

# Validacija metoda genotipizacije polimorfizama u genima za faktor zgrušavanja V, protrombin, inhibitor aktivatora plazminogena-1 i metilentetrahidrofolat reduktazu

---

**Bubnjar, Janko**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:822136>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-24**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Janko Bubnjar**

**Validacija metoda genotipizacije polimorfizama  
u genima za faktor zgrušavanja V, protrombin,  
inhibitor aktivatora plazminogena-1 i  
metilentetrahidrofolat reduktazu**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu i izrađen u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Sandre Šuprahe Gorete i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Marija Štefanovića.

*Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Sandri Šuprahi Goreti i doc. dr. sc. Mariju Štefanoviću na mentoriranju ovog rada. Također, zahvaljujem Tomislavu Pavičiću, specijalistu med. biokemije i lab. medicine na pomoći u izradi rada.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Venski tromboembolizam.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Epidemiologija duboke venske tromboze i plućne embolije .....	1
1.1.2. Rizični čimbenici za razvoj venskog tromboembolizma .....	1
1.1.2.1. Trudnoća.....	2
1.1.2.2. Primjena estrogena .....	2
1.1.2.3. Kirurški zahvati .....	3
1.1.2.4. Malignitet .....	3
1.1.3. Duboka venska tromboza.....	3
1.1.3.1. Terapija duboke venske tromboze.....	5
1.1.3.2. Post-trombotički sindrom.....	5
1.1.4. Plućna embolija.....	5
<b>1.2. Nasljedna trombofilija .....</b>	<b>7</b>
1.2.1. Faktor V Leiden .....	7
1.2.1.1. Fiziologija faktora zgrušavanja V i sustava proteina C.....	8
1.2.1.2. Patofiziologija faktora V Leiden .....	9
1.2.1.3. Klinička značajnost faktora V Leiden .....	10
1.2.1.4. APC rezistencija .....	12
1.2.2. Polimorfizam G20210A u genu za protrombin .....	14
1.2.2.1. Indikacije za genotipizaciju faktora V Leiden i protrombina G20210A.....	15
1.2.3. Polimorfizam 5G/4G u genu za PAI-1.....	16
1.2.4. Polimorfizam C677T u genu za MTHFR .....	17
1.2.4.1. Klinička značajnost genotipizacije polimorfizma MTHFR C677T određivanja plazmatske koncentracije homocisteina .....	18
<b>1.3. Vrednovanje analiza u području molekularne dijagnostike.....</b>	<b>20</b>
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Izolacija DNA.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2. Određivanje koncentracije i čistoće DNA.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3. Genotipizacija polimorfizama <i>F5</i> G1691A, <i>F2</i> G20210A, <i>PAI-1</i> 5G/4G i <i>MTHFR</i> C677T lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu uz analizu krivulje taljenja.....</b>	<b>26</b>

<b>3.4. Validacija metoda genotipizacije polimorfizama <i>F5 G1691A, F2 G20210A, PAI-1</i> <i>5G/4G i MTHFR C677T</i> .....</b>	<b>36</b>
3.4.1. Ispitivanje analitičke nepreciznosti .....	36
3.4.2. Ispitivanje analitičke točnosti .....	37
3.4.3. Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom .....	37
3.4.4. Ispitivanje granice detekcije .....	38
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Ispitivanje analitičke nepreciznosti .....</b>	<b>39</b>
<b>4.2. Ispitivanje analitičke točnosti.....</b>	<b>41</b>
<b>4.3. Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom .....</b>	<b>44</b>
<b>4.4. Ispitivanje granice detekcije.....</b>	<b>45</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>48</b>
<b>6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....</b>	<b>49</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>51</b>
<b>8. SAŽETAK/SUMMARY .....</b>	<b>65</b>
8.1. Sažetak.....	65
8.2. Summary .....	66

# 1. UVOD

## 1.1. Venski tromboembolizam

Tromboza je nastajanje ugruška unutar krvne žile koji dovodi do djelomične ili potpune okluzije krvne žile – vene (venska tromboza) ili arterije (arterijska tromboza) (Ashorobi i sur., 2022). Venska tromboza najčešće pogađa duboke vene ekstremiteta (uglavnom nogu) te se tada naziva dubokom venskom trombozom (DVT). Najopasnija komplikacija duboke venske tromboze je plućna embolija (PE) koja nastaje kada u veni nastali ugrušak otputuje cirkulacijom do plućne arterije ili nekog njezinog ogranka što rezultira začepljenjem. Stoga se DVT i PE često objedinjuju pojmom venskog tromboembolizma (VTE) (Stone i sur., 2017). Za razliku od VTE, arterijska tromboza uglavnom se povezuje s rupturom aterosklerotskog plaka i posljedičnim akutnim infarktom miokarda ili cerebrovaskularnim inzultom (Asada i sur., 2020).

### 1.1.1. Epidemiologija duboke venske tromboze i plućne embolije

Procjena pobolijevanja od DVT u Republici Hrvatskoj oko 160/100 000 godišnje, što u općoj populaciji predstavlja oko 6500 novooboljelih godišnje. Incidencija DVT eksponencijalno prati rastuću životnu dob te se DVT u dobi od 80 godina iznosi 5/1000 (Banfić, 2016). Polovica slučajeva DVT javlja se u hospitaliziranih pacijenata ili osoba smještenih u domove za starije i nemoćne (Heit i sur., 2001). U 10-30 % slučajeva akutne venske tromboze doći će do ponovne tromboze unutar idućih 10 godina (Banfić, 2016). Česta komplikacija DVT je plućna embolija. Incidencija PE procjenjuje se na 60/100 000 (Oger, 2000). Oko 45 % pacijenata s PE razvit će akutno desnostrano zatajenje srca, dok će do 3.8 % pacijenata s PE razviti kroničnu tromboembolijsku plućnu hipertenziju. U 6 % slučajeva duboke venske tromboze i u 12 % slučajeva plućne embolije dolazi do smrti unutar mjesec dana od postavljanja dijagnoze (Waheed i sur., 2023).

### 1.1.2. Rizični čimbenici za razvoj venskog tromboembolizma

Nastajanju tromboze doprinose tri skupine čimbenika koji se tradicionalno nazivaju Virchowovom trijadom: ozljeda vaskularnog endotela, staza krvi i hiperkoagulacijsko stanje (Kushner, 2022). Ozljeda vaskularnog endotela dovodi do izlaganja tkivnog faktora, proteina normalno prisutnog u subendotelu, ali ne i na vaskularnom endotelu, koji aktivira faktor zgrušavanja VII i tako inicira proces zgrušavanja (Winter i sur., 2017). Do ozljede vaskularnog endotela dolazi kod trauma, kirurških zahvata i postavljanja intravenskih katetera. Staza krvi (usporenje ili zaustavljanje normalnog protjecanja krvi) može biti uzrokovana imobilizacijom,

trudnoćom, preti lošću, dugim putovanjima sa smanjenom mobilnošću ili povećanom viskoznošću krvi (npr. u policitemiji ili dehidraciji) (Kushner, 2022). Hiperkoagulacijsko stanje označava pomicanje dinamičke ravnoteže između fizioloških prokoagulacijskih i antikoagulacijskih mehanizama u korist prokoagulacijskih. Hiperkoagulacijskom stanju mogu pogodovati različiti nasljedni i stečeni rizični čimbenici. Nasljedni rizični čimbenici koji pogoduju hiperkoagulacijskom stanju uključuju polimorfizam G1619A (Leiden) u genu za faktor zgrušavanja V, polimorfizam G20210A u genu za protrombin, nedostatak proteina C i S, disfibrinogenemiju te krvnu grupu A, B ili AB (Franchini i Makris, 2013; Zöller i sur., 2012). Stečeni rizični čimbenici koji pogoduju hiperkoagulacijskom stanju su uznepredovala dob, imobilizacija, trudnoća, antifosfolipidni sindrom, kirurški zahvati, traume, primjena estrogena, maligne bolesti, kemoterapija, pretilost, venski kateteri, infekcije, upalne bolesti i pušenje (Zöller i sur., 2012).

#### **1.1.2.1. Trudnoća**

Trudnice imaju četiri do pet puta veću vjerojatnost VTE nego žene iste dobi koje nisu trudne. Smatra se da je prokoagulacijsko stanje u trudnoći fiziološki mehanizam zaštite zbog povećanog rizika od krvarenja uslijed poroda (James, 2015). Rizik od tromboze najveći je neposredno nakon poroda (Maughan, 2022). U trudnoći je povećana aktivnost prokoagulacijskih čimbenika kao što su fibrinogen, faktor zgrušavanja VIII i VWF, a smanjena aktivnost antikoagulacijskih čimbenika kao što su protein C i protein S. Stazi krvi u trudnoći doprinose povećani ukupni volumen krvi i kompresija rastućeg uterusa na krvne žile. Prokoagulacijskom stanju u trudnoći doprinosi i placenta koja pojačano eksprimira tkivni faktor (James, 2015). Osim što predstavlja rizik od tromboze, prokoagulacijsko stanje u trudnoći povezuje se s preeklampsijom, abrupcijom placente, restrikcijom fetalnog rasta, spontanom pobačajem i intrauterinom smrtni (Grouzi, 2022).

#### **1.1.2.2. Primjena estrogena**

Primjena estrogena u svrhu kontracepcije ili hormonske nadomjesne terapije predstavlja hiperkoagulacijsko stanje. Dok je apsolutni rizik za venski tromboembolizam u žena koje ne koriste oralne kontraceptive 0.19 do 0.37 na 1000 žena godišnje, rizik venskog tromboembolizma kod žena koje koriste oralne kontraceptive iznosi između 0.55 i 1.41 na 1000 žena godišnje (Abou-Ismael i sur., 2020). U randomiziranom kontroliranom istraživanju (Rossouw i sur., 2002) žene u postmenopauzi koje su koristile hormonsku nadomjesnu terapiju imale su dva puta veću učestalost VTE nego žene koje su koristile placebo. Patofiziološki se

učinak estrogena objašnjava povećanjem aktivnosti faktora zgrušavanja, a smanjenjem aktivnosti fizioloških inhibitora zgrušavanja. Naime, pokazalo se da kombinirani oralni kontraceptivi povećavaju aktivnost faktora zgrušavanja II, VII, VIII i X te VWF, a smanjuju aktivnost antitrombina i proteina S (Abou-Ismael i sur., 2020).

### **1.1.2.3. Kirurški zahvati**

Kirurški zahvati smatraju se rizičnim čimbenikom za razvoj VTE, posebice ako su dugotrajni ili uključuju naknadnu imobilizaciju i mirovanje kao što je često slučaj u ortopedskim zahvatima koji su ujedno i najrizičniji za razvoj VTE. 13 % pacijenata nakon zamjene koljena, 11 % pacijenata nakon zamjene kuka i 6 % pacijenata nakon operacije kralježnice razvije VTE. Tromboprolifaktična terapija smanjuje vjerojatnost tromboze povezane s kirurškim zahvatima za 70-90 % (Kang i sur., 2022).

### **1.1.2.4. Malignitet**

Osobe oboljele od raka imaju veću vjerojatnost nastanka VTE. Procjenjuje se da je oko 20-30 % svih prvih VTE povezano s rakom (Timp i sur., 2013). Rizik za razvoj VTE značajno ovisi o vrsti raka – najveći je u raku pluća, mozga, pankresa i jajnika te u hematološkim malignitetima, a relativno je nizak kod raka dojke i prostate (Timp i sur., 2013). Patofiziološki se hiperkoagulacijsko stanje u malignitetu objašnjava pojačanom ekspresijom tkivnog faktora i drugih prokoagulacijskih molekula na tumorskim stanicama. Također, pacijenti oboljeli od raka često su smanjene pokretljivosti i uznapredovale dobi, a i samo tumorsko tkivo može uzrokovati stazu krvi zbog pritiska na krvne žile (Falanga i sur., 2015; Timp i sur., 2013).

### **1.1.3. Duboka venska tromboza**

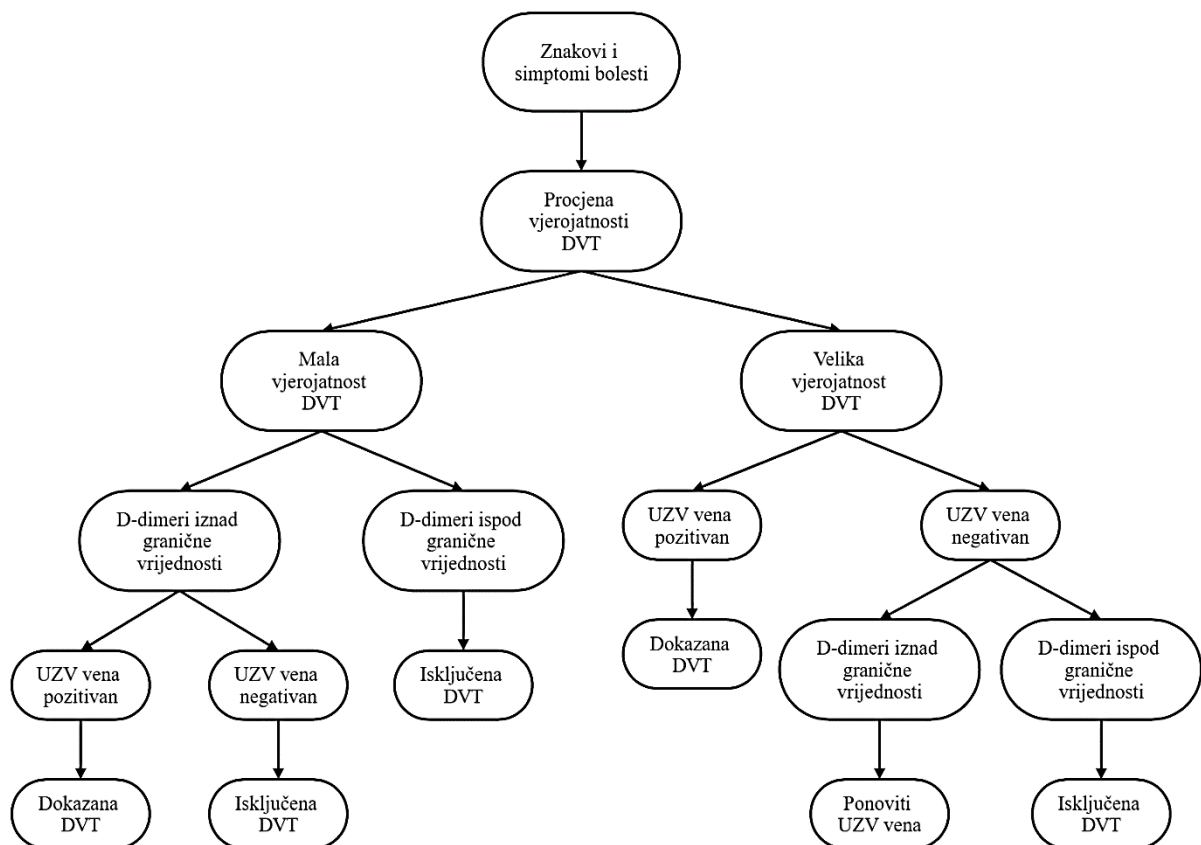
Duboku vensku trombozu može se podijeliti na provociranu i neprovociranu te na proksimalnu i distalnu. Proksimalna se odnosi na trombozu iznad koljena, a distalna na trombozu ispod koljena. Pritom je proksimalna DVT opasnija od distalne jer češće dovodi do plućne embolije (Waheed i sur., 2023). Simptomi DVT su unilateralni edem, bol, eritem, groznica, periferna cijanoza i prominentnost površinskih vena. Simptomi duboke venske tromboze nisu specifični tj. mogu se zamijeniti za celulitis, traumu, vaskulitis, vensku ili limfnu opstrukciju i drugo (Waheed i sur. 2023; Banfić, 2016).

U dijagnostici VTE najvažniji laboratorijski parametar su D-dimeri koji se koriste kao kriterij za isključivanje DVT ili PE. Meta-analizom 16 studija s ukupno 5253 ispitanika (Bhatt



i sur., 2020) utvrđena je visoka dijagnostička osjetljivost povišenih D-dimera u DVT te je ona iznosila 96.1 % (95 % CI = 92.6 – 98.0). S druge strane, u istoj studiji dijagnostička specifičnost povišenih D-dimera u DVT-u bila je niska i iznosila je 35.7 % (95 % CI = 29.5 – 42.4). Naime, D-dimeri su povišeni i u raznim drugim stanjima kao što su malignitet, trudnoća, trauma, kirurški zahvati i diseminirana intravaskularna koagulacija. Zbog njihove nespecifičnosti, povišena vrijednost D-dimera nije dovoljan kriterij za postavljanje dijagnoze DVT ili PE (Linkins i Takach Lapner, 2017).

U slikovnoj dijagnostici DVT prvenstveno se koriste kompresijski ultrazvuk (trombom ispunjena vena nije kompresibilna) i dopplerski ultrazvuk (u trombom ispunjenoj veni izostaje venski protok) (Banfić, 2016). Ultrazvučnoj dijagnostici teže dostupne vene (npr. zdjelične vene, gornja i donja šuplja vena) vizualiziraju se MSCT ili MR venografijom (Banfić, 2016; Karande i sur., 2016). Dijagnostički postupnik pri sumnji na duboku vensku trombozu donjih udova prikazan je na Slici 1.



Slika 1. Dijagnostički postupnik pri sumnji na duboku vensku trombozu donjih udova (preuzeto i prilagođeno prema Banfić, 2016)

### **1.1.3.1. Terapija duboke venske tromboze**

Liječenje DVT treba započeti odmah nakon postavljanja dijagnoze subkutanom primjenom niskomolekulskog heparina (Banfić, 2016). Po potrebi (u trudnica, bubrežnih bolesnika i pretilih pacijenata) terapijska doza može se prilagoditi prema vrijednostima anti-Xa aktivnosti (Banfić, 2016; Egan i Ensom, 2015). Nakon inicijalnog liječenja DVT od 5 do 10 dana, obavezno je i liječenje u trajanju od 3 mjeseca za koje se koriste varfarin ili direktni oralni antikoagulansi (Banfić, 2016). Pritom je kod primjene direktnih oralnih antikoagulansa manja vjerojatnost krvarenja nego kod varfarina (Nakamura i sur., 2017). Kod primjene varfarina potrebno je prilagođavati dozu lijeka tako da se INR održava u terapijskom rasponu od 2.0 do 3.0. Vrijednosti INR-a iznad 3.0 ukazuju na sklonost krvarenju, a vrijednosti ispod 2.0 ukazuju na nedovoljnu učinkovitost terapije, a samim time i rizik od tromboze (Erkens i sur., 2012). Nakon 3 mjeseca individualno se razmatra potreba za produljenjem liječenja varfarinom ili direktnim oralnim antikoagulansima, posebice ako je DVT bila neprovocirana (Banfić, 2016).

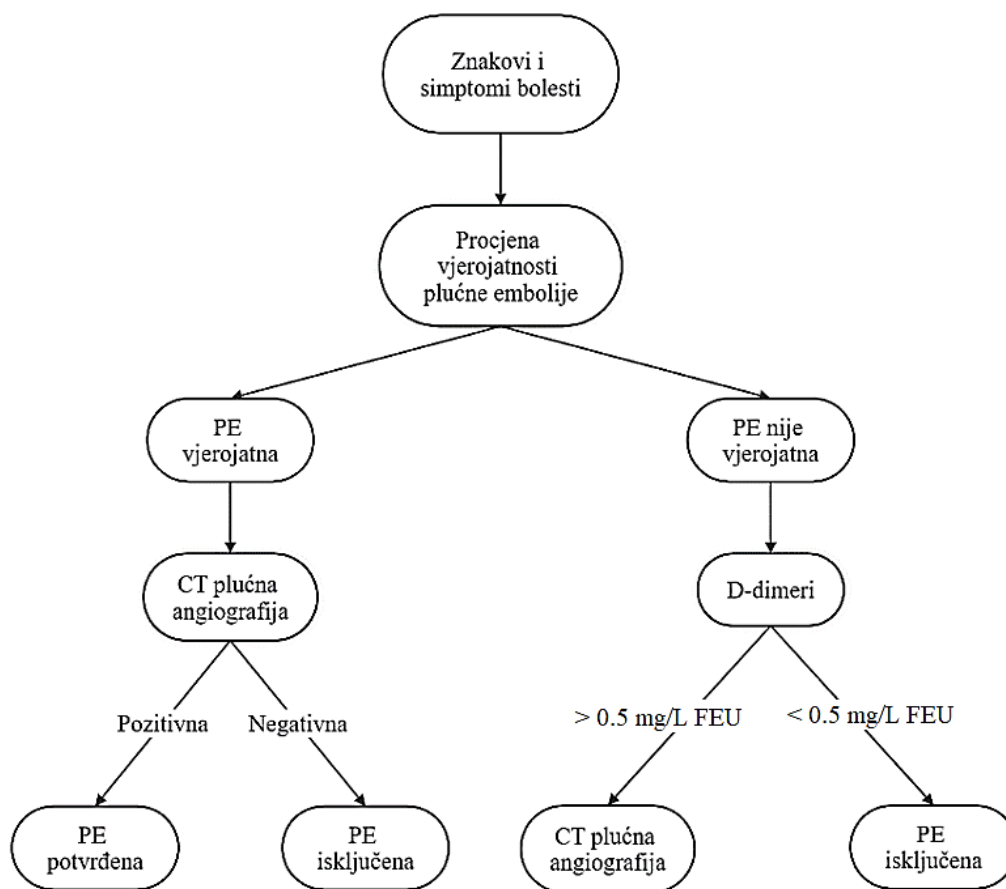
### **1.1.3.2. Post-trombotički sindrom**

Post-trombotički sindrom je dugotrajna komplikacija DVT koja obuhvaća simptome kao što su bol i edem noge, osjećaj težine u nozi, hiperpigmentacija, pruritus i grčevi (Ashrani i Heit, 2009). Post-trombotički sindrom javlja se u 20-50 % bolesnika unutar 2 godine od akutne DVT. 5-10 % oboljelih od DVT razvit će teški oblik post-trombotičkog sindroma koji uključuje ulceracije nogu te značajno smanjuje kvalitetu života (Kahn i sur., 2016). Nastajanje post-trombotičkog sindroma povezuje se s fibroznim promjenama na venama zahvaćenima trombozom i propadanjem venskih zalistaka te posljedičnom venskom hipertenzijom i smanjenom perfuzijom mišića (Gwozdz i sur., 2020; Kahn i sur., 2016). Rizični faktori za razvoj post-trombotičkog sindroma uključuju stariju dob, pretilost, proksimalnu DVT i subdoziranost varfarinom (INR < 2.0 preko 50 % vremena) (Kahn i sur., 2016).

