



STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Genetická predispozice EMMPRINu/CD 147,
MMP-9 TIMP-2 a faktoru V Leiden u pacientů
s chronickým žilním onemocněním

UPRAVENÁ VERZE PRO KRAJSKÉ KOLO

AUTOR Veronika Slonková
KRAJ Jihomoravský
OBOR 6. Zdravotnictví

Brno 2018



STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

GENETICKÁ PREDISPOZICE EMMPRINU/CD
147, MMP-9, TIMP-2 A FAKTORU V LEIDEN
U PACIENTŮ S CHRONICKÝM ŽILNÍM
ONEMOCNĚNÍM

GENETICAL PREDISPOSITION OF EMMPRIN/CD
147, MMP-9, TIMP-2 AND FACTOR V LEIDEN
IN PATIENTS WITH CHRONIC VENOUS DISEASE

AUTOR Veronika Slonková

ŠKOLA Gymnázium a ZUŠ Šlapanice, Riegrova 17

KRAJ Jihomoravský

ŠKOLITEL Prof. MUDr. Anna Vašků, CSc.

OBOR 6. Zdravotnictví

Prohlášení

Prohlašuji, že svou práci na téma Genetická predispozice EMMPRINu/CD147, MMP-9, TIMP-2 a faktoru V Leiden u pacientů s chronickým žilním onemocněním jsem vypracovala samostatně pod vedením prof. MUDr. Anny Vašků, CSc. a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Dále prohlašuji, že tištěná i elektronická verze práce SOČ jsou shodné a nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne

Podpis:



Poděkování

Hned na začátku bych chtěla velmi poděkovat své školitelce prof. MUDr. Anně Vašků, CSc., proděkance Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, bez které by tato práce jen těžko spatřila světlo světa. Moc děkuji za odborné vedení mé práce, spoustu cenných rad a vstřícný přístup. Rovněž děkuji prof. MUDr. Vladimíru Vašků, CSc. za poskytnutí souboru pacientů. Dále patří velké díky mojí mamince MUDr. Veronice Slonkové, PhD za pomoc s porozuměním odborným textům a zasvěcením do klinické problematiky chronického žilního onemocnění. Na dalším místě bych ráda poděkovala zdravotní laborantce Andreji Stejskalové za velkou pomoc při laboratorní části výzkumu, kdy mi vždy ochotně vysvětlila veškeré postupy a problematiku. Velké díky patří také mojí školní vedoucí práce Mgr. Radmile Poláčkové za cenné rady a připomínky.

Abstrakt

Cílem této práce bylo zjistit genetické souvislosti mezi polymorfismem genu pro CD147/EMMPRIN v restrikčním místě 8259 T/A, pro MMP-9 v rs279 A/G, pro TIMP-2 v rs8176329 (+853 G/A), pro faktor V Leiden L/N (G/A) a chronickým žilním onemocněním (CVD – chronic venous disease). Do souboru bylo zařazeno celkem 150 pacientů s CVD a 277 kontrolních osob. Ke zjištění genotypu byla provedena polymerázová řetězová reakce (PCR) společně s restrikční analýzou (RFLP) a horizontální elektroforézou.

V polymorfismech CD147/EMMPRIN, MMP-9 a TIMP-2 jsme neprokázali rozdíly mezi pacienty s chronickým žilním onemocněním a kontrolami, ani muži ani ženami. Ani rozdíly mezi muži a ženami s CVD nebyly signifikantní. Dále jsme neprokázali signifikantní rozdíly v distribuci genotypů ani frekvenci alel ani mezi kontrolními muži a ženami.

V polymorfismu genu pro faktor V Leiden (FVL) jsme našli signifikantní rozdíl v alelické frekvenci mezi muži s CVD a kontrolní skupinou mužů ($P_g=0,108$, $P_a=0,03$). Leidenská mutace byla téměř 3x častější u pacientů s CVD (OR=2,519; 95% KI 1,05-7,60; senzitivita 0,08, specificita 0,97) Podle očekávání jsme pozorovali vysoce signifikantní přítomnost Leidenské mutace u pacientů s CVD a trombofilií (specificita=0,953).

V rámci studie genotyp-fenotyp pro polymorfismus TIMP-2 rs8176329 G/A jsme prokázali, že pacienti s CVD mají 3,55krát častěji pozitivní rodinnou anamnézu žilního onemocnění, pokud mají genotyp AG. Tento test je významně klinicky specifický se specificitou 0,91.

Dále jsme zjistili, že pacienti s CVD mají 3,65krát častěji nádor, pokud mají genotyp AG v polymorfismu genu pro TIMP-2, oproti pacientům s jinými genotypy. Tento test je klinicky významně specifický se specificitou 0,829.

Prokázali jsme signifikantní rozdíl v distribuci genotypů i frekvenci alel mezi pacienty s CVD s obezitou a bez ní v polymorfismu genu pro CD147/EMMPRIN. Alela T byla téměř 2x častější u pacientů s CVD a obezitou.

Dále byla aplikována studie dvojgenotyp/fenotyp a byl zjištěn vztah dvojgenotypů CD147 a MMP-9 k erysipelu u mužů s CVD. Bylo zjištěno, že pacienti s CVD a dvojgenotypem TTAA mají téměř 8x méně často erysipel oproti pacientům s jiným dvojgenotypem v těchto dvou polymorfismech.

Dvojgenotyp TTNN pro polymorfizmy CD147/EMMPRIN a FVL jsme pozorovali 3 x častěji u pacientek s obezitou oproti pacientkám s CVD, u kterých obezita přítomná nebyla.

Klíčová slova

EMMPRIN/CD147, MMP-9, TIMP-2, FVL, Chronické žilní onemocnění

Abstract

The aim of this study was to investigate the genetic association between the gene polymorphism of CD147/EMMPRIN rs8259 T/A, MMP-9 in rs279 A/G, TIMP-2 v rs8176329 (+853 G/A) and factor V Leiden N/L (G/A) and chronic venous disease (CVD). A total of 150 Czech patients with chronic venous disease and 227 controls were enrolled in the study. The patients were genotyped for the polymorphism in CD147, MMP-9 and FVL using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism-based methodology.

In the polymorphisms in CD147, MMP-9 and TIMP-2 no significant differences in the distribution of genotypes or in the allele frequency between CVD patients and control patients were found. No significant differences were observed between male and female and between CVD patients and control groups.

We found significant difference in the allele frequency between male CVD patients and control group male patients in the gene polymorphism for factor V Leiden (FVL) ($P_g=0,108$, $P_a=0,03$). The Leiden mutation was almost 3 times more frequent in the patients with CVD (OR=2,519; 95% KI 1,05-7,60; sensitivity 0,08, specificity 0,97) This result has a very high clinical specificity, therefore we can suggest that a male patient with CVD would not suffer from thrombophilia, if he does not have an L allele. Later, in the genotype/phenotype study, we found highly clinically significant presence of Leiden mutation in the patients with CVD and thrombophilia, which is not very surprising regarding the previous result. (specificity=0,953)

In the genotype-phenotype study for polymorphism of TIMP-2, it was found that the CVD patients with the AG genotype have 3.55times more frequently positive family history of the chronic venous disease, with clinically significant specificity (0.91). It was also found that the CVD patients with the AG genotype have 3.65times more frequently tumor, compared to the CVD patients with the other genotypes, with clinically significant specificity (0.829).

In the genotype/phenotype study for the polymorphism of CD147/EMMPRIN, we proved a significant difference in the distribution of genotypes and allele frequency between CVD patients with and without obesity. Allele T was nearly 2 times more frequent in the patients with CVD and obesity.

Eventually, we applied two-genotype/ phenotype study. We found an association between two-genotypes CD147/EMMPRIN and MMP-9 and erysipiel, this time among men with CVD. Male patients with CVD and a two-genotype TTAA have 8 times less frequently erysipiel compared to patients with another two-genotype in these polymorphism.

We observed 3 times more frequently two-genotype TTNN for the gene polymorphisms in CD147/EMMPRIN and FVL in the female patients with obesity and CVD compared to the female patients with no obesity.

Keywords

EMMPRIN/CD147, MMP-9, TIMP-2, FVL, chronic venous disease

Obsah

ÚVOD.....	7
1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY	9
1.1 POLYMORFISMUS	9
1.2 MATRIX METALOPROTEINÁZY.....	9
1.2.1 <i>Struktura MMPs</i>	10
1.2.2 <i>Aktivace MMPs</i>	10
1.2.3 <i>Dělení MMPs</i>	11
1.2.4 <i>Matrix metaloproteináza-9</i>	11
1.2.5 <i>MMPs a CVD</i>	12
1.3 TKÁŇOVÉ INHIBITORY MATRIX METALOPROTEINÁZ	12
1.3.1 <i>Struktura TIMPs</i>	13
1.3.2 <i>TIMP-2</i>	13
1.4 EMMPRIN/CD147	14
1.4.1 <i>Struktura EMMPRINu/CD147</i>	15
1.4.2 <i>Role EMMPRINu/CD47, MMPs a TIMPs u chronických žilních bércových vředů</i>	16
1.5 FAKTOR V LEIDEN 1691 G/A.....	17
1.6 CHRONICKÉ ŽILNÍ ONEMOCNĚNÍ	18
1.6.1 <i>Chronická žilní nedostatečnost</i>	20
1.6.2 <i>Bércové ulcerace</i>	20
2 CÍLE PRÁCE.....	21
3 SOUBOR PACIENTŮ A KONTROLNÍCH OSOB.....	22
4 LABORATORNÍ METODY	23
4.1 IZOLACE DNA.....	23
4.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)	23
4.3 RESTRIKČNÍ ANALÝZA (RFLP).....	25
4.4 ELEKTROFORÉZA.....	25
4.5 GENOTYPIZACE V GENU PRO TIMP-2.....	25
4.6 GENOTYPIZACE V GENU PRO CD147/EMMPRIN.....	28
4.7 GENOTYPIZACE V GENU PRO MMP-9	29
4.8 GENOTYPIZACE V GENU PRO FVL.....	30
4.9 STATISTIKA.....	31
5 VÝSLEDKY	32
5.1 STUDIE PACIENTI-KONTROLY („CASE-CONTROL“)	32
5.2 STUDIE GENOTYP-FENOTYP.....	35
5.3 STUDIE DVOJGENOTYP/FENOTYP	38
6 DISKUZE.....	40
7 ZÁVĚR.....	44
LITERATURA.....	46
SEZNAM OBRÁZKŮ	54
SEZNAM TABULEK.....	55
SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK.....	55

ÚVOD

Chronické žilní onemocnění (CVD) bývá někdy označováno jako nová epidemie 21. století. Díky nezdravému životnímu stylu, nedostatku sportu a pohybu, obezitě a mnoha dalším faktorům došlo ke stavu, kdy tímto onemocněním trpí 84 % naší populace a toto číslo stále narůstá [29]. Nejtěžším stádiem tohoto onemocnění je bérkový vřed, jehož léčba je často obtížná a dlouhotrvající. Kromě našeho životního stylu jsou však velmi významným faktorem v rozvinutí chronického žilního onemocnění naše genetické predispozice. Mnohdy má pouhá jedna bodová mutace (SNP) katastrofální dopad na celý organismus. Takovým příkladem je mutace faktoru V Leiden (FVL) 1691 G/A. Její vinou je narušena srážlivost krve a vytváří se krevní sraženiny (tromby), vedoucí mnohdy až k úmrtí jedince. Tento polymorfismus, a taky polymorfismy tří látek významně ovlivňujících chronické žilní onemocnění: CD147/EMMPRIN, matrix metaloproteinázu-9 a její tkáňový inhibitor TIMP-2 jsme zkoumali v naší práci.

Matrix metaloproteinázy (MMPs) jsou skupinou enzymů patřících do rodiny zinek-dependentních metaloproteináz. V organismu plní důležitou funkci téměř při všech procesech, kdy je degradována extracelulární matrix. Hrají proto důležitou roli při hojení ran. Za normálních podmínek napomáhají léčbě rány, ale u chronického žilního onemocnění, kde jsou hladiny MMPs dlouhodobě zvýšené, degradují i látky, které nepatří mezi jejich klasické substráty, čímž je zpomalena léčba rány. Aktivita matrix metaloproteináz je endogenně regulována jejich tkáňovými inhibitory (TIMPs). Každý z těchto inhibitorů má široké spektrum MMPs, které je schopen inhibovat, a tedy nízkou specificitu. CD147 neboli EMMPRIN je látka indukující tvorbu těchto matrix metaloproteináz. Jeho zvýšená hladina exprese byla prokázána u chronických bérkových vředů, což vede k vyšší tvorbě MMPs a následnému zhoršení hojení rány. V současnosti jsou také hodně aktuální studie zkoumající vliv EMMPRINu na nádorová onemocnění, kde byla prokázána zvýšená hladina jeho exprese [6, 14, 16]. Genetické polymorfismy EMMPRINu/CD147, MMPs nebo TIMPs mohou vést k nevyváženosti hladin MMPs, což má na organismus negativní dopad.

Byl zkoumán genetický polymorfismus MMP-9 279 A/G v restrikčním místě 17576, který se nachází na šestém exonu MMP-9. Při genové expresi pak dochází k záměně argininu za glutamin ve vznikajícím peptidovém řetězci. Tento polymorfismus má vliv na riziko kolorektálního karcinomu a chronické obstrukční plicní nemoci [60,55].

Také byl zkoumán polymorfismus TIMP-2 +853 G/A, který se nachází na třetím exonu v restrikčním místě 8176329 a jedná se o tzv. tichou mutaci. Tento polymorfismus ovlivňuje chronickou plicní obstrukční nemoc, kdy je alela G spojena s vyšší náchylností k tomuto onemocnění [67,68].

Nakonec byl zkoumán polymorfismus genu pro CD147 neboli EMMPRIN v restrikčním místě 8259 T/A. Tento polymorfismus se nachází v 3' nepřekládaném regionu genu (3'UTR) a je zodpovědný za expresi CD147 v mnoha typech buněk. Dle studií ovlivňuje polymorfismus

CD147 rs8259 náchylnost pacientů k psoriáze a k akutnímu koronárnímu syndromu, kdy se v obou případech ukázala alela T jako protektivní vůči onemocnění[34,63]

Cílem naší práce bylo genotypizovat soubor pacientů s CVD a kontrolní soubor pro bodové mutace v genech pro CD147/EMMPRIN, MMP-9, TIMP-2 a FVL a zjistit jejich vliv na chronické žilní onemocnění. Provedli jsme studii case-control, kde jsme porovnávali genotypy pacientů s CVD a pacienty kontrolního souboru a studii genotyp-fenotyp, kde jsme porovnávali genetické predispozice s fenotypickými projevy. Pro genotypizaci obou souborů byla použita polymerázová řetězová reakce, restrikční analýza a gelová elektroforéza.

1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1 Polymorfismus

Geny se v populaci mohou nacházet v různých variantách – alelách. Dvojici alel téhož genu nebo genetického polymorfismu označujeme jako genotyp. Pokud jsou tyto alely totožné, jedná se o homozygota, jsou-li odlišné, je organismus heterozygotní. Při asociačních studiích genetického polymorfismu rozlišujeme 4 modely dědičnosti. Prvním je model dominantní/recesivní, který vychází ze vztahu $(AA+Aa):aa$, kde „A“ je alela v populaci četnější (dominantní) a „a“ je alela méně četná (recesivní). V tomto modelu se projevují jen dva fenotypy. Další je model kodominantní, vycházející ze vztahu $AA:Aa:aa$, zde se projevují tři rozdílné fenotypy. Předposlední je model výhody heterozygota, platí zde vztah $Aa:(AA+aa)$, a nakonec alelický model se vztahem $A:a$ [4].

Pokud v populaci existují alespoň dvě alely jednoho genu o zastoupení vyšším než 1 %, hovoříme o polymorfismu. SNP z anglického „single nucleotide polymorphism“ je polymorfismus se záměnou jednoho nukleotidu [2, 4].

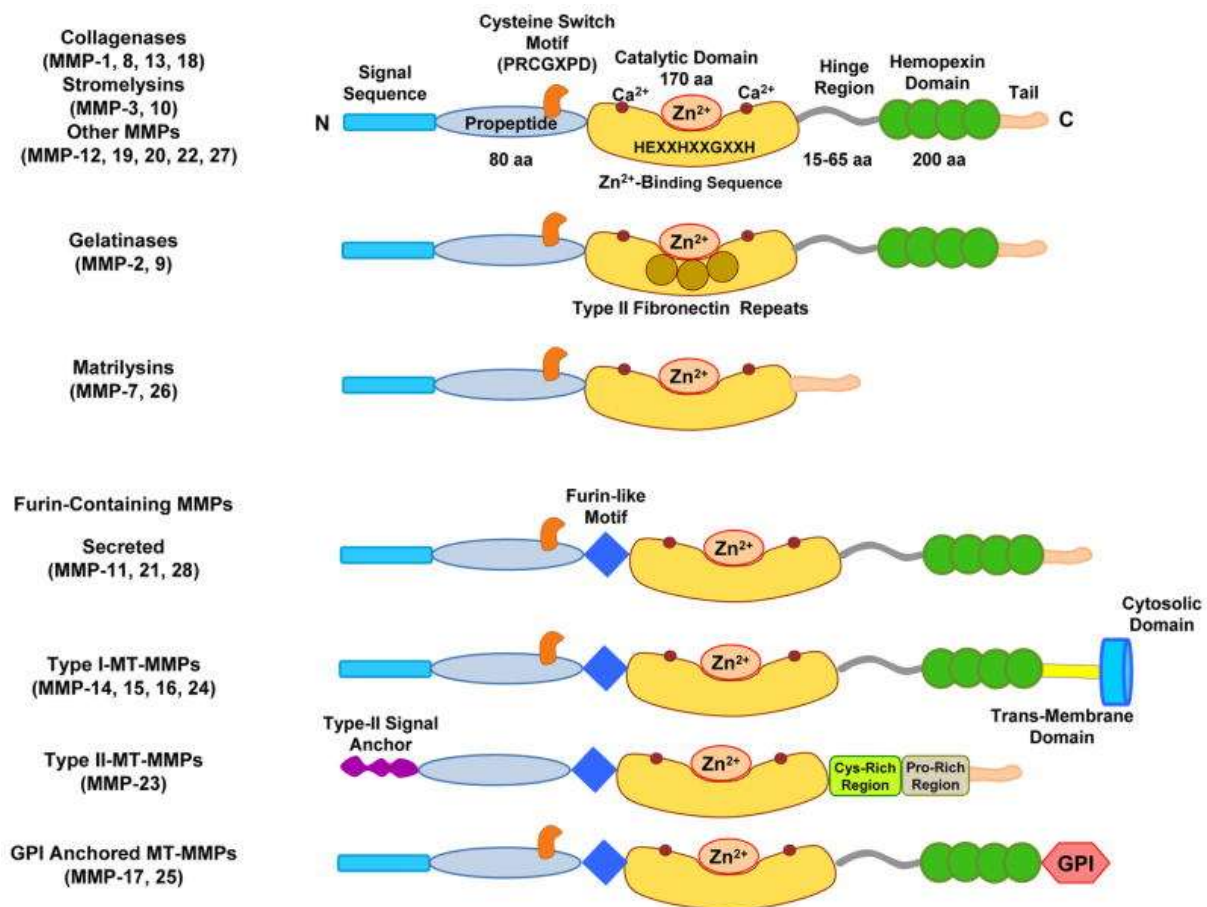
1.2 Matrix metaloproteinázy

Matrix metaloproteinázy (MMPs) jsou endonukleázy, které ke své aktivitě vyžadují zinkový kationt Zn^{2+} . Jedná se o proteolytické enzymy. MMPs se někdy označují také jako matrixiny a patří do širší skupiny zinek-dependentních metaloproteináz, tzv. metzincinů. Skupina metzincinů zahrnuje kromě MMPs ještě adamalysiny (ADAM - **a** **d**isintegrin **a** **n** metalloproteinase), dále ADAMTS (ADAM s **t**hrombospondin **m**otifs), astaciny, a nakonec bakteriální serralysiny a protozoární leishmanolysin. [6] MMPs se účastní většiny procesů, kde dochází k degradaci a remodelaci extracelulární matrix (ECM). Extracelulární matrix je mezibuněčná hmota, tedy materiál ukládající se v mezibuněčných prostorech. MMPs jsou schopny štěpit skoro všechny složky bazální membrány a ECM. MMPs mohou být produkovány mnoha buňkami kůže, zejména aktivovanými zánětlivými buňkami, jako jsou neutrofilové a makrofágy, a dále fibroblasty, keratinocyty, mastocyty, endoteliální buňky nebo bílé krvinky - eozinofily. MMPs mají velký význam při hojení ran, opravách tkání, morfogenezi, embryogenezi a angiogenezi (novotvorbě cév). Během hojení ran ECM remodelují a degradují její proteinové složky. MMPs však také hrají důležitou roli v patogenezi některých nemocí, kde nadměrným rozkladem složek pojivové tkáně ovlivňují mimo jiné bérčové ulcerace, revmatickou artritidu a nádorová onemocnění [6, 7, 8].

