

Frekvence nových trombofilních mutací antitrombinu (SERPINC1) (IVS +141G>A), glykoproteinu GPVI (Ser219Pro) a cytochromu CYP4V2 (Lys259Gln) u zdravých osob středního věku v oblasti středních Čech

J. Kvasnička¹, J. Hájková¹, P. Bobčíková¹, T. Kvasnička¹, D. Dušková², Š. Poletínová², V. Kieferová²

¹ Trombotické centrum a Centrální hematologické laboratoře, přednosta prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc., Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty UK a VFN v Praze, přednosta prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA

² Fakultní transfúzní oddělení VFN v Praze, přednostka prim. MUDr. Daniela Dušková

Souhrn: Cíl: Primárním cílem bylo zjistit frekvenci alel a genotypů nových polymorfismů spojovaných podle GWAS studií s výskytem žilní trombózy u zdravých osob kavkazské rasy v regionu středních Čech. Metody: Genotypizace trombofilních mutací SERPINC1 IVS +141G>A, GP6 13254T>C a CYP4V2 (Lys259Gln) byla provedena u 1 527 zdravých osob pomocí robotické izolace DNA a následnou amplifikací PCR s analýzou křivky tání (LightCycler 480 System, Roche). Výsledky: Frekvence rizikové alely A polymorfismu SERPINC1 (IVS +141G>A) byla u sledovaného souboru 11,3 % a frekvence genotypů byla GG 78,36 %, GA 20,66 % a AA 0,98 %. Frekvence rizikové alely T polymorfismu GP6 13254T>C byla 87,7 % a frekvence genotypů TT 77,14 %, TC 21,15 % a CC 1,70 %. Frekvence rizikové alely A polymorfismu CYP4V2 (Lys259Gln) byla 65,2 % a frekvence genotypů CC 12,25 %, CA 45,12 % a AA 42,63 %. U obou pohlaví se tyto frekvence nelišily. Závěr: Zjištěné frekvence genotypů a alel potvrzují relativně vysokou prevalenci dalších hereditárních trombofilií v regionu střední Čechy. Jejich klinický význam však zatím není plně znám.

Klíčová slova: SERPINC1 (IVS +141G>A) – GP6 (13254T>C) – CYP4V2 (Lys259Gln) – prevalence – střední Čechy

Frequencies of the new thrombophilic mutations of antithrombin (SERPINC1) (IVS +141G>A), glycoprotein GPVI (Ser219Pro) and cytochrome CYP4V2 (Lys259Gln) in healthy middle-aged people in Central Bohemia

Summary: Objective: The aim of study was to determine frequencies of alleles and genotypes of new thrombophilia polymorphisms associated according to GWAS studies with venous thrombosis in Caucasian healthy people in Central Bohemia. Methods: Genotyping of thrombophilic mutations SERPINC1 IVS +141G>A, GP6 13254T>C and CYP4V2 (Lys259Gln) was performed in 1,527 healthy subjects using a robotic DNA isolation and subsequent PCR amplification with melting curve analysis (LightCycler480 System, Roche). Results: For the reference group was the frequency of risk allele A of SERPINC1 (IVS +141G>A) polymorphism 11.3% and frequencies of genotypes were GG 78.36%, GA 20.66% and AA 0.98%. Frequency of risk allele T of GP6 13254T>C polymorphism was 87.7% and frequencies of genotypes were TT 77.14%, TC 21.15% and CC 1.70%. Frequency of risk allele A of CYP4V2 polymorphism (Lys259Gln) was 65.2% and frequencies of genotypes were CC 12.25%, CA 45.12% and AA 42.63%. Those frequencies were not differ for both genders. Conclusion: The results confirm relatively high prevalence of other hereditary thrombophilia polymorphisms in Central Bohemia. But their clinical significance is not fully known yet.