### **1.1.4. Plućna embolija**

Plućna embolija je okluzija plućne arterije ili nekog od njezinih ogranaka, najčešće uslijed tromba (embolusa) porijeklom iz dubokih vena (Freund i sur., 2022). Mali embolusi ne moraju uzrokovati simptome, ali većina dovodi do dispneje. Često je prisutna oštra bol u prsima, tahipneja i osjećaj nemira. Također, manji embolusi mogu uzrokovati okluziju perifernih, manjih ogranaka plućne arterije te tako uzrokovati plućni infarkt (ishemiju plućnog tkiva). Plućni infarkt dovodi do kašlja, krvlju protkanog iskašljaja, oštre boli u prsnoj koži pri

disanju i povišene temperature (<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr>). Veći embolusi dovode do dispneje, tahipneje, iskašljavanja krvi, hipoksije, cijanoze, zatajenja desnog srca i hipotenzije. Hipoksija nastaje zbog smanjenje perfuzije pluća i time otežane izmjene plinova u alveolama. Zatajenje desnog srca nastaje zbog dilatacije i slabljenja desnog ventrikula uslijed pojačanog napora izazvanog pumpanjem krvi u začepljenu plućnu arteriju. Zatajenje desnog srca dovodi do smanjenog srčanog minutnog volumena i hipotenzije, a često i do iznenadne smrti (Vyas i Goyal, 2022). Metodom izbora u dijagnostici plućne embolije smatra se CT plućna angiografija (Moore i sur., 2018) dok se normalna koncentracija D-dimera u plazmi koristi kao isključni kriterij za PE (Gao i sur., 2018) (Slika 2).



Slika 2. Pojednostavljeni dijagnostički postupnik pri sumnji na plućnu emboliju (preuzeto i prilagođeno prema Zhang i sur., 2015).

Terapija plućne embolije podrazumijeva hitnu primjenu niskomolekulskog heparina. Također, u pacijenata s PE visokog rizika (PE visokog rizika uključuje hipotenziju ili šok) potrebno je provesti trombolitičku terapiju. U pacijenata s PE visokog rizika koji imaju kontraindikacije za trombolitičku terapiju potrebno je provesti kiruršku ili katetersku

embolektomiju. Nakon akutnog liječenja, preporučuje se antikoagulacijska terapija varfarinom ili direktnim oralnim antikoagulansima u trajanju od 3 mjeseca, a u slučaju neprovocirane PE potrebno je razmotriti mogućnost i dugotrajnije antikoagulacijske terapije (Stjepanović, 2022; Bergovec i sur., 2011).

## 1.2. Nasljedna trombofilija

Trombofilija se definira kao stanje u kojem zbog stečenih ili nasljednih čimbenika postoji povećani rizik za razvoj tromboze. Nasljedna trombofilija klinički se manifestira kroz rekurentne tromboze, trombozu u ranoj dobi, trombozu na neobičnim mjestima i obiteljsku tendenciju stvaranju tromboze (DeLoughery, 2019). Najčešća nasljedna trombofilija je faktor V Leiden, defekt u faktoru zgrušavanja V koji dovodi do njegove nedovoljne inaktivacije aktiviranim proteinom C. Druga najčešća trombofilija je polimorfizam G20210A u genu za protrombin koji dovodi do povećane sinteze protrombina (Rennert H i DeSimone RA, 2019). Nasljedna trombofilija može biti uzrokovana i kvantitativnim deficitom ili funkcionalnim defektom fizioloških inhibitora zgrušavanja – proteina C, proteina S i antitrombina. Rijetko je trombofilija uzrokovana disfibrinogenemijom, defektom u strukturi molekule fibrinogena koja otežava fibrinolizu (DeLoughery, 2019). Kod pacijenata s disfibrinogenemijom javljaju se i krvarenja kao posljedica otežanog stvaranja fibrinskog ugruška (Casini i sur., 2015) Zastupljenost pojedinih poremećaja kod pacijenata s nasljednom trombofilijom prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Nasljedne trombofilija i njihova zastupljenost (DeLoughery, 2019)

<b>Nasljedna trombofilija</b>	<b>% slučajeva nasljednih trombofilija</b>
<b>Faktor V Leiden</b>	40-60
<b>Protrombin G20210A</b>	10
<b>Nedostatak proteina C</b>	5-10
<b>Nedostatak proteina S</b>	5-10
<b>Nedostatak antitrombina</b>	1-3
<b>Disfibrinogenemija</b>	1

### 1.2.1. Faktor V Leiden

Faktor V Leiden (rs6025) je polimorfizam u faktoru zgrušavanja V koji uzrokuje rezistenciju faktora zgrušavanja Va na inaktivaciju aktiviranim proteinom C što dovodi do povećanog rizika od VTE. Faktor V Leiden je najčešća nasljedna trombofilija (Rennert H i DeSimone RA, 2019).

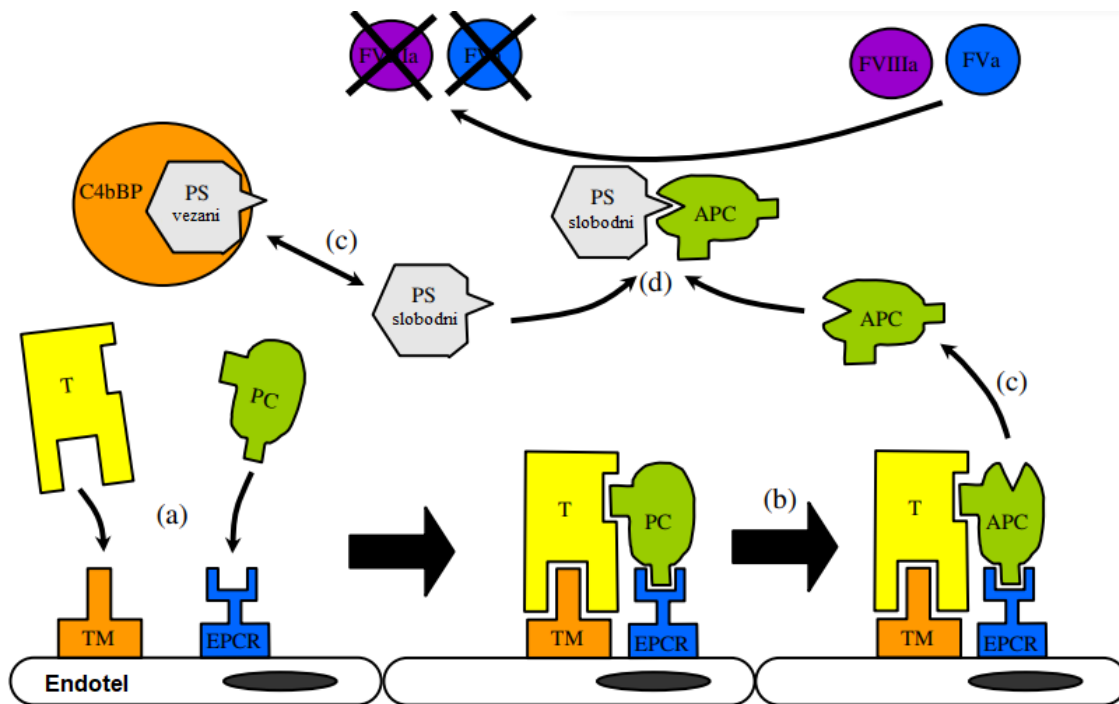
### 1.2.1.1. Fiziologija faktora zgrušavanja V i sustava proteina C

Faktor zgrušavanja V sintetizira se u jetri te je prisutan u plazmi (80 %) i trombocitima (20 %) (Neuenschwander, 2006) iz kojih se, nakon aktivacije trombocita, otpušta i veže za trombocitnu staničnu membranu (Sharda i Flaumenhaft, 2018; McMichael, 2012). Faktor V sastoji se od jednog polipeptidnog lanca kojeg trombin i znatno manje FXa cijepanjem peptidne veze aktiviraju u FVa (Dahlbäck, 2017) koji se sastoji od dva lanca međusobno povezana nekovalentnim interakcijama uz sudjelovanje kalcija (Camire i Bos, 2009). FVa je kofaktor aktiviranog faktora X koji cijepa protrombin u trombin te tako u fazi inicijacije zgrušavanja stvara malu količinu trombina koja će potaknuti proces zgrušavanja, a u fazi propagacije zgrušavanja stvara veliku količinu trombina potrebnu za prevođenje fibrinogena u fibrin (McMichael, 2012).

FVa se fiziološki inhibira sustavom proteina C. Kako nastajanje ugruška napreduje, lokalno raste koncentracija trombina što za posljedicu ima povećanje ekspresije trombomodulina. Trombomodulin je glikoprotein s antikoagulacijskim djelovanjem koji je eksprimiran s luminalne strane vaskularnog endotela. Vežanjem trombina za trombomodulin, dolazi do promjene konformacije trombina čime trombin gubi sposobnost vezanja za fibrinogen, faktor V te trombocitne receptore. Također, trombin vezan za trombomodulin znatno je podložniji inhibicijskom djelovanju antitrombina nego slobodni trombin. Vežanjem antitrombina, osim što se inhibira trombin, povećava mu se i klirens jer se nastali kompleks trombina i antitrombina uklanja iz cirkulacije degradacijom u jetri. Kompleks trombina i trombomodulina važan je aktivator proteina C koji inhibira faktore zgrušavanja FVa i FVIIIa (Esmon, 2003). Vežanjem trombina za trombomodulin dolazi do promjene konformacije trombina te on postaje sposoban aktivirati protein C (Xu i sur., 2005).

Protein C veže se za EPCR (endotelni receptor proteina C, engl. *endothelial protein C receptor*). Vežanjem za EPCR protein C mijenja konformaciju tako da mu raste afinitet za vezanje na kompleks trombin-trombomodulin. Trombin iz kompleksa s trombomodulinom cijepa protein C u aktivirani protein C koji onda disocira s EPCR. Disocirani APC veže se na protein S koji je vezan za faktor Va i faktor VIIIa i djeluje kao kofaktor aktiviranog proteina C u proteolitičkoj inaktivaciji faktora Va i VIIIa (Khor i Van Cott, 2009). Aktivirani protein C je serinska proteaza koja inaktivira faktor Va cijepanjem peptidnih veza na položajima Arg306, Arg506 i manje značajno Arg679 (Dahlbäck, 2017). APC inaktivira i faktor VIIIa, cijepanjem peptidnih veza na položajima Arg336 i Arg562. Osim što cijepa aktivirani faktor V (FVa), APC

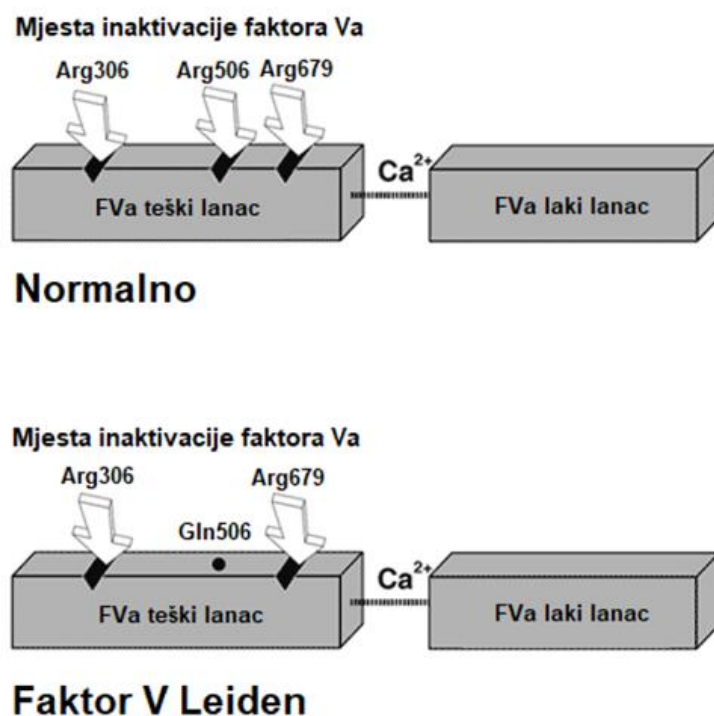
cijepa i inaktivni faktor V (FV) na položaju Arg506 te pritom nastaje produkt koji djeluje kao kofaktor aktiviranog proteina C u inaktivaciji faktora VIIIa (Khor i Van Cott, 2009).



Slika 3. Sustav proteina C. (a) Na vaskularnom endotelu eksprimirani su trombomodulin (TM) i endotelni receptor proteina C (EPCR) na koje se vežu trombin (T) odnosno protein C (PC). (b) Trombin iz kompleksa s trombomodulinom aktivira protein C u aktivirani protein C (APC). (c) APC disocira s endotelnog receptora proteina C; protein S (PS) disocira sa svog plazmatskog nosača, C4b-vezujućeg proteina (C4bBP, engl. *C4b-binding protein*). (d) APC i PS stvaraju kompleks koji na staničnoj površini inaktivira FVa i FVIIIa (preuzeto i prilagođeno prema Khor i Van Cott, 2009).

#### 1.2.1.2. Patofiziologija faktora V Leiden

Faktor V Leiden (*F5* G1691A; rs6025) je polimorfizam u genu *F5* koji kodira faktor zgrušavanja V i nalazi se na kromosomu 1. Faktor V Leiden predstavlja supstituciju gvanina adeninom na položaju 1691 što u proteinskom produktu dovodi do zamjene arginina glutaminom na položaju 506. Budući da je Arg506 položaj na kojem APC inaktivira faktor Va, u proteinskom produktu koji na položaju 506 ima glutamin inaktivacija faktora Va nije efikasna (Albagoush i sur., 2023). Također, kod faktora V Leiden aktivirani protein C ne može cijepati inaktivni faktor V na položaju Arg506 te tako tvoriti antikoagulacijski produkt koji djeluje kao kofaktor aktiviranog proteina C u inaktivaciji FVIIIa (Khor i Van Cott, 2009). Stoga faktor V Leiden predstavlja hiperkoagulacijsko stanje (Kujovich, 2011).



Slika 4. Faktor V Leiden. Zbog zamjene arginina glutaminom na poziciji 506 ne dolazi do efikasne inaktivacije FVa aktiviranim proteinom C (preuzeto i prilagođeno prema <https://diapharma.com>).

### 1.2.1.3. Klinička značajnost faktora V Leiden

U europskoj i američkoj populaciji 3-8% osoba su heterozigoti za FVL, dok je 1/5000 osoba homozigot za FVL. Što se tiče Europe, prevalencija je najveća u Grčkoj (15%), Švedskoj (11%) i Ujedinjenom kraljevstvu (8.8%) (Kujovich, 2011). Prevalencija faktora V Leiden povećana je u pacijenata s poviješću VTE u odnosu na opću populaciju (Tablica 2) (Kujovich, 2011).

Tablica 2. Prevalencija faktora V Leiden među odabranim skupinama pacijenata (Kujovich, 2011)

Stanje	Prevalencija faktora V Leiden među oboljelima (%)
Prvi idiopatski VTE	25
Rekurentni VTE	30-50
Tromboza gornjih ekstremiteta	9-20
Tromboza cerebralnih vena	10-20
VTE povezan s trudnoćom	20-46
VTE povezan s oralnim kontraceptivima	20-60
Spontani pobačaj	8-30

Procijenjeni relativni rizici razvoja pojedinih bolesti za FVL heterozigote prikazani su u Tablici 3, a za FVL mutirane homozigote u Tablici 4. Relativni rizik definira se kao omjer incidencije pojedine bolesti u FVL heterozigota (Tablica 3) tj. FVL mutiranih homozigota (Tablica 4) u odnosu na osobe koje su divlji tip za FVL (Kujovich, 2011; Viera, 2008).

Tablica 3. Procijenjeni relativni rizik pojedinih bolesti u FVL heterozigota (Kujovich, 2018; Kujovich, 2011)

<b>Stanje</b>	<b>Procijenjeni relativni rizik</b>
<b>Prvi VTE</b>	3-8
<b>Tromboza cerebralnih vena</b>	3-5
<b>Primarna tromboza gornjih ekstremiteta</b>	3-6
<b>Tromboza povezana s centralnim venskim kateterom</b>	2-3
<b>Tromboza površinskih vena</b>	6
<b>Tromboza povezana s trudnoćom</b>	5-8*
<b>Rekurentni VTE</b>	1.4-1.6
<b>Spontani pobačaj</b>	2-4

\*u odnosu na trudnice koje su divlji tip za FVL

Tablica 4. Procijenjeni relativni rizik pojedinih bolesti u FVL mutiranih homozigota (Kujovich, 2011).

<b>Stanje</b>	<b>Procijenjeni relativni rizik</b>
<b>Prvi VTE</b>	10-80
<b>Rekurentni VTE</b>	2-3
<b>VTE povezan s trudnoćom</b>	20-40*
<b>VTE povezan s oralnim kontraceptivima</b>	100
<b>VTE povezan s kirurškim zahvatima</b>	20
<b>Spontani pobačaj prije 12. tjedna trudnoće</b>	3
<b>Spontani pobačaj nakon 12. tjedna trudnoće</b>	11

\*u odnosu na trudnice koje su divlji tip za FVL

Iako je relativni rizik povećan, posebice u FVL mutiranih homozigota, godišnje će samo 0.5 % FVL heterozigota i 1.8 % FVL mutiranih homozigota razviti prvu VTE (Kujovich, 2018). Rizik je veći u trudnoći, posebno postpartalno. Prema istraživanju Bates i sur. (2016) 1.2 % (95 % CI = 0.8 – 1.8) FVL heterozigota i 4.8 % (95 % CI = 1.4 – 16.8) FVL mutiranih homozigota razvit će VTE antepartalno ili postpartalno.

FVL heterozigotima bez osobne anamneze VTE se antikoagulacijska profilaksa rutinski ne preporučuje. Preko 50 % VTE kod FVL heterozigota praćeno je nekim od stečenih rizičnih čimbenika tromboze pa se antikoagulacijska profilaksa u takvim okolnostima može privremeno



preporučiti. Primjerice, profilaksa niskomolekulskim heparinom preporučuje se tijekom trudnoće i 6 tjedana postpartalno svim ženama koje su FVL heterozigoti te imaju osobnu ili obiteljsku povijest VTE. Također, antikoagulacijska profilaksa antepartalno i postpartalno preporučuje se svim FVL homozigotima i svim trudnicama koje su dvostruki heterozigoti za FVL i protrombin G20210A (Kujovich, 2011). FVL mutiranim homozigotima preporučuje se antikoagulacijska profilaksa prije kirurških zahvata (Albagoush i sur., 2023).

Povezanost faktora V Leiden i neželjenih ishoda trudnoće kao što su preeklampsija, abrupcija placente i restrikcija fetalnog rasta nije nedvojbeno utvrđena. Neki autori ukazuju da nema povezanosti (Rodger i sur., 2010), dok drugi autori ukazuju da povezanost postoji (Lykke i sur., 2012). Korištenje oralnih kontraceptiva i faktor V Leiden pokazuju aditivni učinak na povećanje rizika VTE. Žene koje koriste oralne kontraceptive te su ujedno FVL heterozigoti imaju 11 do 41 puta veći rizik VTE nego žene koje ne koriste oralne kontraceptive i divlji su tip za FVL. Kod žena koje koriste oralne kontraceptive te su FVL mutirani homozigoti ili su kombinirani FVL i protrombin G20210A heterozigoti, rizik VTE je 17 do 110 puta veći nego kod žena koje su divlji tip za FVL i protrombin G20210A te ne koriste oralne kontraceptive. (Kujovich, 2018).

