

Vrednovanje sustava LightCycler PRO System za genotipizaciju polimorfizama FV Leiden, MTHFR i PAI-1

Markić, Filip

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:835017>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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



Filip Markić

**Vrednovanje sustava LightCycler® PRO System za
genotipizaciju polimorfizama FV Leiden, MTHFR i
PAI-1**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice pod stručnim vodstvom nasl. doc. dr. sc. Maria Štefanovića, spec. med. biochem. i lab medicine.

Za provođenje istraživanja korištena je oprema nabavljena kroz infrastrukturni znanstveni projekt „Modernizacija i proširenje znanstveno-istraživačke djelatnosti Kliničkog zavoda za kemiju pri KBC Sestre milosrdnice“ (KK.01.1.1.02-0014) Europskoga fonda za regionalni razvoj.

The study was carried out on equipment purchased through the grant KK.01.1.1.02-0014 of the European Regional Development Fund.

Zahvaljujem nasl. doc. dr. sc. Mariu Štefanoviću na mentoriranju ovoga rada i Tomislavu Pavičiću, spec. med. biokem. i lab. medicine na pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada i interpretiranju rezultata.

Posebno bih htio zahvaliti svojoj obitelji i djevojci Karli na neizmjerne podršci, razumijevanju i motivaciji kroz sve izazove tijekom studiranja i pisanja ovog rada.

I na kraju, želim zahvaliti svim kolegama s fakulteta, čiji su savjeti, diskusije i prijateljstvo činili ovaj period života nezaboravnim.

1. Uvod.....	1
1.1. Trombofilija.....	1
1.1.1. Stečene trombofilije.....	1
1.1.2. Nasljedni čimbenici rizika za trombofiliju.....	2
1.2. Venski tromboembolizam.....	3
1.2.1. Čimbenici rizika za razvoj VTE.....	4
1.2.2. Liječenje VTE.....	5
1.3. Polimorfizam G1691A (rs6025) u genu za faktor V.....	7
1.4. Polimorfizam C677T (rs1801133) u genu za MTHFR.....	9
1.5. Polimorfizam 5G/4G (rs1799768) u genu za PAI-1.....	10
1.6. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu uz analizu krivulje taljenja.....	12
1.5. Vrednovanje kvalitativnih postupaka ispitivanja.....	14
2. Obrazloženje teme.....	17
3. Materijali i metode.....	18
3.1. Izolacija DNA.....	18
3.2. Određivanje koncentracije i čistoće izolirane DNA.....	20
3.3. Genotipizacija polimorfizama FV, MTHFR i PAI-1.....	21
3.3.2. Metoda određivanja genotipa FV G1691A.....	24
3.3.3. Metoda određivanja genotipa MTHFR C677T.....	24
3.3.4. Metoda određivanja genotipa PAI-1 5G/4G.....	25
3.3.5. Roche Diagnostics Ligthcycler® PRO system.....	26
3.4. Provođenje validacije metoda genotipizacije.....	27
3.4.1. Ispitivanje analitičke nepreciznosti metode.....	27
3.4.2. Ispitivanje analitičke netočnosti metode.....	27
3.4.3. Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom.....	28
3.4.4. Ispitivanje granice detekcije.....	29
4. Rezultati i rasprava.....	30
4.1. Rezultati.....	30
4.1.1. Ispitivanje analitičke nepreciznosti.....	30
4.1.2. Ispitivanje analitičke netočnosti.....	32
4.1.3. Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom.....	35
4.1.4. Ispitivanje granice detekcije.....	37
4.2. Rasprava.....	38
5. Zaključak.....	40
6. Popis kratica, oznaka i simbola.....	41
7. Literatura.....	42
8. Sažetak/Summary.....	46
8.1. Sažetak.....	46
8.2. Summary.....	47
9. Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card.....	48

1. Uvod

1.1. Trombofilija

Trombofilija se definira kao nasljedno ili stečeno stanje, a odnosi se na abnormalnosti u hemostazi koje povećavaju rizik od venske ili arterijske tromboze. Termin "hiperkoagulabilno stanje" često se koristi kao drugi naziv za predtrombotičko stanje, unatoč činjenici da većina osoba s ovim stanjem neće doživjeti trombozu. Istraživanja genetskih mutacija koje uzrokuju nasljednu hiperkoagulabilnost obično se provode u obiteljima s visokom stopom trombotskih događaja. Osim genetskih faktora, stečene bolesti također mogu izazvati promjene u koagulaciji, povećavajući sklonost pojedinca trombozi (Campello i sur, 2019). Trombofilija opisuje poremećaje koji dovode do veće sklonosti formiranju patoloških intravaskularnih tromba (Moore, 2024). Budući da tromboza ima višestruke uzroke, prisutnost trombofilnog defekta je samo jedan od faktora koji utječu na rizik. Zbog toga je testiranje na trombofiliju predmet rasprave kada je riječ o prevenciji i liječenju, jer rezultati testiranja često ne pružaju informacije koje bi značajno utjecale na liječenje, a ponekad mogu čak i naštetiti pacijentima. Testiranje se obično preporučuje za pacijente koji su doživjeli vensku trombozu i njihovu bližu obitelj (Stevens i sur, 2016). Najčešća prezentacija trombofilije je multifaktorijalna bolest venski tromboembolizam (VTE) (Moore, 2024).