Key words: SERPINC1 (IVS +141G>A) – GP6 (13254T>C) – CYP4V2 (Lys259Gln) – prevalence – Central Bohemia

Úvod

V etiopatogenezi tromboembolické nemoci (TEN) se, jak známo, neuplatňuje jen jeden rizikový faktor, ale jedná se o onemocnění multifaktoriální [1]. Dochází zde k interakci mezi různými získanými rizikovými faktory (jako je trauma, hormonální léčba, gravidita aj.) a vlivy genetickými [2]. Při určení výše rizika vzniku žilního tromboembolizmu spojeného s výskytem genetických mutací lze vycházet z výsledků zatím nejroz-

sáhlejší metaanalytické studie Gohila et al [3]. Zahrnuje výsledky 173 studií provedených celkem u 22 000 nemocných s TEN a u 37 000 kontrolních osob, ve kterých bylo vyšetřováno 28 polymorfismů 21 genů spojovaných s žilní trombofilií. Z nich kritérium středně vysokého rizika TEN, to je OR > 1,5, splňoval vedle FV Leiden (FVL) a FII 20210G>A ještě polymorfismus genu inhibitoru aktivátoru plazminogenu PAI-1 4G/5G (SERPINE1). Jejich

frekvence v ČR byla již popsána [4–6]. V posledních třech letech však dochází k publikování výsledků vyšetření tzv. celogenomových studií (GWAS) s vyšetřením desítek až stovek tisíců známých jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v několikatisícových kohortách jedinců s prodělanou žilní trombózou a zdravé kontrolní skupiny [7,8]. K tomuto účelu byla použita i nová technologie vyšetření tzv. DNA microarray. Při tomto vyšetření je fragmentovaná

DNA vyšetřovaného jedince přichycena k matrix a poté hybridizována s označenou sondou [9].

Cílem této naší studie bylo zjistit frekvenci genotypů a alel nových polymorfizmů spojených s výskytem TEN, které byly nyní určeny v uvedených GWAS studiích: SERPINC1 (IVS +141G>A, rs2227589), GP6 (Ser219Pro, rs1613662) a CYP4V2 (Lys259Gln, rs13146272) v populaci zdravých osob středního věku v regionu střední Čechy. Z těchto údajů by pak již bylo možné vycházet při hledání jejich asociace s TEN u rizikových skupin obyvatelstva.

Metodiky

Výběr souboru zdravých osob ve věku 18–60 let

Do studie bylo náhodným výběrem zařazeno celkem 1 527 zdravých osob, z toho 1 450 anonymních dárců krve z fakultního transfuzního oddělení VFN v Praze. Vyšetření bylo provedeno v rámci studie Diagnostika a léčba geneticky podmíněných poruch II schválené etickou komisí 1. LF UK a VFN v Praze. Všichni byli evropského původu a pocházeli z oblasti města Prahy nebo Středočeského kraje ČR. S odběrem na vyšetření souhlasili. Další demografické údaje o této kohortě jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1. Základní charakteristiky studované populace.

Charakteristika	
Evropský původ – počet jedinců (%)	1 527 (100)
Věk, roky	
průměr (SD)	35,1 (9,7)
medián	33,0
mezikvartilové rozpětí	28,0–41,0
Tělesná hmotnost, kg	
průměr (SD)	79,8 (14,3)
medián	80,0
mezikvartilové rozpětí	70,0–89,0
Výška, cm	
průměr (SD)	177,0 (9,0)
medián	177,0
mezikvartilové rozpětí	170,0–183,0
Index tělesné hmotnosti (BMI), kg/m²	
průměr (SD)	25,5 (3,7)
medián	25,1
mezikvartilové rozpětí	22,8–27,7
Muži – počet jedinců (%)	1 008 (66,0)
Ženy – počet jedinců (%)	519 (34,0)
Systolický krevní tlak, mm Hg	
průměr (SD)	119,1 (10,9)
medián	120,0
mezikvartilové rozpětí	110,0–130,0
Diastolický krevní tlak, mm Hg	
průměr (SD)	75,4 (8,7)
medián	70,0
mezikvartilové rozpětí	70,0–80,0
Krevní skupina – počet jedinců (%)	
A	610 (40,8)
B	272 (18,2)
AB	106 (7,1)
0	495 (34,0)
Kouření – počet jedinců (%)	
kuřák	353 (23,3)
exkuřák	28 (1,9)
nekuřák	1 135 (74,9)

Genetické testy

Vyšetření polymorfizmů

Genomová DNA (deoxyribonukleová kyselina) byla extrahována z leukocytů periferní krve a izolována pomocí MagNA Pure LC Nucleic Acid Extraction system™ se soupravou MagNA Pure DNA Isolation Kit I™ (vše Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) podle návodu výrobce. Vstupní a výstupní objemy vzorku byly nastaveny na 100 µl. DNA byla izolována podle protokolu MagNA Pure High-Performance DNA Extraction™.