Faktor V Leiden ne može se jednoznačno povezati s povećanim rizikom arterijske tromboze (Carroll i Piazza, 2018). Ipak, neke studije ukazuju da FVL predstavlja rizični čimbenik za akutni infarkt miokarda (Forte i sur., 2011; Mannucci i sur., 2010; Ye i sur., 2006; Middendorf, 2004) i cerebrovaskularni inzult (Alhazzani i sur., 2018).

#### **1.2.1.4. APC rezistencija**

APC rezistencija (APCR) je laboratorijski test kojim se ispituje antikoagulacijski odgovor plazme na prisutnost aktiviranog proteina C. Princip ispitivanja APC rezistencije temelji se na određivanju aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTV) u ispitivanoj plazmi sa i bez dodanog APC. Kod zdravih ispitanika dolazi do značajnog produljenja APTV-a nakon dodatka APC jer APC inaktivira FVa i FVIIIa koji su sastavnice zajedničkog i unutarnjeg puta zgrušavanja (Moore i sur., 2019). Takav rezultat testa APC rezistencije smatra se negativnim. Pozitivan rezultat APC rezistencije u preko 95 % slučajeva javlja se uslijed faktora V Leiden (Van Cott i sur., 2016) zbog kojeg APC ne može inaktivirati FVa pa dodatak APC nedovoljno produljuje APTV. Prije izvođenja testa za APC rezistenciju potrebno je plazmu prediluirati s faktor V deficijentnom plazmom tako da se nadomjesti eventualni utjecaj nedostatka ostalih faktora zgrušavanja (osim faktora V) na rezultate testa

(Moore i sur., 2019). U svrhu standardizacije APCR se preporuča izraziti kao normalizirani omjer tako da se određuje APTV u pacijentovoj plazmi (prije i poslije dodanog APC) kao i u normalnoj plazmi (prije i poslije dodatnog APC) te se rezultat izražava kao:

$$\text{APCR} = \frac{[\text{APTV}+\text{APC},\text{pacijentova plazma}]/[\text{APTV}-\text{APC},\text{pacijentova plazma}]}{[\text{APTV}+\text{APC},\text{normalna plazma}]/[\text{APTV}-\text{APC},\text{normalna plazma}]}$$

(APTV–APC = izmjereni APTV (s) prije dodanog APC; APTV+APC = izmjereni APTV (s) nakon dodanog APC) (Kadauke i sur., 2014; Margetić, 2014). Pacijenti s pozitivnom APC rezistencijom koja ukazuje na prisutnost polimorfizma FVL imat će sniženu vrijednost ovako izraženog APCR. Iako FVL mutirani homozigoti najčešće imaju izraženiju APC rezistenciju nego FVL heterozigoti (manji APCR normalizirani omjer) (Zöller i sur., 1994), ipak se test APC rezistencije ne može koristiti za pouzdano razlučivanje FVL heterozigota i FVL mutiranih homozigota, nego se u tu svrhu pristupa genotipizaciji FVL (Griffin i sur., 2001).

APCR je ekonomičniji i jednostavniji probirni test za faktor V Leiden nego što je to genotipizacija (Prüller i sur., 2014). Smatra se da negativan rezultat APC rezistencije isključuje potrebu za genotipizacijom faktora V Leiden, dok za postavljanje dijagnoze faktora V Leiden granične i pozitivne rezultate APC rezistencije treba potvrditi genotipizacijom (Khor i van Cott, 2009). Osim ekonomičnosti, prednost ispitivanja APC rezistencije pred genotipizacijom faktora V Leiden je što se njome može otkriti i stečena APC rezistencija koja je također, neovisno o faktoru V Leiden, rizični čimbenik za razvoj VTE. Poznati uzroci stečene APC rezistencije su pozitivan lupus antikoagulans, povećana aktivnost FVIII, trudnoća i korištenje oralnih kontraceptiva (Margetić, 2014).

Iako je test APC rezistencije kod heterozigota za faktor V Leiden gotovo uvijek pozitivan, ipak u iznimnim situacijama može biti negativan. Kod APC rezistencije pseudo-divljeg tipa rezultati APCR daju negativan (normalan) nalaz iako je osoba FVL heterozigot. To se događa iznimno rijetko, kada je na istom alelu i FVL i neka *missense* ili *nonsense* mutacija (primjerice u literaturi je opisan faktor V Graz, *F5 G5326A*) koja će uzrokovati da proteinski produkt uopće ne nastane ili da nastali proteinski produkt bude nefunkcionalan. Zbog toga, iako je osoba FVL heterozigot, na fenotipskoj razini ne dolazi do ispoljavanja faktora V Leiden pa takve osobe nemaju povećani rizik od tromboze (Prüller i sur., 2013).

Otpriblike 1 od 1000 FVL heterozigota ujedno na homolognom kromosomu 1 ima *F5* nul-varijantu (varijanta koja ne rezultira genskim produktom) (Kujovich, 2018). Budući da kod takvih osoba uopće ne nastaje proteinski produkt divljeg tipa, pretraga APC rezistencije dat će rezultate koji se očekuju kod homozigota iako osoba ima samo jednu kopiju varijante FVL. Za

takve osobe kaže se da su APCR pseudo-homozigoti, a smatra se da imaju veći rizik od tromboze nego FVL homozigoti. (Duckers i sur., 2011).

### 1.2.2. Polimorfizam G20210A u genu za protrombin

Polimorfizam G20210A u genu za protrombin (*F2* G20210A; rs1799963) predstavlja zamjenu gvanina adeninom na poziciji 20210 u genu *F2* koji kodira za protrombin (faktor zgrušavanja II) i nalazi se na kromosomu 11 (Kujovich, 2021). Protrombin G20210A uzrokuje pretjeranu sintezu protrombina, a time i povećanu aktivnost protrombina u plazmi što predstavlja hiperkoagulacijsko stanje (Kujovich, 2021). Polimorfizam G20210A nalazi se u dijelu gena *F2* koji kodira za 3' netranslatiranu regiju (3' UTR, engl. *3' untranslated region*) mRNA koja se ne translata, nego ima regulatornu funkciju (Mayr, 2019). Kad je na poziciji 20210 gena *F2* prisutan adenin, povećana je efikasnost procesiranja mRNA što dovodi do njene akumulacije, a time i povećane sinteze protrombina (Kujovich, 2021). Kod heterozigota je plazmatska aktivnost protrombina oko 30 %, a kod mutiranih homozigota oko 70 % veća nego kod osoba koje su divlji tip za *F2* G20210A (Ridker i sur., 1999).

U općoj europskoj populaciji je između 1.7 % (sjeverna Europa) i 3 % (južna Europa) heterozigota za protrombin G20210A, dok je taj polimorfizam vrlo rijedak u afričkoj i azijskoj populaciji (Rosendal i sur., 1998).

Tablica 5. Relativni rizik različitih trombotičkih događaja kod heterozigota za *F2* G20210A u odnosu na homozigote za divlji tip (Kujovich, 2021 (\*); De Stefano i sur., 2001 (\*\*)).

Stanje	Relativni rizik	Literatura
VTE	2-5	*
DVT gornjih ekstremiteta	3-6	*
DVT gornjih ekstremiteta kod žena koje koriste oralne kontraceptive	9-14	*
Tromboza cerebralnih vena	6-10	*
Tromboza portalne vene	4	*
Tromboza hepatičkih vena	1	*
VTE u dječjoj dobi	3-4	*
Rekurentna tromboza	1.3	**

Heterozigoti za *F2* G20210A koji su oboljeli od DVT imaju povećani rizik razvoja PE (32 %) u odnosu na osobe koje nemaju nikakvu poznatu nasljednu trombofiliju (19 %) (Kujovich, 2021). *F2* G20210A heterozigoti imaju najviše 2-3 puta povećani rizik spontanog pobačaja (Kujovich, 2021), iako ne postoji konsenzus oko povezanosti *F2* G20210A genotipa

i neželjenih ishoda trudnoće (Padda i sur., 2021). Literaturni podaci o mutiranim homozigotima za *F2 G20210A* su oskudni, ali ukazuju na veći rizik od VTE i spontanih pobačaja kod mutiranih homozigota nego kod heterozigota (Shemesh i sur., 2017)

*F2 G20210A* genotip ne povezuje se konzistentno s povećanim rizikom od arterijske tromboze (Carroll i Piazza, 2018), iako postoje studije koje ukazuju na povećani rizik od akutnog infarkta miokarda u *F2 G20210A* heterozigota i mutiranih homozigota u odnosu na homozigote za divlji tip (Li i sur., 2017; Forte i sur., 2011).

U jednoj studiji slučaja s kontrolom (engl. *case-control study*) 51 od 2310 (2.2 %) pacijenata oboljelih od VTE i 0 od 3204 (0.0 %) kontrolnih ispitanika bili su dvostruki heterozigoti za faktor V Leiden i *F2 G20210A*. Dvostruki heterozigoti imali su veći rizik od VTE (OR=20.0; 95 % CI = 11.1-36.1) nego nositelji samo FVL (OR=4.9; 95 % CI = 4.1-5.9) ili nositelji samo *F2 G20210A* (OR=3.8; 95 % CI = 3.0-4.9) (Emmerich i sur. 2001).

#### **1.2.2.1. Indikacije za genotipizaciju faktora V Leiden i protrombina G20210A**

Prema smjernicama američkog stručnog društva za medicinsku genetiku (engl. *American College of Medical Genetics*) iz 2018. godine genotipizacija faktora V Leiden i protrombina G20210A preporučuje se u sljedećim slučajevima:

1. prvi neprovocirani VTE, posebice kod osoba mlađih od 50 godina;
2. VTE na neobičnom mjestu (npr. portalna vena, hepatičke, mezenteričke, cerebralne vene);
3. rekurentni VTE;
4. obiteljska anamneza VTE s (a) dva ili više člana obitelji s poviješću VTE ili (b) jedan prvi srodnik s VTE u ranoj dobi;
5. osobe s pozitivnim testom APC rezistencije (Zhang i sur., 2018a).

Testiranje se može razmotriti i u sljedećim slučajevima:

1. žene mlađe od 50 godina koje puše i imaju povijest akutnog infarkta miokarda;
2. braća i sestre osoba koje su homozigoti za faktor V Leiden ili protrombin G20210A;
3. asimptomatska trudnica ili žena koja planira trudnoću s prvim srodnikom s poviješću neprovocirane VTE ili VTE provocirane trudnoćom ili oralnim kontraceptivima;
4. trudnica ili žena koja planira trudnoću ili korištenje estrogena koja ima prvog srodnika s poviješću VTE koji je poznati nositelj faktor V Leiden i/ili protrombina G20210A;

5. trudnica ili žena koja planira trudnoću, a koja je ranije imala VTE nepovezan s estrogenima ili VTE provociran slabim rizičnim faktorom (Zhang i sur., 2018a).

Rutinsko testiranje u pravilu se ne preporučuje osobama s osobnom ili obiteljskom anamnezom arterijske tromboze (Zhang i sur., 2018a).

### 1.2.3. Polimorfizam 5G/4G u genu za PAI-1

Inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) pripada porodici inhibitora serinskih proteaza (serpina) i najvažniji je fiziološki inhibitor aktivatora plazminogena – tkivnog (tPA, engl. *tissue plasminogen activator*) i urokinaznog (uPA, engl. *urokinase plasminogen activator*). Plazmin je serinska proteaza koja razgradnjom fibrina dovodi do razgradnje ugruška. Djelovanjem plazmina na fibrin nastaju razgradni produkti fibrina, od kojih su klinički najrelevantniji D-dimeri (Risman i sur., 2023). Plazmin se sintetizira u jetri kao neaktivni plazminogen, a aktivatori plazminogena, serinske proteaze, cijepaju ga u aktivni plazmin (Flick i Bugge, 2017). Fiziološki najznačajniji aktivator plazminogena je tkivni aktivator plazminogena (tPA), zatim urokinazni aktivator plazminogena (uPA), a manje su važni FXIa, FXIIa i kalikrein (Katz i Tadi, 2021). tPA se luči iz vaskularnog endotela te na fibrinskom ugrušku stvara kompleks s plazminogenom i aktivira ga, a zatim plazmin mehanizmom pozitivne povratne sprege dodatno aktivira tPA. uPA se veže na svoj receptor na površini endotela te aktivira plazmin koji onda dodatno aktivira uPA (Katz i Tadi, 2021). Plazmin koji je aktiviran djelovanjem tPA uglavnom je uključen u fibrinolizu, dok plazmin koji je aktiviran djelovanjem uPA ima funkciju u remodeliranju tkiva, staničnoj adheziji i migraciji te upali (Sillen i Declerck, 2021). PAI-1 posredno, inhičijom aktivatora plazminogena, inhibira aktivaciju plazminogena u plazmin, dok se  $\alpha_2$ -antiplazmin i  $\alpha_2$ -makroglobulin u cirkulaciji vežu na plazminogen i izravno inhibiraju njegovu aktivaciju u plazmin.

PAI-1 sintetizira se u vaskularnom endotelu, trombocitima, adipoznom tkivu i drugdje, a ekspresija mu je potaknuta raznim faktorima kao što su proupalni citokini (Sillen i Declerck, 2021; Suyama i sur., 1998). U krvi se PAI-1 u manjoj količini nalazi u plazmi, a u većoj količini u trombocitima (Sillen i Declerck, 2021). PAI-1 se veže na tPA i uPA te ih izravno inhibira. Povećana aktivnost PAI-1 dovodi do pretjerane inhibicije aktivatora plazminogena i posljedično nedovoljne aktivacije plazminogena u plazmin. Smanjena aktivnost plazmina dovodi do neefikasne fibrinolize, odnosno predstavlja hiperkoagulacijsko stanje (Dayco i sur., 2022; Sillen i Declerck, 2021). PAI-1 kodiran je genom *SERPINE1* koji se nalazi na kromosomu 7 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Poznati polimorfizam u promotorskoj regiji

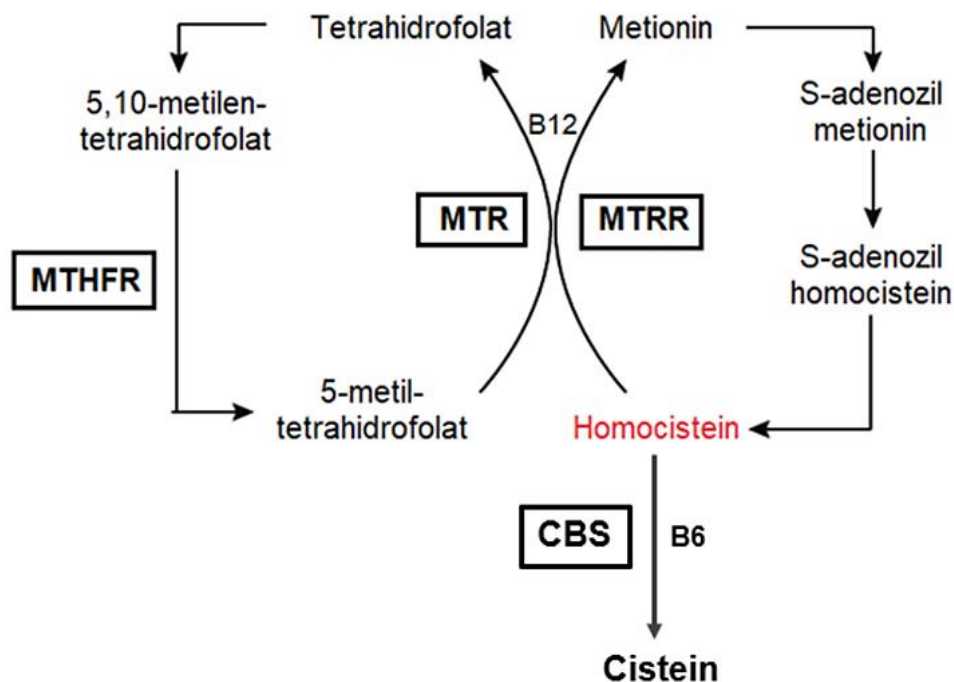
gena *SERPINE1* je delecija/insercija 5G/4G (rs1799768) (Dayco i sur., 2022). 4G alel dovodi do stvaranja više mRNA nego 5G alel, a time i više proteinskog produkta PAI-1 (Isordia-Salas i sur., 2009). U istraživanju koje su na 126 zdravih ispitanika proveli Begonja i sur. (2002) frekvencije genotipova PAI-1 u hrvatskoj populaciji bile su 29 % za 5G/5G, 47 % za 5G/4G i 24 % za 4G/4G.

U meta-analizi koju su proveli Tsantes i sur. (2007) omjer izgleda za VTE u PAI-1 4G/4G homozigota u odnosu na osobe s 5G/4G i 5G/5G genotipom iznosio je 1.14 (95 % CI = 1.004 – 1.297). Doprinos polimorfizma PAI-1 5G/4G nastajanju VTE vjerojatno je malen i prisutan tek u kombinaciji s ostalim rizičnim čimbenicima (Tsantes i sur., 2008). Prema meta-analizi koju su proveli Li i sur. (2015), u odnosu na PAI-1 5G/5G i 5G/4G genotip, PAI-1 4G/4G genotip predstavlja rizični čimbenik za rekurentne spontane pobačaje u bjelkinja (OR = 2.23; 95 % CI = 1.44 – 3.46). Ipak, smjernice za testiranje na tromfobiliju britanskog hematološkog društva (engl. *British Society for Haematology*) iz 2022. godine ne preporučuju genotipizaciju PAI-1 5G/4G polimorfizma niti u svrhu evaulacije VTE niti u svrhu evaulacije spontanih pobačaja ili drugih neželjenih ishoda trudnoće (Arachchillage i sur., 2022).

#### **1.2.4. Polimorfizam C677T u genu za MTHFR**

Metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) je enzim koji katalizira redukciju 5,10-metilentetrahidrofolata u 5-metiltetrahidrofolat, oblik folata koji se koristi u remetilaciji homocisteina u metionin. Smanjena funkcija MTHFR onemogućuje nastajanje 5-metilentetrahidrofolata, a time i uklanjanje homocisteina pa je kod smanjene funkcije MTHFR koncentracija homocisteina u plazmi povišena, što se povezuje s rizikom od kardiovaskularnih bolesti i tromboze (Slika 5) (Raghubeer i Matsha, 2021). Gen za MTHFR nalazi se na kromosomu 1. Polimorfizam C677T (rs1801133) u genu za MTHFR uzrokuje zamjenu alanina valinom na položaju 222 (Liew i Gupta, 2015). Osobe s MTHFR 677 TT genotipom imaju 50-60 % smanjenu aktivnost MTHFR (Rahubeer i Matsha, 2021). Prema nekim istraživanjima MTHFR C677T polimorfizam je rizični faktor za razvoj tromboze i kardiovaskularnih bolesti, dok druga istraživanja to opovrgavaju (Levin i Varga, 2016).

Otpriblike 25 % opće svjetske populacije nositelji su MTHFT C677T, s tim da je najveća frekvencija među hispanskom (47 %) i europskom (36 %) populacijom (The 1000 Genomes Consortium Project, 2015). U europskoj populaciji 13.5 % osoba ima MTHFR 677 TT genotip (Graydon i sur., 2019).



Slika 5. Metabolička povezanost MTHFR i homocisteina. MTHFR – metilentetrahydrofolat reduktaza; MTR – metionin sintaza; MTRR – metionin sintaza reduktaza; CBS – cistation- $\beta$ -sintaza (preuzeto i prilagođeno prema Zhang i sur., 2018b)

#### 1.2.4.1. Klinička značajnost genotipizacije polimorfizma MTHFR C677T određivanja plazmatske koncentracije homocisteina

MTHFR 677 TT genotip povezuje se s blago povišenim koncentracijama homocisteina u plazmi. U istraživanju koje su proveli Pereira i sur. (2004) koncentracija homocisteina u plazmi osoba s MTHFR 677 CC genotipom bila je  $8.2 \pm 2.0 \mu\text{mol/L}$ , kod osoba s MTHFR 677 CT genotipom  $8.8 \pm 3.2 \mu\text{mol/L}$ , a kod osoba s MTHFR 677 TT genotipom  $16.2 \pm 8.9 \mu\text{mol/L}$ . Hiperhomocisteinemija se općenito može podijeliti na blagu, umjerenu i tešku (Tablica 6).

Tablica 6. Klasifikacija hiperhomocisteinemije (Hirmerová, 2013).