MMPs jsou regulovány třemi způsoby: na úrovni genové exprese, dále aktivací proenzymu (mechanismus „cystein-switch“) a nakonec pomocí inhibice jejich proteolytické aktivity, a to buď nespecificky, tedy α -2-makroglobulinem, nebo specificky, tedy tkáňovými inhibitory matrix metaloproteináz (TIMPs) [6].

1.2.1 Struktura MMPs

Matrix metaloproteinázy jsou tvořeny katalytickou doménou, propeptidem, spojovacím peptidem, signálním peptidem a hemopexinem. V propeptidové doméně obsahují „cystein switch“ motiv, který udržuje MMPs v jejich neaktivovaném (pro-MMP) stavu. Motiv cystein switch chybí u MMP-23. Na katalytické doméně obsahují Zn^{2+} vázající motiv. U různých skupin MMPs se pak objevují změny ve struktuře, u želatináz (MMP-2, MMP-9) je navíc na katalytické doméně vázán fibronectin. U matrilysinů chybí hemopexinová doména. U MMPs aktivovaných furinem přibývá furinová část na spojovacím peptidu a u membránově vázaných MMPs ještě transmembránová doména (viz obrázek 1) [8, 9, 10, 15].



Obrázek 1: Struktura MMPs dle jednotlivých skupin

1.2.2 Aktivace MMPs

Většina MMPs je uvolňována z buněk do ECM, výjimku tvoří membránově vázané MMPs, které zůstávají spojeny s buněčnou membránou a mohou dále aktivovat další MMPs nebo taky TNF. Matrix metaloproteinázy jsou uvolňovány z buněk v neaktivní formě v podobě proenzymů – pro-MMP. Aktivovány jsou odštěpením propeptidové domény. K aktivaci dochází buď jinými MMPs, a to zejména membránově vázanými MMPs, nebo serinovými proteázami (endoproteázy, obsahující serin v reakčním centru, zahrnují plazmin, neutrofilní elastázu, mastocytovou chymázu) [6, 16].

1.2.3 Dělení MMPs

V lidském těle se nachází několik desítek matrix metaloproteináz, které jsou kódovány mnoha různými geny. MMPs dělíme dvěma způsoby, a to jednak podle jejich struktury, a jednak podle substrátu, který štěpí.

1) podle struktury:

- a) archetypální: kolagenázy, stromelysiny, MMP-12, -19, -20 a -27
- b) matrilysiny
- c) želatinázy
- d) MMP aktivované furinem [18, 6]

2) podle cílového substrátu:

- a) **kolagenázy**: Kolagenázy mají schopnost štěpit intersticiální kolagen I, II a III. Do této skupiny patří MMP-1, MMP-8, MMP-13 a MMP-18.
- b) **želatinázy**: Tato skupina je tvořena dvěma MMP, a to MMP-2 (želatináza A) a MMP-9 (želatináza B). Tyto MMP mají v katalytické doméně tři opakování fibronektin II domény, která na sebe váže želatinu, kolagen a laminin. MMP-2 je důležitá pro osteogenezi (tvorbu kostí).
- c) **stromelysiny**: Stromelysiny jsou tvořeny MMP-3 (stromelysin 1) a MMP-10 (stromelysin 2). Tyto MMP mají podobnou substrátovou specifitu, ale MMP-3 je účinnější. Také sem patří MMP-11 (stromelysin 3), který má odlišnou strukturu, a bývá sem řazena MMP-19. Stromelysiny štěpí želatinu, kolagen, kasein a mnohé další komponenty ECM.
- d) **matrilysiny**: U této skupiny chybí hemopexinová doména. Patří sem MMP-7 (matrilysin 1) a MMP-26 (matrilysin 2). Štěpí množství komponentů ECM, jako je želatina, kolageny, fibronektin a jiné.
- e) **membránově vázané MMP**: Patří sem 4 transmembránové proteiny: MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMP), MMP-16 (MT3-MMP) a MMP-24 (MT5-MMP) a dva GPI kotvící proteiny: MMP-17 (MT4-MMP) a MMP-25 (MT6-MMP). MT-MMPs mají širokou substrátovou specifitu, štěpí želatinu, kolageny, fibronektin a mnohé další.
- f) **ostatní MMP**: Do této skupiny patří: metaloelastáza MMP-12, která je nezbytná pro migraci makrofágů a štěpí elastin. Dále MMP-20 (Enamelysin), MMP-22, MMP-23 a MMP-28 [6].

1.2.4 Matrix metaloproteináza-9

Matrix metaloproteináza-9 řadíme mezi želatinázy společně s MMP-2. Obě tyto proteázy hrají významnou roli při vzniku bércového vředu. Želatinázy dokáží štěpit kolagen mnohem efektivněji než ostatní MMPs, a proto jsou považovány za velmi důležité. Jsou nezbytné pro remodelaci tkání a pro zahájení epitelizace [52,53].

Výrazně vyšší hodnota MMP-9 byla zjištěna v exsudátu chronických ran. MMP-9 je pokládána za hlavní proteázu v degradaci ECM u chronických ran. MMP-9 je nezbytná pro migraci

keratinocytů, reepitelizaci a angiogenezi. U akutních ran je její hladina zvýšena jen přechodně, zatímco u chronických ran je její hladina mnohonásobně vyšší, a to jak u žilních bérkových vředů, tak dekubitů nebo nehojících se popálenin [52, 53]. Bylo prokázáno, že vysoké hladiny MMP-9 způsobují pomalejší hojení ran [54]. Optimální hladina MMP-9 je také zásadní pro proces epitelizace. Štěpením hlavní složky buněčné membrány – kolagenu IV, umožňuje separaci keratinocytů z buněčné membrány a jejich následnou migraci po spodině rány [53]. Při nízké hladině MMP-9 dochází ke zpomalení epitelizace, při vyšší hladině MMP-9 dochází ke zpomalení hojení rány [52].

1.2.5 MMPs a CVD

V patogenezi CVD hraje roli žilní reflux, který vede k žilní hypertenzi a dilataci žilní stěny. Bylo prokázáno, že chronická žilní hypertenze zvyšuje expresi a aktivitu MMPs, které působí na endotelie a hladkou svalovinu v cévních stěnách, vedou k žilní dilataci a brání svalové kontrakci. Poškozené endotelie aktivují leukocyty, vzniká zánětlivá reakce, jejímž důsledkem je další poškození žilní stěny [14].

U pacientů s křečovými žilami se objevují zvýšené hladiny MMP-1, -2, -3, -9 a MMP-13. Hlavním důvodem je nevyváženost aktivity MMPs a jejich tkáňových inhibitorů TIMPs. Výsledkem je akumulace MMPs v žilní stěně. Důležitou roli při vzniku tohoto nevyváženého stavu hrají polymorfismy MMPs a TIMPs. Hladiny MMPs se liší v jednotlivých stádiích CVD [14, 17].

1.3 Tkáňové inhibitory matrix metaloproteináz

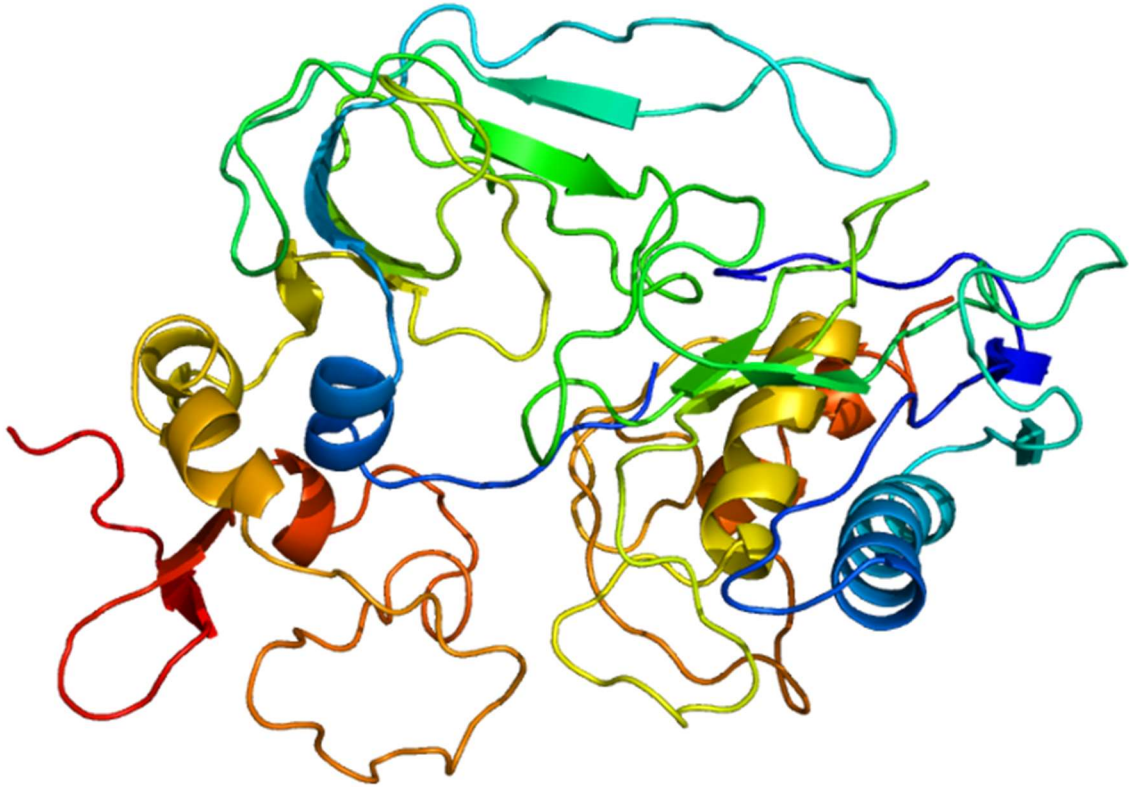
Tkáňové inhibitory matrix metaloproteináz (TIMPs) jsou specifické inhibitory, které na sebe vážou již aktivované matrix metaloproteinázy, a tím omezují jejich aktivitu (blokují vazebná místa MMP). Kromě MMPs také inhibují některé disintegrin metaloproteinázy (ADAM) a disintegrin metaloproteinázy s trombospodinovou doménou (ADAMTS). TIMPs vytvářejí s metaloproteinázami komplexy stechiometricky 1:1. Jsou známy čtyři druhy TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4). TIMP-1 a -3 jsou glykoproteiny, zatímco TIMP-2 a -4 neobsahují sacharidy. Jednotlivé TIMPs jsou schopny inhibovat velké množství MMPs. TIMP-1 a TIMP-2 podporují růst buněk. Nadměrná tvorba TIMP-1, TIMP-2 a TIMP-3 zamezuje růstu tumoru a všechny TIMPs mohou zamezovat angiogenezi [5, 8, 10, 14].

TIMPs dokáží rozeznávat mezi stromelysiny, vazba TIMP-1 a -2 vázající se na MMP-10 (stromelysin-2) katalytickou doménu je 10krát slabší než jejich vazba na MMP-3 (stromelysin-1) katalytickou doménu [14].

TIMPs byly poprvé objeveny mezi lety 1985 až 1996. TIMP-1 byla poprvé naklonována v roce 1985. TIMP-2 byla naklonována Stetlerem Stevensonem et al. v roce 1990, TIMP-3 Pavloffem a jeho kolegy a TIMP-4 roku 1996 [5].

1.3.1 Struktura TIMPs

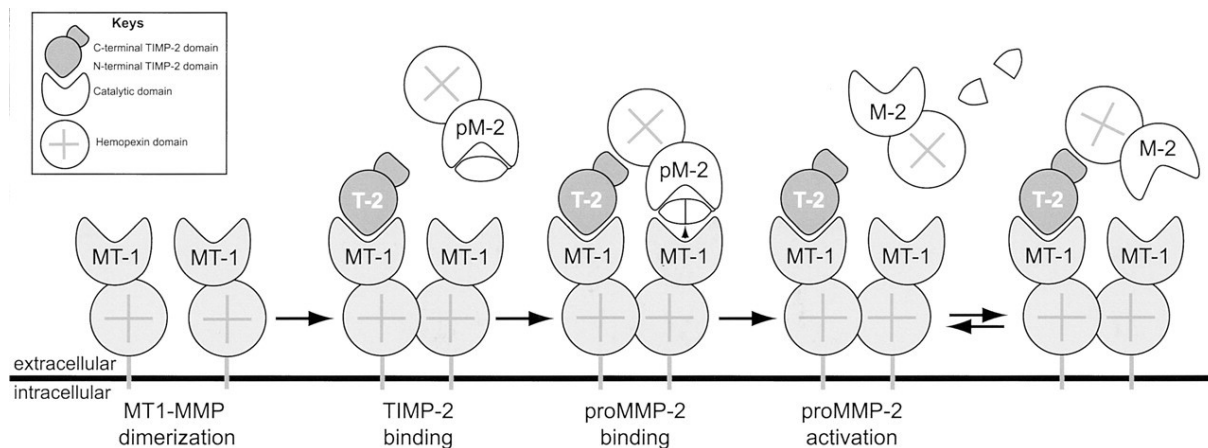
TIMPs se skládají z N-terminální-domény a C-terminální-sub-domény, které jsou stabilizovány šesti disulfidovými vazbami, tedy třemi na každé doméně (obrázek 2). Struktura TIMP je tvořena 184 až 194 aminokyselinami. Amino-terminální doména TIMP se naváže na aktivní MMP a tím ji inhibuje [5, 6].



Obrázek 2: Struktura TIMP-2

1.3.2 TIMP-2

TIMP-2 inhibuje všechny aktivované matrix metaloproteinázy. Kromě toho má schopnost inhibovat neaktivovanou pro-MMP-2. TIMP-2 tvoří tří molekulový komplex s MT1-MMP a pro-MMP a tento komplex zprostředkovává aktivaci pro-MMP-2. Proto je při absenci TIMP-2 znemožněna aktivace pro-MMP-2 (viz obrázek 3). Gen pro TIMP-2 se nachází na chromozomu 17q25 [5, 10]. Skrze vazbu s integrinem $\alpha 3\beta 1$ může TIMP-2 zamezovat angiogenezi [62].



Obrázek 3: Komplex MT1-MMP s pro-MMP-2 způsobující aktivaci pro-MMP-2.

1.4 EMMPRIN/CD147

EMMPRIN (**E**xtracellular **M**atrix **M**etalloproteinase **I**nducer), známý také jako CD147 (Cluster of Differentiation Nomenklature – systém značení používaný pro skupiny molekul na povrchu buněk), je transmembránový glykoprotein patřící do immunoglobulinové superrodiny (IgSF). Původně byl popsán na povrchu nádorových buněk, kde je schopen vyvolat tvorbu MMPs v sousedních fibroblastech. Později byl přejmenován na EMMPRIN, když se zjistilo, že má širší vliv na produkci MMPs. EMMPRIN tedy stimuluje tvorbu MMP-1, MMP-2, MMP-3 a také MT-MMPs, nicméně nemá žádný vliv na jejich tkáňové inhibitory TIMPs. EMMPRIN výrazně ovlivňuje celou řadu jak fyziologických, tak i patofyziologických procesů. Hraje důležitou roli v aterogenezi, progresi aterosklerotických změn a akutní trombóze sklerotických cév, což je spojeno s rizikem vzniku kardiovaskulárního onemocnění. Je však naopak důležitý pro angiogenezi, spermatogenezi, při vývoji lymfocytů a při imunitní odpovědi. [34,33] EMMPRIN byl také identifikován ve zdravých keratinocytech [47]. Expres EMMPRINu je zvýšená u zánětlivých onemocnění, jako jsou bércové ulcerace, revmatoidní artritida, systémový lupus erythematosus. EMMPRIN je dále receptorem pro invazivní protein RH5, který je přítomný u přenašečů malárie [35].

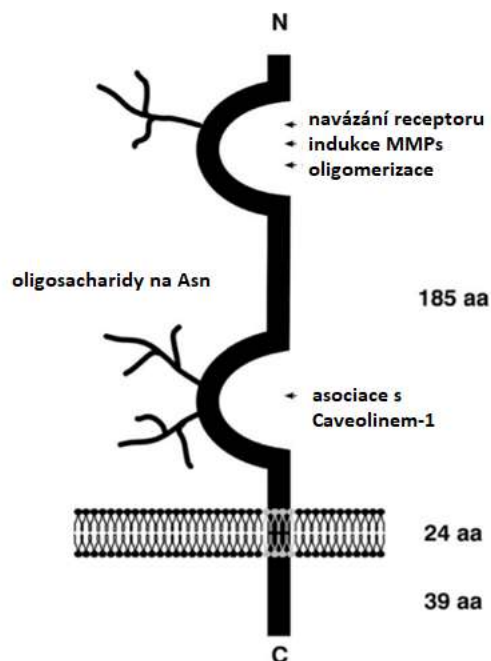
V současnosti je v mnoha studiích zkoumán vliv EMMPRINu na nádorová onemocnění. Jeho zvýšená hladina, jež byla detekována u mnoha maligních nádorů (kožní, rakovina močového měchýře, rakovina plic, rakovina prsu, lymfom) vede k progresi těchto nádorů. Zvýšená hladina exprese vedla k progresi také u gliomů, hepatomu, melanomu a nemelanomových karcinomů kůže. Naštěstí existují látky, které dokáží snížit expresi EMMPRINu, což by se v budoucnosti dalo využít při léčbě rakoviny. Jsou jimi růstové faktory (EGR, anti-sense EGFR, Amphiregulin), hormony, protein pinin nebo posttranskripčně proces glykosylace. Také navázání proteinu Caveolinu-1 na Ig doménu EMMPRINu vede ke snížení hromadění EMMPRINu na povrchu buňky, a tím ke snížení jeho tvorby MMPs. Dále se EMMPRIN váže na integriny $\beta 1$, zejména na $\alpha 3\beta 1$ integrin [36,37].