Sledované mutace byly stanoveny pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) následované analýzou křivky tání se specifickými fluorescenčně značenými hybridizačními sondami v procesu FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Vyšetření bylo provedeno na přístroji LightCycler® 480 System s použitím kitů LC® 480 Genotyping Master (vše Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) podle instrukcí výrobce.

Sekvenčně specifické primery a fluorescenčně značené sondy byly navrženy ve spolupráci s firmou TIB MOLBIOL (Berlín, Německo), kde byly také na zakázku připraveny. Primery byly použity v 0,4 µM koncentraci a fluorescenční sondy v 0,1 µM, resp. 0,3 µM koncentraci. Reakce proběhla v prostředí Mg²⁺ kationtů. V tab. 2 jsou uvedeny sekvence použitých primerů a sond a v tab. 3 jsou uvedeny parametry provedených PCR.

Statistické testy

Ke stanovení odchylky od Hardy-Weinbergova zákona ($p > 0,05$) byl použit χ^2 test. Při nízkému zastoupení homozygotních mutací jsme použili přesnější variantu exact test. Interval 95% spolehlivosti byl kalkulován metodou dle Walda. Rozdíly mezi zastoupením genotypů a frekvencí alel mezi muži a ženami byly vyhodnoceny opět χ^2 testem.

K výpočtu byl použit statistický program SAS, verze 9.2 (SAS Institute, NC, USA) s genetickým souborem.

Výsledky

Určené genotypy a frekvence alel SERPINC1 (IVS +141G>A, rs2227589), GP6 (Ser219Pro, rs1613662) a CYP4V2 (Lys259Gln, rs13146272) v celém souboru a poté zvlášť u žen a mužů jsou uvedeny v tab. 4–6. Všechny splňovaly požadavky Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

Diskuze

Gen antitrombinu SERPINC1 (serpin peptidase inhibitor, clade C, member 1) je lokalizován na 1. chromozomu v oblasti q23–q25.1. Jeho polymorfismus (SERPINC1, IVS +141G>A, rs2227589) je podle výsledků studií LETS, MEGA-1 a MEGA-2 spojen s velmi nízkým rizikem žilního tromboembolizmu (zjištěné OR pro rizikovou minoritní alelu A bylo určeno 1,42; 1,24 a/nebo 1,29) [7]. V dalších studiích [8,10] však tento vztah již potvrzen nebyl. Výskyt rizikové alely A je u nositelů spojen s lehkým protrombogenním funkčním defektem – nižší inhibicí F Xa (genotyp AA 94,6 ± 8,4 %) a nižší koncentrací antitrombinu (AA 94,8 ± 5,6 %), než jaké byly zjištěny u jedinců s genotypem GG (97,0 ± 7,3 % a 99,5 ± 5,8 %, resp.) [10]. Frekvence genotypů SERPINC1 IVS +141G>A byla u zdravých osob evropského původu ve Španělsku [11] 80,5 % GG, 18,1 % GA a 1,3 % AA, s frekvencí alely A 12 %. V Nizozemsku [7] dle výsledků studie Mega-2 je to 82 % GG, 17 % GA a 1 % AA, s frekvencí alely A 11 %. U zdravých Američanů bílé rasy byla zjištěna frekvence minoritní alely 11 % s frekvencí

Tab. 2. Použité primery a sondy.