Vrsta hiperhomocisteinemije (prevalencija)	Koncentracija homocisteina u plazmi	Etiologija
Blaga (<10 %)	15 – 30 $\mu\text{mol/L}$	MTHFR 677 TT, vegetarijanska prehrana, blagi deficit folata ili vitamina B12, renalna insuficijencija, terapija antagonistima folata
Umjerena (<1 %)	30 – 100 $\mu\text{mol/L}$	Umjereni i teški deficit folata ili vitamina B12, renalna insuficijencija
Teška (<0.02 %)	> 100 $\mu\text{mol/L}$	Homocistinurija

Teška hiperhomocisteinemija vrlo je rijetka i javlja se kod kongenitalne homocistinurije koja je najčešće uzrokovana mutacijom u genu za cistation  $\beta$ -sintazu (Hirmerová, 2013), ali znatno rjeđe može biti uzrokovana i mutacijama u MTHFR genu koje uzrokuju izrazito smanjenu aktivnost MTHFR, čak i aktivnost od 0 % (Leclerc i sur., 2013). Najčešći uzrok smrti kod oboljelih od homocistinurije su VTE i arterijska tromboza (Morris i sur., 2017). Predloženi mehanizmi protrombotičkog djelovanja homocisteina uključuju uzrokovanje disfunkcije endotela, vazokonstrikciju povećanjem sinteze tromboksana A<sub>2</sub>, povećanje aktivnosti trombocita te smanjenje vezanja tPA na fibrin i time smanjenu fibrinolizu (Hirmerová, 2013). Ipak, ostaje dvojbeno može li se blaga hiperhomocisteinemija, kakva se pojavljuje u osoba s MTHFR 677 TT genotipom, povezati s povećanim rizikom od VTE. Neke studije (Herrmann i sur., 2012) su ustvrdile postojanje korelacije između hiperhomocisteinemije i VTE, dok druge studije nisu (Mäkelburg i sur., 2009; Gómez i sur., 2008). Prema prospektivnoj studiji na 27 555 žena starosti  $\geq$  45 godina (Aday i sur., 2021) hiperhomocisteinemija je rizični faktor za neprovociranu, ali ne i za provociranu DVT i PE. Prospektivna studija (Næss, 2008) pratila je kohortu od 66 140 osoba kroz 7 godina te su rezultati ukazivali na to da hiperhomocisteinemija (u koncentracijama iznad 95. percentila) jest rizični faktor za razvoj prvog VTE u muškaraca (OR 2.17; 95 % CI = 1.20-3.91), ali ne i u žena. Rezultati iste studije pokazali su da polimorfizam MTHFR 677 TT nije faktor rizika za razvoj prvog VTE. Studija koja je uključivala 4375 pacijenata s prvim VTE i 4856 kontrolnih ispitanika nije potvrdila korelaciju MTHFR 677 TT i VTE (Bezemer i sur., 2007). Meta-analiza na preko 11 000 VTE pacijenata i 22 000 kontrola nije pronašla korelaciju MTHFR 677 TT i VTE (Simone i sur., 2013). S druge strane, meta-analiza koja je obuhvatila 99 ranijih studija pokazala je povećani rizik DVT u osoba s MTHFR 677 TT i CT genotipom u odnosu na osobe s CC genotipom (OR=1.39, 95 % CI 1.29-1.55) (Zeng i Zeng, 2018).

MTHFR 677 TT genotip povezuje se s nižim koncentracijama folata u serumu. U jednom istraživanju koncentracije folata u serumu bile su 20.2 % (95 % CI = 5.4-32.6 %) niže u osoba s MTHFR 677 TT genotipom nego u osoba s genotipom MTHFR 677 CC ili CT (Nishio i sur., 2008). Budući da je deficit folata prije i na početku trudnoće poznati uzrok defekata neuralne cijevi kao što su spina bifida ili anencefalija (Wald, 2022), provedena su istraživanja povezanosti genotipa MTHFR i pojavnosti defekata neuralne cijevi (Levin i Varga, 2016). Ranije studije ukazivale su na 2 do 4 puta povećani rizik od defekta neuralne cijevi u djeteta kad je trudnica MTHFR 677 TT genotip (Reilley i sur., 2013). U meta-analizi koja je obuhvatila 1329 pacijenata oboljelih od defekata neuralne cijevi i 2965 kontrolnih ispitanika MTHFR 677



TT genotip pokazao se kao rizični faktor za razvoj defekata neuralne cijevi u odnosu na MTHFR 677 CC genotip (OR 1.892, 95 % CI = 1.333-2.687). U istu meta-analizu uključeno je 3018 majki s potomstvom koje je bolovalo od defekata neuralne cijevi i 8746 kontrolnih ispitanica. MTHFR 677 TT genotip u majki pokazao se kao rizični čimbenik za razvoj defekata neuralne cijevi u djece u usporedbi s MTHFR 677 CC genotipom (OR 2.016, 95 % CI = 1.478-2.750). Ipak, relevantna američka društva ne preporučuju povećanje dnevnog unosa folne kiseline trudnicama s MTHFR 677 TT genotipom (Levin i Varga, 2016).

Tablica 7. Smjernice stručnih društava vezano za kliničku primjenu genotipizacije MTHFR i određivanja plazmatske koncentracije homocisteina (Arachchillage i sur., 2022; Levin i Varga, 2016)

<b>Organizacija</b>	<b>Smjernice</b>	<b>Literatura</b>
<b>American Heart Association</b>	Homocistein i genotipizacija MTHFR ne trebaju se koristiti u procjeni rizika kardiovaskularnih bolesti.	Greenland i sur., 2010
<b>American College of Medical Genetics</b>	Genotipizacija MTHFR ne treba se koristiti u svrhu procjene rizika tromboze ili rekurentnih sponatnih pobačaja. U svrhu smanjenja rizika defekta neuralne cijevi svim trudnicama se preporučuje 4 mg folne kiseline/dan, neovisno o genotipu MTHFR C677T.	Hickey i sur., 2013
<b>American Congress of Obstetricians and Gynecologists</b>	Ne preporučuje se koristiti genotipizaciju MTHFR niti homocistein u evaulaciji VTE i neželjenih ishoda trudnoće.	American Congress of Obestricians and Gynecologists, 2013
<b>British Society for Haematology</b>	U svrhu testiranja na trombofiliju ne preporučuje se određivanje plazmatske koncentracije homocisteina, niti genotipizacija MTHFR.	Arachchillage i sur., 2022

### 1.3. Vrednovanje analiza u području molekularne dijagnostike

U vrednovanju metoda molekularne dijagnostike razlikuju se postupci verifikacije i validacije. Validacijom se ispituju opće karakteristike određene metode tj. dokazuje se služi li određena metoda svrsi kojoj je primarno namijenjena (Joint Committee for Guides in Metrology, 2012). Verifikacija je provjera istinitosti tehničkih specifikacija proizvođača pregledom dokumentacije i prikupljanjem objektivnih dokaza da su utvrđeni zahtjevi ispunjeni (Tešija Kuna, 2016). Verifikacija se provodi kod metoda koje su prethodno validirane i koje se bez modifikacije koriste točno prema zadanom protokolu. Laboratorij provodi validaciju za *in*

*house* metode i za metode koje su modificirane u odnosu na validirani protokol (Joint Committee for Guides in Metrology, 2012).

Vrednovanje analiza u području molekularne dijagnostike provodi se ispitivanjem analitičke preciznosti, analitičke točnosti, granica detekcije i ponovljivosti drugom metodom (Felicitas i sur., 2012; Clinical Practice Committees of the Association for Molecular Pathology, 2009). Analitička preciznost definira se kao bliskost slaganja između mjerenja istog analita u istom uzorku u ponovljenim mjerenjima (Tešija Kuna, 2016). U molekularnoj dijagnostici analitička preciznost može se definirati kao bliskost slaganja između rezultata nezavisnih analiza provedenih u propisanim uvjetima. Najčešći uzroci varijabilnosti koji se mogu odraziti na preciznost uključuju operatera i lot reagensa (Clinical Practice Committees of the Association for Molecular Pathology, 2009). Analitička točnost definira se kao bliskost rezultata mjerenja nekog analita stvarnoj vrijednosti tog analita. Analitička točnost u kvalitativnim metodama predstavlja udio pravilno klasificiranih rezultata (stvarno pozitivnih i stvarno negativnih). Komponente analitičke točnosti su analitička osjetljivost i analitička specifičnost (Tešija Kuna, 2016). U kvalitativnim metodama molekularne dijagnostike analitička osjetljivost predstavlja sposobnost testa da detektira mutaciju kada je ta mutacija prisutna, a analitička specifičnost predstavlja sposobnost testa da pokaže negativan rezultat u uzorcima koji nemaju ispitivanu mutaciju (Clinical Practice Committees of the Association for Molecular Pathology, 2014). Analitička osjetljivost, specifičnost i točnost kvalitativnih metoda računaju se prema sljedećim izrazima (Clinical Practice Committees of the Association for Molecular Pathology, 2014):

$$\text{analitička osjetljivost ( \% )} = \frac{SP}{SP+LN} \times 100;$$

$$\text{analitička specifičnost ( \% )} = \frac{SN}{SN+LP} \times 100;$$

$$\text{analitička točnost ( \% )} = \frac{SP+SN}{SP+SN+LP+LN} \times 100;$$

gdje je: SP – broj stvarno pozitivnih uzoraka; SN – broj stvarno negativnih uzoraka; LP – broj lažno pozitivnih uzoraka; LN – broj lažno negativnih uzoraka (Tablica 8).

Tablica 8. Određivanje broja stvarno pozitivnih, stvarno negativnih, lažno pozitivnih i lažno negativnih uzoraka

	<b>pozitivna ciljna vrijednost</b>	<b>negativna ciljna vrijednost</b>
<b>pozitivan rezultat dobiven metodom u postupku vrednovanja</b>	stvarno pozitivan (SP)	lažno pozitivan (LP)
<b>negativan rezultat dobiven metodom u postupku vrednovanja</b>	lažno negativan (LN)	stvarno negativan (SN)

Granica detekcije u molekularnoj dijagnostici predstavlja najmanju količinu DNA potrebnu za uspješno dobivanje rezultata određene analize (Clinical Practice Committees of the Association for Molecular Pathology, 2009). Osim analitičke validacije, može se provoditi i klinička validacija koja uključuje dijagnostičku specifičnost, osjetljivost i točnost. One se računaju identično kao analitička osjetljivost, specifičnost i točnost, ali kriterij pozitivnosti/negativnosti uzorka nije pozitivna/negativna ciljna vrijednost, nego prisutnost/odsustvo bolesti (Clinical Practice Committees of the Association for Molecular Pathology, 2009).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

U Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice došlo je do promjene analitičkog sustava za izvođenje genotipizacije polimorfizama *F5* G1619A (faktor V Leiden; rs6025), *F2* G20210A (protrombin G20210A; rs1799963), *PAI-1* 5G/4G (rs1799768) i *MTHFR* C677T (rs1801133). Uveden je LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska) koji je zamijenio dotadašnji analitički sustav LightCycler® 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska). Cilj ovog rada bio je validirati analitičke karakteristike mjernih postupaka genotipizacije polimorfizama *F5* G1619A, *F2* G20210A, *PAI-1* 5G/4G i *MTHFR* C677T na analitičkom sustavu LightCycler® 480 kako bi se utvrdilo posjeduju li navedeni mjerni postupci dovoljnu analitičku kvalitetu da bi se mogli koristiti u rutinskom radu.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Izolacija DNA

Koristeći komercijalni kit za ekstrakciju DNA, nakon liziranja stanica, primjenom postupka ekstrakcije i centrifugiranja na kolonama s adsorbensom za DNA, u konačnici se dobije čista DNA otopljena u puferu.

##### Uzorci:

Za izolaciju DNA korišteni su uzorci pune venske krvi uzeti u epruvetu s antikoagulansom K<sub>3</sub>EDTA.

##### Laboratorijska oprema:

- termostat Hybex Microsample Incubator (SciGene, Sjedinjene Američke Države)
- vrtložna mješalica Variable Speed SA8 Vortex Mixer (Cole-Palmer Stuart, Sjedinjene Američke Države)
- mikrocentrifuga MicroCL 17 (Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države)
- automatske pipete volumena 10-100 µL i 100-1000 µL (Eppendorf, Njemačka)

##### Reagensi i potrošni materijali:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska), sadrži:
  - *Tissue Lysis Buffer* (4 M urea, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA)
  - *Binding Buffer* (6 M gvanidin-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20 % Triton X-100)
  - Proteinaza K (liofilizat)
  - *Inhibitor Removal Buffer* (5 M gvanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl; konačne koncentracije nakon dodatka etanola)
  - *Wash Buffer* (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl; konačne koncentracije nakon dodatka etanola)
  - *Elution Buffer* (10 mM Tris-HCl)
  - kolone za pročišćavanje *High Pure Filter Tubes*
  - plastične epruvete za prikupljanje eluata *Collection Tubes*
- plastični jednokratni nastavci za pipete s filterom volumena 100 µL i 1000 µL (Eppendorf, Njemačka)
- plastične jednokratne sterilne epruvete volumena 1,5 mL (Eppendorf, Njemačka)
- izopropanol 99.7 % (Merck, Njemačka)
- etanol apsolutni (T.T.T., Hrvatska)

- voda za PCR (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska)
- menzura volumena 100 mL

#### **Postupak:**

- **Priprema reagensa**

1. U bočicu s liofiliziranom proteinazom K dodati 4.5 mL vode za PCR i otopiti liofilizat.
2. U bočicu s *Inhibitor Removal Bufferom* dodati 20 mL apsolutnog etanola.
3. U bočicu s *Wash Bufferom* dodati 80 mL apsolutnog etanola.

- **Izolacija DNA**

1. Prije samog postupka izolacije DNA potrebno je zagrijati uzorke na sobnu temperaturu (+15°C do +25°C) i temperirati alikvot *Elution Buffera* u termostatu na +70°C.
2. Dodati proteinazu K u plastičnu jednokratnu sterilnu epruvetu volumena 1,5 mL.
3. Dodati 200 µL uzorka pune venske krvi.
4. Dodati 200 µL *Binding Buffera* i vorteksirati 10 sekundi.
5. Inkubirati 10 minuta. Kratko centrifugirati epruvete.
6. Dodati 100 µL izopropanola. Vorteksirati 10 sekundi. Kratko centrifugirati epruvete.
7. Prebaciti sadržaj epruvete u *Filter Tube* koja je prethodno umetnuta u *Collection Tube*. Začepiti kolonu i centrifugirati 1 min na 8000 g. Baciti eluat.
8. U *Filter Tube* dodati 500 µL *Inhibitor Removal Buffera*. Centrifugirati 1 min na 8000 g. Baciti eluat.
9. U *Filter Tube* dodati 500 µL *Wash Buffera*. Centrifugirati 1 min na 8000 g. Baciti eluat.
10. U *Filter Tube* dodati 500 µL *Wash Buffera*. Centrifugirati 1 min na 8000 g.
11. Centrifugirati 10 sekundi na 13 000 g. Baciti eluat.
12. Premjestiti *Filter Tube* u novu plastičnu jednokratnu epruvetu volumena 1,5 mL i dodati 200 µL prethodno zagrijanog *Elution Buffera*.
13. Centrifugirati 1 min na 8000 g.
14. Pohraniti epruvetu s izoliranom DNA na +4°C.

### **3.2. Određivanje koncentracije i čistoće DNA**

Koncentracija i čistoća izolirane DNA određena je mikrovolumnim spektrofotometrom koji u uzorku od 1 µL otopine izolirane DNA mjeri apsorbancije na 230, 260 i 280 nm te računa koncentraciju DNA u uzorku. Budući da DNA ima apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 260 nm, izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 260 nm razmjerna je koncentraciji DNA. Proteini (tj. aromatske aminokiseline) imaju apsorpcijski maksimum na 280 nm. Gvanidin-HCl

koji se koristi u izolaciji DNA ima apsorpcijski maksimum na 230 nm. Stoga omjer apsorbanacija A260/A280 i A260/A230 uzorka ukazuje na čistoću izolirane DNA. Prihvatljivi su uzorci DNA s omjerom A260/A280 koji iznosi 1.7 – 2.0 i omjerom A260/A230 koji iznosi 1.8 – 2.4.

#### **Laboratorijska oprema:**

- mikrovolumni spektrofotometar DS-11 FX+ (DeNovix, Sjedinjene Američke Države)
- vrtložna mješalica Variable Speed SA8 Vortex Mixer (Cole-Palmer Stuart, Sjedinjene Američke Države)
- automatska pipeta volumena 0,5-10 µL (Eppendorf, Njemačka)

#### **Reagensi i potrošni materijali:**

- plastični jednokratni sterilni nastavci za pipete s filterom volumena 10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- Elution Buffer, sadržan u High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska)
- staničevina

#### **Postupak:**

1. 2 µL *Elution Buffera* pipetira se na mjerno polje u svrhu postavljanja bazne linije (engl. *blank*) spektrofotometra te se izvrši mjerenje.
2. Po završetku mjerenja, staničevinom se obriše mjerno polje.
3. Na mjerno polje pipetira se 1 µL prethodno vorteksiranog uzorka DNA te se izvrši mjerenje.
4. Mjerno polje prebriše se staničevinom.

### **3.3. Genotipizacija polimorfizama *F5 G1691A*, *F2 G20210A*, *PAI-1 5G/4G* i *MTHFR C677T* lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu uz analizu krivulje taljenja**

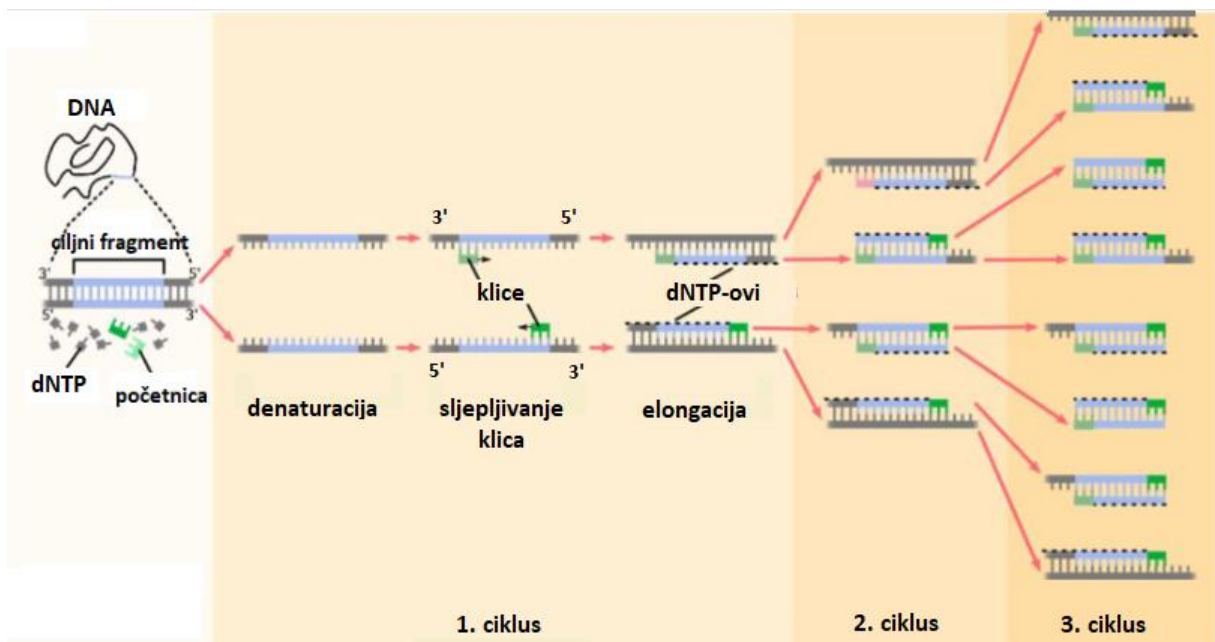
Genotipizacija polimorfizama *F5 G1691A*, *F2 G20210A*, *PAI-1 5G/4G* i *MTHFR C677T* provedena je lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR, engl. *quantitative polymerase chain reaction*) uz analizu krivulje taljenja (engl. *melting curve analysis*).

PCR se temelji na višestrukom ponavljanju ciklusa grijanja i hlađenja reakcijske smjese koji uključuju denaturaciju DNA i njenu replikaciju djelovanjem termostabilne DNA polimeraze koja se ne denaturira na visokim temperaturama potrebnima za denaturaciju DNA. U svakom se

ciklusu replicira ciljni fragment DNA, odnosno ukupni broj fragmenata DNA umnoženih PCR-om iznosi  $2^N$  gdje je  $N$  broj ciklusa. Svaki ciklus uključuje tri faze, omogućene prikladnom temperaturom i trajanjem:

1. denaturaciju kalupa dvolančane DNA zbog pucanja vodikovih veza između lanaca DNA uslijed visoke temperature;
2. sljepljivanje (hibridizaciju) klica i jednolančane DNA;
3. produljenje (elongaciju) klica (sintezu novog lanca DNA) djelovanjem DNA polimeraze kojom nastaje dvolančani DNA produkt.

