jak taková mutace na tento systém působí. Součástí rešerše je i ucelený přehled o rizicích, které jdou ruku v ruce s Leidenskou mutací, včetně vlivu na užívání hormonální antikoncepce a těhotenství. Následně jsou zde popsány nejběžnější metody k detekci Leidenské mutace z teoretického hlediska.

V praktické části práce jsem uvedla několik genetických metod vhodných pro testování Leidenské mutace, a to real-time PCR, RFLP-PCR a reverzní hybridizaci na stripech.

8 POUŽITÉ ZDROJE

1. AIACH, M., GANDRILLE, S; EMTNERICH, J.: *A review of mutations causing deficiencies of antitrombin, protein C, protein S*. Thromb. Haemost. 74, 1995, s. 81-89 .
2. AMIRAL J., CROSLEY, M., MIMILLA, F. et al: *Monoclonal antibodies to different neo- epitopes as fibrinogen and fibrin degradations products*. Blood Coag. Fibrinolysi s I, 1990, s. 447--452.
3. BAROWCLIFF, T., THOMAS, D. P.: *Antithrombin III and heparin*. In: Bloom, A. L., Thomas. D. P., eds. Haemostasis and Thrombosis. Second edition. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987, s. 849
4. BERTINA, R.M., KOELEMAN, B.P., KOSTER, T., et al. *Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C*. Nature 1994; 369:64–67
5. COLTNAN, R., HIRSH, K., MARDER; V. J. et al.: *Hemostasis and Thrombosis*, New York 2001, Lippincott Williams and Wilkins.
6. DAHLBÄCK, B., CARLSSON, M., SVENSSON, P. J. *Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C*. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:1004 –1008
7. DAVIE et al.: *The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation*. Biochemistry 30, 1991, s. 10363-10370.
8. DEBIZE, C., MASSIGNON, D., COUER; P.: *Antiphospholipid antibodies and thrombotic risk: relationship to thrombomodulin, D-dirners and prothrombin fragment 1 + 2*. Nouv. Rev. Fr. Hématol. 37, 1995, Suppl II, s. 93- 96.

9. DEVINE, D., BRIGDEN, M. L.: *The antiphospholipid syndrome: When does the presence of antiphospholipid antibodies require therapy?* Postgrad. Med. 99, 1996, č. 6, S. 105-108.
10. DYR J., BLOMBICK, B., HESSEL, B. et al.: *Conversion of fibrinogen to fibrin induced by pronaal release of fibrinopeptide B.* Biochim. Biophys. Acta 990, 1989, s. 18-24.
11. FERRIE, R. M., M. J. SCHWARZ, N. H. ROBERTSON, S. VAUDIN, M. SUPER, G. MALONE a S. LITTLE. *Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene.* Am. J. Hum. Genet. 1992, 51(2), 251-262.
12. GALAJDA, P., BALÁŽ, D., MOKDŮ, M., KUBISZ, P.: *K problematice nového modelu hemostázy.* Vnitřní lékařství 44, 1998, Č. II, s. 671- 674.
13. HAYDEN, M. J. et al. *Multiplex-Ready PCR: A New Method for Multiplexed SSR and SNP Genotyping.* BMC Genomics 9 (2008): 80. PMC.
14. HEIMARK, R. L., KURACHI, K., FUJIKAWA, K., DAVIE, E. W: *Surface activation of blood coagulation, fibrinolysis and kinin formation.* Nature 286, 1980, s. 456-460.
15. CHOTTOVÁ DVOŘÁKOVÁ M. *Hematologie pro zubní lékařství.* 2015
16. KUJOVICH, J. L.: *Factor V Leiden thrombophilia.* Genetics IN Medicine, Volume 13, č. 1, 2011
17. LECHNER, K. KYRLE, P. A.: *Antitrombin III concentrates - are they clinically useful?* Thromb. Haemost. 83, 1995, Č. 3, s. 340-348.