GP6 rs1613662		
Primery	GP6_F	5'-CAAATCTgTgAAAgAACCAACT-3'
	GP6_A	5'-gATTTCCCAGgAACCTCTgT-3'
Sondy	rs1613662_Anc	5'-gCACCAgAATggACCCTgCgAACCT-FL-3'
	rs1613662_[A]	5'-LCRed640-CCTgCTACCgAggAAGgTgg-PH-3'
SERPINC1 (antitrombin) rs2227589		
Primery	rs2227589 F	5'-ggATgACATCCCCCTTgT-3'
	rs2227589 R	5'-CTCCAAAggACTCACAggAAT-3'
Sondy	rs2227589 C	5'-gCACTTgAAATgACgTCTTCC-FL-3'
	Anc rs2227589	5'-LCRed640-AACAggTCTTTgACTgTAACTACCAgggA-PH-3'
CYP4V2 rs13146272		
Primery	rs13146272 S	5'-ggCTTgATCTCTgTACCTTATgTTT-3'
	rs13146272 A	5'-CATCgTgAATgCACTTAATACCACC-3'
Sondy	rs13146272 C	5'-AAAgAgCCTTCgATCCTACATACTT-FL-3'
	Anc rs13146272	5'-LCRed640-ACCAACAgTgTAAgTCCCTgACTTT-TACAA-PH-3'

Tab. 3. Parametry PCR reakce.

	GP6 rs1613662	SERPINC1 rs2227589	CYP4V2 rs13146272
Denaturace	10 min 95 °C	10 min 95 °C	10 min 95 °C
Amplifikace – 45 cyklů	10 s 95 °C	10 s 95 °C	10 s 95 °C
	10 s 55 °C	10 s 55 °C	10 s 56 °C
	15 s 72 °C	15 s 72 °C	15 s 72 °C
Analýza křivek tání	30 s 95 °C	30 s 95 °C	30 s 95 °C
	120 s 54 °C	120 s 45 °C	120 s 45 °C
	0,57 °C/s na 77 °C	0,57 C/s na 75 °C	0,57 °C/s na 75 °C
	Acq. 1	Acq. 1	Acq. 1
Chlazení	40 °C	40 °C	40 °C

genotypů CC 79,82 %, CT 19,13 % a TT 1,05 %. U zdravých černých Američanů byla ale frekvence minoritní alely nižší – 7 %, s nálezem frekvence genotypů CC 86,78 %, CT 12,35 % a TT 0,87 % [10]. V naší studii je nález frekvence minoritní rizikové alely A po-

lymorfizmu IVS +141G>A 11,3 %, tedy podobný jako v Nizozemsku. Frekvence genotypů GG 78,36 %, GA 20,66 % a AA 0,98 % se pak blíží spíše nálezům genotypů u bílé rasy v USA.

Gen destičkového glykoproteinu VI (GP6) je lokalizován na 19. chromo-

Tab. 4. Frekvence genotypů a alel ve sledované české populaci.

Chromozom	Gen	SNP	dbSNP ID	Genotyp (%) (n = 1 527)			Rizi- ková alela	Frekvence alel (95% limit spolehlivosti)		HWE
				TT	TC	CC	T	p	q	
19q13.4	GP6	Ser219Pro	rs1613662	77,14	21,15	1,70	T	T = 0,877 (0,866–0,889)	C = 0,123 (0,111–0,134)	p = 0,4794
1q23-q25.1	SERPINC1	IVS +141G>A	rs2227589	78,36	20,66	0,98	A	G = 0,887 (0,875–0,898)	A = 0,113 (0,102–0,125)	p = 0,2494
4q35.2	CYP4V2	Lys259Gln	rs13146272	42,63	45,12	12,25	A	A = 0,652 (0,635–0,669)	C = 0,348 (0,331–0,365)	p = 0,8214

Poznámka: symboly genů, rs čísla, SNP typy a čísla chromozomů vycházejí z National Center for Biotechnology Information build 37.1

Tab. 5. Frekvence genotypů a alel ve sledované české populaci (muži).

Gen	SNP	dbSNP ID	Muži			Frekvence alel		HWE
			Genotyp (%) (n = 1 008)			(95% limit spolehlivosti)		
						p	q	
GP6	Ser219Pro	rs1613662	TT	TC	CC	T = 0,870	C = 0,131	p = 0,1046
			76,19	21,53	2,28	(0,855–0,884)	(0,116–0,145)	
SERPINC1	IVS +141G>A	rs2227589	GG	GA	AA	G = 0,883	A = 0,117	p = 0,4051
			77,73	21,17	1,09	(0,870–0,897)	(0,103–0,130)	
CYP4V2	Lys259Gln	rs13146272	AA	AC	CC	A = 0,642	C = 0,358	p = 0,7101
			41,47	45,44	13,10	(0,621–0,663)	(0,337–0,380)	

Poznámka: Symboly genů, rs čísla, SNP typy a čísla chromozomů vycházejí z National Center for Biotechnology Information build 37.1.