DNA polimeraza ima sintetsku aktivnost u smjeru  $5' \rightarrow 3'$  te može sintetizirati lanac DNA na temelju komplementarnog lanca, ali ne može započeti sintezu *de novo*, nego nastavlja lanac koji su već započele oligonukleotidne klice (engl. *primers*) – uzvodna klica (engl. *forward primer*) i nizvodna klica (engl. *reverse primer*), koje tako omeđuju fragment DNA koji se umnožava. Cilj je umnožiti onaj dio DNA koji sadrži poziciju ispitivanog polimorfizma. Konkretno, u zasebnim lančanim reakcijama polimeraze umnoženi su fragment gena za faktor V duljine 110 pb, fragment gena za protrombin duljine 106 pb, fragment gena za PAI-1 duljine 345 pb i fragment gena za MTHFR duljine 288 pb. U sastavu reakcijske smjese nalaze se još dNTP-ovi (deoksiribonukleozid-trifosfati, engl. *deoxynucleoside triphosphates*, dNTPs) koji su gradivni elementi novosintetizirane DNA te ioni  $Mg^{2+}$  koji su kofaktor DNA polimeraze i stabilizatori dNTP-ova. Shema lančane reakcije polimeraze prikazana je na Slici 6.



Slika 6. Shema lančane reakcije polimeraze (preuzeto i prilagođeno prema Quan i sur., 2018).



Za umnažanje fragmenta DNA od interesa korištena je lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu koja koristi hibridizacijske sonde obilježene s dva fluorofora – donorskim i akceptorskim. Kada su sonde vezane za DNA od interesa (tijekom PCR-a to se događa u fazi sljepljivanja klica, kada je DNA od interesa jednolančana), donorski i akceptorski fluorofor nalaze se u neposrednoj blizini te dolazi do fluorescentnog rezonantnog prijenosa energije (FRET, engl. *fluorescence resonance energy transfer*) između dvaju fluorofora. Donorski fluorofor, pobuđen svjetlošću iz uređaja, emitira fluorescenciju koju akceptorski fluorofor apsorbira te posljedično i on emitira fluorescenciju, ali na drugoj valnoj duljini nego donorski fluorofor. Mjeri se samo fluorescencija koju emitira akceptorski fluorofor. Nužni uvjet za nastajanje fluorescencije je vezanje sonde na jednolančanu DNA jer su u suprotnom fluorofori previše udaljeni da bi došlo do FRET-a. Kako ciklusi PCR-a napreduju, u svakoj fazi sljepljivanja klica bit će sve više dostupnih jednolančanih DNA na koje se sonde mogu vezati te će dolaziti do rezonantnog prijenosa energije između sve većeg broja fluorofora, a time i do sve veće detektirane fluorescencije. Tako fluorescentno obilježene sonde omogućuju praćenje nastajanja produkata PCR-a u stvarnom vremenu.

Nakon provedene lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu, umnoženi produkti denaturirani su povišenjem temperature i nakon toga renaturirani sniženjem temperature. Denaturacijom se razdvajaju lanci umnoženih produkata, a renaturacijom dolazi do njihove hibridizacije, ali također dolazi i do hibridizacije umnoženih produkata i fluorescentno obilježenih sonde iz otopine. Budući da su se hibridizacijom sonde na DNA od interesa fluorofori našli u neposrednoj blizini, dolazi do FRET-a i detektira se fluorescencija. Za sva četiri ispitivana polimorfizma korištene sonde dizajnirane su tako da su potpuno komplementarne divljem alelu iako načelno sonde mogu biti dizajnirane tako da su potpuno komplementarne mutiranom alelu. Budući da su sve korištene sonde dizajnirane tako da su potpuno komplementarne divljem alelu, kod homozigota za divlji tip nastat će samo homodupleksi (sonde i umnoženi produkti su potpuno komplementarni), kod mutiranih homozigota će nastati samo heterodupleksi (sonde i umnoženi produkti nisu potpuno komplementarni), dok će kod heterozigota nastati homodupleksi i heterodupleksi.

Nakon umnažanja fragmenta DNA od interesa te provedene denaturacije i renaturacije kojom su nastali homodupleksi i/ili heterodupleksi, reakcijska smjesa se postupno zagrijava. Postupnim povećanjem temperature dolazi do denaturacije homodupleksa i heterodupleksa tj. odvajanja sonde od lanca umnožene DNA, nakon čega se sonde nalaze udaljene u otopini pa se fluorescencija gasi (dakle, povećanjem temperature fluorescencija se smanjuje). Homodupleksi i

heterodupleksi kod svakog ispitivanog polimorfizma pokazuju karakteristične temperature taljenja ( $T_m$ , engl. *melting temperature* – temperatura pri kojoj je denaturirano 50 % DNA), koje su veće kod homodupleksa nego kod heterodupleksa jer je teže razdvojiti lance koji su međusobno potpuno komplementarni. Krivulje taljenja prikazuju ovisnost izmjerene fluorescencije o temperaturi, a na njima prisutne točke infleksije odgovaraju temperaturama taljenja. Krivulje taljenja lakše se analiziraju kada se funkcija ovisnosti fluorescencije (F) o temperaturi (T) transformirana u funkciju ovisnosti negativne derivacije fluorescencije po temperaturi ( $-dF/dT$ ) o temperaturi (T). Time se teže uočljive točke infleksije sigmoidalnih krivulja taljenja transformiraju u lakše uočljive vrhove krivulja, gdje svaki vrh krivulje odgovara jednoj temperaturi taljenja. Ako je prisutan samo vrh krivulje na temperaturi koja odgovara temperaturi taljenja hibrida sonde i DNA koja sadrži divlji alel, ispitanik je homozigot za divlji tip. Ako je prisutan samo vrh krivulje na temperaturi koja odgovara temperaturi taljenja hibrida sonde i DNA koja sadrži mutirani alel, ispitanik je mutirani homozigot. Ako su prisutna oba vrha krivulje, ispitanik je heterozigot (prisutan je i mutirani i divlji alel).

#### **Uzorci**

- uzorci DNA izolirane iz uzoraka pune krvi uzete na antikoagulans  $K_3EDTA$ , zaprimljenih u Klinički zavod za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice;
- pozitivni kontrolni uzorci heterozigotnog genotipa i genotipizirajući standardi genotipa divljeg tipa i homozigotnog mutiranog genotipa za svaki pojedini ispitivani polimorfizam, sadržani u komercijalnim kitovima (popisani pod *Reagensi i potrošni materijali*).

#### **Laboratorijska oprema:**

- uređaj za qPCR LightCycler<sup>®</sup> 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska) s pripadajućim programom LightCycler<sup>®</sup> 480 Software, verzija 1.5.1.62 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska)
- vrtložna mješalica MS 3 Vortexer (IKA, Švicarska)
- centrifuga MEGA STAR 3.0R (VWR, Sjedinjene Američke Države)
- automatske pipeta volumena 0,5-10  $\mu L$  i 1-100  $\mu L$  (Eppendorf, Njemačka)

#### **Reagensi i potrošni materijali:**

- plastični jednokratni nastavci za pipete s filterom volumena 10  $\mu L$  i 100  $\mu L$  (Eppendorf, Njemačka)
- pločice s 96 reakcijskih jažica LightCycler<sup>®</sup> 480 Multiwell (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska)

- adhezivna folija LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska)
- LightMix in-vitro diagnostics kit Factor V (Leiden) (TIB Molbiol, Njemačka), sadrži:
  - *Parametar Specific Reagents* (PCR) – specifične klice i hibridizacijske sonde, liofilizat
  - *Positive Heterozygous Control* – pozitivni kontrolni uzorak DNA heterozigotnog genotipa (F5 1619 GA), liofilizat
  - *Genotyping Standard Wildtype* – genotipizirajući standard DNA genotipa divljeg tipa (F5 1619 GG), liofilizat
  - *Genotyping Standard Mutant* – genotipizirajući standard DNA mutiranog homozigotnog genotipa (F5 1619 AA), liofilizat
- LightMix in-vitro diagnostics kit Factor II G20210A (TIB Molbiol, Njemačka), sadrži:
  - *Parametar Specific Reagents* (PCR) – specifične klice i hibridizacijske sonde, liofilizat
  - *Positive Heterozygous Control* – pozitivni kontrolni uzorak DNA heterozigotnog genotipa (F2 20210 GA), liofilizat
  - *Genotyping Standard Wildtype* – genotipizirajući standard DNA genotipa divljeg tipa (F2 20210 GG), liofilizat
  - *Genotyping Standard Mutant* – genotipizirajući standard DNA mutiranog homozigotnog genotipa (F2 20210 AA), liofilizat
- LightMix in-vitro diagnostics kit PAI-1 (TIB Molbiol, Njemačka), sadrži:
  - *Parametar Specific Reagents* (PCR) – specifične klice i hibridizacijske sonde, liofilizat
  - *Positive Heterozygous Control* – kontrolni uzorak DNA heterozigotnog genotipa (PAI-1 5G/4G), liofilizat
  - *Genotyping Standard Wildtype* – genotipizirajući standard DNA genotipa divljeg tipa (PAI-1 5G/5G), liofilizat
  - *Genotyping Standard Mutant* – genotipizirajući standard DNA mutiranog homozigotnog genotipa (PAI-1 4G/4G), liofilizat
- Light Mix in-vitro diagnostics kit MTHFR C677T (TIB Molbiol, Njemačka), sadrži:
  - *Parametar Specific Reagents* (PCR) – specifične klice i hibridizacijske sonde, liofilizat
  - *Positive Heterozygous Control* – pozitivni kontrolni uzorak DNA heterozigotnog genotipa (MTHFR 677 CT), liofilizat

- *Genotyping Standard Wildtype* – genotipizirajući standard DNA genotipa divljeg tipa (MTHFR 677 CC), liofilizat
- *Genotyping Standard Mutant* – genotipizirajući standard DNA mutiranog homozigotnog genotipa (MTHFR 677 TT), liofilizat.
- LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska), sadrži:
  - LightCycler® FastStart Enzyme (oznaka: 1a) – Taq polimeraza
  - LightCycler® FastStart Reaction Mix HybProbe (oznaka: 1b), 10x konc. – reakcijski pufer Tris-HCl, smjesa dNTP-ova (s dUTP umjesto dTTP), 10 mM MgCl<sub>2</sub>
  - *stock* otopina MgCl<sub>2</sub>, 25 mM
  - voda za PCR

#### **Postupak:**

- **Priprema otopine specifičnih klica i hibridizacijskih sondi** (jednaka je za sva četiri ispitivana polimorfizma, uz korištenje posebnog reagensa za svaki ispitivani polimorfizam):
  1. Bočicu s liofiliziranom smjesom specifičnih klica i hibridizacijskih sondi centrifugirati 1 min na 10 000 o/min.
  2. Provjeriti nalazi li se na dnu bočice zeleno-plavkasti talog.
  3. Otopiti talog u 66 µL vode za PCR i lagano promiješati pipetom sa sterilnim nastavkom 10 puta.
  4. Inkubirati otopinu na sobnoj temperaturi 20 s.
  5. Promiješati na vrtložnoj miješalici 10 s.
  6. Kratko centrifugirati da se sa stijenki bočice spuste zaostale kapi reagensa.
- **Priprema otopina pozitivnih kontrolnih uzoraka/genotipizirajućih standarda** (jednaka je za sva četiri ispitivana polimorfizma, uz korištenje posebnih pozitivnih kontrolnih uzoraka i genotipizirajućih standarda za svaki ispitivani polimorfizam):
  1. Bočicu s liofiliziranim pozitivnim kontrolnim uzorkom/genotipizirajućim standardom centrifugirati 1 min na 10 000 o/min.
  2. Provjeriti nalazi li se na dnu bočice plavkasti talog.
  3. Otopiti talog u 80 µL vode za PCR i lagano promiješati pipetom sa sterilnim nastavkom 10 puta.
  4. Inkubirati otopinu na sobnoj temperaturi 20 s.
  5. Promiješati na vrtložnoj miješalici 10 s.

6. Kratko centrifugirati da se sa stijenki bočice spuste zaostale kapi pozitivnih kontrolnih uzoraka/genotipizirajućih standarda.
- **Priprema otopine LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe:**
    1. Bočicu 1a držati u ledenici na -15°C do -25°C sve do kratkog centrifugiranja (točka 3).
    2. Odmrznuti bočicu 1b; ukoliko se tijekom pohrane u bočici stvorio vidljivi reverzibilni precipitat, inkubirati otopinu 1b na +37°C i lagano povremeno promiješati u bočici okretanjem sve dok se potpuno ne otopi precipitat.
    3. Kratko centrifugirati bočicu 1a i bočicu 1b (kako bi se sa stijenki spustile zaostale kapi) te ih potom staviti na led.
    4. 45 µL otopine 1b ispipetirati u otopinu 1a.
    5. Otopina lagano izmiješati pipetom.
  - **Priprema reakcijske smjese za qPCR** (naveden je postupak za jednu reakcijsku smjesu, tj. za genotipizaciju jednog uzorka DNA/pozitivnog kontrolnog uzorka/genotipizirajućeg standarda; postupak je jednak za sva četiri ispitivana polimorfizam, uz korištenje posebne pripremljene otopine specifičnih klica i hibridizacijskih sonda za svaki ispitivani polimorfizam):

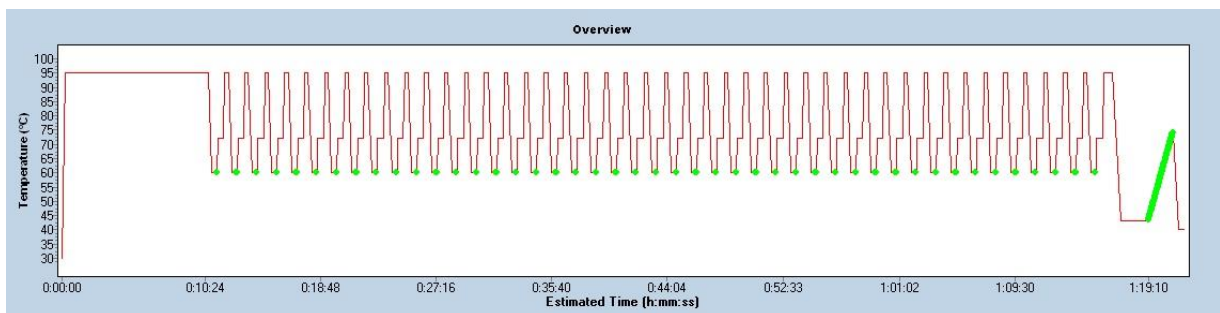
U reakcijsku jažicu na ploči se ispipetira redom:

    1. 5.2 µL vode za PCR;
    2. 0.8 µL otopine MgCl<sub>2</sub>, 25 mM;
    3. 1.0 µL pripremljene otopine specifičnih klica i hibridizacijskih sonda;
    4. 1.0 µL pripremljene otopine LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe;
    5. 2.0 µL otopine izolirane DNA ili pripremljene otopine pozitivnog kontrolnog uzorka/genotipizirajućeg standarda za ispitivani polimorfizam.

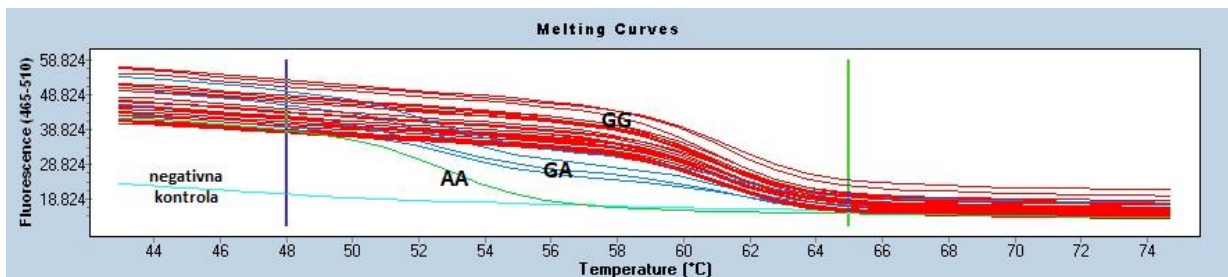
U svakoj seriji uzoraka nužno je korištena negativna kontrola (voda za PCR) i pozitivni kontrolni uzorak heterozigotnog genotipa za ispitivani polimorfizam. Reakcijska smjesa za negativnu kontrolu priređuje se na isti način kao za uzorke, samo što se umjesto 2.0 µL izolirane u jažicu pipetira 2.0 µL vode za PCR. Nakon pipetiranja reakcijskih smjesa u jažice na ploči, ploča je prekrivena adhezivnom folijom i 1 minutu centrifugirana na 700 g na temperaturi od kako bi se sav sadržaj reakcijske smjese spustio na dno jažice. Ako u negativnoj kontroli dođe do umnažanja PCR produkata, rezultati cijelog *run*-a se odbacuju i postupak se mora ponoviti.

- **Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu uz analizu krivulje taljenja**

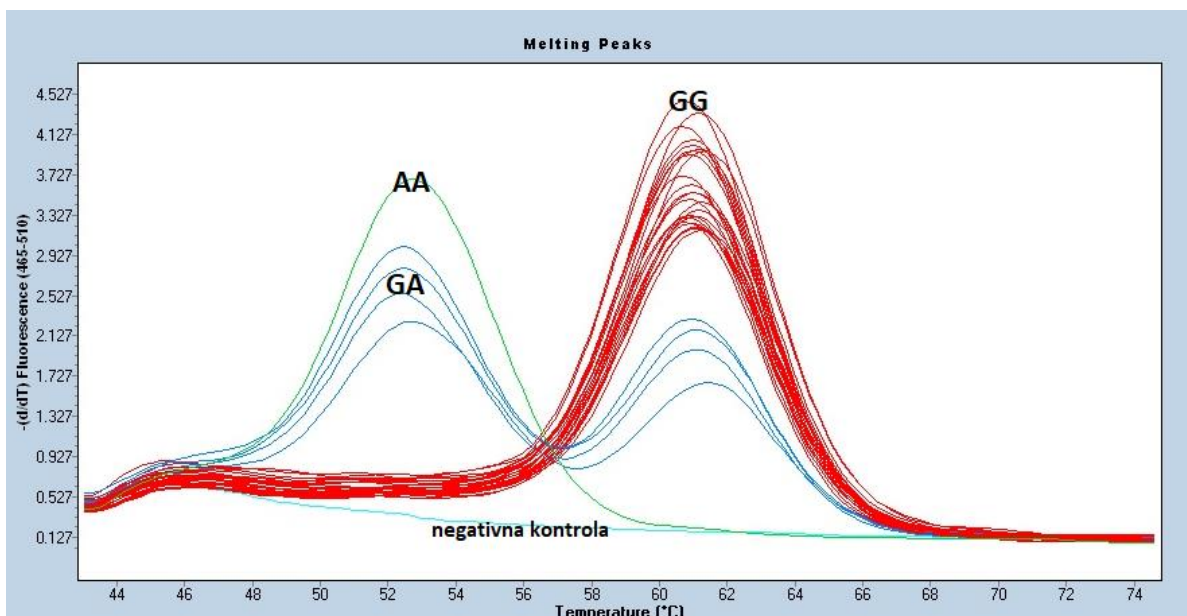
PCR je proveden na analitičkom sustavu LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska) uz korištenje pripadajućeg programa. Uvjeti PCR-a (Slika 7) za ispitivanje sva četiri polimorfizma bili su sljedeći: početna denaturacija na 95°C tijekom 10 min; 45 ciklusa umnažanja koji su se sastojali od denaturacije DNA na 95°C tijekom 5 s, sljepljivanja klica na 60°C tijekom 10 s i produljenja klica na 72°C tijekom 15 s. Fluorescencija u svrhu praćenja količine nastalog produkta mjerena je tijekom faze sljepljivanja klica. Nakon 45 ciklusa umnažanja, provedena je denaturacija umnožene DNA na 95°C tijekom 30 s, a zatim renaturacija DNA na 43°C tijekom 2 min kada je došlo do hibridizacije fluorescentno obilježenih sonda i umnožene DNA. Nakon toga je provedeno postupno zagrijavanje do 75°C uz kontinuirano mjerenje fluorescencije. Pritom je, ovisno o prisutnom genotipu, došlo do denaturacije DNA pri točno određenim temperaturama taljenja. Nakon taljenja DNA uređaj je ohlađen na 40°C tijekom 30 s. Fluorescencija je mjerena na valnim duljima od 465 do 510 nm. Dobivene krivulje taljenja (Slika 8) transformirane su u krivulje ovisnosti negativne derivacije fluorescencije po temperaturi (-dF/dT) o temperaturi (T) (Slika 9, Slika 10) radi lakšeg očitavanja krivulja i određivanja genotipa.