EMMPRIN má spoustu jmen. Vzhledem ke svým pleiotropním funkcím byl objeven nezávisle na sobě v několika různých studiích. Jeho formě u člověka, která je kódovaná na BSG genu,

bylo Human Genome Organization dáno jméno basigin. Basigin na sobě nese tzv. OK Blood Group System, což je skupina tří antigenů. U člověka je dále EMMPRIN nazýván CD147 nebo HAb18G. U myši je nazýván gp42, OX-47 u krysy a 5A11, HT7 a neurothelin u kuřat [33, 46].

1.4.1 Struktura EMMPRINU/CD147

EMMPRIN je kódován na BSG genu na chromozomu 19p13.3 a obsahuje 8 exonů a 6 intronů. Má 1797 párů bází. EMMPRIN se skládá ze dvou immunoglobulinových domén - N-terminální IgC2 domény a C-terminální IgI domény v extracelulárním regionu, které jsou flexibilně spojeny. První Ig doména zajišťuje indukci MMPs, oligomerizaci a navázání receptoru. Druhá Ig doména slouží k navázání caveolinu-1. Kromě těchto dvou Ig domén EMMPRIN obsahuje transmembránovou doménu s 24 aminokyselinami a cytoplasmatickou doménu se 39 aminokyselinami. Extracelulární region obsahuje 3 oligosacharidy navázané na asparagin a uprostřed této domény najdeme kyselinu glutamovou, díky které se EMMPRIN může vázat s ostatními transmembránovými proteiny. V 5' regionu genu obsahuje EMMPRIN oblast dlouhou 30 bp (-144- -112), díky které se dokáže vázat na Sp1 (specifický protein), AP1TFII a transkripční faktor EGF-2 (early growth response). Intracelulární doména pak zajišťuje přenos signálů do buněk. Molekula EMMPRINU se může navázat na jinou molekulu EMMPRINU a vytvořit tak homo-oligomer schopný zvyšovat aktivitu na povrchu buněk [36, 38, 45;57]. EMMPRIN rozpoznává molekuly ve stejné membráně (cis-recognition) nebo ty s extracelulární lokací (trans-recognition) [38] Důležitou roli hraje dimerizace krystalické struktury EMMPRINU, která souvisí s invazitou nádorových buněk a tvorbou MMP-2 [58].



Obrázek 4: Struktura EMMPRINU [36, upraveno]

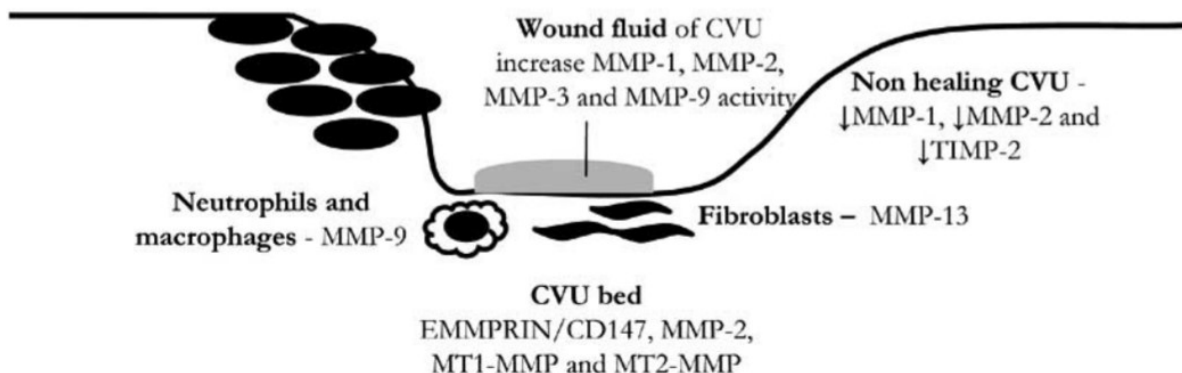
1.4.2 Role EMMPRINu/CD47, MMPs a TIMPs u chronických žilních bérkových vředů

MMPs hrají důležitou roli při hojení ran, a to ve všech třech fázích - tedy zánětlivé, proliferační a remodelační. V zánětlivé fázi štěpí poškozenou ECM a rozrušují biofilm. Ten je tvořen bakteriemi, které produkují želatinovou ECM chránící bakterie před imunitním systémem. V proliferační fázi se uplatňují při degradaci bazální membrány kapilár, čímž umožňují angiogenezi (novotvorbu kapilár). MMPs jsou nezbytné také při migraci keratinocytů, fibroblastů a endoteliálních buněk na spodině rány. Zejména MMP-1, která je produkována keratinocyty, štěpí kolagen I, čímž umožňuje pohyb keratinocytů po spodině rány. MMPs se také uplatňují ve fázi kontrakce a remodelace jizvy. V malém množství jsou tedy MMPs nezbytné k léčbě rány [14, 16].

Jejich přiměřená hladina je regulována TIMPs, které v akutní ráně brání nadměrné produkci MMPs. Za normálních okolností je tedy v ráně rovnováha mezi MMPs a TIMPs. U chronických ran byla prokázána mnohonásobně vyšší hladina některých MMPs, např. MMP-2 a také zvýšená hladina exprese EMMPRINu [25]. Tento stav vede k tomu, že MMPs následně degradují i jiné látky, než jsou jejich substráty (kolagen, růstové faktory aj.). Dochází ke vzniku nehojících se chronických ran. Cílem léčby by tedy mělo být vytvoření rovnováhy mezi MMPs a TIMPs. Snížením hladiny MMPs se v ráně vytvoří prostředí podobné ráně akutní, a tím by se měla chronická rána rychle zhojit.

Biopsie ze spodiny CVU (chronic venous ulceration – chronického žilního bérkového vředu) prokázala zvýšenou expresi EMMPRINu, MMP-2, MT1-MMP a MT2-MMP ve srovnání s kontrolním souborem zdravých pacientů [41]. Distribuce MMPs/TIMPs se liší u akutních ran a chronických bérkových vředů. Některé MMPs byly prokázány v oblasti spodiny bérkového vředu (MMP-9, MMP-13), zatímco jiné MMPs byly zjištěny u migrujících buněk žilního bérkového vředu (MMP-1) a u proliferačních buněk v okrajích akutních ran (TIMP-1, TIMP-3) Na základě těchto zjištění se předpokládá, že některé MMPs (MMP-1, TIMP-1, TIMP-3) jsou nezbytné pro reepitelizaci a jiné (MMP-9, MMP-13) mohou být zahrnuty v remodelaci kolagenu (viz obrázek) [40].

Keratinocytes and dermal cells
of acute wound or healing CVU –
MMP-1, TIMP-1 and TIMP-3



Obrázek 5 Rozložení MMPs a TIMPs v chronickém žilním bérčovém vředu. Na okrajích vidíme MMP-1, TIMP-1 a TIMP-3 zajišťující epitelizaci

V současné době jsou pro léčbu ran vyvíjeny produkty upravující rovnováhu MMPs a TIMPs. Jedním z nich je hydroaktivní krytí obsahující superabsorbující polyakrylát, u kterého bylo dokázáno, že inhibuje MMPs navázáním se na dvojmocné ionty v MMPs (Zn^{2+} , Ca^{2+}), které jsou nezbytné pro jejich enzymatickou aktivitu [42]. Dalším produktem je oxidovaná regenerovaná celulóza, která upravuje prostředí rány pomocí navázání a následné inaktivace přebytečných proteáz [43]. Byl také zveřejněn článek popisující léčbu kombinací doxycyklinu (který je MMP inhibítorem) a topického tacrolimu, kterým byly úspěšně vyléčeny 3 rezistentní CVU. V současnosti by měla následovat studie s vyšším počtem pacientů [44].

1.5 Faktor V Leiden 1691 G/A

Leidenská mutace je autozomálně dominantně dědičná bodová mutace důležitého hemokoagulačního faktoru V. Dochází k ní v exonové části genu pro faktor V v pozici 1691 a dochází při ní k záměně guaninu za adenin. Tím je v peptidickém řetězci zařazena místo argininu aminokyselina glutamin a kvůli této záměně se faktor V stává rezistentní vůči aktivovanému proteinu C, který je jeho přirozeným inhibítorem. Tím je narušena funkce celého koagulačního systému, protože protein C není schopen mutovaný FVL inhibovat a abnormálně se zvyšuje krevní srážlivost – dochází k tzv. trombofilnímu stavu. Tento stav může vést ke vzniku krevních sraženin – tzv. trombům, které ucpávají cévy. Vznikají žilní trombózy, zejména na dolních končetinách, a následně i velmi nebezpečná plicní embolie. Leidenská mutace tak může být příčinou předčasných infarktů nebo mozkových příhod a potratů nebo předčasných porodů. Rizikovými faktory jsou při trombofilním stavu dlouhodobé lety letadlem, operace, těhotenství nebo obezita.

Prevalence Leidenské mutace je v Evropě poměrně vysoká, heterozygotní variantu má 5-6 % populace. Naproti tomu v Asii nebo Africe se s touto mutací setkáme velmi zřídka. Heterozygotní varianta faktoru V Leiden zvyšuje riziko žilní trombózy přibližně 10krát. Jeho homozygotní varianta dokonce 80krát. Leidenská mutace může být velmi nebezpečná pro ženy užívající hormonální antikoncepci, která i jen sama o sobě zvyšuje krevní srážlivost. Riziko vzniku

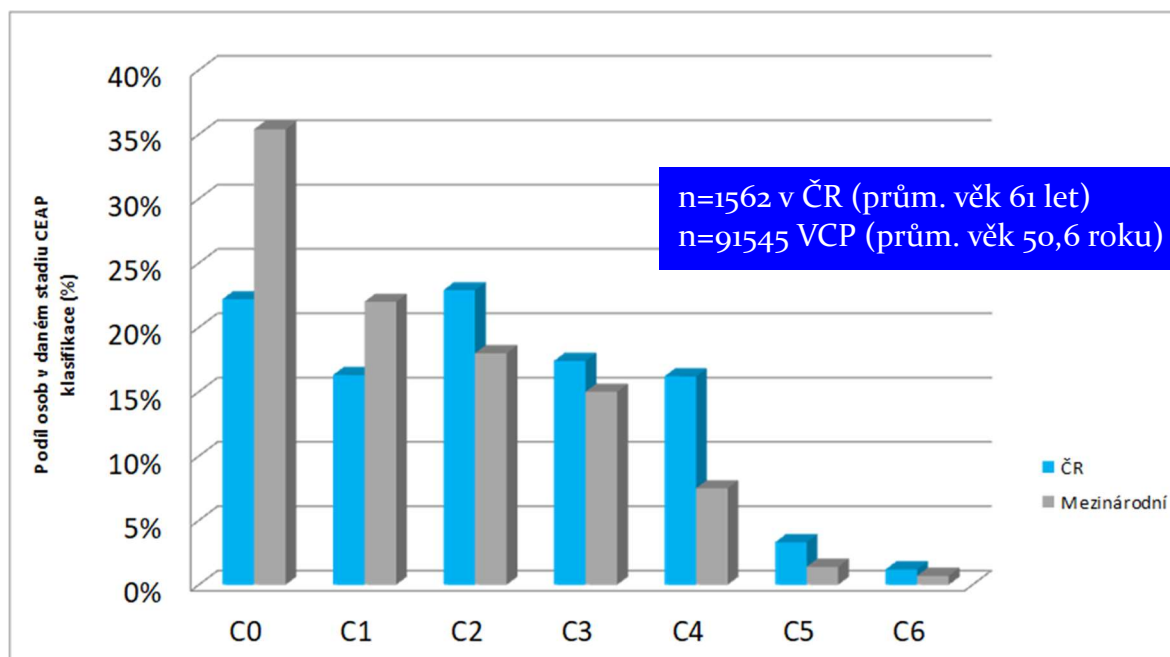
krevní sraženiny a komplikací s tím spojených se mnohonásobně zvyšuje a dívky s mutací faktor V Leiden by hormonální antikoncepci neměly vůbec užívat [48,49,50,51].

1.6 Chronické žilní onemocnění

Chronické žilní onemocnění (CVD) se definuje jako „dlouhodobé morfologické a funkční abnormality žilního systému, které se projevují příznaky vyžadujícími vyšetření a /nebo léčbu“ [11]. Chronické žilní onemocnění je extrémně častá choroba. Podle mezinárodního epidemiologického průzkumu, jménem Vein Consult program, do nějž bylo zařazeno 91 545 pacientů, trpělo tímto onemocněním 84 % pacientů ve stádiích C0-C6, z toho 64 % patřilo do stádií C1-C6 a 19 % patřilo do stádia C0, kam řadíme mj. pacienty s pocity „těžkých nohou“ anebo s nočními křečemi nohou. Prevalence s věkem narůstá, ve stádiích C1-C3 je signifikantně častější u žen, ve stádiích C4-C6 jsou poměry mužů a žen srovnatelné. Vein Consult program probíhal i v ČR pod názvem Czech Vein program, a zapojilo se do něj 1562 pacientů. Výsledná prevalence pro ČR je podle tohoto průzkumu 70 % a má progredující charakter [29, 30, 31].

Rizikovými faktory pro vznik chronického žilního onemocnění jsou komplexní genetické predispozice a s tím související pozitivní rodinná anamnéza, ženské pohlaví, obezita, vyšší věk, těhotenství a dlouhodobé stání [32].

Mezi symptomy CVD patří bolesti, pocit otoku, křeče, svědění nohou a také již zmiňovaný pocit těžkých nohou. Chronické žilní onemocnění výrazně snižuje kvalitu života pacientů, což je způsobeno bolestmi, omezenou schopností pohybu a vykonávání fyzických aktivit. Často je proto toto onemocnění provázáno depresi a sociální izolací pacienta [32].



Obrázek 6-Graf porovnávající údaje Vein Consult Programu a Czech Vein Programu

Dle celosvětové CEAP klasifikace hodnotíme stav a závažnost CVD podle klinických příznaků, etiologie, anatomických změn a patofyziologie (viz tabulka níže).

CEAP Klasifikace: C - Klinická klasifikace

C0	Žádné viditelné známky žilního onemocnění
C1	Teleangiektázie nebo retikulární žíly
C2	Varixy (křečové žíly)
C3	Varixy a otok (edém)
C4a	Varixy a pigmentace nebo ekzém
C4b	Varixy a lipodermatoskleróza nebo bílá atrofie
C5	Varixy a zhojený bércový vřed
C6	Varixy a aktivní bércový vřed

E - Etiologie			
Ec	Ep	Es	En
kongenitální příčina	primární příčina	sekundární příčina (posttrombotická či jiná)	bez identifikovatelné žilní etiologie
A - Anatomická lokalizace			
As	Ad	Ap	An
povrchový žilní systém	hluboký žilní systém	žilní perforátory	anatomickou anomálii nelze identifikovat
P - Patofyziologický proces			
Pr	Po	Pr,o	Pn
reflux	obstrukce	reflux a obstrukce	patofyziologii nelze identifikovat

[30, upraveno]

1.6.1 Chronická žilní nedostatečnost

Chronická žilní nedostatečnost (VEI) je pak těžší stadium žilního onemocnění (C3-C6 dle CEAP klasifikace), kdy dochází k otoku, kožním změnám a tvorbě bérceových vředů. Při tomto stavu je také narušena funkce žilního systému. Je způsobena žilním refluxem při nedomykavosti chlopní [11, 12].

1.6.2 Bérceové ulcerace

Bérceové ulcerace (=bérceové vředy) jsou nejtěžším stádiem chronického žilního onemocnění. Jsou to otevřené léze v oblasti bérce, tedy mezi kolenem a kotníkem. Jedná se o ztrátu kůže v celé hloubce, někdy vřed zasahuje až do podkoží. Část ulcerací lze vyléčit během několika týdnů, většinou se ale jedná o chronické onemocnění. Prevalence bérceových ulcerací se ve většině studií pohybuje mezi 1-2 % populace [11, 12].

Rizikovými faktory pro vznik bérceového vředu jsou starší věk, ženské pohlaví, obezita, hluboká žilní trombóza, nedostatek pohybu, zánět žil, faktor V Leiden, těhotenství a dlouhodobé stání [12, 14, 66].

1.6.2.1 Patofyziologie bérceových ulcerací

Venózní ulcerace vznikají důsledkem chronické žilní hypertenze (dlouhodobě zvýšený tlak), která dále vede ke změnám v mikrocirkulaci. Také nadměrné množství fibrinu uložené v blízkosti kapiláry vede ke zvýšenému intravaskulárnímu tlaku, je výrazně snížena propustnost (permeabilita) žil. Tato bariéra dále zabraňuje přestupu kyslíku a dalších živin, což způsobuje nedostatek kyslíku ve tkáni, a tím komplikuje hojení rány. Růstové faktory a zánětlivé buňky, které zůstanou uvězněny ve fibrinové bariéře, mohou způsobovat těžké záněty v okolní tkáni. Leukocyty zachycené v kapilárách uvolňují proteolytické enzymy a reaktivní kyslíkové metabolity, což způsobuje poškození endotelií. Dysregulace nejrůznějších prozánětlivých cytokinů, růstových faktorů, např. tumor nekrotizujícího faktoru alfa (tumor necrosis factor- α TNF- α), transformujícího růstového faktoru beta (transforming growth factor-beta - TGF- β) a matrix metaloproteináz vede ke vzniku chronického bérceového vředu [13].

2 CÍLE PRÁCE

Moje práce navazuje na loňskou SOČ, kdy jsme zkoumali polymorfismus genu pro tkáňový inhibitor matrix metaloproteináz TIMP-2 u pacientů s chronickým žilním onemocněním a u kontrolního souboru. Cílem mé letošní práce proto bylo navázat na zkoumání vlivu genetických polymorfismů na chronické žilní onemocnění. Vybrali jsme tři faktory, které toto onemocnění výrazně ovlivňují, a to CD147 - bodovou mutaci v restrikčním místě 8259, matrix metaloproteinázu 9 s bodovou mutací v rs279 a mutaci Faktoru V Leiden N/L. Cílem naší práce bylo genotypizovat soubor pacientů s CVD a kontrolní soubor pro bodové mutace v genech pro CD147, MMP-9 a FVL a zjistit jejich vliv na chronické žilní onemocnění. Provedli jsme studii case-control, kde jsme porovnávali genotypy pacientů s CVD a pacienty kontrolního souboru a studii genotyp fenotyp, kde jsme porovnávali genetické predispozice s fenotypickými projevy.

Při detekci rizikových variant genů u pacienta by pak bylo možné rozlišit pacienty s vysokým rizikem vzniku chronického žilního bércevého vředu a pacienty s pomalým hojením ulcerace, a tím uzpůsobit léčbu pro takového pacienta. Včasná prevence může vést k rychlejšímu zavedení preventivních opatření a tím zabránit vzniku bércevého vředu. Tím by došlo k výraznému zvýšení kvality života pacientů.

Mým osobním cílem bylo pokračovat v započatém výzkumu v laboratořích a psáním odborné práce se naučit lepšímu porozumění a orientaci ve vědeckých člancích.

3 SOUBOR PACIENTŮ A KONTROLNÍCH OSOB

Tato studie byla asociační studie případy-kontroly („case-control“) a v rámci souboru pacientů s CVD také studie genotyp-fenotyp.

Do studie bylo zařazeno 150 pacientů léčených na I. dermatovenerologické klinice fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně. Všichni tito pacienti měli diagnostikováno chronické žilní onemocnění (CVD) v různých stádiích (tabulka 1). Průměrný věk pacientů byl 70 let, přičemž u mužů to bylo 73 let a u žen 67 let. Průměrný věk začátku onemocnění byl 43,2 let (48,3 u mužů a 39,5 let u žen).