1.1.1. Stečene trombofilije

Određeni stečeni poremećaji mogu dovesti do sklonosti stvaranju krvnih ugrušaka zbog različitih faktora. To uključuje povećanje faktora koje potiču zgrušavanje krvi, smanjenje tvari koje sprječavaju zgrušavanje, upalne i autoimune procese, te brojne promjene koje utječu na ravnotežu procesa zgrušavanja. Najčešći stečeni poremećaji povezani s povećanim rizikom od tromboze uključuju antifosfolipidni sindrom, povišene razine homocisteina, privremeno ili trajno povećanje prokoagulantnih faktora, te smanjenje prirodnih antikoagulanasa u tijelu (Campello i sur, 2019).

Antifosfolipidni sindrom predstavlja jedan od oblika stečene sklonosti ka stvaranju krvnih ugrušaka, a preporuke naglašavaju važnost testiranja na ovu bolest. Postoji niz drugih stanja koja mogu doprinijeti većem riziku od tromboze, uključujući stečene anomalije u proteinima koji sudjeluju u zgrušavanju krvi (poput deficita prirodnih antikoagulanata ili

rezistencije na aktivirani protein C bez prisutnosti faktora V Leiden) te određena medicinska stanja (kao što su mijeloproliferativni poremećaji, paroksizmalna noćna hemoglobinurija i karcinom). Određeni lijekovi poput hormonske nadomjesne terapije i kemoterapije, mogu povećati rizik za trombozu. Pušenje, prekomjerna tjelesna masa, starenje i trudnoća, također mogu pridonijeti povećanju rizika (Stevens i sur, 2016).

Iako su laboratorijske pretrage za trombofiliju lako dostupne i jednostavne za provedbu, izbor pacijenata za testiranje i interpretacija rezultata može biti kompleksna. Često je pacijente s genetskom sklonosti prema trombofiliji moguće identificirati bez provođenja laboratorijskih pretraga, a na temelju rizičnih faktora kao što su: rana pojava VTE (ispod 40-50 godina), izražena obiteljska anamneza VTE, epizode VTE u kombinaciji s blagim okidačima, ponovljene epizode VTE te VTE na neuobičajenim mjestima poput cerebralnih i abdominalnih vena. Postoji velik broj stečenih i nasljednih varijanti trombofilije koje povećavaju rizik od VTE, ali istraživanja sugeriraju da testiranje ima ograničenu kliničku korist, osobito u pogledu ishoda kao što je smrtnost. Rezultati testiranja rijetko utječu na promjenu pristupa liječenju VTE, a kliničari često pozitivne ili negativne rezultate ne tumače ispravno. Pozitivan rezultat može rezultirati nepotrebno produljenom antikoagulantnom terapijom, dok negativan rezultat ne eliminira mogućnost postojanja neidentificirane trombofilije koja nije pokrivena standardnim testiranjem, što znači da negativan rezultat ne implicira nužno nizak rizik. Uobičajeno je mišljenje da rutinska procjena trombofilije nije neophodna za sve pacijente s VTE, ali postoje određene situacije u kojima bi takva procjena mogla biti korisna (Dicks i sur, 2024). Testiranje može biti korisno za određene pacijente koji bi inače prekinuli antikoagulantnu terapiju dok za većinu članova obitelji pacijenata s VTE, testiranje na trombofiliju nije potrebno jer se odluke o profilaksi u situacijama visokog rizika i izboru kontraceptivnih metoda mogu donijeti na temelju obiteljske anamneze. Međutim, testiranje se može uzeti u obzir kod ženskih članova obitelji s VTE i poznate nasljedne trombofilije, ako bi rezultati testiranja mogli utjecati na odluke vezane za upotrebu estrogena ili njegovu profilaksu tijekom trudnoće (Stevens i sur, 2016).

1.1.2. Nasljedni čimbenici rizika za trombofiliju

Nasljedna trombofilija predstavlja genetsku predispoziciju za razvoj venske tromboze. Glavni genetski faktori su faktor V Leiden i mutacija gena protrombina, koji zajedno čine većinu slučajeva. Manje učestali, ali ozbiljniji su defekti antitrombina, proteina C i S. Novootkriveni genetski faktori uključuju pseudo-homozigotnost za APC rezistenciju,

hiperfunkcionalni faktor IX Padova i antitrombin (AT) rezistenciju. U mnogim obiteljima s trombofilijom poznati genetski uzroci ostanu neotkriveni (Campello i sur, 2019).

Faktor V Leiden je genetska mutacija koja povećava rizik od stvaranja krvnih ugrušaka zbog otpornosti na aktivirani protein C. Ova mutacija je najčešća kod bijelaca, posebno američke bjelačke populacije i varira po riziku između onih s jednom (heterozigoti) i dvije kopije mutacije (homozigoti) (Dicks i sur, 2024). Heterozigoti imaju do 3 puta veći rizik za razvoj VTE, dok homozigoti imaju i do 11 puta veći rizik od venskog tromboembolizma, što može zahtijevati dugotrajnu antikoagulacijsku terapiju (Pastori i sur, 2023). Oko 10% osoba s faktorom V Leiden (FVL) mutacijom doživi VTE (Moore, 2024).