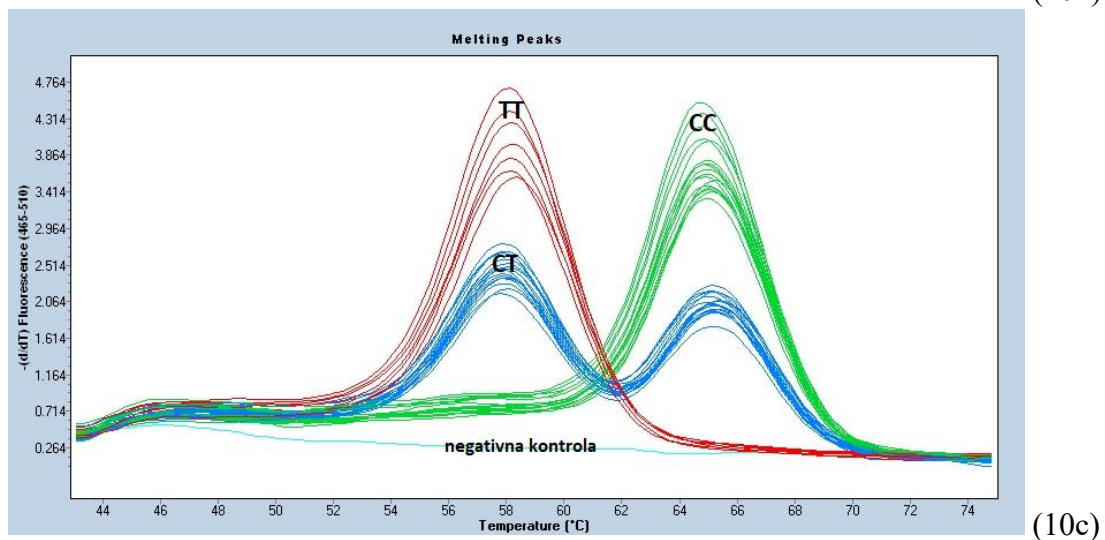
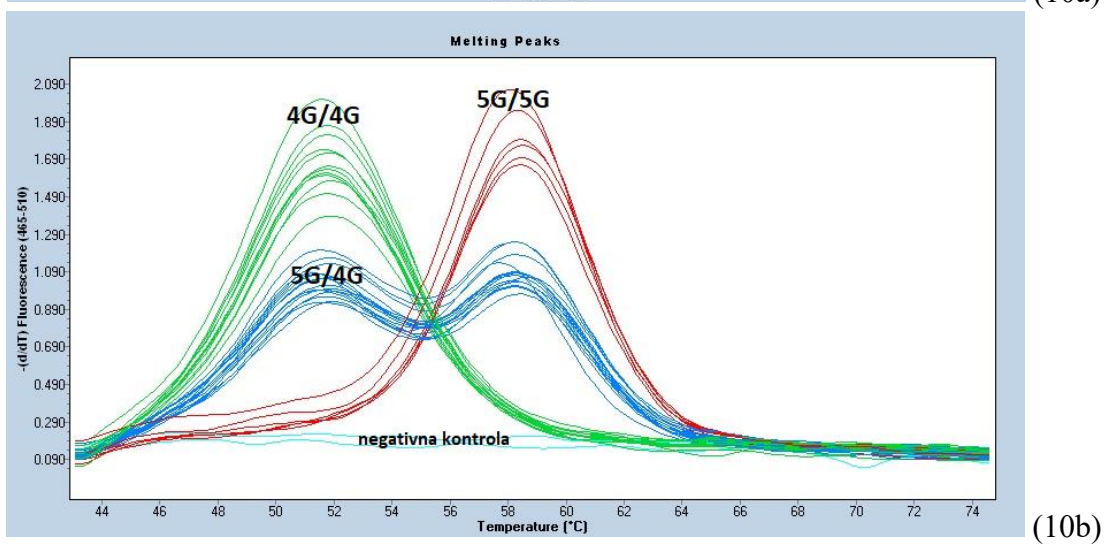
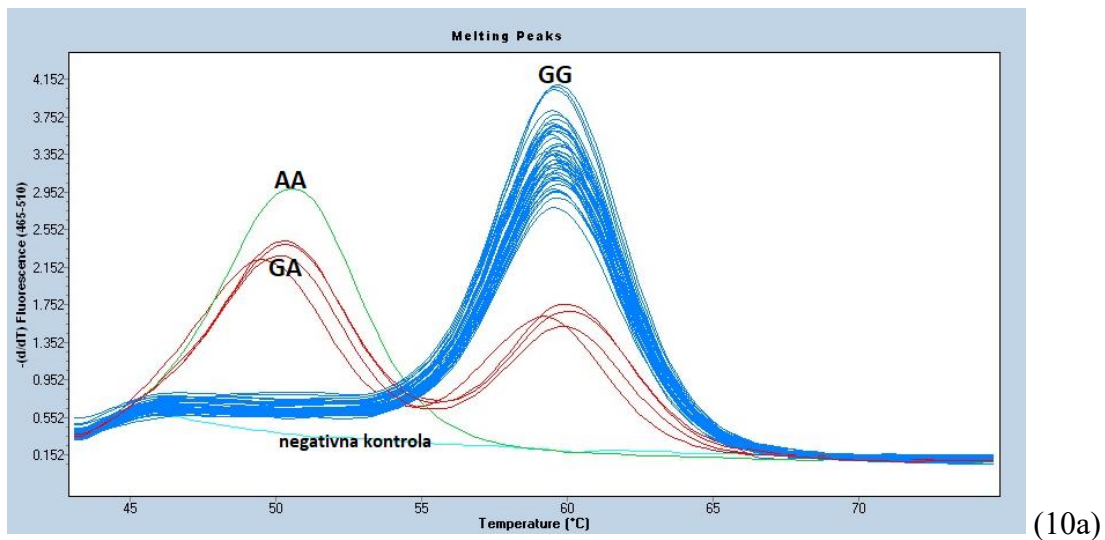
Slika 7. Shema uvjeta temperature (os ordinata) i trajanja (os apscisa) pojedinih faza qPCR-a i taljenja DNA. Zeleno označene točke označavaju trenutke mjerenja fluorescencije. Tijekom ciklusa umnažanja ciljnog fragmenta DNA fluorescencija se mjeri samo jednom u svakoj fazi sljepljivanja klica, a tijekom taljenja DNA fluorescencija se mjeri kontinuirano.



Slika 8. Krivulje taljenja (ovisnost  $F$  o  $T$ ) dobivene tijekom genotipizacije *F5 G1619A*. Svaka krivulja predstavlja krivulju taljenja za jedan ispitivani uzorak. Temperature pridružene točkama infleksije odgovaraju temperaturama taljenja hibrida umnožene DNA i fluorescentno obilježenih sondi, a karakteristične su za svaki pojedini genotip (GG, GA, AA). Temperature taljenja je teško precizno očitati jer su točke infleksije teško uočljive pa se ovako dobivena krivulja transformira u krivulju prikazanu na Slici 11. Negativna kontrola (voda) ne smije pokazivati sigmoidalnu krivulju.  $F$  – izmjerena fluorescencija;  $T$  – temperatura.



Slika 9. Krivulje taljenja (ovisnost  $-dF/dT$  o  $T$ ) dobivene tijekom genotipizacije *F5 G1619A*. Svaka krivulja odgovara krivulji taljenja za jedan ispitivani uzorak. Temperature koje odgovaraju vrhovima krivulja na grafu označavaju temperature taljenja hibrida umnožene DNA i fluorescentno obilježenih sondi, a karakteristične su za svaki pojedini genotip (GG, GA, AA). Negativna kontrola (voda) ne smije pokazivati vrh krivulje. Shema očitavanja genotipa prikazana je u Tablici 9.  $-dF/dT$  – derivacija fluorescencije po temperaturi;  $T$  – temperatura.



Slika 10. Krivulje taljenja (ovisnost  $-dF/dT$  o  $T$ ) dobivene tijekom genotipizacije (10a) *F2* G20210A; (10b) *PAI-1* 5G/4G; (10c) *MTHFR* C677T. Krivuljama su pridruženi odgovarajući genotipovi: (10a) GG, GA, AA; (10b) 5G/5G, 5G/4G, 4G/4G; (10c) CC, CT, TT. Negativna kontrola (voda) ne smije pokazivati vrh krivulje. Shema očitavanja genotipa prikazana je u Tablici 9.  $-dF/dT$  – derivacija fluorescencije po temperaturi;  $T$  – temperatura.



Tablica 9. Sheme očitavanja genotipa prema krivuljama taljenja. T<sub>m</sub> – temperatura taljenja; mut/mut – mutirani homozigot; wt/mut – heterozigot; wt/wt – divlji tip.

<b>F5 G1619A</b>			
<b>genotip</b>	<b>AA (mut/mut)</b>	<b>GA (wt/mut)</b>	<b>GG (wt/wt)</b>
<b>broj vrhova</b>	1	2	1
<b>T<sub>m</sub> / °C</b>	51-53	51-53 i 59-61	59-61
<b>F2 G20210A</b>			
<b>genotip</b>	<b>AA (mut/mut)</b>	<b>GA (wt/mut)</b>	<b>GG (wt/wt)</b>
<b>broj vrhova</b>	1	2	1
<b>T<sub>m</sub> / °C</b>	50-53	50-53 i 60-63	60-63
<b>PAI-1 5G/4G</b>			
<b>genotip</b>	<b>4G/4G (mut/mut)</b>	<b>5G/4G (wt/mut)</b>	<b>5G/5G (wt/wt)</b>
<b>broj vrhova</b>	1	2	1
<b>T<sub>m</sub> / °C</b>	52-55	52-55 i 59-62	59-62
<b>MTHFR C677T</b>			
<b>genotip</b>	<b>TT (mut/mut)</b>	<b>CT (wt/mut)</b>	<b>CC (wt/wt)</b>
<b>broj vrhova</b>	1	2	1
<b>T<sub>m</sub> / °C</b>	58-61	58-61 i 65-68	65-68

### 3.4. Validacija metoda genotipizacije polimorfizama *F5 G1691A*, *F2 G20210A*, *PAI-1 5G/4G* i *MTHFR C677T*

#### 3.4.1. Ispitivanje analitičke nepreciznosti

Za svaki od četiri ispitivana polimorfizma, analitička nepreciznost ispitana je na dva uzorka DNA s poznatim ciljnim vrijednostima divljeg tipa i heterozigota, uz 5 ponavljanja svakog uzorka tijekom 5 radnih dana. Pritom su ispitivani uzorci zauzimali nasumične položaje na ploči s 96 reakcijskih jažica. Analitička nepreciznost izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$\text{Analitička nepreciznost} = 100 \% - \% \text{ podudarnosti s ciljnim vrijednostima}$$

#### Uzorci:

- komercijalni kontrolni uzorci/genotipizirajući standardi s poznatim ciljnim vrijednostima divljeg tipa i heterozigota, navedeni pod točkom 3.3.

#### Korišteni materijali i uređaji:

- navedeni pod točkama 3.2. i 3.3.

#### Postupak:

- opisan pod točkama 3.2. i 3.3.

### 3.4.2. Ispitivanje analitičke točnosti

Analitička osjetljivost ispitana je u 5 neovisnih *run*-ova tijekom 5 radnih dana genotipizacijom 5 uzoraka s poznatom pozitivnom ciljnom vrijednosti mutiranog homozigota. Analitička specifičnost ispitana je u 5 neovisnih *run*-ova tijekom 5 radnih dana genotipizacijom 5 uzoraka s poznatom negativnom ciljnom vrijednosti.

Analitička osjetljivost, specifičnost i točnost izračunati su prema sljedećim izrazima:

$$\text{analitička osjetljivost ( \% )} = \frac{SP}{SP+LN} \times 100;$$

$$\text{analitička specifičnost ( \% )} = \frac{SN}{SN+LP} \times 100;$$

$$\text{analitička točnost ( \% )} = \frac{SP+SN}{SP+SN+LP+LN} \times 100;$$

gdje je SP – broj stvarno pozitivnih uzoraka; LP – broj stvarno negativnih uzoraka; LP – broj lažno pozitivnih uzoraka; LN – broj lažno negativnih uzoraka.

#### Uzorci:

- uzorci s pozitivnom ciljnom vrijednosti mutiranog homozigota – komercijalni genotipizirajući standardi, navedeno pod točkom 3.3.
- uzorci s negativnom ciljnom vrijednosti – voda za PCR, navedeno pod točkom 3.3.

#### Korišteni materijali i uređaji:

- navedeno pod točkama 3.2. i 3.3.

#### Postupak:

- naveden pod točkama 3.2. i 3.3.

### 3.4.3. Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom

Ponovljivost drugom metodom ispitana je metodom qPCR-a uz analizu krivulje taljenja na analitičkom sustavu LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska) u seriji od 10 uzoraka različitih genotipova ranije određenih na analitičkom sustavu LightCycler® 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska). Ponovljivost drugom metodom izražena je kao postotak podudarnosti rezultata dobivenih na različitim analitičkim sustavima.

#### Uzorci:

- uzorci DNA izolirane iz uzoraka pune krvi uzete na antikoagulans K<sub>3</sub>EDTA, zaprimljenih u Klinički zavod za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice

- uzorci DNA iz programa vanjske procjene kvalitete RfB (Referenzinstitut für Bioanalytik, Njemačka)

**Korišteni materijali i uređaji:**

- navedeni pod točkama 3.2. i 3.3.

**Postupak:**

- opisan pod točkama 3.2 i 3.3.

**3.4.4. Ispitivanje granice detekcije**

Ispitana je uspješnost PCR-a u seriji razrjeđenja uzorka DNA kako bi se utvrdila minimalna količina DNA potrebna za uspješnu reakciju.

**Uzorci**

- uzorci DNA izolirane iz uzoraka pune krvi uzete na antikoagulans K<sub>3</sub>EDTA, zaprimljenih u Klinički zavod za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice; korišteni su uzorci poznatog heterozigotnog genotipa za ispitivani polimorfizam

**Korišteni materijali i uređaji:**

- automatska pipeta volumena 1000 µL (Eppendorf, Njemačka)
- plastični jednokratni nastavci za pipete s filterom volumena 1000 µL (Eppendorf, Njemačka)
- plastične jednokratne sterilne epruvete volumena 1,5 mL (Eppendorf, Njemačka)
- ostali korišteni materijali i uređaji navedeni su pod točkama 3.2. i 3.3.

**Postupak:**

U uzorku DNA određena je koncentracija DNA (opisano pod točkom 3.2.). Razrjeđenja uzorka izolirane DNA heterozigota za ispitivani polimorfizam izrađena su u jednokratnim plastičnim epruvetama volumena 1,5 mL u odgovarajućim volumenima vode za PCR kao što je opisano u Tablici 13. Iz svakog razrjeđenja uzet je alikvot od 2 µL te je on korišten kao uzorak u daljnjem postupku genotipizacije (opisano pod točkom 3.3.).

Ukoliko je došlo do uspješnog PCR-a te je bilo moguće iz dobivene krivulje taljenja odrediti genotip, reakcija se smatra uspješnom, a u suprotnom se reakcija smatra neuspješnom. Granicom detekcije smatra se najmanja količina DNA (ng) kod koje je došlo do uspješne reakcije.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Ispitivanje analitičke nepreciznosti

Tablica 10. Ispitivanje analitičke nepreciznosti za metode genotipizacije polimorfizama *F5 G1619A*, *F2 G20210A*, *PAI-1 5G/4G* i *MTHFR C677T* na analitičkom sustavu LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska).

<b>Ispitivani polimorfizam: <i>F5 G1619A</i></b>			
Ponavljjanje	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Podudarnost
1	GG	GG	DA
	GA	GA	DA
2	GG	GG	DA
	GA	GA	DA
3	GG	GG	DA
	GA	GA	DA
4	GG	GG	DA
	GA	GA	DA
5	GG	GG	DA
	GA	GA	DA
Podudarnost: 10/10 (100 %)			
Analitička nepreciznost: 0 %			
<b>Ispitivani polimorfizam: <i>F2 G20210A</i></b>			
Ponavljjanje	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Podudarnost
1	GG	GG	DA
	GA	GA	DA
2	GG	GG	DA
	GA	GA	DA
3	GG	GG	DA
	GA	GA	DA
4	GG	GG	DA
	GA	GA	DA
5	GG	GG	DA
	GA	GA	DA
Podudarnost: 10/10 (100 %)			
Analitička nepreciznost: 0 %			
<b>Ispitivani polimorfizam: <i>PAI-1 5G/4G</i></b>			

Ponavljanje	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Podudarnost
1	5G/5G	5G/5G	DA
	5G/4G	5G/4G	DA
2	5G/5G	5G/5G	DA
	5G/4G	5G/4G	DA
3	5G/5G	5G/5G	DA
	5G/4G	5G/4G	DA
4	5G/5G	5G/5G	DA
	5G/4G	5G/4G	DA
5	5G/5G	5G/5G	DA
	5G/4G	5G/4G	DA
Podudarnost: 10/10 (100 %)			
Analitička nepreciznost: 0 %			
<b>Ispitivani polimorfizam: <i>MTHFR C677T</i></b>			
Ponavljanje	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Podudarnost
1	CC	CC	DA
	CT	CT	DA
2	CC	CC	DA
	CT	CT	DA
3	CC	CC	DA
	CT	CT	DA
4	CC	CC	DA
	CT	CT	DA
5	CC	CC	DA
	CT	CT	DA
Podudarnost: 10/10 (100 %)			
Analitička nepreciznost: 0 %			

Unaprijed definirani kriterij prihvaćanja za analitičku nepreciznost iznosi 0%. Kriterij je zadovoljen za sve četiri ispitane metode genotipizacije polimorfizama na analitičkom sustavu LightCycler® 480. Stoga se može zaključiti da sve četiri ispitane metode imaju zadovoljavajuću bliskost slaganja između rezultata nezavisnih analiza provedenih u propisanim uvjetima.

## 4.2. Ispitivanje analitičke točnosti

Tablica 11. Ispitivanje analitičke osjetljivosti, preciznosti i točnosti za metode genotipizacije polimorfizama *F5 G1619A*, *F2 G20210A*, *PAI-1 5G/4G* i *MTHFR C677T* na analitičkom sustavu LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska). MT Standard – genotipizirajući standard DNA mutiranog homozigotnog genotipa; H<sub>2</sub>O – voda za PCR; neg – negativna vrijednost (nije došlo do umnažanja produkta PCR-a)

<b>Ispitivani polimorfizam: <i>F5 G1619A</i></b>				
Uzorak	Analitička osjetljivost		Analitička specifičnost	
	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost
MT Standard	AA	AA	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
MT Standard	AA	AA	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
MT Standard	AA	AA	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
MT Standard	AA	AA	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
MT Standard	AA	AA	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
Stvarno pozitivni (SP)		5		
Lažno pozitivni (LP)		0		
Stvarno negativni (SN)		5		
Lažno negativni (LN)		0		
Analitička osjetljivost		100 %		
Analitička specifičnost		100 %		
Analitička točnost		100 %		
<b>Ispitivani polimorfizam: <i>F2 G20210A</i></b>				
Uzorak	Analitička osjetljivost		Analitička specifičnost	
	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost
MT Standard	AA	AA	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
MT Standard	AA	AA	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
MT Standard	AA	AA	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg

MT Standard	AA	AA	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
MT Standard	AA	AA	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
Stvarno pozitivni (SP)		5		
Lažno pozitivni (LP)		0		
Stvarno negativni (SN)		5		
Lažno negativni (LN)		0		
Analitička osjetljivost		100 %		
Analitička specifičnost		100 %		
Analitička točnost		100 %		
<b>Ispitivani polimorfizam: PAI-1 5G/4G</b>				
Uzorak	Analitička osjetljivost		Analitička specifičnost	
	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost
MT Standard	4G/4G	4G/4G	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
MT Standard	4G/4G	4G/4G	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
MT Standard	4G/4G	4G/4G	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
MT Standard	4G/4G	4G/4G	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
MT Standard	4G/4G	4G/4G	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
Stvarno pozitivni (SP)		5		
Lažno pozitivni (LP)		0		
Stvarno negativni (SN)		5		
Lažno negativni (LN)		0		
Analitička osjetljivost		100 %		
Analitička specifičnost		100 %		
Analitička točnost		100 %		
<b>Ispitivani polimorfizam: MTHFR C677T</b>				
Uzorak	Analitička osjetljivost		Analitička specifičnost	
	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost

MT Standard	TT	TT	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
MT Standard	TT	TT	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
MT Standard	TT	TT	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
MT Standard	TT	TT	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
MT Standard	TT	TT	/	/
H <sub>2</sub> O	/	/	neg	neg
Stvarno pozitivni (SP)		5		
Lažno pozitivni (LP)		0		
Stvarno negativni (SN)		5		
Lažno negativni (LN)		0		
Analitička osjetljivost		100 %		
Analitička specifičnost		100 %		
Analitička točnost		100 %		

Unaprijed definirani kriterij prihvaćanja za analitičku osjetljivost iznosi 100%. Kriterij je zadovoljen za sve četiri ispitane metode genotipizacije polimorfizama na analitičkom sustavu LightCycler® 480. Stoga se može zaključiti da sve četiri ispitane metode imaju zadovoljavajuću sposobnost detektiranja pojedinih polimorfizama kada su ti polimorfizmi stvarno prisutni.