Stádium CVD dle CEAP klasifikace	Muži (N=63)	ženy (N=87)
C1	0 (0 %)	1 (1 %)
C2	0 (0 %)	2 (2 %)
C3	0 (0 %)	12 (14 %)
C4	8 (13 %)	7 (8 %)
C5	17 (27 %)	24 (28 %)
C6	38 (60 %)	41 (47 %)

Tabulka 1: Počet pacientů v jednotlivých stádiích CVD dle CEAP klasifikace

Celý výzkum probíhal anonymně, vzorky byly označeny pouze čísly. Pacienti podepsali informovaný souhlas se studií. Kromě CVD měli někteří pacienti diagnostikována další onemocnění, jako je tumor, diabetes mellitus, hypertenze, trombofilie, obezita nebo ischemická choroba srdeční.

Kontrolní soubor tvořilo 227 pacientů bez příznaků CVD. Průměrný věk pacientů kontrolního a vyšetřovaného souboru byl srovnatelný.

4 LABORATORNÍ METODY

4.1 Izolace DNA

Pro zjištění genotypu pacienta je nejdříve potřeba izolovat jeho DNA, v případě našeho výzkumu se izolace prováděla z krve pacienta. Jedná se o poměrně složitý proces, při němž se nejdříve vzorky krve centrifugují po dobu 10 minut na 5000 otáček za minutu. Díky této centrifugaci se na dně zkumavky vytváří sraženina, od které se postupně opatrně odlévá supernatant. Následně se přidá 20-30 ml destilované vody a vzorek se znovu centrifuguje opět 10 minut na 5000 otáček za minutu. Od usazeniny se opětovně odlije supernatant a přidá se 20-25 ml fyziologického roztoku. Dochází ke třetí centrifugaci a následnému slévání. Pro odstranění zbytků hemoglobinu a erytrocytů se dále promývá fyziologickým roztokem. K promytému sedimentu DNA se posléze přidá 0,5 ml fyziologického roztoku a po promíchání dále 3 ml roztoku FASSANO (NaCl, EDTA, TRIS, demineralizovaná voda) a 20 μ l proteinázy K. Ty způsobí lýzu buněk a proteolýzu neboli rozklad bílkovin na peptidy a aminokyseliny. Zkumavky se nechají inkubovat v termostatu buď přes noc při teplotě 37 °C nebo 2 hodiny při teplotě 50°C. Po vyjmutí z termostatu zkumavky temperujeme na pokojovou teplotu a následně přidáme 1,4 ml 5M roztoku NaCl a stejný objem chloroformu jako vzorku. Tyto látky způsobí deproteinaci tedy odstranění bílkovin ze směsi. Zkumavky dále mícháme dvě hodiny na přístroji zvaném třepačka a posléze vzorky 15 minut centrifugujeme na 8000 otáček za minutu. Po odsátí horní vrstvy pak do nové zkumavky přidáme stejný podíl chlazeného 2-propanolu jako vzorku. Jemným obracením zkumavky vysrážíme DNA, kterou pak namotáme na skleněný háček a opláchneme v 70% ethanolu. Nakonec DNA umístíme do nové sterilní zkumavky, kterou popíšeme kódem DNA. Při teplotě 4 °C necháme DNA rozpouštět po dobu minimálně 5 dní.

Pro práci se DNA dále ředí s demineralizovanou vodou (voda, zbavená všech iontově rozpustných látek a křemíku) v poměru 1:9. Zásobní DNA se skladuje při teplotě -20°C [3].

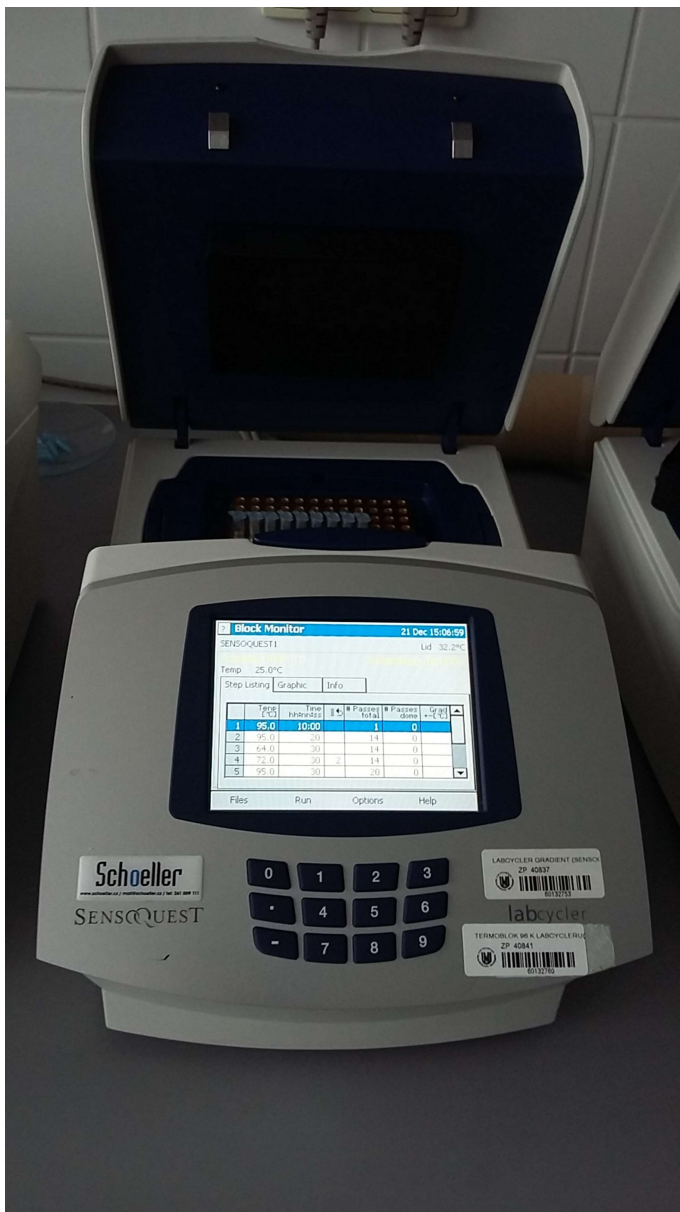
4.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro možnost aplikace PCR je třeba znát nukleotidovou sekvenci DNA na obou koncích požadovaného úseku. Při této reakci dochází k amplifikaci sekvence DNA, přičemž se v řádu několika hodin může vytvořit přes milion kopií této sekvence. Reakce probíhá *in vitro*.

Principem PCR je cyklické střídání tří teplot. V první fázi dochází k denaturaci (rozdělení dvojšroubovice na dva samostatné řetězce) genomové DNA, a to při teplotě 92-95°C. Ve druhé fázi se na denaturovanou DNA navážou synteticky vytvořené oligonukleotidové primery a to na protilehlé konce amplifikované sekvence. Toto připojení primerů probíhá při teplotě 50-60°C. Ve třetí fázi se použitím DNA-polymerázy replikuje úsek DNA navazující na oligonukleotidové primery ve směru 5'-3' podle sekvence původní DNA. Primery totiž poskytují volnou 3' OH skupinu, na niž se polymeráza naváže. Původní vlákno DNA slouží jako templát. Třetí fáze probíhá při teplotě 70-72 °C a trvá 1,5 minuty. Celý cyklus se posléze mnohokrát opakuje, dochází k denaturaci původní DNA a replikované DNA, následnému

připojení primerů a replikaci DNA také k řetězci vzniklému v předchozím cyklu. Reakce PCR je exponenciální. Za pouhých 30 cyklů vzniká více než miliarda kopií (přesněji 1 073 741 766 molekul).

V praxi se reakce PCR provádí nejdříve přidáním tzv. mastermixu ke vzorku DNA. Mastermix se skládá z: destilované vody; pufru, který zajišťuje správné podmínky pro aktivitu DNA-polymerázy; hořčičných kationtů; obou primerů, které se obvykle skládají z 20-25 nukleotidů; směsi dNTP (2'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), které jsou stavebními kameny pro vznik nového řetězce DNA; a DNA-polymerázy. Následně se vzorky vloží do zařízení zvaných termocykly, které samy střídají tři teploty pro zmiňované tři fáze v naprogramovaných časech, stanovených při optimalizaci příslušné metody PCR. (viz obrázek) O tom, zda se nám povedlo syntetizovat dostatečné množství produktu reakce PCR se přesvědčíme elektroforetickými metodami [3, 4].



Obrázek 7: Termocykler s naprogramovanými teplotami pro tři fáze PCR

4.3 Restrikční analýza (RFLP)

Při této metodě dochází ke štěpení DNA v produktu PCR na specifickém místě pomocí restrikčních endonukleáz. Tyto endonukleázy jsou bakteriální enzymy, které DNA štěpí neohledě na zdroj, z něhož DNA pochází, vždy stejně. Bakterie se jimi pravděpodobně brání proti vniknutí virové DNA. Místo, kde dochází k rozštěpení, se nazývá restrikční. Rozpoznávací sekvence je často palindromická (čte se stejně zepředu i zezadu), díky čemuž po rozštěpení vzniká tzv. lepivý neboli kohezní konec, který je tvořen částí jednořetězcové DNA. Vytvořením příhodných podmínek tak lze tyto rozštěpené části zase spojit. Každá restrikční endonukleáza rozeznává v DNA jinou specifickou sekvenci, kterou štěpí. Restrikční endonukleázy se dělí na čtyři typy podle místa, kde štěpí DNA. Typ I sice rozlišuje specifické sekvence, ale místo štěpení není přesně určeno. Typ II štěpí DNA přímo v místě rozpoznávací sekvence nebo v její těsné blízkosti. Typ III štěpí DNA ve vzdálenosti 25-27 bp od rozpoznávací sekvence. Typ IV štěpí methylovanou DNA.

Pro restrikční analýzu ke stanovení genotypu polymorfismu v genu pro TIMP-2 jsou využívány restrikční endonukleázy typu II, které dále štěpí DNA na samostatné fragmenty. Každá endonukleáza pracuje při specifické teplotě, která se nastavuje v termostatu [1,3,4].

4.4 Elektroforéza

Elektroforéza je děj v elektrickém poli, při kterém se záporně nabitá DNA pohybuje od anody ke katodě. Přitom je umístěna v agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu, který zde slouží jako síto. Větší molekuly se tudíž pohybují ke katodě pomaleji než menší. Agarosový gel je vhodnější pro elektroforézu větších molekul (nad několik set nukleotidů), kdežto polyakrylamidový gel je lepší pro malé molekuly. Této metody se využívá při oddělování fragmentů vzniklých po štěpení DNA.

Do utěsněné elektroforetické vaničky s nachystaným hřebínkem pro vzorky DNA se nalije rozvařený agarosový gel. Po ztuhnutí se hřebínek vyjme a do vzniklých jamek se nanese vzorky DNA smíchané s pufrům o vyšší hustotě než pufr ve vaničce, aby se vzorky při klesání do jamek nerozptýlily. Posléze připojíme vaničku ke zdroji elektřiny a dochází k oddělení fragmentů. Agarosový gel se poté vyjme z vaničky a barví Ethidium Bromidem, který se naváže na DNA a má po následném ozáření UV světlem fluorescenční vlastnosti.

Ozáríme UV světlem, po vyfotografování vidíme přesnou polohu restrikčních fragmentů v gelu. Odečteme genotyp podle délky restrikčních fragmentů ve srovnání s referenčním žebříčkem se známým počtem nukleotidů. Pokud restrikční enzym nerozpoznal specifickou sekvenci, DNA se nenaštěpilo a v gelu vidíme jediný celistvý proužek [3, 4].

4.5 Genotypizace v genu pro TIMP-2

Při své práci jsem měla k dispozici již izolované vzorky DNA všech pacientů v souborech. Nejdříve jsem připravila mastermix, potřebný pro provedení reakce PCR. V boxu vyzářeném

UV světlem jsem v jednotlivých zkumavkách vždy ke 2 μl DNA z jednoho vzorku přidala 13 μl mastermixu, který se na jeden vzorek skládal z:

- 7,4 μl destilované vody
- 1,5 μl pracovního pufru
- 2,5 μl hořečnatých kationtů Mg^{2+}
- 0,5 μl prvního primeru
- 0,5 μl druhého primeru
- 0,5 μl nukleotidů
- 0,1 μl Taq polymerázy

Primery byly oligonukleotidové kyseliny, obsahující v kladném směru sekvenci 5'-GCCCAGGGTGGTCTGGATGG-3' a v záporném směru 5'-CTCCGGCTGATGGCCCCACT-3. Poté jsem všechny zkumavky naskládala do termocyklerů, kde proběhla reakce PCR. Vznikly produkty o délce 221bp. Elektroforézou jsem ověřila, zda se nasynetizovalo dostatečné množství DNA.

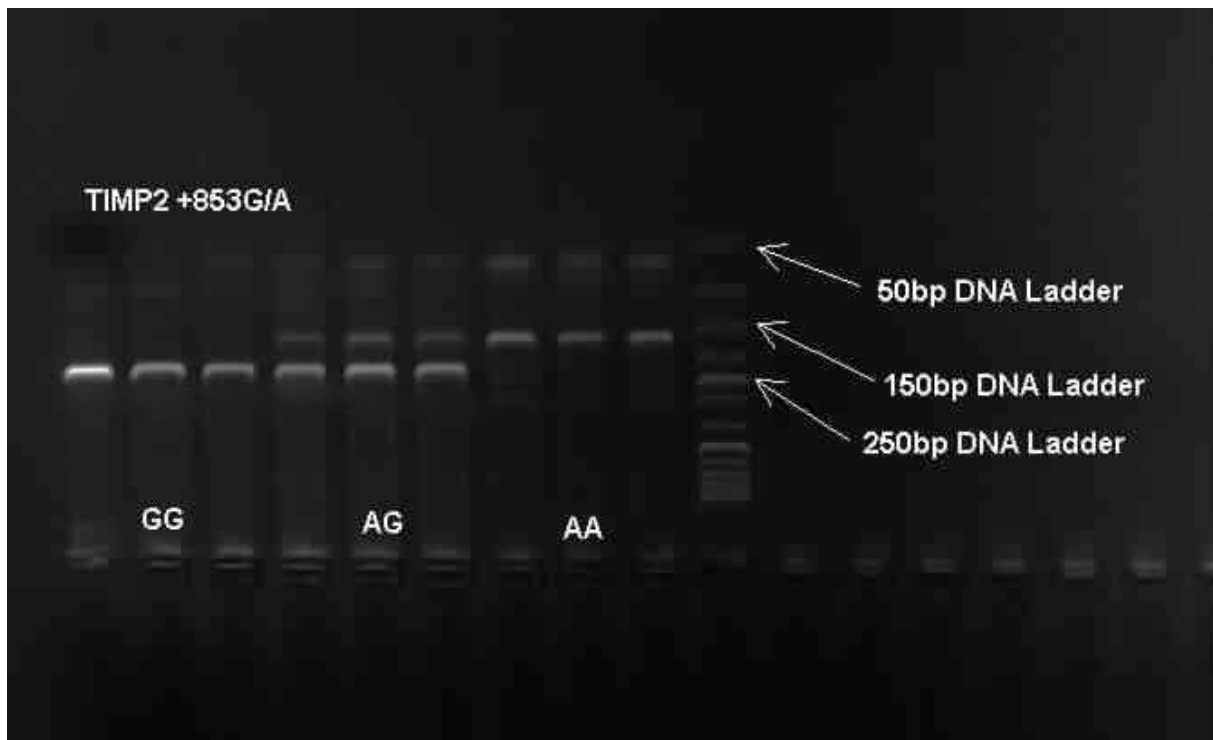
Pro stanovení jednotlivých genotypů ze vzniklého produktu PCR jsem použila restrikční analýzu. K produktu PCR ve zkumavce se přidá 5 μl mastermixu pro restrikční analýzu. Ten se skládá na jeden vzorek z:

- 2,7 μl destilované vody
- 2,0 μl pracovního pufru
- 0,3 μl restrikčního enzymu BsrI

Zkumavky se vloží do termostatu, ve kterém je dosaženo teploty potřebné k aktivitě enzymu, v tomto případě je to 65°C a 4 hodiny probíhá štěpení. Poté je třeba pomocí elektroforézy určit jednotlivé genotypy. Nejdříve jsem uvařila 2% agarosový gel. V Erlenmayerově baňce se vaří agarósa s pracovním TBE, dokud není roztok čirý. Zásobní TBE se skládá z:

- 108 g Tris
- 55 g Boric acid (kyselina boritá)
- 40 ml 0,5M EDTA
- destilovaná voda

Pracovní TBE se pak ředí v poměru 1:9 s destilovanou vodou. Poté se směs vlije do formy s přichystanými okraji a hřebínkem, vytvářejícím jamky na vzorky, a nechá se zatuhnout. Hotový gel se vloží do elektroforetické vaničky. Do připravených jamek se pak nanese vzorky DNA smíchané s pufrem o vyšší hustotě, než má pufr ve vaničce, obarvené fluorescenčním Ethidium Bromidem. Vanička se připojí ke zdroji elektřiny a záporně nabitě vzorky DNA se dle velikosti svých fragmentů pohybují rozdílnou rychlostí ke katodě. Poté vaničku odpojíme od zdroje elektrického proudu a vyjmeme agarosový gel. Ten ozáříme UV zářením a vyfotografujeme. Nakonec odečteme jednotlivé genotypy podle délky restrikčních fragmentů ve srovnání s referenčním žebříčkem se známým počtem nukleotidů (viz obrázek).



Obrázek 8: Fotografie elektroforetického gelu. Na obrázku vidíme tři vzorky od každého genotypu (GG, AG, AA). Při přítomnosti genotypu GG se jedná o nemutovaný genotyp a enzym ho neštěpí. Na obrázku se tedy jeví jako jediný celistvý proužek a délka jeho fragmentu je 221 bp. V případě genotypu AG se alela G nenaštěpí a mutovaná alela A se rozštěpí na dva fragmenty o délce 161bp+61bp. Jsou kratší, a proto se při elektroforéze dostali blíže ke katodě než 221 bp fragment G. Při genotypu AA, kdy jsou tedy obě alely mutované, se naštěpí na fragmenty o délce 161bp+61bp. Polohu fragmentů srovnáváme s referenčním žebříčkem (DNA Ladder)

4.6 Genotypizace v genu pro CD147/EMMPRIN

Při své práci jsem měla k dispozici již izolované vzorky DNA všech pacientů v obou souborech. Nejdříve jsem připravila mastermix, potřebný pro provedení reakce PCR. V boxu vyzářeném UV světlem jsem v jednotlivých zkumavkách vždy ke 2 μl DNA z jednoho vzorku přidala 13 μl mastermixu, který se na jeden vzorek skládal z:

- 7,4 μl destilované vody
- 1,5 μl pracovního pufru
- 2,5 μl hořečnatých kationtů Mg^{2+}
- 0,5 μl prvního primeru
- 0,5 μl druhého primeru
- 0,5 μl nukleotidů
- 0,1 μl Taq polymerázy

Primery byly oligonukleotidové kyseliny, obsahující v kladném směru sekvenci 5'-GAGTCCACTCCCAGTGCTTG-3' a v záporném směru 5'-CTCGTGAAACACTTCAGAAGGAAAAGA-3. Poté jsem všechny zkumavky naskládala do termocyklerů, kde proběhla reakce PCR. Vznikly produkty o délce 162bp. Elektroforézou jsem ověřila, zda se nasynthetizovalo dostatečné množství DNA.