Mutacija protrombina G20210A je drugi najčešći genetski uzrok trombofilije s učestalošću od oko 2% u općoj populaciji. Ova genetska promjena dovodi do povećane aktivnosti protrombinskog gena, što uzrokuje povišene koncentracije protrombina u krvi i veću aktivnost trombina, čime se povećava opasnost od razvoja venske tromboembolijske bolesti. Prevalencija ove mutacije varira ovisno o geografskoj lokaciji, pri čemu je češća među osobama europskog podrijetla, dok je u azijskim i afričkim populacijama vrlo rijetka. Heterozigoti imaju 2,8 puta, a homozigoti 6,7 puta veći rizik od razvoja VTE nego osoba bez mutacije. Osobe koje su heterozigoti i za FV Leiden i protrombin G20210A mutaciju imaju 3,4 puta veći rizik (Simeone i sur, 2013). Mutacija protrombina G20210A se nasljeđuje autosomno dominantno, slično kao i mutacija faktora V Leiden (Dicks i sur, 2024). Iako je polimorfizam u genu za protrombin jedan od značajnijih uzroka trombofilije, on nije tema validacije pa neće biti opširnije obrađen.

1.2. Venski tromboembolizam

Venski tromboembolizam (VTE), uključujući plućnu emboliju (PE) i duboku vensku trombozu (DVT), predstavlja značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta globalno, a najčešće pogađa donje ekstremitete. Iako su izravni oralni antikoagulansi unaprijedili prevenciju, incidencija VTE raste, posebno među mlađim odraslim osobama i pacijentima s upalnim stanjima. VTE je treći najčešći kardiovaskularni uzrok smrti u zapadnim zemljama, a posebno je zabrinjavajući zbog rizika od ponovne tromboze. Genetske predispozicije i rasne razlike također doprinose prevalenciji VTE, čineći ga sveprisutnim zdravstvenim izazovom (Yamashita i sur., 2022, Colling i sur., 2021).

U SAD-u, godišnja učestalost venskog tromboembolizma (VTE) je 123 slučaja na 100.000 ljudi, dok je u Europi incidencija nešto veća, s procjenom od 131 slučaja na 100.000

ljudi. Učestalost VTE raste s dobi i varira među različitim etničkim skupinama, s većom prevalencijom među bjelačkom i afroameričkom populacijom u odnosu na azijsku populaciju. Plućna embolija (PE), kao ozbiljan oblik VTE, ima smrtnost između 8,7% i 17,4% unutar tri mjeseca od dijagnoze. PE može se manifestirati na različite načine, od asimptomatske do smrtonosne. Smjernice naglašavaju važnost procjene rizika kod pacijenata s PE kako bi se donijele informirane odluke o liječenju, posebno za one s visokim kratkoročnim rizikom koji bi mogli imati koristi od agresivnijih tretmana poput trombolize (Yamashita i sur., 2022). Godišnje, DVT pogađa između 88 i 112 osoba na 100.000, s rizikom ponovne pojave VTE-a od 20% do 36% unutar deset godina. Simptomi DVT-a uključuju oticanje, bol i nelagodu, toplinu, osjetljivost na dodir i izražene venske kolaterale. Dijagnostički pristup obuhvaća procjenu vjerojatnosti, testiranje D-dimera i slikovne pretrage, posebno kod pacijenata bez prethodne povijesti VTE-a, gdje je prevalencija DVT-a manja od 20% (Chopard i sur., 2020).

1.2.1. Čimbenici rizika za razvoj VTE

Rizik od VTE je multifaktorijalan. U istraživanjima koja se bave ovim stanjem, VTE se obično kategorizira kao izazvan ili neizazvan. Izazvani VTE se povezuje s određenim pokretačkim faktorima koji su se dogodili unutar tri mjeseca prije pojave, poput imobilizacije, ozljede, kirurškog zahvata, raka ili boravka u bolnici. S druge strane, neizazvani VTE se javlja bez prisutnosti ovih faktora. Različiti elementi doprinose riziku od venskog tromboembolizma (VTE), uključujući kako trenutne tako i dugotrajne faktore, poput demografskih karakteristika, životnih navika, antropometrije i genetike, te kliničkih stanja koja su se razvila. Patofiziologija VTE se razlikuje od drugih vaskularnih bolesti, jer neki poznati faktori rizika za aterosklerotske kardiovaskularne bolesti, poput hiperlipidemije, hipertenzije i dijabetesa melitusa, nisu izravno povezani s rizikom za VTE, za razliku od faktora poput starosti i prekomjerne tjelesne mase (Lutsey i Zakai, 2023).