18. LEVY-TOLEDANO, S., GALLET, C., NADAL, F. et al.: *Phosphorylation and dephosphorylation mechanism in platelet function a tightly regulated balance.* Thromb . Haemost. 78, 1997, s. 226-227.
19. MARTINELLI, I., BOTTASSO, B., DUCA, F., FAIONI, E., MANNUCCI, P.M. *Heightened thrombin generation in individuals with resistance to activated protein C.* Thromb Haemost 1996; 75:703–705)
20. MATÝŠKOVÁ, M., ČECH, Z. *Warfarin a farmakogenetika.* Klin. Biochem. Metab. 2009, 17(38), 215-219.
21. MAZOYER, E., RIPOLL, L., GUEGUEN, R., et al. *Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutation in a large French population selected for nonthrombotic history: geographical and age distribution.* Blood Coagul Fibrinolysis 2009; 20:503–510.
22. MILLER, G. J., MARTIN, J. C., MITROPOULOS, K. A. et al.: *Activation of factor VII during alimentary lipemia occurs in healthy adults and patients with congenital factor XII or factor XI deficiency, but not in patients with factor IX deficiency.* Blood 87, 1996, s. 4187-4196.
23. MUSIL, D. *Hluboká žilní trombóza – minimum pro praktické lékaře.* Med. Pro Praxi. 2009, 6 (5), 231-234.
24. NEMERSON, 2. : *The tissue factor pathway of blood coagulation.* Sem. Hematol. 29, 1992, Č . 3, s. 170-176.
25. PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu.* Český Těšín: Finidr, 2004. ISBN 80-86682-00-5.

26. PENKA, M., BULIKOVÁ, A.. *Neonkologická hematologie*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2299-3.
27. POORT, S. R., ROSENDALL, F R., REITSMA, P. H., BERTINA, R. M.: *A common genetic variation in the 3-utruncated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis*. Blood 88, 1996, s. 3698- 3703.
28. POUL, H. *Trombofilní stavy významné v patogenezi žilní tromboembolické nemoci*. Vnitřní lékařství: časopis České internistické společnosti a Slovenskej internistickej spoločnosti. Praha, 2006, 52(S1), 17-25. ISSN 0042-773X.
29. REES, D.C., COX, M., CLEGG, J.B. *World distribution of factor V Leiden*. Lancet 1995; 346:1133–1134.
30. REITSMA, P. H., BERNARDI, F, DOIG, R. G., GANDRILLE, S., GREENGARD, J. S., IRELAND, H. et al.: *Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update*. Thromb. Haemost. 73, 1995, S. 876-889.
31. RIDKER, P. M., HENNEKENS, CH, LINDPAINTNER, K., STAMPFER M. J., EISENBERG P. R., Miletich J. P. *Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men*. N Engl J Med 1995; 332:912–917
32. RIDKER, P. M., MILLETICH, J. P., HENNEKENS, C. H., BURING, J. E. *Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening*. JAMA 1997; 277:1305–1307

33. SEGERS, K., DAHLBÄCK, B., NICOLAES, G. A. *Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms*. Thromb Haemost 2007; 98:530 – 542)
34. SPRAGGON, C. et al.: *The crystal structure of the catalytic domain of human urokinase - type plasminogen activator*. Structure 3, 1995, s. 681-691.
35. SUSSMAN , F. F.: *Normal pathways of coagulation*. Sem. Hemato!. 29, 1992, Č. 3, s. 157-158.
36. TOLLEFSEN, D. M.: *Insight into to mechanism of action of Heparin Cofactor II*. Review Article. Thromb. Haemost., 74, 1995, Č. 5, s. 1209-1214.
37. WEISS, H. J., TURITTO, V. T., BAUMGARTNET; H. R., NEMERSON, Y., HOFFMANN, T.: *Evidence for the presence of tissue factor activity on subendotelium*. Blood 73, 1989, s. 968- 975.
38. ZIMA, T. *Laboratorní diagnostika. 2., dopl. a přeprac. vyd.* Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-372-3.

Internetové zdroje

1. FONTANA, J., LAVRÍKOVÁ, P. *Hemostáza* [online]. [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/v-krev-a-organy-imunitniho-systemu/4-hemostaza/>
2. *Generi biotech* [online]. [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <http://www.generi-biotech.com/sondy-hybridizacni-sondy>
3. *IKEM* [online]. [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <http://www2.ikem.cz/www?docid=1005912>
4. *IKEM* [online]. [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <http://www2.ikem.cz/www?docid=1005973>

5. *Iкта* [online]. [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <http://www.ikta.cz/index.php?pg=home--cevni-mozkova-prihoda-iktus>
6. *National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp>
7. *National Institutes of Health* [online]. [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/F5>
8. *Wikimedia* [online]. [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:RFLP_mapping.svg