Pro stanovení jednotlivých genotypů ze vzniklého produktu PCR jsem použila restrikční analýzu. K produktu PCR ve zkumavce se přidá 5 μl mastermixu pro restrikční analýzu. Ten se skládá na jeden vzorek z:

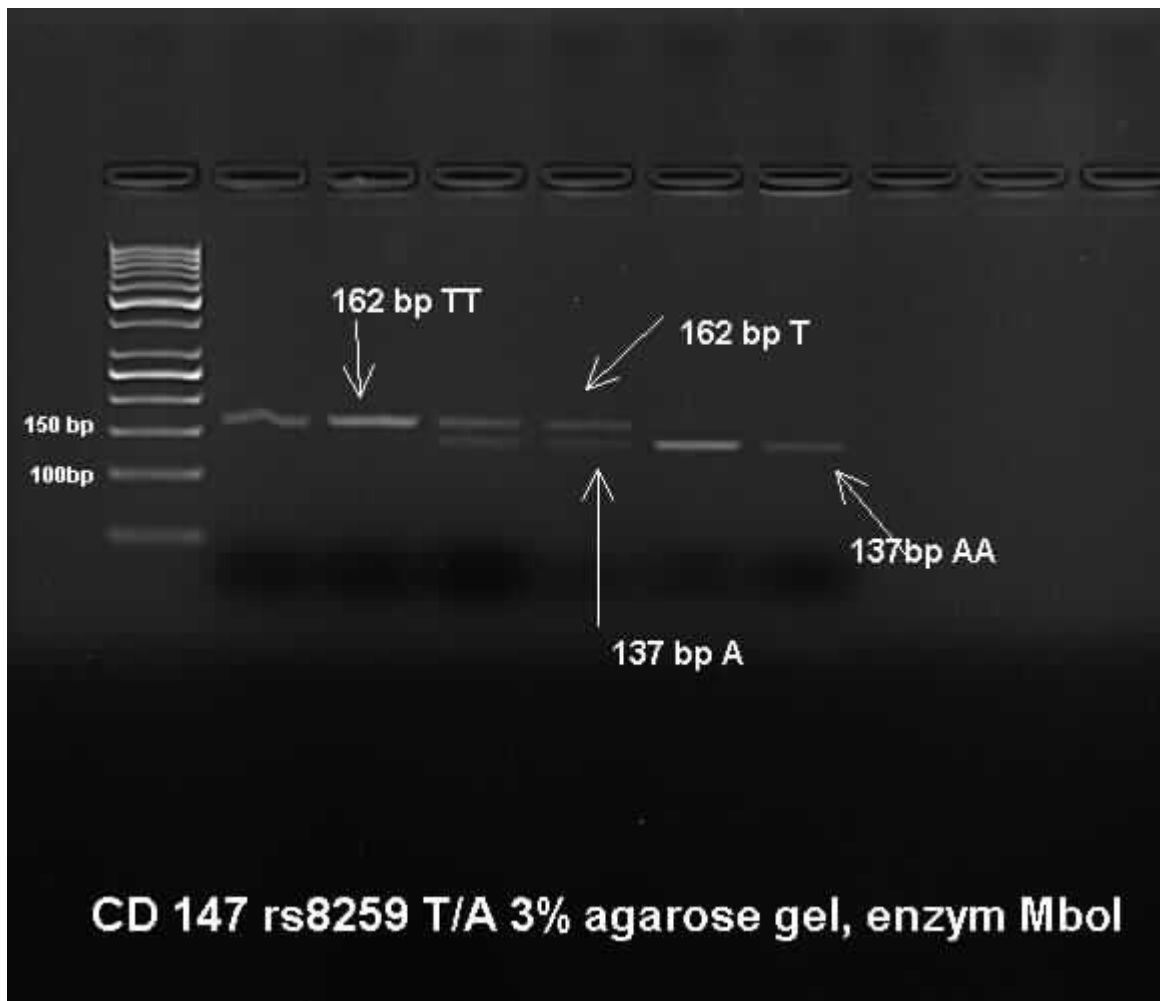
- 2,7 μl destilované vody
- 2,0 μl pracovního pufru
- 0,3 μl restrikčního enzymu MboI

Restrikční enzym MboI, který štěpí sekvenci dle obrázku:



Obrázek 6: Štěpné místo restrikčního enzymu MboI [<https://www.neb.com/products/r0147-mboi#Legal%20Information>]

Pro aktivitu enzymu MboI je potřeba teplota 37°C. Při restrikční analýze štěpí fragment mutované alely A na 137bp+25bp. Zkumavky se vloží do termostatu, ve kterém je dosaženo teploty potřebné k aktivitě enzymu a probíhá štěpení. Pokud je přítomna mutovaná alela A, produkt PCR se rozštěpí na dva fragmenty o délkách 137bp a 25bp. Neštěpený 162bp dlouhý fragment pak při odečítání genotypů značí alelu T. Poté se pomocí elektroforézy určí jednotlivé genotypy stejným způsobem jako u TIMP-2.



Obrázek 7: Fotografie elektroforetického gelu. Na obrázku vidíme dva vzorky od každého genotypu (TT, AT, AA). Nemutovaný genotyp TT enzym neštěpí. Na obrázku se tedy jeví jako jediný celistvý proužek a délka jeho fragmentu je 162 bp. V případě genotypu AT se alela T nenaštěpí a mutovaná alela A se rozštěpí na dva fragmenty o délce 137bp+25bp. Jsou kratší, a proto se při elektroforéze dostali blíže ke katodě než 162 bp dlouhý fragment T. Při genotypu AA, kdy jsou obě alely mutované, se obě naštěpí na fragmenty o délce 137bp+25bp. Polohu fragmentů srovnáváme s referenčním žebříčkem umístěným na fotografii nalevo (DNA Ladder)

4.7 Genotypizace v genu pro MMP-9

U genotypizace pro MMP-9 jsme zkoumali bodovou mutaci v restričním místě 279 A/G. Jako u CD147 jsem použila již izolovanou DNA pacientů v obou souborech. Jako první byla provedena reakce PCR, na kterou jsem si připravila mastermix, skládající se na jeden vzorek z:

- 9,0 µl destilované vody
- 1,5 µl pracovního pufru
- 1,5 µl MgCl₂
- 0,5 µl prvního primeru
- 0,5 µl druhého primeru
- 0,5 µl dNTP
- 0,1 µl Taq polymerázy

Do každé zkumavky jsem si napipetovala 1 µl templátové DNA a k ní přidala celkem 14 µl mastermixu. Primery byly oligonukleotidové kyseliny, obsahující v kladném směru sekvenci 5'-CTCGCCCCAGGACTCTACAC-3' a v záporném směru 5'-GTGCAGGCGGAGTAGGATT-3. Poté jsem všechny zkumavky naskládala do termocyklerů, kde proběhla reakce PCR. Vznikly produkty o délce 95bp. Elektroforézou jsem ověřila, zda se nasyntetizovalo dostatečné množství DNA.

Pro restrikční analýzu byl použit enzym SmaI. Do každé zkumavky nanese 13-15 µl PCR produktu. Namícháme mastermix v poměru na jeden vzorek:

- 1,0 µl destilované vody
- 1,7 µl pracovního pufru pro SmaI
- 0,2-0,4 µl restrikčního enzymu SmaI

Do každé zkumavky svrchu napipetujeme 3 µl tohoto mastermixu. Zkumavky vložíme do termostatu, kde proběhne štěpení ve specifické sekvenci, kterou enzym rozpoznává (viz obrázek). Pro aktivitu enzymu je potřeba teplota 25°C.



Obrázek 8: Štěpné místo restrikčního enzymu SmaI [<https://www.neb.com/products/r0141-smai#Product%20Information>]

Pokud je přítomna mutovaná alela G, enzym původní 95bp dlouhý produkt PCR rozštěpí na dva fragmenty o délkách 73bp a 22bp. Nemutovanou alelu A enzym neštěpí. Elektroforézu provedeme identickým způsobem jako u genotypizace pro CD147 v 3% agarosovém gelu. Po ozáření UV zářením a vyfocení gelu můžeme odečíst genotypy, přičemž délky fragmentů u jednotlivých genotypů potom vypadají následovně:

homozygot/heterozygot	délky fragmentů v bp
AA	95
AG	95+73+22
GG	73+22

4.8 Genotypizace v genu pro FVL

Jako u předchozí genotypizace CD147 a MMP-9 jsem měla k dispozici izolované vzorky DNA pacientů s CVD a bez CVD. Nejdříve jsem provedla polymerázovou řetězovou reakci, kdy jsem do každé zkumavky nanese 2 µl DNA a 13 µl mastermixu, který se skládal z:

- 9,9 µl destilované vody
- 1,5 µl pracovního pufru, který obsahoval MgCl₂
- 0,5 µl prvního primeru
- 0,5 µl druhého primeru

- 0,5 µl dNTP
- 0,1 µl Taq polymerázy

Délka PCR produktu byla 224bp. Následně jsem provedla restriční analýzu, při níž byl použit restriční enzym MnlI, který štěpí tuto sekvenci:

5'... CCTC (N)₇... 3'
3'... GGAG (N)₆... 5'

[<https://www.neb.com/products/r0163-mnli#Product%20Information>]

K 15 µl produktu PCR jsem přidala 5 µl Mastermixu na restriční analýzu, který se skládal z:

- 2,7 µl destilované vody
- 2,0 µl pracovního pufru pro MnlI
- 0,3 µl restričního enzymu MnlI

Pro enzym MnlI je při restriční analýze potřeba teplota 37°C. Enzym MnlI naštěpí nemutovanou alelu N na 142+45+37bp a mutovanou alelu L na 142+82bp. Následně byla provedena gelová elektroforéza v 2,5% agarosovém gelu. Elektroforetický gel byl ozářen UV zářením a byly odečteny genotypy. Genotyp NN, tedy nemutovaný homozygot, měl délky fragmentů 142+45+37 bp, mutovaný homozygot LL potom délky 142+82bp.

4.9 Statistika

Ve všech sledovaných skupinách byla distribuce genotypů a frekvence alel porovnávána pomocí χ^2 testu a Fisher exakt testu. Distribuce genotypů se porovnávala s Hardyho-Weinbergovou rovnováhou pomocí χ^2 testu. Ke stanovení rizikových genotypů a alel jsme počítali odds ratio (OR) s 95% konfidenčním intervalem. Pro zjištění significance OR byl použit Fisher exakt test. Sensitivita a specificita výsledků byla spočítána pomocí Clinical Calculator 1 (<http://faculty.vassar.edu/lowry/clin1.html>). Používali jsme programový balík Statistica v. 12.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK)

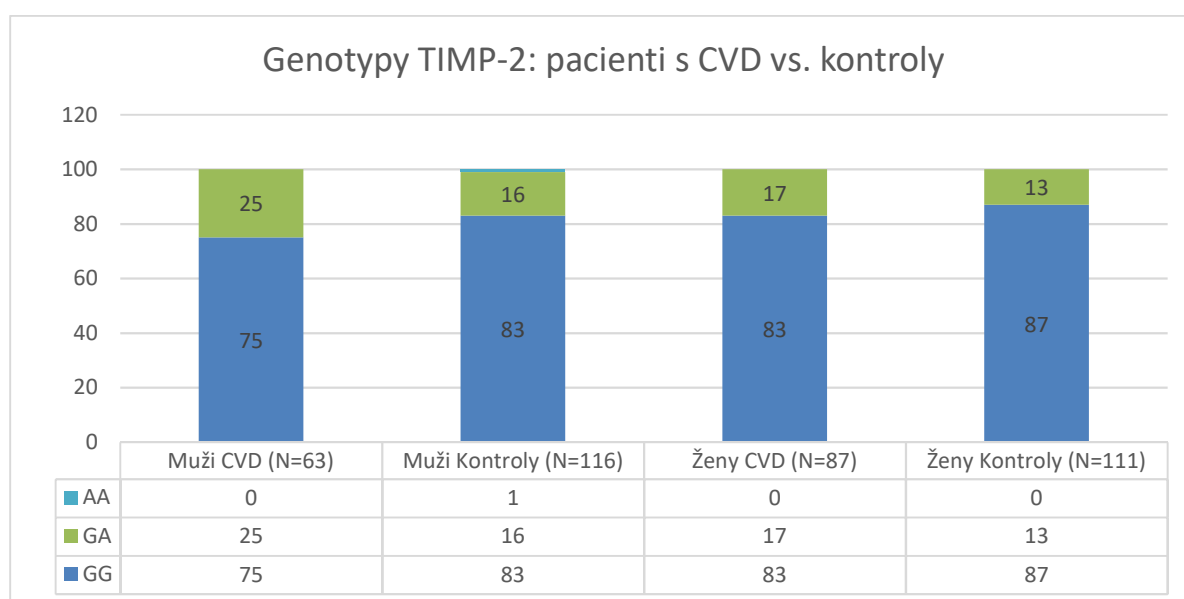
5 VÝSLEDKY

5.1 Studie pacienti-kontroly („case-control“)

Při porovnávání kontrolního souboru pacientů a souboru pacientů s diagnostikovaným CVD a polymorfismem TIMP-2 G/A nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl v distribuci genotypů (P_g) ani ve frekvenci alel (P_a) (tabulka2). Nebyly nalezeny žádné rozdíly mezi muži a ženami, ani rozdíly mezi zdravými a nemocnými (viz tabulka a obrázek).

Genotypy a alely	TIMP-2 rs8176329						
	GG (%)	GA (%)	AA (%)	P _g	G	A	P _a
Pacienti s CVD Muži (N=63)	47 (75)	16 (25)	0 (0)	0,317	0,83	0,13	0,585
Kontrolní soubor Muži (N=116)	93 (83)	21 (16)	2 (1)		0,89	0,11	
Pacienti s CVD Ženy(N=87)	72 (83)	15 (17)	0 (0)	-	0,91	0,09	0,380
Kontrolní soubor Ženy (N=111)	97 (87)	14 (13)	0 (0)		0,94	0,06	

Tabulka 2: Srovnání genotypů u souboru pacientů s chronickým žilním onemocněním a kontrolního souboru pro TIMP-2

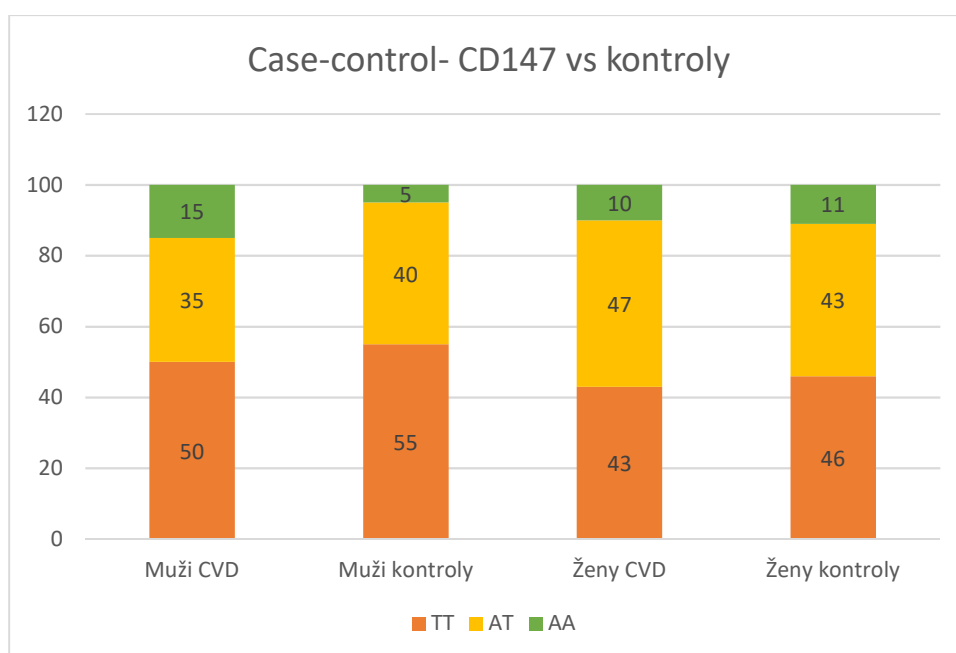


Obrázek12: Graf srovnávající soubor pacientů s chronickým žilním onemocněním a kontrolní soubor pro TIMP-2

V polymorfismech CD147 a MMP9 jsme neprokázali rozdíly mezi pacienty s chronickým žilním onemocněním a kontrolami, ani muži ani ženami. Ani rozdíly mezi muži a ženami s CVD nebyly signifikantní. Dále jsme neprokázali signifikantní rozdíly v distribuci genotypů ani frekvencí alel ani mezi kontrolními muži a ženami (Tab 2,3).

	CD147 TT	CD147 AT	CD147 AA	Celkem
Muži CVD	31 (50%)	22 (35%)	9 (15%)	62
Muži kontroly	64 (55%)	46 (40%)	6 (5%)	116
Ženy CVD	38 (43%)	41 (47%)	9 (10%)	88
Ženy kontroly	51 (46%)	48 (43%)	12 (11%)	111
Všechny skupiny	184	157	36	377

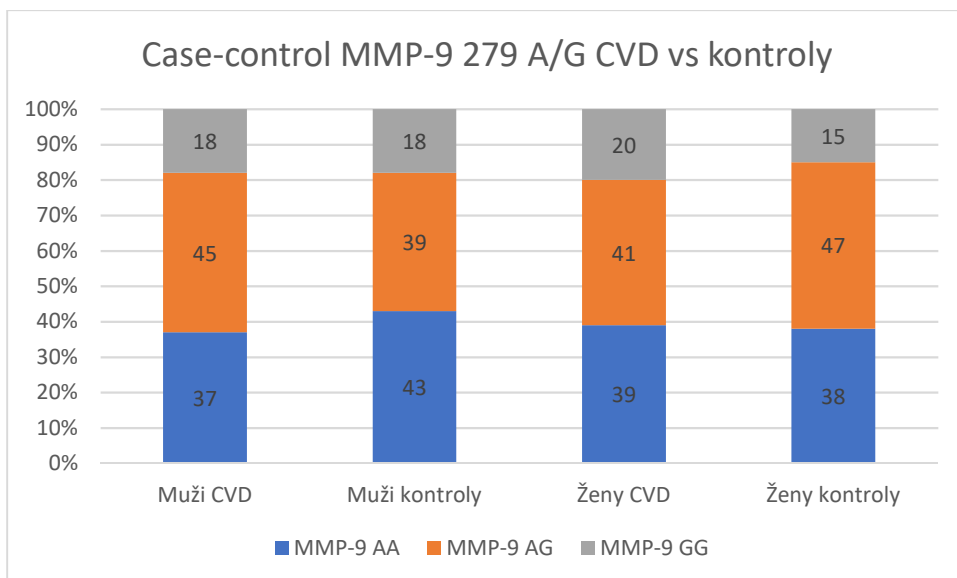
Tabulka 3: Srovnání case-control studie pro CD147 pacienti s CVD vs kontrolní soubor



Obrazek 13: Graf distribuce genotypů u case-control studie pro CD147 u pacientů s CVD a kontrolami

Pohlaví	MMP9 279 AA	MMP9 279 AG	MMP9 279 GG	Celkem
Muži CVD	23 (37%)	28 (45%)	11 (18%)	62
Muži kontroly	50 (43%)	45 (39%)	21 (18%)	116
Ženy CVD	34 (39%)	36 (41%)	18 (20%)	88
Ženy kontroly	42 (38%)	52 (47%)	17 (15%)	111
Všechny skupiny	149	161	67	377

Tabulka 4: rozdíly case-control: MMP9 279 A/G a CVD

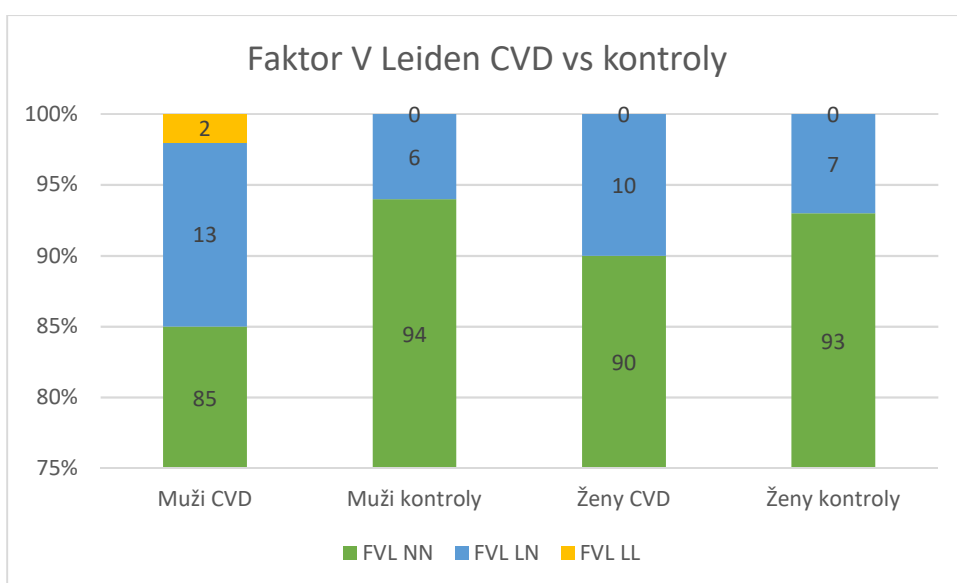


Obrázek 14: Graf rozdílů u case-control studie: MMP9 279 A/G a CVD

V polymorfismu genu pro FVL jsme našli signifikantní rozdíl v alelické frekvenci faktoru V Leiden mezi muži s CVD a kontrolními muži ($P_g=0,108$, $P_a=0,03$). Leidenská mutace byla tedy téměř 3x častější u pacientů s CVD (OR=2,519; 95% konfidenční interval 1,05-7,60; senzitivita 0,08, specifická 0,97.