Tablica 1: Rizični faktori za venski tromboembolizam iz (Lutsey i Zakai, 2023)

KATEGORIJA	DEFINICIJA	RIZIČNI FAKTORI
Akutni okidači	Čimbenici koji dovode do trenutnog povećanja rizika od venskog tromboembolizma, koji traje samo kratko vrijeme.	Operacije, prijelomi i lakše ozljede, hospitalizacija, trombocitopenija izazvana heparinom, infekcije COVID-19
Subakutni okidači	Stanja koja dovode do trajnog povećanja rizika od venskog tromboembolizma, tijekom trajanja okidača.	Upala, korištenje oralnih kontraceptiva, hormonska nadomjesna terapija, trudnoća, egzogeni testosteron
Bazalni čimbenici rizika	Čimbenici koji su stabilni ili prilično stabilni kod pojedinca i povezani su s rizikom od venskog tromboembolizma.	Starija dob, spol, etnička pripadnost, tjelesna neaktivnost, nezdrava prehrana, pušenje, viši rast, pretilost, May-Thurnerov sindrom, genetika
Stečeni rizični faktori	Čimbenici rizika koji su ili prisutni ili odsutni kod pojedinaca i nisu prisutni tijekom cijelog života.	Rak i liječenje raka, pretilost sindrom antifosfolipidnih antitijela, autoimune bolesti, zatajenje srca, fibrilacija atrijska, prethodni venski tromboembolizam

1.2.2. Liječenje VTE

Terapijski pristup venskom tromboembolizmu (VTE) provodi se kroz tri ključne etape: inicijalnu stabilizaciju koja traje od nekoliko dana do nekoliko tjedana, osnovno liječenje koje obično traje između tri i šest mjeseci, te dugoročnu prevenciju koja započinje nakon završetka osnovnog liječenja. Identifikacija VTE kao izazvanog ili neizazvanog je bitna jer određuje dužinu terapije, a posebno je važna u odluci o primjeni dugotrajnih preventivnih strategija. Takve strategije su posebno preporučene za osobe s neizazvanim VTE i mogu obuhvatiti periodični nadzor, antikoagulacijsku terapiju u periodima povećanog rizika, ili trajnu antikoagulacijsku terapiju. VTE predstavlja značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta, stoga je razumijevanje opterećenja koje ovo stanje predstavlja, kao i faktora

rizika, od iznimnog značaja za njegovu prevenciju i smanjenje socijalnih dispariteta u pojavnosti i ishodima VTE (Lutsey i Zakai, 2023). Antikoagulantna terapija ostaje temelj liječenja i prevencije VTE, a uvođenje izravnih oralnih antikoagulansa (DOAK) predstavlja značajan napredak, nudeći alternativu antagonistima vitamina K i omogućujući različite pristupe liječenju. Neki DOAK-i omogućuju liječenje bez intravenskih antikoagulansa, što može dovesti do ranijeg otpusta iz bolnice ili liječenja izvan bolničkih uvjeta. Unatoč napretku, postoje brojna otvorena pitanja i nejasnoće koje predstavljaju izazove za kliničare, ističući potrebu za daljnjim istraživanjima u ovom području (Yamashita i sur., 2022).

U fazi akutnog liječenja antikoagulantna terapija je ključna u liječenju duboke venske tromboze (DVT) kako bi se smanjila smrtnost od plućne embolije i spriječio morbiditet. Odmah nakon dijagnoze DVT-a ili pri visokoj sumnji, preporučuje se započeti s antikoagulantnom terapijom. Izbor terapije uključuje izravne oralne antikoagulanse poput rivaroksabana ili apiksabana, ili parenteralnu antikoagulaciju s heparinom niske molekularne težine koja se kasnije zamjenjuje DOAK-om.

Kronično liječenje venskog tromboembolizma zahtijeva pažljivu ravnotežu između sprječavanja recidiva i minimiziranja rizika od krvarenja. Nakon inicijalne faze liječenja, produžena terapija antikoagulansima može biti potrebna za osobe s visokim rizikom od ponovne VTE. Europsko kardiološko društvo preporučuje procjenu individualnog rizika od recidiva umjesto korištenja starih kategorija izazvane i neizazvane VTE. Prema novim smjernicama, dugotrajno liječenje se savjetuje ako je rizik od recidiva veći od 3% godišnje, dok bi oni s manjim rizikom trebali imati vremenski ograničeno liječenje. Ove promjene odražavaju potrebu za personaliziranim pristupom u liječenju VTE, uzimajući u obzir kako dugoročne koristi tako i potencijalne rizike povezane s antikoagulantnom terapijom (Chopard i sur, 2020). Kearon i Kahn (2020) navode da su posljedice krvarenja generalno lošije od posljedica povratne VTE te da je smrtnost od krvarenja do 3 puta veća od smrtnosti VTE. Testiranje na trombofilije omogućuje procjenu rizika od povratka VTE i adekvatno liječenje pacijenata. Prema smjernicama američkog društva za hematologiju, testiranje potpunog panela za trombofiliju opravdano je kod osoba:

- sa simptomatskom VTE izazvanom nekirurškim prijelaznim rizičnim faktorima, trudnoćom ili postpartalno, korištenjem kombiniranih hormonskih kontraceptiva
- sa simptomatskom VTE na neobičnom mjestu kod kojih se planira ukidanje inicijalne terapije.