Tab. 6. Frekvence genotypů a alel ve sledované české populaci (ženy).

Gen	SNP	dbSNP ID	Ženy			Frekvence alel		HWE
			Genotyp (%) (n = 519)			(95% limit spolehlivosti)		
						p	q	
GP6	Ser219Pro	rs1613662	TT	TC	CC	T = 0,892	C = 0,108	p = 0,1653
			79,00	20,42	0,58	(0,874–0,911)	(0,089–0,126)	
SERPINC1	IVS +141G>A	rs2227589	GG	GA	AA	G = 0,894	A = 0,106	p = 0,3969
			79,58	19,65	0,77	(0,877–0,912)	(0,088–0,123)	
CYP4V2	Lys259Gln	rs13146272	AA	AC	CC	A = 0,672	C = 0,329	p = 0,8404
			44,89	44,51	10,60	(0,642–0,701)	(0,299–0,358)	

Poznámka: Symboly genů, rs čísla, SNP typy a čísla chromozomů vycházejí z National Center for Biotechnology Information build 37.1.

zomu v oblasti q13.4. Kóduje 319 aminokyselin tvořících transmembránový protein, řazený do imunoglobulinové (Ig) superrodiny I spolu s proteiny imunoreceptorů NK buněk a receptorů leukocytů Fc α . Glykoprotein VI se však v lidském organismu vyskytuje jen na destičkách a na megakaryocytech, na jiných buňkách nikoli [12]. Je destičkovým receptorem pro kolagen a při styku destiček s volným kolagenem umožňuje jejich sekundovou aktivaci. Prostřednictvím GP VI tedy velmi rychle dochází při poranění cévy k vytvoření destičkového trombu. Bohužel také rychle navodí trombotizaci v koronárním řečišti po ruptuře aterosklerotického plátu. V kavkazské populaci se vyskytují různé varianty GP6, z nichž funkční rozdíly byly popsány mezi výskytem majoritního (a) a minoritního (b) haplotypu, který kóduje izoformy proteinu GP6 s aminokyselinami SKTQH nebo PEALN v pozici 219, 237, 249, 317 a 322, resp. mutace GP6 655T>C,

709A>G, 745A>G, 950A>T a 964C>A, které jsou v silné LD ($D \sim 0,92$) [13]. Výskyt minoritní alely GP6 (haplotypu b), resp. její představitelky mutace GP6 655T>C (Ser219Pro, 13254T>C, rs1613662), byl zkoumán především ve vztahu k aterotrombóze, zejména k infarktu myokardu, kde byly dosud popsány protichůdné nálezy. V řadě asociačních studií byl sice prokázán vztah polymorfizmu GP6 s infarktem myokardu u mladých osob [14–16] a s vyšší incidencí u žen [17], zejména pokud užívaly hormonální substituci v menopauze (studie HERS) [18]. Další velká studie SMILE [19] však tento vztah s infarktem u mužů a vznikem rekurencí kardiovaskulárních příhod nebo mortalitou (studie Leiden) nepotvrdila. V incidenci rekurence infarktu myokardu nebo nestabilní anginy pectoris však nebylo možné vyloučit vliv užívání, nebo neužívání aspirinu sledovanými osobami. Ve svém úsudku, že minoritní alela C polymorfizmu GP6

13254T>C není spojena s rizikem infarktu myokardu, se pak studie SMILE opírala i o výsledky laboratorního vyšetření, kdy výskyt minoritní alely byl spojen i s nižší aktivací destiček (expresí P-selektinu) po přidání agonisty GPVI. U nemocných s infarktem myokardu se totiž předpokládá, že zde ve vyšší míře cirkulují destičky aktivované po styku s kolagenem prasklého aterosklerotického plátu [20]. Nižší reaktivita po styku destiček s kolagenem byla při nálezu haplotypu b přisuzována snížené expresi GPVI na jejich povrchu [21]. Nyní však bylo zjištěno, že za tento funkční defekt je v destičkách s minoritní alelou GPVI odpovědná porucha přenosu aktivačního signálu na úrovni konstitučně aktivované Src-tyrozinové kinázy Fyn/Lyn v tzv. imunotyrozinovém aktivním motivu (ITAM) [22]. Co se však týká spojení výskytu mutace GP6 13254T>C, resp. minoritního haplotypu b, a žilního tromboembolizmu, byl v GWAS studiích [7,8]