	FVL NN	FVL LN	FVL LL	Celkem
Muži CVD	53 (85%)	8 (13%)	1(2%)	62
Muži kontroly	109 (94%)	7 (6%)	0 (0%)	116
Ženy CVD	79 (90%)	9 (10%)	0 (0%)	88
Ženy kontroly	104 (93%)	7 (7%)	0 (0%)	111
Všechny skupiny	345	31	1	377

Tabulka 5: rozdíly case- control: FVL a CVD



Obrázek15: Case control studie Faktor V Leiden CVD vs. kontroly

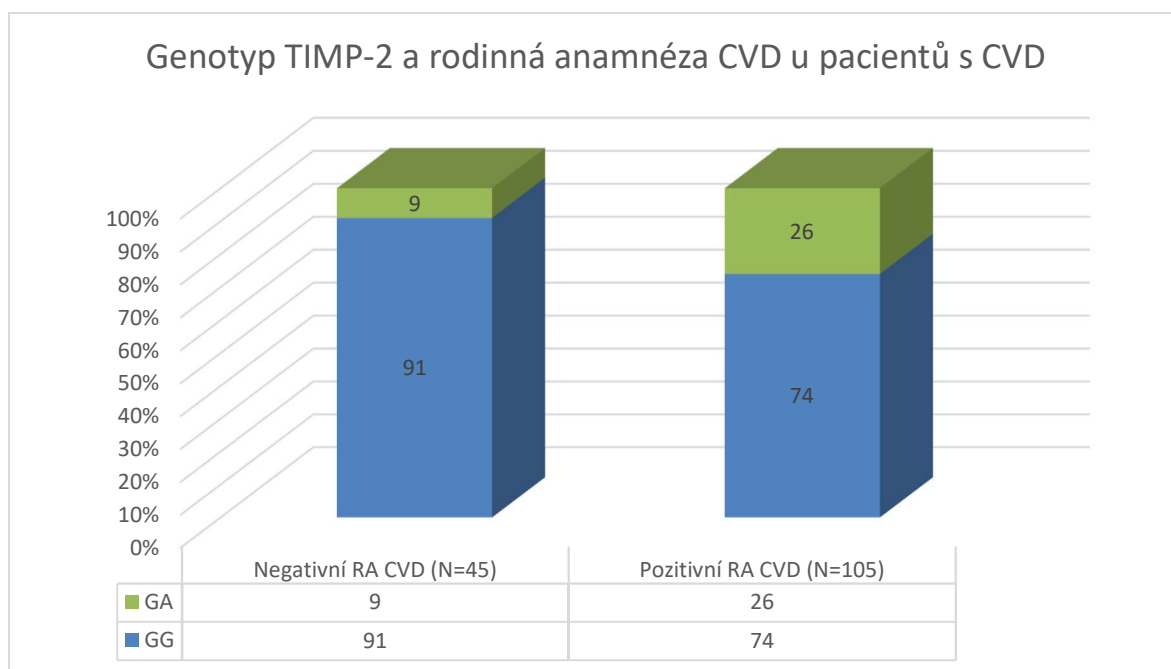
5.2 Studie genotyp-fenotyp

V polymorfismu genu pro TIMP-2 bylo zjištěno, že pacienti s CVD mají 3,55krát častěji pozitivní rodinnou anamnézu CVD, pokud mají genotyp AG. Tento test je významně klinicky specifický se specificitou 0,91. Lze tedy říci, že pacient nemá s vysokou pravděpodobností pozitivní rodinnou anamnézu CVD, pokud nemá genotyp AG (tabulka 3, obrázek 16). Test měl senzitivitu 0,26 a síla testu byla 0,580.

41:4 vs 78:27: OR = 3,55 (1.16-10.83); p=0,01

rodinná anamnéza	TIMP-2 GG (%)	TIMP-2 GA (%)	Součet
negativní	41 (91)	4 (9)	45
pozitivní	78 (74)	27 (26)	105
Všechny skupiny	119	31	150

Tabulka 6: Srovnání genotypů jednotlivých pacientů ve vztahu k jejich rodinné anamnéze chronického žilního onemocnění



Obrázek 16: Graf srovnání genotypů jednotlivých pacientů ve vztahu k jejich rodinné anamnéze chronického žilního onemocnění

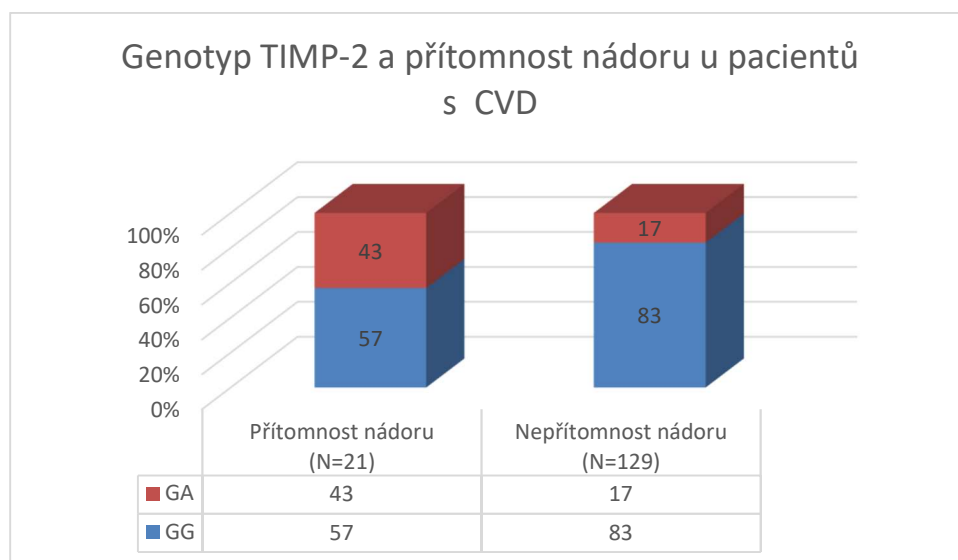
Pacienti s diagnostikovaným chronickým žilním onemocněním mají 3,65krát častěji nádor, pokud mají genotyp AG, oproti pacientům s genotypem GG. Tento test je klinicky významně

specifický se specificitou 0,829, existuje tedy vysoká pravděpodobnost, že pacient s CVD nemá nádor, pokud nemá genotyp AG. Senzitivita tohoto testu byla 0,429 a síla testu 0,657.

107/22 vs. 12/9; OR=3,65 (1,37-9,70); P=0,01

nádor	TIMP-2 GG (%)	TIMP-2 AG (%)	Součet
Nepřítomnost nádoru (N=129)	107 (83)	22 (17)	129
Přítomnost nádoru (N=21)	12 (57)	9 (43)	21
Všechny skupiny	119	31	150

Tabulka 7: Vztah genotypů pacientů k přítomnosti nádoru



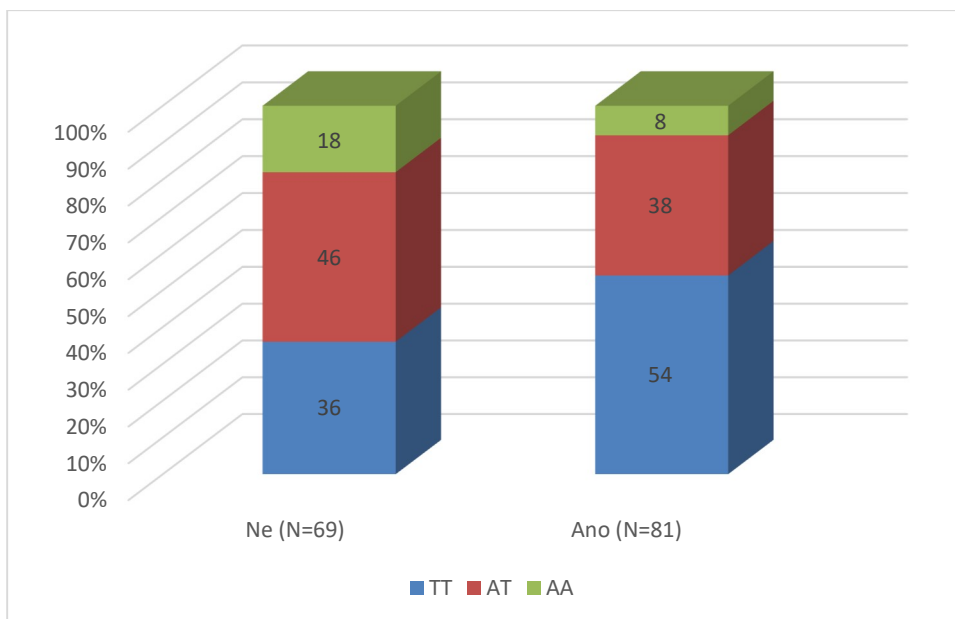
Obrázek 17: Graf vztahu genotypů pacientů k přítomnosti nádoru

Ve studii genotyp fenotyp u souboru pacientů s CVD jsme prokázali signifikantní rozdíl v distribuci genotypů i frekvenci alel pro polymorfismus CD147 A/T mezi pacienty s CVD s obezitou a bez ní. Alela T byla téměř 2x častější u pacientů s CVD a obezitou.

obezita	CD147 TT	CD147 AT	CD147 AA	Celkem
Ne	25 (36%)	32 (46%)	12 (18%)	69
Ano	44 (54%)	31 (38%)	6 (8%)	81
Obě skupiny	69	63	18	150

Tabulka 8: Studie genotyp/ fenotyp u pacientů s CVD –CD147 a obezita

Pg=0,04, Pa=0,01, proto 82/56 vs 119/43, P=0,007; OR=1,89 (1,16-3,08), senzitivita 0,735, specificita 0,406, síla testu 0,685



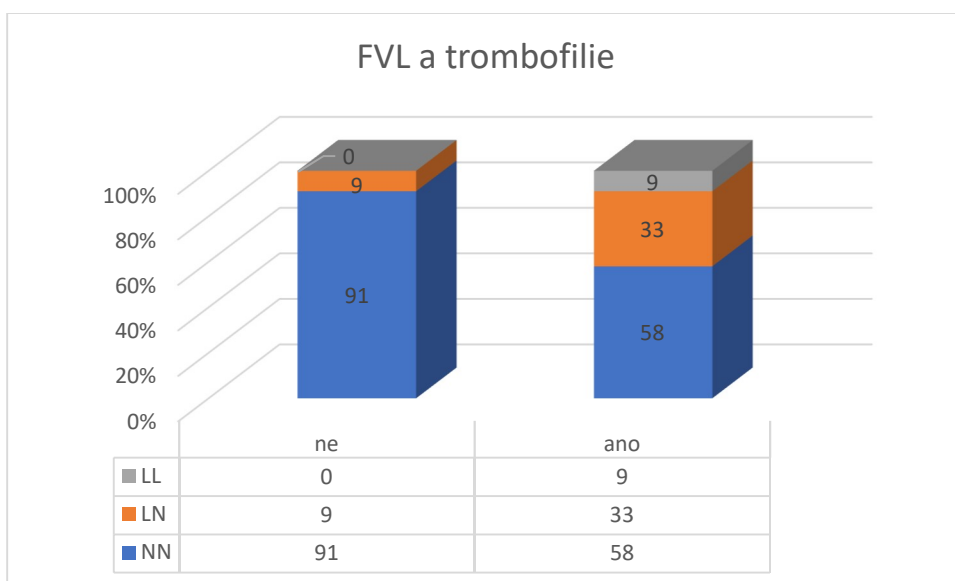
Obrázek 18 Vztah genotypu a obezity pro polymorfismus CD147

Dále jsme podle očekávání pozorovali vysoce signifikantní přítomnost Leidenské mutace u pacientů s CVD a trombofilií ($P_g=0,0001$, $P_a=9 \cdot 10^{-5}$)

Trombofilie	FVL NN	FVL LN	FVL LL	Celkem
Ne	125 (91%)	13 (9%)	0	138
Ano	7 (58%)	4 (33%)	1 (9%)	12
Obě skupiny	132	17	1	150

Tabulka 9: Studie genotyp/ fenotyp u pacientů s CVD – vztah FVL a trombofilie

263/13 vs 18/6; OR=6,7 (2,3-18,8); P=0,002, senzitivita 0,25, specificita 0,953



Obrázek19: Graf znázorňující vztah genotypu faktoru V Leiden vzhledem k trombofilii u pacientů s CVD

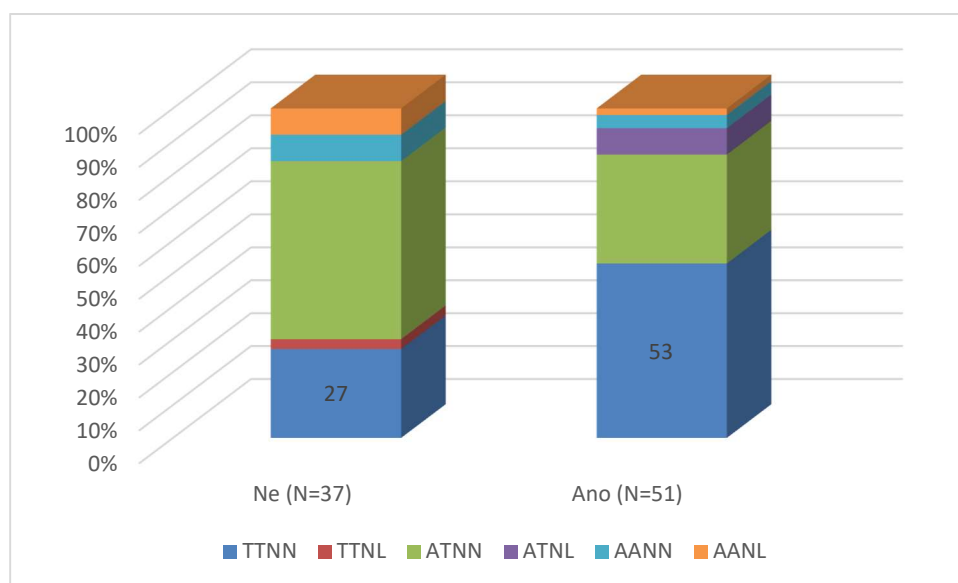
5.3 Studie dvojgenotyp/fenotyp

Dále jsme zjistili, že mají na chronické žilní onemocnění vliv nejenom jednotlivé genotypy, ale také kombinace genotypů navzájem. K zajímavým výsledkům jsme dospěli spojením genotypů pro CD147 a FVL u pacientek s obezitou. Dvojgenotyp TTNN pro polymorfizmy CD147 a FVL jsme pozorovali 3 x častěji u pacientek s obezitou oproti pacientkám s CVD, u kterých obezita přítomná nebyla.

Obezita	CD147-FVL TTNN	CD147-FVL TTNL	CD147-FVL ATNN	CD147-FVL ATNL	CD147-FVL AANN	CD147-FVL AANL	Celkem
Ne	10 (27%)	1 (3%)	20 (54%)	0	3 (8%)	3 (8%)	37
Ano	27 (53%)	0	17 (33%)	4 (8%)	2 (4%)	1 (2%)	51
Obě skup.	37	1	37	4	5	4	88

Tabulka 10: Studie dvojgenotyp/fenotyp obezita - ženy s CVD. Pro orientaci v tabulce: FVL – NN – nemutovaný homozygot, NL = heterozygot s mutací, LL= homozygot s oběma mutovanými alelami. CD147 – TT = nemutovaný homozygot, AT = heterozygot s mutací, AA = homozygot s oběma mutovanými alelami

10/27 vs. 27/24; P=0,01; OR=3,04 (1,22-7,55) pro dvojgenotyp TTNN, senzitivita 0,529, specificita 0,730, síla testu 0,608.



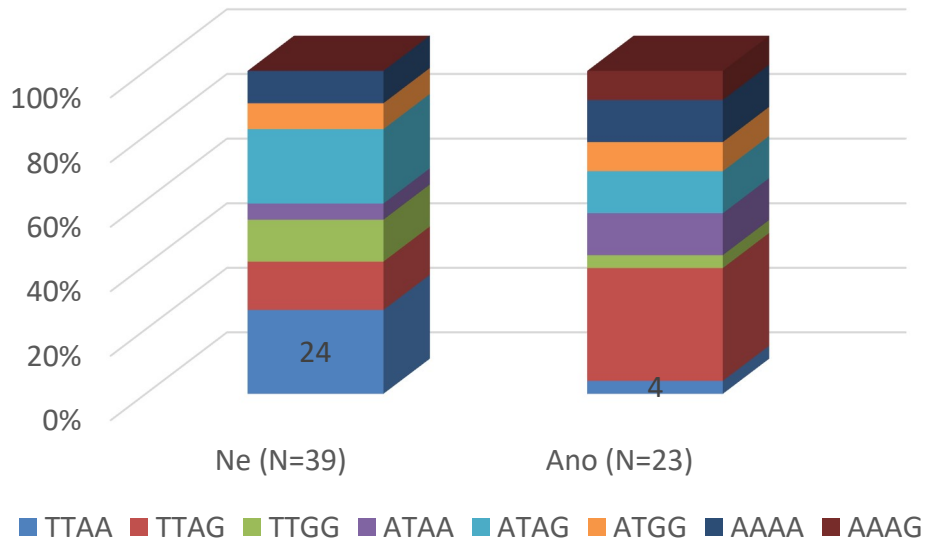
Obrázek 20: Graf vztahu dvojgenotypu CD147 a FVL k obezitě u žen s CVD

Dále byl zjištěn vztah dvojgenotypů CD147 a MMP-9 k erysipelu, tentokrát ovšem u mužů s CVD. Bylo zjištěno, že pacienti s CVD a dvojgenotypem TTAA mají téměř 8x méně často erysipel oproti pacientům s jiným dvojgenotypem v těchto dvou polymorfismech.