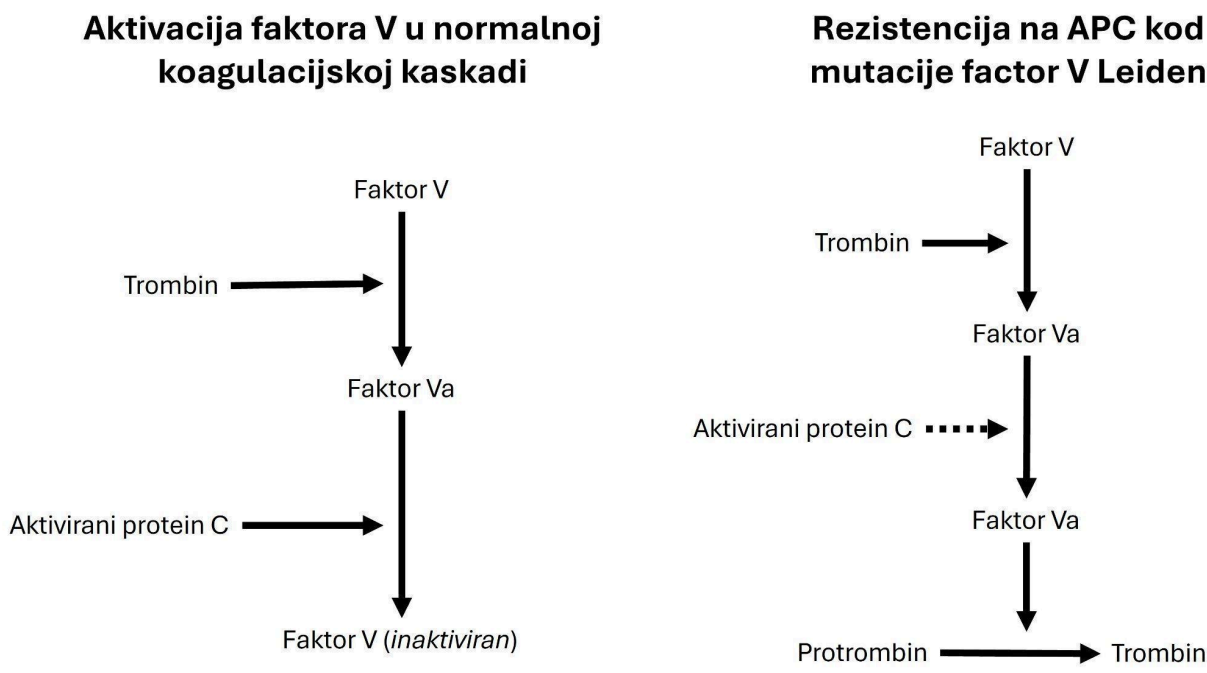
Potpuni panel za trombofiliju obuhvaća istovremeno testiranje faktora V Leiden, mutacije protrombina G20210A, antifosfolipidnih antitijela, nedostatak antitrombina, proteina C i

proteina S. Selektivno testiranje na nasljedne trombofilije preporučeno je kod osoba s obiteljskom povijesti trombofilije (Middeldorp i sur., 2023). Pastori i sur. (2024) navode da je testiranje na faktor V preporučeno kod osoba:

- s niskom ili graničnom vrijednosti testa rezistencije na aktivirani protein C (APCR)
- koje primaju direktne inhibitore trombina ili faktora Xa, koji mogu interferirati testiranjem APCR
- s lupus antikoagulansom i produženim aktiviranim parcijalnim tromboplastinskim vremenom
- koje su razvile VTE u ili nakon trudnoće
- s VTE koji je povezan s korištenjem kombiniranih hormonskih kontraceptiva
- mlađih od 40 godina s neizazvanim VTE i jednim srodnikom s poviješću VTE.

1.3. Polimorfizam G1691A (rs6025) u genu za faktor V

Faktor V je jednolančani glikoprotein veličine 330 kD koji sudjeluje u hemostazi, a u krvi je neaktivan sve do cijepanja trombinom ili faktorom Xa. Cijepanjem nastaje aktivirani faktor V (FVa), heterodimer koji se sastoji od teškog (105 kDa) i lakog (71-74 kDa) lanca (Rosing i sur., 2001). FVa se povezuje sa faktorom Xa te nastaje kompleks protrombinaze koja cijepa protrombin u trombin. U početnoj fazi zgrušavanja nastaje mala količina trombina potrebna za aktivaciju trombocita te faktora V i X. U amplifikacijskoj fazi kompleks protrombinaze nalazi se vezan na trombocite te počinje proizvoditi velike količine trombina potrebne za stvaranje stabilnog trombocitno-fibrinskog ugruška (Topić i sur., 2017). Aktivirani protein C (APC) je inhibitor faktora V. APC cijepa aktivirani FV kod očuvanih argininskih ostataka R306, R506 i R679 te ga tako inaktivira. Faktor V Leiden (FVL) je točkasta mutacija kod koje je gvanin zamijenjen adeninom na poziciji 1691 u genu za faktor V. Ta supstitucija uzrokuje zamjenu arginina R506 glutaminom što 10 puta usporava inaktivaciju aktiviranog faktora V (Van Cott i sur., 2016; Kujovich, 2011).



Slika 1: Prikaz aktivacije normalnog i mutiranog faktora V u koagulacijskoj kaskadi.

Prevalencija heterozigota za FVL u Europi i Sjedinjenim Američkim Državama je 3-8%, dok je prevalencija homozigota za FVL 1/5000. Mutacija je najčešća u europskim populacijama, dok je u azijskim i afričkim iznimno rijetka. U Europi prevalencija varira od 10-15% u Grčkoj i Švedskoj do 2-3% u Italiji i Španjolskoj (Kujovich, 2011).