Unaprijed definirani kriterij prihvaćanja za analitičku specifičnost iznosi 100%. Kriterij je zadovoljen za sve četiri ispitane metode genotipizacije polimorfizama na analitičkom sustavu LightCycler® 480. Može se zaključiti da sve četiri ispitane metode imaju zadovoljavajuću sposobnost pokazivanja negativnog rezultata kada u uzorku nema prisutnog pojedinog polimorfizma.

Unaprijed definirani kriterij prihvaćanja za analitičku točnost iznosi 100%. Kriterij je zadovoljen za sve četiri ispitane metode genotipizacije polimorfizama na analitičkom sustavu LightCycler® 480, te sve četiri ispitane metode na zadovoljavajući način klasificiraju pozitivne i negativne rezultate.



### 4.3. Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom

Tablica 12. Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom za genotipizaciju polimorfizama *F5* G1619A, *F2* G20210A, *PAI-1* 5G/4G i *MTHFR* C677T. # – redni broj uzorka; LC 1.5 – LightCycler® 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska); LC 480 – LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska).

<b>Ispitivani polimorfizam: <i>F5</i> G1619A</b>			
#	Genotip određen na LC 1.5	Genotip određen na LC 480	Podudarnost
1	GG	GG	DA
2	GA	GA	DA
3	GG	GG	DA
4	GA	GA	DA
5	AA	AA	DA
6	AA	AA	DA
7	GG	GG	DA
8	GA	GA	DA
9	AA	AA	DA
10	GA	GA	DA
Podudarnost rezultata dobivenih na LC 1.5 i LC 480 = 10/10 (100 %)			
<b>Ispitivani polimorfizam: <i>F2</i> G20210A</b>			
#	Genotip određen na LC 1.5	Genotip određen na LC 480	Podudarnost
1	GG	GG	DA
2	GG	GG	DA
3	GG	GG	DA
4	AA	AA	DA
5	GA	GA	DA
6	GA	GA	DA
7	GA	GA	DA
8	GA	GA	DA
9	AA	AA	DA
10	AA	AA	DA
Podudarnost rezultata dobivenih na LC 1.5 i LC 480 = 10/10 (100 %)			
<b>Ispitivani polimorfizam: <i>PAI-1</i> 5G/4G</b>			
#	Genotip određen na LC 1.5	Genotip određen na LC 480	Podudarnost
1	4G/4G	4G/4G	DA
2	5G/4G	5G/4G	DA

3	4G/4G	4G/4G	DA
4	5G/5G	5G/5G	DA
5	4G/4G	4G/4G	DA
6	5G/4G	5G/4G	DA
7	5G/4G	5G/4G	DA
8	4G/4G	4G/4G	DA
9	5G/5G	5G/5G	DA
10	5G/4G	5G/4G	DA
Podudarnost rezultata dobivenih na LC 1.5 i LC 480 = 10/10 (100 %)			
<b>Ispitivani polimorfizam: <i>MTHFR</i> C677T</b>			
#	Genotip određen na LC 1.5	Genotip određen na LC 480	Podudarnost
1	CT	CT	DA
2	CC	CC	DA
3	CT	CT	DA
4	CC	CC	DA
5	TT	TT	DA
6	CC	CC	DA
7	TT	TT	DA
8	TT	TT	DA
9	CC	CC	DA
10	CT	CT	DA
Podudarnost rezultata dobivenih na LC 1.5 i LC 480 = 10/10 (100 %)			

Unaprijed definirani kriterij prihvaćanja za ponovljivost drugom metodom iznosi 100%. Kriterij je zadovoljen za sve četiri ispitane metode genotipizacije polimorfizama na analitičkom sustavu LightCycler® 480. Može se zaključiti da su na analitičkim sustavima LightCycler® 480 i LightCycler® 1.5 sve četiri ispitivane metode međusobno usporedive (daju istovjetne rezultate).

#### 4.4. Ispitivanje granice detekcije

Tablica 13. Ispitivanje granica detekcije za genotipizaciju polimorfizama *F5* G1619A, *F2* G20210A, *PAI-1* 5G/4G i *MTHFR* C677T na analitičkom sustavu LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska).

<b>Ispitivani polimorfizam: <i>F5</i> G1619A</b>
--

Genotip uzorka DNA: GA				
Koncentracija DNA u uzorku izolirane DNA: 35 ng/ $\mu$ L				
V (DNA) / $\mu$ L	V (H <sub>2</sub> O) / $\mu$ L	Razrjeđenje	Količina DNA u alikvotu od 2 $\mu$ L	Uspješna reakcija
2	2	1:2	35 ng	DA
2	6	1:4	17.5 ng	DA
2	14	1:8	8.8 ng	DA
2	30	1:16	4.4 ng	DA
2	62	1:32	2.2 ng	DA
2	126	1:64	1.1 ng	DA
2	254	1:128	0.6 ng	DA
Granica detekcije: 0.6 ng DNA				
<b>Ispitivani polimorfizam: F2 G20210A</b>				
Genotip uzorka DNA: GA				
Koncentracija DNA u uzorku izolirane DNA: 41 ng/ $\mu$ L				
V (DNA) / $\mu$ L	V (H <sub>2</sub> O) / $\mu$ L	Razrjeđenje	Količina DNA u alikvotu od 2 $\mu$ L	Uspješna reakcija
2	2	1:2	41.0 ng	DA
2	6	1:4	20.5 ng	DA
2	14	1:8	10.3 ng	DA
2	30	1:16	5.1 ng	DA
2	62	1:32	2.6 ng	DA
2	126	1:64	1.3 ng	DA
2	254	1:128	0.7 ng	NE
Granica detekcije: 1.3 ng DNA				
<b>Ispitivani polimorfizam: PAI-1 5G/4G</b>				
Genotip uzorka DNA: 5g/4g				
Koncentracija DNA u uzorku izolirane DNA: 42 ng/ $\mu$ L				
V (DNA) / $\mu$ L	V (H <sub>2</sub> O) / $\mu$ L	Razrjeđenje	Količina DNA u alikvotu od 2 $\mu$ L	Uspješna reakcija
2	2	1:2	42 ng	DA
2	6	1:4	21 ng	DA
2	14	1:8	10.5 ng	DA
2	30	1:16	5.2 ng	DA
2	62	1:32	2.6 ng	DA
2	126	1:64	1.3 ng	DA

Granica detekcije: 1.3 ng DNA				
<b>Ispitivani polimorfizam: <i>MTHFR</i> C677T</b>				
Genotip uzorka DNA: CT				
Koncentracija DNA u uzorku izolirane DNA: 33.3 ng/uL				
V (DNA) / uL	V (H <sub>2</sub> O) / uL	Razrjeđenje	Količina DNA u aliquotu od 2 uL	Uspješna reakcija
2	2	1:2	33.3 ng	DA
2	6	1:4	16.7 ng	DA
2	14	1:8	8.4 ng	DA
2	30	1:16	4.2 ng	DA
2	62	1:32	2.1 ng	DA
2	126	1:64	1.0 ng	DA
Granica detekcije: 1.0 ng DNA				

Prema deklaraciji proizvođača granice detekcije za sve četiri ispitane metode genotipizacije polimorfizama na analitičkom sustavu LightCycler® 480 iznose 1.5 ng DNA. Ispitane granice detekcije za metode genotipizacije polimorfizama *F5* G1619A, *F2* G20210A, *PAI-1* 5G/4G i *MTHFR* C677T iznose redom: 0.6 ng DNA, 1.3 ng DNA, 1.3 ng DNA i 1.0 ng DNA. Sve ispitane granice detekcije manjih su vrijednosti od deklariranih te je time potvrđena deklaracija proizvođača.

Etiologija venskog tromboembolizma uključuje brojne stečene i nasljedne rizične čimbenike. S obzirom na promjene analitičkog sustava za genotipizaciju navedenih polimorfizama uveden je LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska). Cilj ovog rada bio je validirati analitičke karakteristike mjernih postupaka genotipizacije *F5* G1619A, *F2* G20210A, *PAI-1* 5G/4G i *MTHFR* C677T metodom lančane reakcije polimeraze uz analizu krivulje taljenja na sustavu LightCycler® 480 prije korištenja u rutinskom radu. Ispitani su parametri; analitička nepreciznost, analitička osjetljivost, analitička specifičnost, analitička točnost, usporedivost drugom metodom i granica detekcije koji su u potpunosti zadovoljili unaprijed definirane analitičke kriterije kvalitete i stoga se ispitani mjerni postupci mogu prihvatiti za rutinski rad.

## 5. ZAKLJUČCI

Rezultati validacije mjernih postupaka genotipizacije polimorfizama *F5* G1619A (rs6025), *F2* G20210A (rs1799963), *PAI-1* 5G/4G (rs1799768) i *MTHFR* C677T (rs1801133) na analitičkom sustavu LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska) u potpunosti su zadovoljili unaprijed definirane analitičke kriterije kvalitete i stoga se ispitani mjerni postupci mogu prihvatiti za rutinski rad.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

A230	apsorbancija na valnoj duljini od 230 nm
A260	apsorbancija na valnoj duljini od 260 nm
A280	apsorbancija na valnoj duljini od 280 nm
APC	aktivirani protein C
APCR	rezistencija na aktivirani protein C (engl. <i>activated protein C resistance</i> )
APTV	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
CBS	cistation- $\beta$ -sintaza (engl. <i>cystathionine beta-synthase</i> )
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i> )
CT	kompjutorska tomografija (engl. <i>Computed Tomography</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	deoksiribonukleozid-trifosfat (engl. <i>deoxynucleoside triphosphate</i> )
DVT	duboka venska tromboza
EPCR	endotelni receptor proteina C (engl. <i>endothelial protein C receptor</i> )
FRET	fluorescentni rezonantni prijenos energije (engl. <i>fluorescence resonance energy transfer</i> )
FV	faktor zgrušavanja V
FVa	aktivirani faktor zgrušavanja V
FVIIa	aktivirani faktor zgrušavanja VII
FVIIIa	aktivirani faktor zgrušavanja VIII
FVL	faktor V Leiden
FXa	aktivirani faktor zgrušavanja X
FXIa	aktivirani faktor zgrušavanja XI
FXIIa	aktivirani faktor zgrušavanja XII
INR	internacionalni normalizirajući omjer (engl. <i>International Normalized Ratio</i> )
LN	lažno negativan
LP	lažno pozitivan
MR	magnetska rezonancija
MS	metionin sintaza (engl. <i>methionine synthase</i> )
MSCT	višeslojna kompjutorizirana tomografija (engl. <i>Multislice Computed Tomography</i> )

MSR	metionin sintaza reduktaza (engl. <i>methionine synthase reductase</i> )
MTHFR	metilentetrahidrofolat reduktaza (engl. <i>methylenetetrahydrofolate reductase</i> )
OR	omjer izgleda (engl. <i>odds ratio</i> )
PAI-1	inhibitor aktivatora plazminogena-1 (engl. <i>plasminogen activator inhibitor-1</i> )
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	plućna embolija
qPCR	lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
SN	stvarno negativan
SP	stvarno pozitivan
TF	tkivni faktor
TFPI	inhibitor puta tkivnog faktora (engl. <i>tissue factor pathway inhibitor</i> )
Tm	temperatura taljenja (engl. <i>melting temperature</i> )
TM	trombomodulin
tPA	tkivni aktivator plazminogena (engl. <i>tissue plasminogen activator</i> )
uPA	urokinazni aktivator plazminogena (engl. <i>urokinase plasminogen activator</i> )
VTE	venski tromboembolizam
VWF	von Willebrandov faktor
wt	alel divljeg tipa (engl. <i>wild type</i> )

## 7. LITERATURA

Abou-Ismaïl MY, Sridhar, DC, Nayak L. Estrogen and thrombosis: A bench to bedside review. *Thromb Res*, 2020, 192, 40–51.

Activated Protein C (APC) and Factor V Leiden, <https://diapharma.com/activated-protein-c-apc-factor-v-leiden/>, pristupljeno 24.04.2023.

Aday AW, Duran EK, Van Denburgh M, Kim E, Christen WG, Manson JE, Ridker PM, Pradhan AD. Homocysteine Is Associated With Future Venous Thromboembolism in 2 Prospective Cohorts of Women. *Arterioscler, Thromb, Vasc Biol*, 2021, 41(7), 2215–2224.

Albagoush SA, Chakraborty RK, Schmidt AE. Factor V Leiden Mutation. StatPearls, 2023., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534802/>, pristupljeno 24.04.2023.

Alhazzani AA, Kumar A, Selim M. Association between Factor V Gene Polymorphism and Risk of Ischemic Stroke: An Updated Meta-Analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2018, 27(5), 1252–1261.

American College of Obstetricians and Gynecologists Women's Health Care Physicians. ACOG Practice Bulletin No. 138: Inherited thrombophilias in pregnancy. *Obstet Gynecol*, 2013, 122(3), 706-17.

Arachchillage DJ, Mackillop L, Chandratheva A, Motawani J, MacCallum P, Laffan M. Thrombophilia testing: A British Society for Haematology guideline. *Br J Haematol*, 2022, 198(3), 443-458.

Ashorobi D, Ameer MA, Fernandez R. Thrombosis. StatPearls, 2022., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538430/>, pristupljeno 13.04.2023.

Ashrani AA, Heit JA. Incidence and cost burden of post-thrombotic syndrome. *J Thromb Thrombolysis*, 2009, 28(4), 465–476.



Banfić L. (2016). Guidelines on diagnosis, treatment and prevention of venous thrombosis. *Cardiol Croat*, 2016, 11(9), 351–374.

Bates SM, Middeldorp S, Rodger M i sur. Guidance for the treatment and prevention of obstetric-associated venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis*, 2016, 41, 92–128.

Begonja A, Šimundić AM, Štefanović M, Topić E. PCR-SSCP genotipizacija polimorfizma 4G/5G inhibitora-1 aktivatora plazminogena. *Biochem Med*, 2002, 12(1/2), 1-5.

Bergovec M, Udovičić M, Vražić H. Smjernice Europskog kardiološkog društva za dijagnosticiranje i liječenje plućne embolije. *Liječ Vjesn*, 2011, 133, 140–146.

Bezemer ID, Doggen CJM, Vos HL, Rosendaal FR. No Association Between the Common MTHFR 677C→T Polymorphism and Venous Thrombosis: Results From the MEGA Study. *Arch Intern Med*, 2007, 167(5), 497–501.

Bhatt M, Braun C, Patel P, Patel P, Begum H, Wiercioch W, Varghese J, Wooldridge D, Alturkmani HJ, Thomas M, Baig M, Bahaj W, Khatib R, Kehar R, Ponnappureddy R, Sethi A, Mustafa A, Nieuwlaat R, Lim W, Bates SM. Diagnosis of deep vein thrombosis of the lower extremity: a systematic review and meta-analysis of test accuracy. *Blood Advances*, 2020, 4(7), 1250–1264.

Camire RM, Bos MH. The molecular basis of factor V and VIII procofactor activation. *J Thromb Haemost*, 2009, 7(12), 1951-61.

Campello E, Spiezia L, Simioni P. Diagnosis and management of factor V Leiden. *Expert Rev Hematol*, 2016, 9(12), 1139-1149.

Carroll BJ, Piazza G. Hypercoagulable states in arterial and venous thrombosis: When, how, and who to test? *Vasc Med*, 2018, 23(4), 388–399.

Casini A, Neerman-Arbez M, Ariëns RA, de Moerloose P. Dysfibrinogenemia: from molecular anomalies to clinical manifestations and management. *J Thromb Haemostasis*, 2015, 13(6), 909–919.

Clinical Practice Committees of the Association for Molecular Pathology. Molecular Diagnostic Assay Validation Update to the 2009 AMP Molecular Diagnostic Assay Validation White Paper. Association for Molecular Pathology, 2014., <https://www.amp.org/AMP/assets/File/resources/201503032014AssayValidationWhitePaper.pdf?pass=19>, pristupljeno 26.04.2023.

Dahlbäck B. Novel insights into the regulation of coagulation by factor V isoforms, tissue factor pathway inhibitor $\alpha$ , and protein S. *J Thromb Haemostasis*, 2017, 15(7), 1241–1250.

Dayco J, Ataya T, Tidwell C, et al. Plasminogen Activator Inhibitor-1 5G/4G Polymorphism Presenting as Recurrent Ischemic Stroke: The Microthrombi Shower. *Cureus*, 2022, 14(4), e23828.

De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Rossi E, Chiusolo P, Casorelli I, Leone G. The risk of recurrent venous thromboembolism among heterozygous carriers of the G20210A prothrombin gene mutation. *Br J Haematol*, 2001, 630-635.

DeLoughery TG. Inherited thrombophilias. U: Hemostasis and Thrombosis. 4. izd. DeLoughery TG, urednik, Cham, Springer, 2019, str. 115-119.

Duckers C, Simioni P, Tormene D, Carraro S, Rosing J, Castoldi E. Factor V Leiden pseudo-homozygotes have a more pronounced hypercoagulable state than factor V Leiden homozygotes. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(4), 864–867.

Egan G, Ensom MH. Measuring anti-factor Xa activity to monitor low-molecular-weight heparin in obesity: a critical review. *Can J Hosp Pharm*, 2015, 68(1), 33-47.

Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T, Arruda V, Hillarp A, Reny JL. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the

risk of venous thromboembolism – pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost*, 2001, 86(3), 809-816.

Falanga A., Schieppati F, Russo D. Cancer Tissue Procoagulant Mechanisms and the Hypercoagulable State of Patients with Cancer. *Semin Thromb Hemost*, 2015, 41(7), 756–764.

FL Lacbawan, KE Weck, JA Kant, GL. Feldman, I Schrijver. Verification of Performance Specifications of a Molecular Test: Cystic Fibrosis Carrier Testing Using the Luminex Liquid Bead Array. *Arch Pathol Lab Med*, 2012, 136(1), 14–19.

Flick MJ, Bugge TH. Plasminogen–receptor KT: plasminogen activation and beyond. *J Thromb Haemost*, 2017, 15(1), 150–154.

Forte GI, Vaccarino L, Palmeri M, Branzi A, Caldarera CM, Scola L, Caruso C, Licastro F, Lio D. Analysis of polymorphisms Leiden Factor V G1691A and prothrombin G20210A as risk factors for acute myocardial infarction. *Biogerontology*, 2011, 12(5), 485-490.

Franchini M, Makris M. Non-O blood group: an important genetic risk factor for venous thromboembolism. *Blood Transfus*, 2013, 11(2), 164–165.

Gao H, Liu H, Li Y. Value of D-dimer levels for the diagnosis of pulmonary embolism: An analysis of 32 cases with computed tomography pulmonary angiography. *Exp Ther Med*, 2018, 16(2), 1554-1560.

Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA i sur. ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 56(25), 50–103.

Grouzi E, Pouliakis A, Aktypi A, Christoforidou A, Kotsi P, Anagnostou G, Foifa A, Papadakis E. Pregnancy and thrombosis risk for women without a history of thrombotic events: a retrospective study of the real risks. *Thromb J*, 2022, 20(1), 60.

Gwozdz AM, Black SA, Hunt BJ, Lim CS. Post-thrombotic Syndrome: Preventative and Risk Reduction Strategies Following Deep Vein Thrombosis. *Vascular and Endovascular Review*, 2020, 3, e15.

Heit JA, Melton LJ, Lohse CM, Petterson TM, Silverstein MD, Mohr DN, Michael O'Fallon W. Incidence of Venous Thromboembolism in Hospitalized Patients vs Community Residents. *Mayo Clin Proc*, 2001, 76(11), 1102–1110.

Herrmann M, Whiting M, Veillard A, Ehnholm C, Sullivan D, Keech A. Plasma homocysteine and the risk of venous thromboembolism: insights from the FIELD study. *Clin Chem Lab Med*, 2012, 50(12), 2213-2219.

Hickey SE, Curry CJ, Toriello HV. American College of Medical Genetics Practice guideline: Lack of evidence for MTHFR polymorphism testing. *Genet Med*, 2013, 15(2), 153–156.

Hirmerová J. Homocysteine and venous thromboembolism: is there any link? *Cor Vasa*, 2013, 55(3), 248–258.

Isordia-Salas I, Leños-Miranda A, Sainz IM, Reyes-Maldonado E, Borrayo-Sánchez G. Association of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene 5G/4G Polymorphism With ST Elevation Acute Myocardial Infarction in Young Patients. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2009, 62(4), 365–372.

James AH. Thrombosis in pregnancy and maternal outcomes. *Birth Defects Res C: Embryo Today*, 2015, 105(3), 159–166.