Erysipel	CD174- MMP-9 TTAA	CD174- MMP-9 TTAG	CD174- MMP-9 TTGG	CD174- MMP-9 ATAA	CD174- MMP-9 ATAG	CD174- MMP-9 ATGG	CD174- MMP-9 AAAA	CD174- MMP-9 AAAG	Celkem
Ne	10 (26%)	6 (15%)	5 (13%)	2 (5%)	9 (23%)	3 (8%)	4 (10%)	0	39
Ano	1 (4%)	8 (35%)	1 (4%)	3 (13%)	3 (13%)	2 (9%)	3 (13%)	2 (9%)	23
All Grps	11	14	6	5	12	5	7	2	62

Tabulka 11: Studie dvojgenotyp pro CD147 a MMP9 279 A/G a fenotyp erysipel-muži s CVD

10/29 VS 1/22; OR =0,131 (95% KI 0,01-1,11), P=0,03; senzitivita pro dvojgenotyp TTAA = 0,043, specificita 0, 744, síla testu 0,442



Obrázek 21: Dvojgenotyp CD147 a MMP9 a erysipel – muži s CVD

6 DISKUZE

Cílem práce bylo detekovat rizikové varianty genu pro CD 147/EMMPRIN, MMP-9, TIMP-2 a faktor V Leiden u pacientů s chronickým žilním onemocněním.

TIMP-2 rs8176329, +853G/A

Nepodařilo se nám najít žádnou studii, která by měla srovnatelný soubor pacientů a zároveň zkoumala stejný polymorfismus genu pro TIMP-2, tedy studii, jejímž souborem pacientů by byli pacienti s CVD a která by zkoumala TIMP-2 rs8176329 (+853 G/A) polymorfismus. Našli jsme ovšem studie, které zkoumaly stejný polymorfismus v souvislosti s odlišným onemocněním:

Ve studii case-control byla zkoumána souvislost polymorfismu pro TIMP-2 rs8176329 s chronickou obstrukční plicní nemocí (COPD) v tuniské populaci. Frekvence genotypů se významně lišila u pacientů s COPD a u kontrolních pacientů ($P = 0.029$). Rozdíly v alelické frekvenci nebyly významné [67]. Tato studie navazovala na stejný výzkum v japonské populaci a potvrdila jeho výsledky. V japonské studii bylo navíc prokázáno, že pacienti s COPD měli významně vyšší alelickou frekvenci pro alelu G ve srovnání s kontrolní skupinou. Genetický polymorfismus TIMP-2 tak může souviset s rizikem onemocnění COPD [68].

Dále byly zkoumány jiné polymorfismy TIMP-2:

Xu et al. zkoumal možnou asociaci mezi polymorfismy v promotorové oblasti MMP-9 a TIMP-2 a rizikem vzniku varixů v čínské populaci. Byla zjištěna asociace polymorfismu genu pro TIMP-2 s varixy. Rovněž byla prokázána významná korelace mezi pacienty s varixy a kontrolním souborem v polymorfismu MMP-9 (-1562C/T). Výsledky této studie ukazují, že polymorfismus v promotorové oblasti MMP-9 a TIMP-2 je spojen se vznikem varixů v čínské populaci [23].

Podobnou studii provedl Kunt et al. v turecké populaci. Zkoumal rovněž vztah mezi polymorfismem MMP-9 (-1562 C/T) a TIMP-2(418 G/C) a rizikem vzniku varixů. Bylo zjištěno, že TIMP-2 -418 C alela je spojena se zvýšeným rizikem vzniku varixů ($p=0.007$). Rovněž bylo prokázáno, že frekvence GG genotypu je významně vyšší v kontrolním souboru než ve skupině pacientů (odds ratio=0.333, 95% konfidenční interval=0.14-0.78, $p=0.012$) [24].

Někteří autoři zkoumali hladinu TIMP-2 v exsudátu bércového vředu. Zjistili, že nehojící se bércové vředy jsou spojeny s nižší hladinou TIMP-2 v raném exsudátu [25].

Nedávno byly publikovány výsledky studie, která zkoumala zánětlivé a proteolytické biomarkery při hojení ran u CVD [26, 27]. Bylo zjištěno, že exsudát z ulcerace v zánětlivé fázi obsahuje významně vyšší koncentrace MMP-2, MMP-9, MMP-12, TIMP-1, a TIMP-2 ve srovnání s exsudátem z ulcerace v granulační fázi hojení. Dále bylo prokázáno, že exsudát

v granulační fázi hojení žilního bércového vředu obsahuje signifikantně vyšší hladiny MMP-1, MMP-7, MMP-13, and TIMP-4 ve srovnání s exsudátem v zánětlivé fázi hojení [27].

Caimi et al. zkoumala hladinu plasmatické koncentrace MMP-2, MMP-9 a jejich inhibitorů (TIMP-1 and TIMP-2) u pacientů s žilními bércovými vředy. Plasmatická koncentrace jak MMP, tak TIMP-1 a TIMP-2 byla signifikantně vyšší u pacientů s bércovými vředy než u kontrolních pacientů [28].

V souvislosti s našimi výsledky, kdy pacienti s CVD a genotypem AG mají výrazně vyšší výskyt tumoru, jsme našli práci, zabývající se expresí a významem MMPs a TIMPs v souboru pacientů s nemelanomovými kožními nádory (NMSC – nonmelanoma skin cancer), tj. bazaliomy a spinaliomy. V této práci bylo prokázáno, že exprese TIMP-1 a TIMP-2 je statisticky signifikantně nižší v kůži u pacientů s nemelanomovými kožními nádory (NMSC) než v kůži pacientů bez NMSC ($P < 0.01$). Dále bylo zjištěno, že exprese TIMP-1 a TIMP-2 v kožním vzorku je statisticky signifikantně nižší u skupiny spinaliomů než u skupiny bazaliomů ($P < 0.01$). Lze tedy předpokládat, že MMP-2, MMP-9 a TIMP-2, TIMP-1 mohou hrát důležitou roli při vzniku, progresi, invazi a metastázování nemelanomových kožních nádorů [22].

Polymorfismus MMP-9 A/G (R/Q)

Fang et al. zkoumali vliv polymorfismu MMP-9 279 R/Q na kolorektální karcinom v čínské populaci. Prokázali, že jedinci s nemutovanou alelou R byli dvakrát více náchylní ke vzniku kolorektálního karcinomu (OR = 1.737, 95% KI = 1.323-2.281, $p < 0.001$) ve srovnání s kontrolní skupinou. Navíc genotyp RR koreloval se zvýšeným rizikem kolorektálního karcinomu oproti pacientům s genotypem QQ (OR = 2.213, 95% KI = 1.248-3.926, $p = 0.006$), což potvrdilo předchozí výsledek [55].

Li et al. zkoumali vliv běžných polymorfismů v matrix metaloproteinázách, včetně polymorfismu MMP-9 279 R/Q, na periodontitidu. Studie zahrnovala 17 polymorfismů a soubor pacientů sestával z 2399 pacientů s periodontitidou a 2002 kontrol. Nebyla nalezená žádná souvislost mezi periodontitidou a polymorfismy matrix metaloproteináz [59].

Ve studii zkoumající vliv polymorfismů MMP-9 279 R/Q a C-1562T na chronickou obstrukční plicní nemoc (COPD) v tuniské populaci bylo zjištěno že polymorfismus 279 R/Q má vliv na vznik a závažnost onemocnění. Genotyp AA byl spojen s horší funkcí plic [60].

Polymorfismus CD147 rs8259 T/A

Poměrně nedávno byla publikována studie, jejíž autoři zkoumali vliv bodové mutace rs8259 CD147 T/A u pacientů s akutním koronárním syndromem (AKS) a u kontrolní skupiny. Bylo zjištěno, že genotyp TT a alela T byla výrazně méně zastoupena u pacientů s AKS než u ostatních skupin. V patogenezi onemocnění dochází ke zvýšené expresi CD147. Bylo zjištěno, že alela T může snižovat riziko vzniku AKS, díky zamezení exprese CD147 [34].

V roce 2017 byla otisknuta studie, zkoumající vliv polymorfismu genu pro CD147 rs8259 na pacienty s chronickým žilním selháním v čínské populaci. Bylo zahrnuto 922 dospělých pacientů a 1107 kontrol. BSG rs8259 TT genotyp koreloval s nižším rizikem chronického žilního selhání (odds ratio = 0.83, 95% KI = 0.72-0.96, p = 0.010), zejména pak u pacientů s žilní hypertenzí (odds ratio = 0.80, 95% KI = 0.68-0.95, p = 0.011) a u pacientů s ischemickou chorobou srdeční (odds ratio = 0.81, 95% KI = 0.69-0.96, p = 0.013). Nemutovaná T alela byla také spojena s nižší hladinou BSG mRNA v celém krevním oběhu [56].

Wu et al. zkoumali polymorfismus rs8259 pro CD147 u pacientů s psoriázou a kontrolního souboru. Hladina CD147 byla u psoriázy zvýšená. Nemutovaná alela T signifikantně snižovala náchylnost k psoriáze (odds ratio = 0.758, 95% KI 0.638-0.901, p = 0.002). Polymorfismus rs8259 se nachází v regionu sloužícím k navázání miR-492 (MicroRNA). MiR-492 byla schopná interagovat se sekvencí CD147 která v rs8259 obsahovala nemutovanou alelu T, avšak nikoli se sekvencí obsahující mutovanou alelu A. Dále byla exprese CD147 v periferních krevních mononukleárních buňkách signifikantně vyšší u pacientů s genotypem AA, než u těch s genotypem TT. Tyto výsledky naznačují, že miR-492 může fyziologicky potlačit expresi CD147 [63].

Nedávno byla otisknuta studie zkoumající souvislosti více polymorfismů CD147, mezi nimi i rs8259, a rozvoje karotických aterosklerotických plaků u pacientů s mozkovým infarktem v čínské populaci. Polymorfismy rs4919862, rs8637 and rs8259 vykazovaly silné vazebné disekvilibrum, a mohou být proto spojeny se vznikem aterosklerotických plaků [64].

Faktor V Leiden

Bylo zjištěno, že pacienti s pozitivní rodinnou anamnézou trombózy a Leidenskou mutací jsou více náchylní ke vzniku žilního bércevého vředu [61].

Byla publikována studie zkoumající tromboembolickou nemoc (TED), která je jednou z hlavních příčin morbidity a mortality v západním světě. Pacienti s tromboembolickou nemocí byli rozděleni do tří skupin, podle toho, jestli měli žilní trombózu, arteriální trombózu anebo smíšenou trombózu. Nebyl nalezen signifikantní rozdíl v prevalenci FVL u žilní a arteriální trombózy, což naznačuje, že FVL by mohl být rizikovým faktorem i pro arteriální trombózu. Pacienti s Leidenskou mutací a TED měli dvakrát vyšší riziko vzniku žilní trombózy [65].

Cushman et al. zjistili, že faktor V Leiden je jedním z rizikových faktorů pro vznik a progresi periferního onemocnění žil. Také potvrdili, že mnoho rizikových faktorů je společných jak pro žilní trombózu, tak pro periferní onemocnění žil [66].

Jelikož bércevé vředy zvyšují riziko trombofilie až o 75 %, byla provedena studie, zkoumající trombofilii u pacientů s bércevémi vředy. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin na starší a mladší (<50 let) podle projevu prvního bércevého vředu. Pacienti s nižším věkem při začátku onemocnění měli vyšší riziko opakovaných trombofilií (≥ 3), častější pozitivní rodinnou anamnézu a vyšší prevalenci Leidenské mutace než druhá skupina [69].

Byla publikována studie zahrnující více než 11 000 pacientů a 21 000 kontrol, která zkoumala vliv genetických polymorfismů faktoru V Leiden, prothrombinu (PT20210A) a C677T MTHFR na žilní tromboembolickou nemoc. Studie vznikla spojením dat z mnoha menších studií, které již byly dříve uveřejněny. U nositelů AG genotypu pro FVL bylo riziko VTU 4,2krát vyšší a pro nositele homozygotního GG dokonce 11,45krát vyšší [70].

7 ZÁVĚR

TIMP-2 +853 G/A

V souladu s našimi výsledky by měly být děti z rodin, ve kterých mají rodiče CVD a současně genotyp AG pro polymorfismus TIMP-2 rs8176329 G/A geneticky vyšetřeny a sledovány, aby u nich také nepropuklo onemocnění. Primární prevencí je v tomto případě aktivní a zdravý životní styl. Velmi důležitý je pro pacienta dostatek pohybu, který aktivuje žilně-svalovou pumpu a posiluje svalstvo dolních končetin, čímž se snižuje riziko žilního refluxu.

Pokud by se výsledky znovu prokázaly na větším souboru pacientů, bylo by vhodné pacienty s CVD a současně s genotypem AG pravidelně preventivně vyšetřovat, protože tato skupina pacientů má na základě této práce vysokou pravděpodobnost vzniku nádoru. Bylo by tedy možné nádor zachytit v časně fázi, zabránit jeho další progresi, a zlepšit tak léčebné výsledky a přežití pacientů.

Faktor V Leiden 1961G/A

Prokázali jsme signifikantní rozdíl v alelické frekvenci faktoru V Leiden mezi muži a kontrolní skupinou mužů. Leidenská mutace byla téměř 3x častější u mužských pacientů s CVD, a to s klinicky velmi významnou specificitou 0,97. Lze tedy říci, že mužský pacient s velmi vysokou pravděpodobností nebude mít Leidenskou mutaci, pokud nemá CVD. Naopak muži s Leidenskou mutací mají větší riziko vzniku a progresu CVD, mělo by se proto u nich dbát na zvýšenou prevenci a správnou životosprávu.

Dále jsme podle očekávání pozorovali vysoce signifikantní přítomnost Leidenské mutace u pacientů s CVD a trombofilií (OR=6,7) ve studii genotyp/fenotyp. Tento výsledek potvrzuje výsledek předchozí a koreluje s faktem, že Leidenská mutace je významným rizikovým faktorem pro vznik trombofilie. I zde byla statisticky velmi významná specificita 0,953, lze tedy říci, že pacient s CVD, který nemá mutovanou alelu L, nemá velmi pravděpodobně trombofilii.

Obezita

Ve studii genotyp/fenotyp jsme u polymorfismu CD147 rs8259 T/A prokázali signifikantní rozdíl v distribuci genotypů i frekvenci alel mezi pacienty s CVD s obezitou a pacienty bez obezity. Nemutovaná alela T byla téměř 2x častější u pacientů s CVD a obezitou. Ve studii dvojgenotyp/fenotyp pro polymorfismy CD147 a faktor V Leiden jsme pozorovali 3x častěji dvojgenotyp TTNN (pro oba polymorfismy nemutovaní homozygoti) u pacientek s CVD a obezitou oproti pacientkám s CVD, které obezitou netrpěly.

Pacienti s alelou T a současně pacientky s dvojgenotypem TTNN jsou tedy náchylnější k obezitě a pacient by měl více dbát na svou životosprávu, aby se u něj obezita nerozvinula. Podobně jako u chronického žilního onemocnění, i zde je zásadní zdravý životní styl, zejména zdravá strava a dostatek pohybu. Obezita pak zpětně negativně ovlivňuje a zhoršuje průběh chronického žilního onemocnění a je jedním z rizikových faktorů pro vznik chronického bércového vředu, který se obtížně hojí a zhoršuje kvalitu života pacienta.

Erysipel

Erysipel (růže) je akutní bakteriální infekce kůže a podkoží. Často bývá u komplikací chronických ran, a tedy i žilních bércových vředů. Ve studii dvojgenotyp/fenotyp pro CD147 a MMP-9 279 A/G měli pacienti s CVD a dvojgenotypem TTAA (pro oba polymorfismy nemutovaný homozygot) 7,6x méně často erysipel oproti pacientům s jiným dvojgenotypem v těchto dvou polymorfismech. Dvojgenotyp TTAA je tedy pro pacienta s CVD protektivní variantou, tzn. že jsou pacienti s dvojgenotypem TTAA méně náchylní ke vzniku erysipelu.

LITERATURA

1. BsrI. New England Biolabs [online]. England: New England Biolabs, 2016 [cit. 2016-12-25]. Dostupné z: <https://www.neb.com/products/r0527-bsri>
2. Genotyp. In: Wikiskripta [online]. Česká republika, 2016 [cit. 2016-12-30]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Genotyp>
3. VOJTÍŠKOVÁ, Marie. Klinická molekulární genetika. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1999. ISBN 80-7013-292-2.
4. SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS, RELICHOVÁ, Jiřina, ed. Genetika. Přeložila Anna MATALOVÁ. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-4852-2.
5. MURPHY, Gillian. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biology* [online]. 2011, 12(11), 233- [cit. 2017-01-07]. DOI: 10.1186/gb-2011-12-11-233. ISSN 1465-6906. Dostupné z: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2011-12-11-233>
6. Woesner JF, Nagase H: Matrix metalloproteinases and TIMPs. Oxford University Press Inc., New York, 2000
7. KAHARI, Veli-Matti; SAARIALLO-KERE, Ulpu. Matrix metalloproteinases in skin. *Experimental dermatology*. 1997, 6, s. 199-213.
8. RIVERA, S., M. KHRESTCHATISKY, L. KACZMAREK, G. A. ROSENBERG a D. M. JAWORSKI. Metzincin Proteases and Their Inhibitors: Foes or Friends in Nervous System Physiology? *Journal of Neuroscience* [online]. 2010, 30(46), 15337-15357 [cit. 2017-01-05]. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3467-10.2010. ISSN 0270-6474. Dostupné z: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3467-10.2010>
9. HASMAN, Luboš. Srovnání aktivity genů MMP při hojení ran u zdravých a diabetických potkanů. Univerzita Pardubice, 2011. Diplomová práce.
10. VISSE, R. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circulation Research* [online]. 92(8), 827-839 [cit. 2017-01-05]. DOI: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D. ISSN 00097330. Dostupné z: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>
11. EKLÖF, Bo, Robert B. RUTHERFORD, John J. BERGAN, et al. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: Consensus statement. *Journal of Vascular Surgery* [online]. 2004, 40(6), 1248-1252 [cit. 2017-01-07]. DOI:

- 10.1016/j.jvs.2004.09.027. ISSN 07415214. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0741521404012777>
12. SLONKOVÁ, Veronika. Kvalita života u pacientů s chronickými bércovými vředy. Brno, 2013. Disertační práce.
13. VASUDEVAN, Biju. Venous leg ulcers: Pathophysiology and Classification. *Indian Dermatology Online Journal* [online]. 2014, 5(3), 366- [cit. 2017-01-30]. DOI: 10.4103/2229-5178.137819. ISSN 2229-5178. Dostupné z:
<http://www.idoj.in/text.asp?2014/5/3/366/137819>
14. Kucukguven, A., & Khalil, R. A. (2013). Matrix Metalloproteinases as Potential Targets in the Venous Dilation Associated with Varicose Veins. *Current Drug Targets*, 14(3), 287–324.
15. Matrix Metalloproteinases in Varicose Veins, Elisabeth MacColl and Raouf A. Khalil, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* December 1, 2015, 355 (3) 410-428; DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.115.227330>
16. Gibson D, Cullen B, Legerstee R, Harding KG, Schultz G. MMPs Made Easy. *Wounds International* 2009; 1(1):Available from <http://www.woundsinternational.com>
17. Flour M. Are we any better at identifying the risk factors for chronic venous disease progression? *Medicographia* 2011;33(3):315-319.
18. FOLGUERAS, Alicia R., Alberto M. PENDAS, Luis M. SANCHEZ a Carlos LOPEZ-OTIN. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *The International Journal of Developmental Biology* [online]. 2004, 48(5-6), 411-424 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1387/ijdb.041811af. ISSN 0214-6282. Dostupné z:
<http://www.intjdevbiol.com/paper.php?doi=041811af>
19. CEAP Classification: Comprehensive Classification System for Chronic Venous Disorders(CEAP). Sigvaris [online]. [cit.2017-02-15]. Dostupné z:
<http://www.sigvaris.com/global/en/knowledge/ceap-classification>
20. TIMP-2. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-02-15]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/TIMP2>
21. Graham ID, Harrison MB, Nelson EA, Lorimer K, Fisher A. A systematic review of prevalence studies of lower limb ulceration. *Advances in Skin and Wound Care* 2003;16:305-316.
22. Zhonghua Zhong Liu Za Zh, Expression and significance of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in non-melanoma skin cancer. [online].