prokázán spíše jeho protektivní vliv s nálezem OR 0,80–0,87. Riziko žilního tromboembolizmu je tedy podle těchto výsledků GWAS studií spojeno s výskytem majoritního haplotypu a, tedy alely T (A) (OR 1,5–1,36). V opakované studii provedené nyní Austinem et al [10] to však v souboru Američanů evropské rasy potvrzeno nebylo, OR pro majoritní alelu bylo jen 1,04. U zdravých Francouzů evropské rasy byla nalezena frekvence majoritní alely v 84–85 % a minoritní alely 15–16 %. Podobný výskyt alel T v 85 % a C v 15 % u osob evropské rasy nalézají i Watkins et al [13]. V nizozemské populaci zdravých osob byl výskyt majoritní alely opět prakticky stejný 80–82 % a minoritní v 18–20 %. Ve studii MEGA-2 byl dále uveden i výskyt genotypů TT 68 %, TC v 29 % a CC ve 3 %. I u bílých Američanů byla podobná frekvence majoritní alely (84 %) s frekvencí genotypu TT 71,04 %, TC 26,40 % a CC 2,56 %. U Afroameričanů však frekvence majoritní alely T byla 76 %, to je nižší než u evropské rasy, s výskytem genotypů TT 58,71 %, TC 34,50 % a CC 6,79 %. V naší studii jsme u zdravé populace našli frekvenci „rizikové“ majoritní alely T (A) 87,7 %, minoritní C (G) 12,3 %, s tímto zastoupením genotypů AA (TT) 77,14 %, AG (TC) 21,15 % a GG (CC) 1,7 %. Tyto nálezy odpovídají frekvenci nalezené v populaci evropského etnika s lehkou převahou výskytu majoritní alely a naopak poklesu frekvence výskytu minoritní alely.

Také další polymorfismus CYP4V2 rs13146272 (Lys259Gln, záměna alel A>C) je spojován s rizikem žilního tromboembolizmu. Nalézá se v genu cytochromu P450, jeho rodiny 4, podrodiny V, polypeptidu 2. Tento gen však dosud vůbec nebyl spojován s hemokoagulací nebo s funkcí krevních destiček. Nachází se na 4. chromozomu v oblasti q35.2 a jím kódovaný protein se podílí na oxidaci mastných kyselin. Účastní se např. přeměny prekursorů mastných kyselin na n-3 poly-nenasycené mastné kyseliny (n-3PUFA) [23]. Dosud byly známy

jen mutace CYP4V2 vyvolávající metabolickou poruchu mastných kyselin spojenou s Biettiho progresivní krystalickou dystrofií oční rohovky a retiny a postupnou slepotou. Tato porucha tukového metabolismu se však týká i jiných tkání, kde je spojena s vyšším obsahem triglyceridů a cholesterolu v buňkách. Lipidové inkluze se přitom mohou nalézt i v lymfocytech [24]. Nyní však ve všech 3 výše uvedených asociačních studiích [7,8,10] bylo potvrzeno, že minoritní alela C nového polymorfismu genu CYP4V2, označeného v databázi SNP jako rs13146272 (Lys259Gln), se u osob s žilní trombózou vyskytuje v nižším počtu než v kontrolním souboru. Za rizikovou alelu pro žilní trombózu lze tedy v tomto případě považovat majoritní alelu A, kdy je její výskyt spojen s OR pro TEN ve výši 1,24 [7]. V tomto případě se však nepředpokládá, že je tato asociace vyvolána metabolickou poruchou mastných kyselin, ale že patrně bude spjata s aktivitou koagulačního faktoru FXI, jehož gen je na čtvrtém chromozomu umístěn v blízkosti genu CYP4V2 [25]. Li et al [26] pomocí rozsáhlé haplotypové studie provedené v oblasti 4q35.2 totiž prokázali, že dva polymorfismy genu F11 rs2289252 a rs2036914, spojené s vyšší hladinou FXI, jsou též přítomny v nalezených haplotypech obsahujících rizikovou alelu A polymorfismu CYP4V2 rs13146272. K tomuto nálezu došli i přes velmi nízkou LD ($r^2 \leq 0,12$) rs13146272 v CYP4V2 s rs2289252 a rs2036914 genu F11. Vlastní trombofilii zde tedy bude vyvolávat vyšší hladina F11 spojená s oběma uvedenými polymorfismy F11, se kterými se riziková alela A rs13146272 CYP4V2 u jejich nosičů vyskytuje společně. Mutace CYP4V2 (Lys259Gln) je zde tedy jen markerem vyššího rizika vzniku žilního tromboembolizmu. V kontrolních souborech osob bez žilního tromboembolizmu byly u jedinců evropského etnika zjištěny tyto frekvence výskytu rizikové majoritní alely A (rs13146272 CYP4V2): u Nizozemců 64–65 % a frekvence mi-