Joint Committee for Guides in Metrology. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), 3. izd., 2012., [https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM\\_200\\_2012.pdf/f0e1ad45-d337-bbeb-53a6-15fe649d0ff1](https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM_200_2012.pdf/f0e1ad45-d337-bbeb-53a6-15fe649d0ff1), pristupljeno 28.04.2023.

Kadauke S, Khor B, Van Cott EM. Activated protein C resistance testing for factor V Leiden. *Am J Hematol*. 2014, 89(12), 1147–1150.

Kahn SR. The post-thrombotic syndrome. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*, 2016(1), 413–418.

Kang K-W, Lee JY, Lee B-H, Jeon MJ, Yu ES, Kim DS, Lee SR, Choi CW, Park Y, Sung HJ, Kim BS. Postoperative Thromboembolism According to the Type of Surgery: A Nationwide Study in the Republic of Korea. *Journal of Clinical Medicine*, 2022, 11(6), 1477.

Katz JM, Tadi P. Physiology, Plasminogen Activation. StatPearls, 2021., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539745/>, pristupljeno 24.04.2023.

Khor B, van Cott EM. Laboratory evaluation of hypercoagulability. *Clin Lab Med*, 2009, 29(2), 339-66.

Kraft P, De Meyer SF, Kleinschnitz C. Next-Generation Antithrombotics in Ischemic Stroke: Preclinical Perspective on ‘Bleeding-Free Antithrombosis’. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32(10), 1831–1840.

Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. GeneReviews, 2018., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1368/>, pristupljeno 24.04.2023.

Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. *Genet Med*, 2011, 13(1), 1–16.

Kujovich JL. Prothrombin Thrombophilia. GeneReviews, 2021., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1148/>, pristupljeno 24.04.2023.

Kushner A, West WP, Khan Suheb, Pillarisetty LS. Virchow Triad. StatPearls, 2022., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539697/>, pristupljeno 13.04.2023.

Leclerc D, Sibani S, Rozen R. Molecular Biology of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Overview of Mutations/Polymorphisms. Madame Curie Bioscience Database, 2013., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6561/>, pristupljeno 15.04.2023.

Levin BL, Varga E. MTHFR: Addressing Genetic Counseling Dilemmas Using Evidence-Based Literature. *J Genet Couns*, 2016, 25(5), 901-11.

Li C, Ren H, Chen H, Song J, Li S, Lee C, Liu J, Cui Y. Prothrombin G20210A (rs1799963) polymorphism increases myocardial infarction risk in an age-related manner: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 2017, 7(1), 13550.

Li X, Liu Y, Zhang R, Tan J, Chen L, Liu Y. Meta-analysis of the association between plasminogen activator inhibitor-1 5G/4G polymorphism and recurrent pregnancy loss. *Med Sci Monit*, 2015, 11(21), 1051-1056.

Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet*, 2015, 58(1), 1-10.

Linkins LA, Takach Lapner S. Review of D-dimer testing: Good, Bad, and Ugly. *Int J Lab Hematol*, 2017, 39(1), 98–103.

Lykke JA, Bare LA, Olsen J, Lagier R, Arellano AR, Tong C, Paidas MJ, Langhoff-Roos J. Thrombophilias and adverse pregnancy outcomes: results from the Danish National Birth Cohort. *J Thromb Haemost*, 2012, 10, 1320–1325.

Mäkelburg AB, Lijfering WM, Middeldorp S, Hamulyák K, Veeger NJ, Prins MH, Büller HR, van der Meer J. Low absolute risk of venous and arterial thrombosis in hyperhomocysteinaemia - a prospective family cohort study in asymptomatic subjects. *Thromb Haemost*, 2009, 101, 209–212.

Mannucci PM, Asselta R, Duga S, Guella I, Spreafico M, Lotta L, Merlini PA, Peyvandi F, Kathiresan S, Ardissino D. The association of factor V Leiden with myocardial infarction is

replicated in 1880 patients with premature disease. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(10), 2116–2121.

Maughan BC, Marin M, Han J, Gibbins KJ, Brixey AG, Caughey AB, Kline JA, Jarman AF. Venous Thromboembolism During Pregnancy and the Postpartum Period: Risk Factors, Diagnostic Testing, and Treatment. *Obstet Gynecol Surv*, 2022, 77(7), 433–444.

Mayr C. What Are 3' UTRs Doing? *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11(10), a034728.

McMichael M. New Models of Hemostasis. *Top Companion Anim Med*, 2012, 27(2), 40–45.

Middendorf K, Göhring P, Huehns TY, Seidel D, Steinbeck G, Nikol S. Prevalence of resistance against activated protein C resulting from factor V Leiden is significantly increased in myocardial infarction: investigation of 507 patients with myocardial infarction. *Am Heart J*, 2004, 147(5), 897-904.

Moore AJE, Wachsmann J, Chamarthy MR, Panjikaran L, Tanabe Y, Rajiah P. Imaging of acute pulmonary embolism: an update. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2018, 8(3), 225–243.

Moore GW, Van Cott EM, Cutler JA, Mitchell MJ, Adcock DM. Recommendations for clinical laboratory testing of activated protein C resistance; communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*, 2019, 17(9), 1555–1561.

Morris AA, Kožich V, Santra S, Andria G, Ben-Omran TI, Chakrapani AB, Crushell E, Henderson MJ, Hochuli M, Huemer M, Janssen MC, Maillot F, Mayne PD, McNulty J, Morrison TM, Ogier H, O'Sullivan S, Pavlíková M, de Almeida IT, Terry A, Yap S, Blom HJ, Chapman KA. Guidelines for the diagnosis and management of cystathionine beta-synthase deficiency. *J Inherit Metab Dis*, 2017, 40(1), 49-74.

Næss IA, Christiansen SC, Romundstad PR, Cannegieter SC, Blom HJ, Rosendaal FR, Hammerstrøm J. Prospective study of homocysteine and MTHFR 677TT genotype and risk for venous thrombosis in a general population – results from the HUNT 2 study. *Br J Haematol*, 2008, 141(4), 529–535.

Nakamura M, Yamada N, Ito M. Novel Anticoagulant Therapy of Venous Thromboembolism: Current Status and Future Directions. *Ann Vasc Dis*, 2017, 10(2), 92–98.

Napolitano F, Montuori N. The Role of the Plasminogen Activation System in Angioedema: Novel Insights on the Pathogenesis. *J Clin Med*. 2021, 10(3), 518.

Neuenschwander PF. Coagulation Cascade. U: Encyclopedia of Respiratory Medicine. 1. svezak. Laurent GJ, Shapiro SD, urednici, London, Academic Press, 2006, str. 490-494.

Nishio K, Goto Y, Kondo T, Ito S, Ishida Y, Kawai S, Naito M, Wakai K, Hamajima N. Serum folate and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism adjusted for folate intake. *J Epidemiol*, 2008, 18(3), 125-131.

Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale. *Thromb Haemost*, 2000, 83(5), 657–660.

Padda J, Khalid K, Mohan A, Pokhriyal S, Batra N, Hitawala G, Cooper AC, Jean-Charles G. Factor V Leiden G1691A and Prothrombin Gene G20210A Mutations on Pregnancy Outcome. *Cureus*, 2021, 13(8), e17185.

Pereira AC, Schettert IT, Morandini Filho AAF, Guerra-Shinohara EM, Krieger JE. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. *Clin Chim Acta*, 2004, 340(1-2), 99–105.

Plućna embolija, <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/bolesti-pluca-i-disnih-putova/plucna-embolija>, pristupljeno 14.04.2023.

Prüller F, Raggam RB, Mangge H, Truschnig-Wilders M, Matzhold EM, Weiss EC, Hasiba B, Summers KL, Renner W, Siegert G, Kostka H. A novel factor V mutation causes a normal



activated protein C ratio despite the presence of a heterozygous F5 R506Q (factor V Leiden) mutation. *Br J Haematol*, 2013, 163(3), 414-417.

Prüller F, Weiss E-C, Raggam RB, Cervar-Zivkovic M, Renner W, Wagner J, Michaelis S, März W, Mangge H. Activated Protein C Resistance Assay and Factor V Leiden. *N Engl J Med*, 2014, 371(7), 685–686.

Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors*, 2018, 18(4), 1271.

Raghubeer S, Matsha TE. Methylenetetrahydrofolate (MTHFR), the One-Carbon Cycle, and Cardiovascular Risks. *Nutrients*, 2021, 13(12), 4562.

Reilly R, McNulty H, Pentieva K, Strain JJ, Ward M. MTHFR 677TT genotype and disease risk: is there a modulating role for B-vitamins? *Proc Nutr Soc*, 2014, 73(1), 47–56.

Rennert H, DeSimone RA. Molecular Testing for Factor V Leiden and Prothrombin Gene Mutations in Inherited Thrombophilia. U: Transfusion Medicine and Hemostasis: Clinical and Laboratory Aspects. 3. izd. Shaz BH, Hillyer CD, Gil MR, urednici, New York, Elsevier Science, 2018, str. 903-906.

Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation*, 1999, 99(8), 999-1004.

Risman RA, Kirby NC, Bannish BE, Hudson NE, Tutwiler V. Fibrinolysis: an illustrated review. *Res Pract Thromb Haemost*, 2023, 7(2), 100081.

Rodger MA, Betancourt MT, Clark P, Lindqvist PG, Dizon-Townson D, Said J, Seligsohn U, Carrier M, Salomon O, Greer IA. The association of factor V leiden and prothrombin gene mutation and placenta-mediated pregnancy complications: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *PLoS Med*, 2010, 7, e1000292.

Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost*, 1998, 79(4), 706-708.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *J Am Med Assoc*, 2002, 288(3), 321-33.

SERPINE1 serpin family E member 1 [*Homo sapiens* (human)], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5054>, pristupljeno 17.04.2023.

Sharda A, Flaumenhaft R. The life cycle of platelet granules. *F1000Research*, 2018, 7, 236.

Shemesh A, Hoffman R, Nadir Y, Keren-Politansky A, Monreal M, Brenner B, Tzoran I. Clinical significance of prothrombin G20210A mutation in homozygous patients. *Am J Hematol*, 2017, 92(10), 618-620.

Sillen M, Declerck PJ. A Narrative Review on Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Its (Patho)Physiological Role: To Target or Not to Target? *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5), 2721.

Simone B, De Stefano V, Leoncini E, Zacho J, Martinelli I, Emmerich J, Rossi E, Folsom AR, Almawi WY, Scarabin PY, den Heijer M, Cushman M, Penco S, Vaya A, Angchaisuksiri P, Okumus G, Gemmati D, Cima S, Akar N, Oguzulgen KI. 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. *Eur J Epidemiol*, 2013, 28(8), 621–647.

Stjepanović J. Duboka venska tromboza. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 2022.

Stone J, Hangge P, Albadawi H, Wallace A, Shamoun F, Knuttien MG, Naidu S, Oklu R. Deep vein thrombosis: pathogenesis, diagnosis, and medical management. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 2017, 7(S3), S276–S284.

Suyama T, Tsuchida T, Yasui K, Kawamoto K. Tissue plasminogen activator (T-PA) and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) levels in the conditioned medium of cultured porcine brain microvascular endothelial cells. *Hum Cell*, 1998, 11(1), 35-42.

Tešija Kuna A. Verifikacija kvalitativnih postupaka ispitivanja. U: Upravljanje kvalitetom u medicinskom laboratoriju, tumačenje zahtjeva u revidiranom upitniku za samoprocjenu. Vukasović I, ur., Zagreb, Medicinska naklada, 2016, str. 73-87.

The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature*, 2015, 526, 68–74.

Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Bonovas S, Kopterides P, Vaiopoulos G. The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 5G/4G polymorphism on the thrombotic risk. *Thromb Res*, 2008, 122(6), 736-742.

Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Rapti E, Mantzios G, Kapsimali V, Travlou A. Association between the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost*, 2007, 97, 907–13.

Ünlü Y, Keleş S, Becit N, Koçoğulları CU, Koçak H, Bakan E. Hyperhomocysteinaemia as a Risk Factor for Deep-vein Thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2005, 30(3), 315–318.

Van Cott EM, Khor B, Zehnder JL. Factor V Leiden. *Am J Hematol*. 2016, 91, 46–49.

Vayá A, Gómez I, Mira Y, Ferrando F, Corella D. Homocysteine levels in patients with deep vein thrombosis lacking thrombophilic defects. *Thromb Haemost*, 2008, 99(6), 1132–1134.

Viera AJ. Odds ratios and risk ratios: what's the difference and why does it matter? *South Med J*, 2008, 101(7), 730-734.

Vyas V, Goyal A. Acute Pulmonary Embolism. StatPearls, 2022., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560551/>, pristupljeno 14.04.2023.

Waheed SM, Kudaravalli P, Hotwagner DT. Deep Vein Thrombosis (DVT). StatPearls, 2023., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507708/>, pristupljeno 13.04.2023.

Wald NJ. Folic acid and neural tube defects: Discovery, debate and the need for policy change. *J Med Screen*, 2022, 29(3), 138–146.

Winter WE, Flax SE, Harris NS. Coagulation Testing in the Core Laboratory. *Lab Med*, 2017, 48(4), 295–313.

Xu H, Bush LA, Pineda AO, Caccia S, Di Cera E. Thrombomodulin Changes the Molecular Surface of Interaction and the Rate of Complex Formation between Thrombin and Protein C. *J Biol Chem*, 2005, 280(9), 7956–7961.

Ye Z, Liu EH, Higgins JP, Keavney BD, Lowe GD, Collins R, Danesh J. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet*, 2006, 367(9511), 651-658.

Zeng J, Zeng Q. Correlations between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and venous thromboembolism: A meta-analysis of 99 genetic association studies. *Eur J Prev Cardiol*, 2018, 26(2), 120–134.

Zhang LJ, Lu GM, Meinel FG, McQuiston AD, Ravenel JG, Schoepf UJ. Computed tomography of acute pulmonary embolism: state-of-the-art. *Eur Radiol*, 2015, 25(9), 2547–2557.

Zhang Q, Jin Y, Li X, Peng X, Peng N, Song J, Xu M. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 5G/4G promoter polymorphisms and risk of venous thromboembolism – a meta-analysis and systematic review. *Vasa*, 2020, 49(2), 141–146.

Zhang S, Taylor AK, Huang X, Luo B, Spector EB, Fang P, Richards CS. Venous thromboembolism laboratory testing (factor V Leiden and factor II c.\*97G>A), 2018 update: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med*, 2018a, 20(12), 1489–1498.

Zhang Z, Yu L, Li S, Liu J. Association Study of Polymorphisms in Genes Relevant to Vitamin B12 and Folate Metabolism with Childhood Autism Spectrum Disorder in a Han Chinese Population. *Med Sci Monit*, 2018b, 24, 370–376.

Zöller B, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Autoimmune diseases and venous thromboembolism: a review of the literature. *Am J Cardiovasc Dis*, 2012, 2(3), 171–183.

Zöller B, Svensson PJ, He X, Dahlbäck B. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest*, 1994, 94(6), 2521–2524.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

### 8.1. Sažetak

Venski tromboembolizam je potencijalno po život opasno stanje čija etiologija uključuje brojne stečene i nasljedne rizične čimbenike. Nasljedni rizični čimbenici uključuju genske polimorfizme faktor V Leiden (*F5* G1619A) i protrombin G20210A (*F2* G20210A). Katkad se u rizične faktore za venski tromboembolizam ubrajaju i genski polimorfizmi *PAI-1* 5G/4G i *MTHFR* C677T iako se oni ne mogu jednoznačno povezati s povećanim rizikom venskog tromboembolizma. U Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice došlo je do promjene analitičkog sustava za genotipizaciju navedenih polimorfizama te je uveden LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska). Cilj ovog rada bio je validirati analitičke karakteristike mjernih postupaka genotipizacije *F5* G1619A, *F2* G20210A, *PAI-1* 5G/4G i *MTHFR* C677T metodom lančane reakcije polimeraze uz analizu krivulje taljenja na sustavu LightCycler® 480 prije korištenja u rutinskom radu. Ispitani su analitička nepreciznost, analitička osjetljivost, analitička specifičnost, analitička točnost, usporedivost drugom metodom i granica detekcije. Svi ispitani parametri u potpunosti su zadovoljili unaprijed definirane analitičke kriterije kvalitete i stoga se ispitani mjerni postupci mogu prihvatiti za rutinski rad.

## 8.2. Summary

Venous thromboembolism is a potentially life-threatening condition whose etiology includes numerous acquired and hereditary risk factors. Hereditary risk factors include gene polymorphisms factor V Leiden (*F5* G1619A) and prothrombin G20210A (*F2* G20210A). Gene polymorphisms *PAI-1* 5G/4G and *MTHFR* C677T are also sometimes considered a risk factor for venous thromboembolism although those can not be consistently associated with increased risk of venous thromboembolism. In the Clinical Chemistry Department of the Sestre milosrdnice University Hospital Center, the analytical system being used for genotyping mentioned polymorphisms was changed by introducing LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Switzerland). This study aimed to evaluate analytical characteristics of genotyping polymorphisms *F5* G1619A, *F2* G20210A, *PAI-1* 5G/4G, and *MTHFR* C677T by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis on LightCycler® 480 before putting it into routine operation. Analytical imprecision, analytical sensitivity, analytical specificity, analytical accuracy, repeatability using another method, and limit of detection were examined. All examined parameters fully met the pre-defined analytical quality criteria and therefore the evaluated methods can be accepted for routine work.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija

Diplomski rad

## Validacija metoda genotipizacije polimorfizama gena za faktor zgrušavanja V, protrombin, PAI-1 i MTHFR

**Janko Bubnjar**

### SAŽETAK

Venski tromboembolizam je potencijalno po život opasno stanje čija etiologija uključuje brojne stečene i nasljedne rizične čimbenike. Nasljedni rizični čimbenici uključuju genske polimorfizme faktor V Leiden (*F5 G1619A*) i protrombin *G20210A (F2 G20210A)*. Katkad se u rizične faktore za venski tromboembolizam ubrajaju i genski polimorfizmi *PAI-1 5G/4G* i *MTHFR C677T* iako se oni ne mogu jednoznačno povezati s povećanim rizikom venskog tromboembolizma. U Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice došlo je do promjene analitičkog sustava za genotipizaciju navedenih polimorfizama te je uveden LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska). Cilj ovog rada bio je validirati analitičke karakteristike mjernih postupaka genotipizacije *F5 G1619A*, *F2 G20210A*, *PAI-1 5G/4G* i *MTHFR C677T* metodom lančane reakcije polimeraze uz analizu krivulje taljenja na sustavu LightCycler® 480 prije korištenja u rutinskom radu. Ispitani su analitička nepreciznost, analitička osjetljivost, analitička specifičnost, analitička točnost, usporedivost drugom metodom i granica detekcije. Svi ispitani parametri u potpunosti su zadovoljili unaprijed definirane analitičke kriterije kvalitete i stoga se ispitani mjerni postupci mogu prihvatiti za rutinski rad.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 66 stranica, 10 grafičkih prikaza, 13 tablica i 118 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: trombofilija, genotipizacija, validacija

Mentori: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

**Dr. sc. Mario Štefanović**, *naslovni docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

**Dr. sc. Ivana Čelap**, *naslovna docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

**Dr. sc. Mario Štefanović**, *naslovni docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: lipanj 2023.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry

Diploma thesis

### Validation of Methods for Genotyping Polymorphisms in Factor V, Prothrombin, Plasminogen Activator Inhibitor-1, and Methylenetetrahydrofolate Reductase Genes

Janko Bubnjar

#### SUMMARY

Venous thromboembolism is a potentially life-threatening condition whose etiology includes numerous acquired and hereditary risk factors. Hereditary risk factors include gene polymorphisms factor V Leiden (*F5* G1619A) and prothrombin G20210A (*F2* G20210A). Gene polymorphisms *PAI-1* 5G/4G and *MTHFR* C677T are also sometimes considered a risk factor for venous thromboembolism although those can not be consistently associated with increased risk of venous thromboembolism. In the Clinical Chemistry Department of the Sestre milosrdnice University Hospital Center, the analytical system being used for genotyping mentioned polymorphisms was changed by introducing LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Switzerland). This study aimed to evaluate analytical characteristics of genotyping polymorphisms *F5* G1619A, *F2* G20210A, *PAI-1* 5G/4G, and *MTHFR* C677T by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis on LightCycler® 480 before putting it into routine operation. Analytical imprecision, analytical sensitivity, analytical specificity, analytical accuracy, repeatability using another method, and limit of detection were examined. All examined parameters fully met the pre-defined analytical quality criteria and therefore the evaluated methods can be accepted for routine work.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 66 pages, 10 figures, 13 tables, and 118 references. Original is in Croatian language.

Keywords: thrombophilia, genotyping, validation

Mentors: **Sandra Šupraha Goreta, PhD**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Mario Štefanović, PhD**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Sandra Šupraha Goreta, PhD**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ivana Čelap, PhD**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Mario Štefanović, PhD**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2023