Rezistencija na aktivirani protein C (APCR) je koagulacijski test kojim se procjenjuje odgovor plazme na prisutnost aktiviranog proteina C. Test se temelji na mjerenju aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTV) u plazmi, prije i nakon dodavanja APC-a. Kod zdravih osoba, APTV se značajno produžuje nakon dodavanja APC-a jer on inaktivira faktore Va i VIIIa, koji su ključni za zgrušavanje krvi. Takav rezultat se smatra negativnim za APC rezistenciju. Pozitivan rezultat APC rezistencije, koji se u više od 95 % slučajeva javlja zbog faktora V Leiden, pokazuje da APC ne može inaktivirati faktor Va pa dodatak APC-a ne produžuje dovoljno APTV. Prije provođenja testa za APC rezistenciju, plazmu je potrebno prediluirati s plazmom koja nema faktor V kako bi se eliminirao utjecaj nedostatka drugih faktora zgrušavanja na rezultate testa (Moore i sur., 2019; Van Cott i sur., 2016). APCR se izračunava prema formuli:

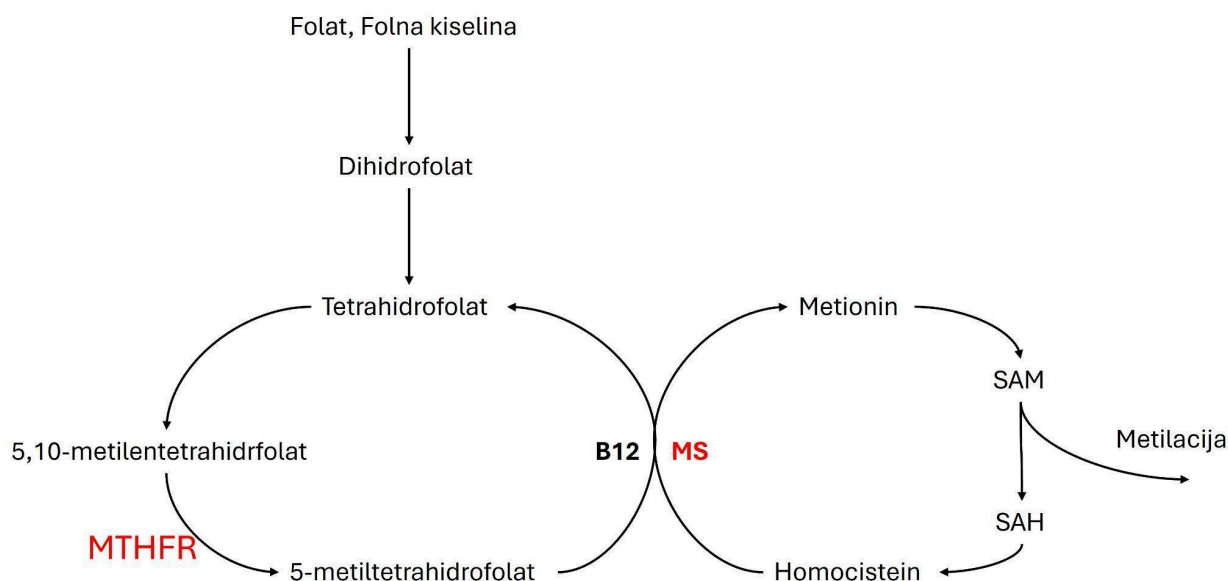
$$APCR = \frac{\frac{APTV+APC \text{ (pacijentova plazma)}}{APTV \text{ (pacijentova plazma)}}}{\frac{APTV+APC \text{ (normalna plazma)}}{APTV \text{ (normalna plazma)}}$$

(APTV+APC - izmjereni APTV(s) nakon dodatka APC-a). APCR se izražava kao normalizirani omjer APTV-a (sa i bez APC) pacijentove plazme i APTV-a (sa i bez APC) normalne plazme. 80% pacijenata s omjerom osjetljivosti na APC manjim od 0,84 i 100% pacijenata s omjerom osjetljivosti na APC manjim od 0,70 bili su heterozigotni ili homozigotni za FVL mutaciju (www.practical-haemostasis.com). APCR je povoljniji i jednostavniji test za otkrivanje faktora V Leiden u usporedbi s genotipizacijom. Negativan rezultat APC rezistencije eliminira potrebu za genotipizacijom faktora V Leiden, dok granične i pozitivne rezultate APC rezistencije treba potvrditi genotipizacijom (Selby, 2019). Prednost APC rezistencije u odnosu na genotipizaciju faktora V Leiden je i mogućnost otkrivanja stečene APC rezistencije, koja je rizični čimbenik za razvoj VTE, neovisno o faktoru V Leiden. Poznati uzroci stečene APC rezistencije uključuju pozitivan lupus antikoagulans, povećanu aktivnost FVIII, trudnoću i korištenje oralnih kontraceptiva (Takhviji i sur., 2021).