noritní alely 35–36 %, s frekvencí genotypů (Studie MEGA-2) CC 13 %, CA 45 % a AA 42 % [7]. U Francouzů byla frekvence rizikové majoritní alely A 63–67 % a minoritní alely C 33–37 % (s OR 0,84) [8] a u bílých Američanů byla frekvence alely A 62 % a alely C 38 % s výskytem genotypů CC 15,43 %, CA 45,84 % a AA 38,73 %. U amerických černochů byl výskyt podobný, majoritní rizikové alely A 61 % a minoritní alely C 39 % s výskytem genotypů CC 14,69 %, CA 48,60 % a AA 36,71 %. V naší populaci jsme došli k těmto výsledkům: frekvence majoritní rizikové alely A je 65,2 %, minoritní alely C je 34,8 % a frekvence genotypů CC 12,25 %, CA 45,12 % a AA 42,63 %. Tedy k velmi podobným nálezům jako v dalších populacích evropského původu.

Závěr

Z výše uvedeného tedy závěrem vyplývá, že i v běžné české populaci je poměrně vysoký nález frekvencí nových trombofilních polymorfismů, které byly zjištěny celogenomovými asociačními studiemi. Z výsledků citovaných studií však je zřejmé, že po zjištění OR je výše rizika TEN u osob s těmito mutacemi poměrně nízká. Předpokládá se tedy, že vlastní klinický význam tohoto nálezu bude ještě předmětem dalšího studia, zejména z hlediska možných kombinací jejich výskytu se známými trombofilními mutacemi, jako je mutace FV Leiden, nebo mutace FII.

Seznam zkratk

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – jeden nukleotidový polymorfismus
dbSNP – databáze SNP
rs – reference SNP ID
p – frekvence „major“ alely
q – frekvence „minor“ alely
HWE – Hardy-Weinbergovo rovnováhu
FII – koagulační faktor II, protrombin
FVL – faktor V Leiden
SERPINE1 – serpin peptidase inhibitor, clade E (inhibitor aktivátoru plazminogenu (PAI-1))
PCR (Polymerase Chain Reaction) – polymerázová řetězová reakce
TEN – tromboembolická nemoc
OR (Odds Ratio) – poměr šancí
GWAS (Genome Wide Association Study) – celogenomové asociační studie
LD (Linkage Disequilibrium) – vazebná nerovnováha

Studie byla podpořena finančními prostředky z RVO – VFN 64165/2012 a IGA MZ ČR NT 11176-5.