- 2012 [cit. 2017-02-17]. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2012.05.011. ISSN 0253-3766.2012.05.01. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22883459>
23. Xu HM, Zhao Y, Zhang XM, Zhu T, Fu WG. Polymorphisms in MMP-9 and TIMP-2 in Chinese patients with varicose veins. *J Surg Res* 2011;168(1):e143-e148
 24. Kunt AT, Isbir S, Gormus U, Kahraman OT, Arsan S, Yilmaz SG, Isbir T. Polymorphisms of MMP9 and TIMP2 in Patients with Varicose Veins. *In Vivo*. 2015 Jul-Aug;29(4):461-5
 25. Mwaura B1, Mahendran B, Hynes N, Defreitas D, Avalos G, Adegbola T, Adham M, Connolly CE, Sultan S. The impact of differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer, matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 and PDGF-AA on the chronicity of venous leg ulcers. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006 Mar;31(3):306-10
 26. Ligi D, Mosti G, Croce L, Raffetto JD, Mannello F. Chronic venous disease - Part I: Inflammatory biomarkers in wound healing. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Oct;1862(10):1964-74. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.07.018. Epub 2016 Jul 28
 27. Ligi D, Mosti G, Croce L, Raffetto JD, Mannello F. Chronic venous disease - Part II: Proteolytic biomarkers in wound healing. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Oct;1862(10):1900-8. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.07.011. Epub 2016 Jul 25
 28. Caimi G, Ferrara F, Montana M, Muratori I, Amato C, Canino B, Lo Presti R, Hopps E. Behaviour of the plasma concentration of gelatinases and their tissue inhibitors in subjects with venous leg ulcers. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2015;60(3):309-16. doi: 10.3233/CH-141863
 29. Epidemiology of chronic venous disorders in geographically diverse populations: results from the Vein Consult Program. *Int Angiol* [online]. 2012, 2012 [cit. 2018-01-18].
 30. Klinická a funkční vyšetření onemocnění žilního systému dolních končetin a jejich korelace, MUDr. Sabina Švestková, Brno 2008 [cit. 2018-01-18]
 31. Czech Vein Program, *Prakt.flebol*.2012;21:1-28 [cit. 2018-01-18]
 32. , Bergan JJ1, Schmid-Schönbein GW, Coleridge Smith PD, Nicolaides AN, Boisseau MR, Eklof B. Chronic Venous Disease. *The New England Journal of Medicine* [online]. , 488-98 [cit. 2018-01-18]
 33. MURAMATSU, Takashi. Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. *Journal of Biochemistry* [online]. 2016, 159(5),

- 481-490 [cit. 2018-01-20]. DOI: 10.1093/jb/mvv127. ISSN 0021-924x. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jb/article-lookup/doi/10.1093/jb/mvv127>
34. YAN, Jinchuan, Yu MAO, Cuiping WANG a Zhongqun WANG. Association Study between an SNP in CD147 and Its Expression With Acute Coronary Syndrome in a Jiangsu Chinese Population. *Medicine* [online]. 2015, 94(42), e1537- [cit. 2018-01-20]. DOI: 10.1097/MD.0000000000001537. ISSN 0025-7974. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201510030-00005>
35. CROSNIER, Cécile, Leyla Y. BUSTAMANTE, S. Josefin BARTHOLDSON, et al. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature* [online]. 2011, 480(7378), 534-537 [cit. 2018-01-20]. DOI: 10.1038/nature10606. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nature10606>
36. GABISON, Eric E., Thanh HOANG-XUAN, Alain MAUVIEL a Suzanne MENASHI. EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie* [online]. 2005, 87(3-4), 361-368 [cit. 2018-01-21]. DOI: 10.1016/j.biochi.2004.09.023. ISSN 03009084. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908404001701>
37. Regulation of MMP-1 and MMP-2 Production through CD147/Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer Interactions, Jianxin Sun and Martin E. Hemler, *Cancer Res* March 3 2001 (61) (5) 2276-2281;
38. YU, Xiao-Ling, Tiancen HU, Jia-Mu DU, et al. Crystal Structure of HAb18G/CD147. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2008, 283(26), 18056-18065 [cit. 2018-01-21]. DOI: 10.1074/jbc.M802694200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M802694200>
39. Biswas C., Zhang Y., DeCastro R., Guo H., Nakamura T., Kataoka H., Nabeshima K. (1995) The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res.* 55, 434–439 [PubMed]
40. LIM, Chung, Joseph SHALHOUB, Manjit GOHEL, Amanda SHEPHERD a Alun DAVIES. Matrix Metalloproteinases in Vascular Disease - A Potential Therapeutic Target? *Current Vascular Pharmacology* [online]. 2010, 8(1), 75-85 [cit. 2018-01-24]. DOI: 10.2174/157016110790226697. ISSN 15701611. Dostupné z:

<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1570-1611&volume=8&issue=1&spage=75>

41. NORGAUER, J., T. HILDENBRAND, M. IDZKO, E. PANTHER, E. BANDEMIR, M. HARTMANN, W. VANSCHIEDT a Y. HEROUY. Elevated expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) and membrane-type matrix metalloproteinases in venous leg ulcers. *British Journal of Dermatology* [online]. 2002, 147(6), 1180-1186 [cit. 2018-01-24]. DOI: 10.1046/j.1365-2133.2002.05025.x. ISSN 0007-0963. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2133.2002.05025.x>
42. EMING, Sabine, Hans SMOLA, Berenike HARTMANN, Gebhart MALCHAU, Ronny WEGNER, Thomas KRIEG a Sigrun SMOLA-HESS. The inhibition of matrix metalloproteinase activity in chronic wounds by a polyacrylate superabsorber. *Biomaterials* [online]. 2008, 29(19), 2932-2940 [cit. 2018-01-24]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.03.029. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014296120800207X>
43. SMEETS, Ralf, Dietmar ULRICH, Frank UNGLAUB, Michael WÖLTJE a Norbert PALLUA. Effect of oxidised regenerated cellulose/collagen matrix on proteases in wound exudate of patients with chronic venous ulceration. *International Wound Journal* [online]. 2008, 5(2), 195-203 [cit. 2018-01-24]. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2007.00367.x. ISSN 1742-4801. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-481X.2007.00367.x>
44. MACKELFRESH, Jamie, Seaver SOON a Jack L. ARBISER. Combination Therapy of Doxycycline and Topical Tacrolimus for Venous Ulcers. *Archives of Dermatology* [online]. 2005, 141(11), - [cit. 2018-01-24]. DOI: 10.1001/archderm.141.11.1476. ISSN 0003-987x. Dostupné z: <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archderm.141.11.1476>
45. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion, Muramatsu T1, Miyauchi T., *Histol Histopathol.* 2003 Jul;18(3):981-7. doi: 10.14670/HH-18.981
46. SEULBERGER, Harald, Carolin M. UNGER a Werner RISAU. HT7, Neurothelin, Basigin, gp42 and OX-47 - many names for one developmentally regulated immunoglobulin-like surface glycoprotein on blood-brain barrier endothelium, epithelial tissue barriers and neurons. *Neuroscience Letters* [online]. 1992, 140(1), 93-97 [cit. 2018-01-25]. DOI: 10.1016/0304-3940(92)90690-9. ISSN 03043940. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304394092906909>

47. DeCastro R, Zhang Y, Guo H, Kataoka H, Gordon MK, Toole B et al. Human keratinocytes express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer. *J Invest Dermatol*, 1996;106(6):1260–1265.
48. Faktor V Leiden (R506Q~G1691A). Imalab [online]. Zlín [cit. 2018-01-30]. Dostupné z: <http://www.imalab.cz/clanek/187-faktor-v-leiden-r506qg1691a.aspx>https://www.wikiskripta.eu/w/Leidensk%C3%A1_mutace
49. Leidenská mutace. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. 2011 [cit. 2018-01-30]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=leidenska-mutace>
50. Kujovich JL. Factor V Leiden Thrombophilia. 1999 May 14 [Updated 2018 Jan 4]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1368/> [cit. 2018-01-30]
51. Leidenská mutace. Wikiskripta [online]. [cit. 2018-01-30]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Leidensk%C3%A1_mutace
52. WIDGEROW, Alan David. Chronic wound fluid-thinking outside the box. *Wound Repair and Regeneration* [online]. 2011, 19(3), 287-291 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2011.00683.x. ISSN 10671927. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1524-475X.2011.00683.x>
53. Wang L, Ma Y, Xie X, et al. Association of MMP-9 gene polymorphisms with acute coronary syndrome in the Uygur population of China. *World Journal of Emergency Medicine*. 2011;2(2):104-110.[cit. 2018-02-13]
54. RAYMENT, E.A., Z. UPTON a G.K. SHOOTER. Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. *British Journal of Dermatology* [online]. 2008, 158(5), 951-961 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2008.08462.x. ISSN 0007-0963. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2133.2008.08462.x>
55. FANG, Wen-Liang, Wei-Bo LIANG, Huan HE, Yi ZHU, Shi-Liu LI, Lin-Bo GAO a Lin ZHANG. Association of Matrix Metalloproteinases 1, 7, and 9 Gene Polymorphisms with Genetic Susceptibility to Colorectal Carcinoma in a Han Chinese Population. *DNA and Cell Biology* [online]. 2010, 29(11), 657-661 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1089/dna.2010.1017. ISSN 1044-5498. Dostupné z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/dna.2010.1017>
56. Li M-P, Hu X-L, Yang Y-L, et al. Basigin rs8259 Polymorphism Confers Decreased Risk of Chronic Heart Failure in a Chinese Population. Cho WC, ed. *International*

- Journal of Environmental Research and Public Health. 2017;14(2):211. doi:10.3390/ijerph14020211. [cit. 2018-02-16]
57. XIONG, Lijuan, Carl EDWARDS a Lijun ZHOU. The Biological Function and Clinical Utilization of CD147 in Human Diseases: A Review of the Current Scientific Literature. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, 15(12), 17411-17441 [cit. 2018-02-16]. DOI: 10.3390/ijms151017411. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/10/17411>
 58. Cui, H.Y.; Guo, T.; Wang, S.J.; Zhao, P.; Dong, Z.S.; Zhang, Y.; Jiang, J.L.; Chen, Z.N.; Yu, X.L. Dimerization is essential for HAb18G/CD147 promoting tumor invasion via MAPK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, 419, 517–522 [cit. 2018-02-16]
 59. LI, Wenyang, Ying ZHU, Pradeep SINGH, Deepal Haresh AJMERA, Jinlin SONG a Ping JI. Association of Common Variants in MMPs with Periodontitis Risk. *Disease Markers* [online]. 2016, 2016, 1-20 [cit. 2018-02-17]. DOI: 10.1155/2016/1545974. ISSN 0278-0240. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/dm/2016/1545974/>
 60. Matrix Metalloproteinase-9 (279R/Q) Polymorphism is Associated with Clinical Severity and Airflow Limitation in Tunisian Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Molecular diagnosis and therapy* [online]. [cit. 2018-02-17]. DOI: 10.1007/s40291-015-0163-2. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs40291-015-0163-2>
 61. Procopciuc LM1, Has C, Drugan C, Capusa C, Jebeleanu G. Genetic analysis of factor V Leiden in a family with history of thrombosis and venous leg ulcers.[online] *J Cell Mol Med.* 2000 Oct-Dec;4(4):297-302. [cit. 2018-02-17]
 62. BREW, Keith a Hideaki NAGASE. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. 2010, 1803(1), 55-71 [cit. 2018-02-18]. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.003. ISSN 01674889. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488910000042>
 63. Li-Sha Wu, Fang-Fang Li, Liang-Dan Sun, Dai Li, Juan Su, Ye-Hong Kuang, Gang Chen, Xiao-Ping Chen, Xiang Chen. A miRNA-492 binding-site polymorphism in BSG (basigin) confers risk to psoriasis in central south Chinese population. *Hum Genet.* 2011 Dec; 130(6): 749–757. Published online 2011 Jun 8. doi: 10.1007/s00439-011-1026-5 [cit. 2018-02-18]

64. NI, Tongtian, Min CHEN, Kang YANG, Jianwei SHAO, Yi FU a Weijun ZHOU. Association of CD147 genetic polymorphisms with carotid atherosclerotic plaques in a Han Chinese population with cerebral infarction. *Thrombosis Research* [online]. 2017, 156, 29-35 [cit. 2018-02-18]. DOI: 10.1016/j.thromres.2017.05.027. ISSN 00493848. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384817303456>
65. Mandala E, Lafaras C, Tsioni C, et al. Prevalence of thrombophilic mutations in patients with unprovoked thromboembolic disease. A comparative analysis regarding arterial and venous disease. *Hippokratia*. 2012;16(3):250-255. [cit. 2018-02-18]
66. CUSHMAN, M., P. W. CALLAS, J. O. DENENBERG, E. G. BOVILL a M. H. CRIQUI. Risk factors for peripheral venous disease resemble those for venous thrombosis: the San Diego Population Study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2010, 8(8), 1730-1735 [cit. 2018-02-18]. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.03924.x. ISSN 15387933. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2010.03924.x>
67. A. E. Hegab, T. Sakamoto, Y. Uchida, A. Nomura, Y. Ishii, Y. Morishima, M. Mochizuki, T. Kimura, W. Saitoh, T. Kiwamoto, et al. Association analysis of tissue inhibitor of metalloproteinase2 gene polymorphisms with COPD in Egyptians. *Respir Med*. 2005 Jan; 99(1): 107–110. [cit. 2018-02-18]
68. K. Hirano, T. Sakamoto, Y. Uchida, Y. Morishima, K. Masuyama, Y. Ishii, A. Nomura, M. Ohtsuka, K. Sekizawa Tissue inhibitor of metalloproteinases-;2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* Nov 2001, 18 (5) 748-752; [cit. 2018-02-18]
69. Calistru AM, Baudrier T, Gonçalves L, Azevedo F. Thrombophilia in venous leg ulcers: A comparative study in early and later onset. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* [serial online] 2012 [cited 2018 Feb 20];78:406. Available from: <http://www.ijdv.com/text.asp?2012/78/3/406/95477> [cit. 2018-02-20]
70. Simone B, De Stefano V, Leoncini E, et al. Risk of venous thromboembolism associated with single and combined effects of Factor V Leiden, Prothrombin 20210A and Methylenetetrahydrofolate reductase C677T: a meta-analysis involving over 11,000 cases and 21,000 controls. *European journal of epidemiology*. 2013;28(8):621-647. doi:10.1007/s10654-013-9825-8. [cit. 2018-02-20]

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura MMPs dle jednotlivých skupin[14]	10
Obrázek 2: Struktura TIMP-2[20].....	13
Obrázek 3: Komplex MT1-MMP s pro-MMP-2 způsobující aktivaci pro-MMP-2.[10].....	14
Obrázek 4:Struktura EMMPRINU [36, upraveno]	15
Obrázek 5 Rozložení MMPs a TIMPs v chronickém žilním bérčovém vředu. Na okrajích vidíme MMP-1, TIMP-1 a TIMP-3 zajišťující epitelizaci[40]	17
Obrázek 7-Graf porovnávající údaje Vein Consult Programu a Czech Vein Programu.....	18
Obrázek 8: Termocykler s naprogramovanými teplotami pro tři fáze PCR	24
Obrázek 6: Fotografie elektroforetického gelu.	27
Obrázek 9: Štěpné místo restričního enzymu MboI.....	28
Obrázek 10: Fotografie elektroforetického gelu.	29
Obrázek 11:Štěpné místo restričního enzymu SmaI	30
Obrázek 7: Graf srovnávající soubor pacientů s chronickým žilním onemocněním a kontrolní soubor pro TIMP-2.....	32
Obrázek 12: Graf distribuce genotypů u case control studie pro CD147 u pacientů s CVD a kontrolami	33
Obrázek 13:Graf rozdílů u case- control studie: MMP9 279A/G a CVD.....	34
Obrázek 14: Case kontrol studie Faktor V Leiden CVD vs kontroly	34
Obrázek 8: Graf srovnání genotypů jednotlivých pacientů ve vztahu k jejich rodinné anamnéze chronického žilního onemocnění	35
Obrázek 9: Graf vztahu genotypů pacientů k přítomnosti nádoru	36
Obrázek 15:CD147 vztah genotypu a obezity.....	37
Obrázek 16: Graf znázorňující vztah genotypu faktoru V Leiden vzhledem k trombofilii u pacientů s CVD	37
Obrázek 17:Graf vztahu dvojgenotypu CD147 a FVL k obezitě u žen s CVD	38
Obrázek 18:Dvojgenotyp CD147 a MMP9 a erysipel – muži s CVD	39

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1:Počet pacientů v jednotlivých stádiích CVD dle CEAP klasifikace.....	22
Tabulka 2: Srovnání genotypů u souboru pacientů s chronickým žilním onemocněním a kontrolního souboru pro TIMP-2	32
Tabulka 2: Srovnání case-control studie pro CD147 pacienti s CVD vs kontrolní soubor	33
Tabulka 3: rozdíly case- control: MMP9 279A/G a CVD	33
Tabulka 4: rozdíly case- control: FVL a CVD.....	34
Tabulka 3:Srovnání genotypů jednotlivých pacientů ve vztahu k jejich rodinné anamnéze chronického žilního onemocnění	35
Tabulka 4:Vztah genotypů pacientů k přítomnosti nádoru	36
Tabulka 5: Studie genotyp/ fenotyp u pacientů s CVD –CD147 a obezita.....	36
Tabulka 6: Studie genotyp/ fenotyp u pacientů s CVD – vztah FVL a trombofilie.....	37
Tabulka 7: Studie dvojgenotyp/ fenotyp obezita - ženy s CVD.....	38
Tabulka 8: Studie dvojgenotyp pro CD147 a MMP9 279 A/G a fenotyp erysipel- muži s CVD	38

SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK

MMP	matrix metaloproteináza
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer
TIMP	tkáňový inhibitor matrix metaloproteináz
FVL	faktor V Leiden
CVU	chronický žilní bércový vřed
SNP	single nucleotid polymorphism-bodová mutace
CVD	chronické žilní onemocnění
ECM	extracelulární matrix
VEI	venózní insuficience (=chronická žilní nedostatečnost)