1.4. Polimorfizam C677T (rs1801133) u genu za MTHFR

Metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) je enzim koji sudjeluje u metabolizmu folata i homocisteina. Katalizira reakciju redukcije 5,10-metilentetrahidrofolata u 5-metiltetrahidrofolat, oblik folata koji sudjeluje u reakciji remetilacije homocisteina u metionin (Zaremska i sur., 2023). Smanjena katalitička aktivnost enzima MTHFR povezana je sa kardiovaskularnim i psihičkim bolestima, psorijazom, dijabetesom i karcinomima. Gen za enzim MTHFR nalazi se na lokaciji p36.3 prvog kromosoma i kodira dimerne proteine veličine 70-77 kDa (Liew i Gupta, 2015). Najčešće ispitivani polimorfizmi su C677T i A1298C. Točkasta mutacija C677T uzrokuje zamjenu citozina timinom na poziciji 677 te posljedično uzrokuje zamjenu aminokiseline alanina valinom (Wan i sur., 2018). Mutacija uzrokuje sintezu termolabilnog enzima što uzrokuje smanjenje enzimske aktivnosti za 70% kod homozigota, odnosno za 35% kod heterozigota. Smanjenje enzimske aktivnosti uzrokuje povišenu koncentraciju homocisteina (Fan i sur., 2016).

CIKLUS FOLATA



Slika 2. Ciklus folata. MTHFR - metilentetrahidrofolat reduktaza; MS - metionin sintetaza; SAM - S-adenozil metionin; SAH - S-adenozil homocistein;

U hrvatskoj populaciji oko 46% ljudi ima divlji tip gena (CC), 45% ljudi su heterozigoti (CT), a 9% su homozigoti za mutirani tip gena (TT). Distribucija polimorfizma u hrvatskoj je u skladu sa distribucijom polimorfizma u drugim europskim državama (Lovričević i sur., 2004).

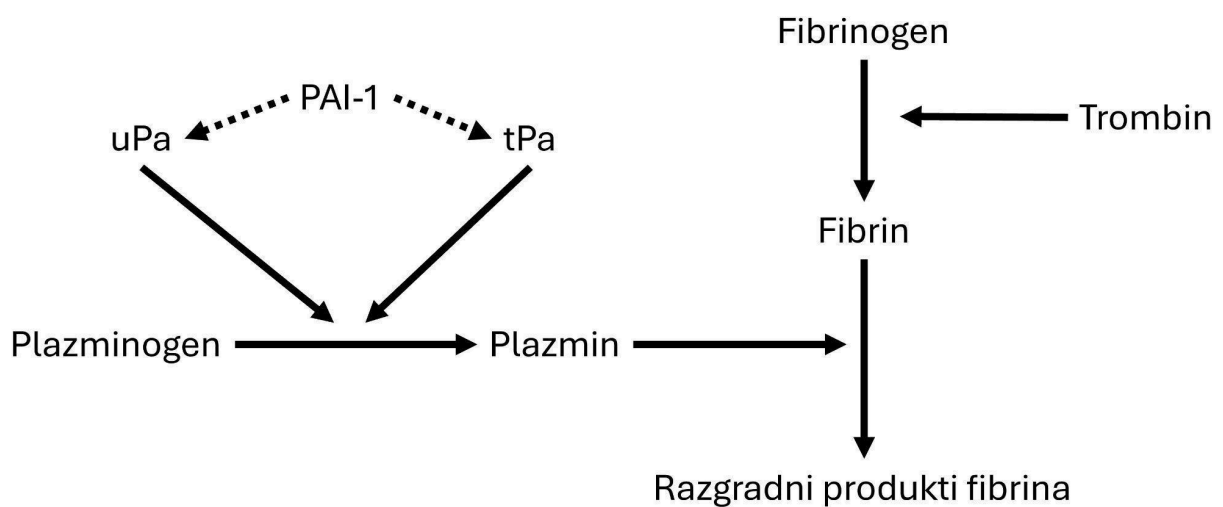
Polimorfizam C677T je najčešći uzrok povišene koncentracije homocisteina u krvi. Povišena razina homocisteina u krvi uzrokuje aktivaciju i agregaciju trombocita, aktivaciju faktora V i VII, oksidativni stres i aterosklerotske lezije. Normalna razina homocisteina u krvi je do 15 $\mu\text{mol/L}$, a povišena razina homocisteina se može podijeliti u tri kategorije: umjerena (15 - 30 $\mu\text{mol/L}$), srednja (30 - 100 $\mu\text{mol/L}$) i izrazito povišena (>100 $\mu\text{mol/L}$). Kod izrazito povišene koncentracije homocisteina u krvi, postoji ozbiljan rizik za nastanak tromboembolijskih komplikacija (Zaremska i sur., 2023). Seo i sur. (2010) su utvrdili da za svaki porast koncentracije homocisteina od 5 $\mu\text{mol/L}$, raste rizik od kardiovaskularne bolesti za 50%.

1.5. Polimorfizam 5G/4G (rs1799768) u genu za PAI-1

Inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1) je jednolančani glikoprotein veličine 47 kDa. Regulator je endogene fibrinolize, a glavni supstrat mu je tkivni aktivator plazminogena (tPa). PAI-1 se uglavnom nalazi u alfa granulama trombocita iz kojih se izlučuje u aktivnom

obliku. U sistemske cirkulaciji brzo prelazi u latentni oblik što osigurava visoku inhibiciju fibrinolize samo na mjestu akutnog nastajanja tromba (Pavlov i Čelap, 2019). PAI-1 stvara kovalentnu vezu sa tkivnim i urokinaznim aktivatorima plazminogena u omjeru 1:1 te blokira nastajanje plazmina i posljedično razgradnju fibrina. PAI-1 potiče migraciju leukocita na mjesto upale i ima značajnu ulogu u remodeliranju tkiva (Yildiz i sur., 2014). Visoke razine PAI-1 u krvi su povezane sa kardiovaskularnim i neurodegenerativnim bolestima, metaboličkim poremećajima, tkivnom fibrozom, starenjem i rakom (Sillen i Declerck, 2021).