Literatura

1. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multi-causal disease. *Lancet* 1999; 353: 1167–1173.
2. Margaglione M, Grandone E. Population genetics of venous thromboembolism. A narrative review. *Thromb Haemostas* 2011; 105: 221–231.
3. Gohil R, Peck G, Sharma P. The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls. *Thromb Haemost* 2009; 102: 360–370.
4. Matýšková M, Paseka J, Vorlová Z et al. Prevalence of factor V Leiden mutation in healthy women. In: Scharrer I, Schramm W (eds). 29. Hämophilie Symposium Hamburg 1998, Berlin-Heidelberg: Springer Verlag 1999: 309–311.
5. Hrachovinová I, Vorlová Z, Matýšková M et al. Thrombotic risk of the prothrombin gene G20210A mutation and clinical features of thrombophilia in 50 carriers of mutation. XVIIth Congress of the ISTH, Washington D.C., USA. *Thromb Haemostas* 1999; (Suppl): Abstract No 2060, 652.
6. Bucková D, Izakovicová-Hollá L, Vácha J. Polymorphism 4G/5G in the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with IgE-mediated allergic diseases and asthma in the Czech population. *Allergy* 2002; 57: 446–448.
7. Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJ et al. Gene variants associated with deep vein thrombosis. *JAMA* 2008; 299: 1306–1314.
8. Tregouet DA, Heath S, Saut N et al. Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach. *Blood* 2009; 113: 5298–3303.
9. Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010; 363: 166–176.
10. Austin H, De Staercke C, Lally C et al. New gene variants associated with venous thrombosis: a replication study in White and Black Americans. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 489–495.
11. Antón AI, Teruel R, Corral J et al. Functional consequences of the prothrombotic SERPINC1 rs2227589 polymorphism on antithrombin levels. *Haematologica* 2009; 94: 589–592.
12. Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E et al. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcαRI and the natural killer receptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 29019–29024.
13. Watkins NA, O'Connor MN, Rankin A et al. Definition of novel GP6 polymorphisms and major difference in haplotype frequencies between populations by a combination of in-depth exon resequencing and genotyping with tag single nucleotide polymorphisms. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1197–1205.
14. Croft SA, Samani NJ, Teare MD et al. Novel platelet membrane glycoprotein VI dimorphism is a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 2001; 104: 1459–1463.
15. Ollikainen E, Mikkelsen J, Perola M et al. Platelet membrane collagen receptor glycoprotein VI polymorphism is associated with coronary thrombosis and fatal myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis* 2004; 176: 95–99.
16. Takagi S, Iwai N, Baba S et al. A GPVI polymorphism is a risk factor for myocardial infarction in Japanese. *Atherosclerosis* 2002; 165: 397–398.
17. Motovska Z, Kvasnicka J, Widimsky P et al. Platelet glycoprotein GP VI 13254C allele is an independent risk factor of premature myocardial infarction. *Thromb Res* 2010; 125: e61–e64.
18. Bray PF, Howard TD, Vittinghoff E et al. Effect of genetic variations in platelet glycoproteins Iba1 and VI on the risk for coronary heart disease events in postmenopausal women taking hormone therapy. *Blood* 2007; 109: 1862–1869.
19. Snoep JD, Gaussem P, Eikenboom JC et al. The minor allele of GP6 13254T>C is associated with decreased platelet activation and a reduced risk of recurrent cardiovascular events and mortality: results from the SMILE-Platelets project. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2377–2384.
20. Parguina AF, Grigorian-Shamagian L, Agra RM et al. Variations in platelet proteins associated with ST-elevation myocardial infarction: novel clues on pathways underlying platelet activation in acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 2957–2964.
21. Joutsu-Korhonen L, Smethurst PA, Rankin A et al. The low frequency allele of the platelet collagen signalling receptor glycoprotein VI is associated with reduced functional responses and expression. *Blood* 2003; 101: 4372–4379.
22. Trifiro E, Williams SA, Cheli Y et al. The low-frequency isoform of platelet glycoprotein VIb attenuates ligand-mediated signal transduction but not receptor expression or ligand binding. *Blood* 2009; 114: 1893–1899.
23. <http://www.Genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP4V2>.
24. Li A, Jiao X, Munier FL et al. Bi-allelic crystal-line corneoretinal dystrophy is caused by mutations in the novel gene CYP4V2. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 817–826.
25. Bezemer A, Morange PE, Tregouet DA. Lessons from genome-wide association studies in venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2011; 9 (Suppl 1): 258–264.
26. Li Y, Bezemer ID, Rowland CM et al. Genetic variants associated with deep vein thrombosis: the F11 locus. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1802–1808.

doc. MUDr. Tomáš Kvasnicka, CSc.
www.ukb.lf1.cuni.cz
e-mail: tomas.kvasnicka@seznam.cz

Doručeno do redakce: 18. 5. 2012