ULOGA PAI-1 U FIBRINOLITIČKOM SUSTAVU



Slika 3. Uloga PAI-1 u fibrinolitičkom sustavu. uPa - urokinazni aktivator plazminogena; tPa - tkivni aktivator plazminogena; PAI-1 - inhibitor aktivatora plazminogena 1;

Gen za PAI-1 nalazi se na kromosomu 7 na poziciji q22. Polimorfizam 5G/4G nalazi se u promotorskoj regiji gena te se radi o inserciji (5G)/ deleciji (4G). Mutacija utječe na vezanje transkripcijskih faktora, pa tako 5G alel može vezati i aktivator i inhibitor transkripcije, dok 4G alel može vezati samo aktivator transkripcije. 4G alel je povezan s višim koncentracijama PAI-1 u plazmi. S obzirom da je PAI-1 reaktant akutne faze, razlika u plazmatskim koncentracijama između 4G i 5G alela bit će znatno veća u prisustvu upale (Tsantes i sur., 2008). Begonja i sur. (2002) su na 126 zdravih ispitanika proveli istraživanje frekvencija genotipova PAI-1 u hrvatskoj populaciji. Frekvencije su bile 29 % za 5G/5G, 47 % za 5G/4G te 24 % za 4G/4G.

1.6. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu uz analizu krivulje taljenja

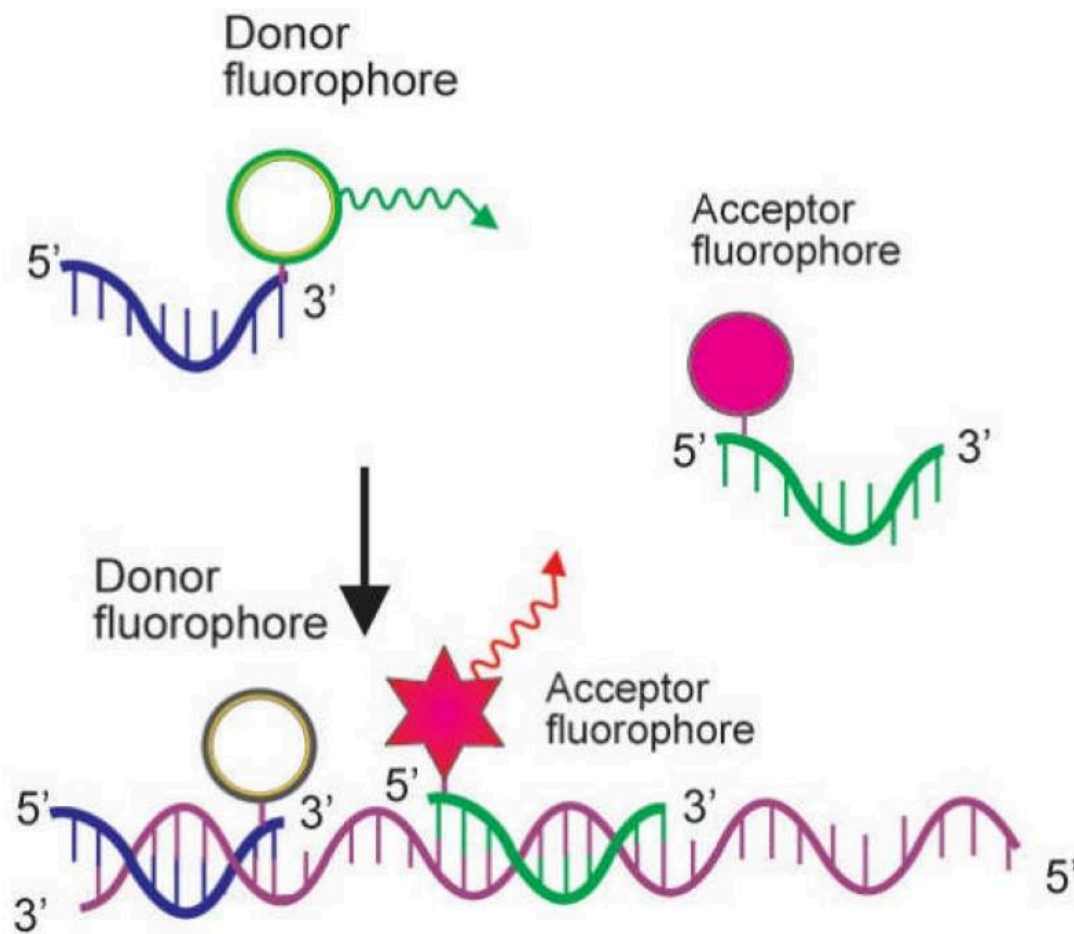
Lančana reakcija polimeraze (engl. polymerase chain reaction, PCR) je najčešće korištena metoda u molekularnoj dijagnostici. PCR se koristi za dijagnostiku genetskih poremećaja, otkrivanje gena povezanih s rakom, tipizaciju tkiva i odabir donora za transplantaciju, filogenetske analize, molekularna epidemiološka istraživanja, dijagnostiku infekcija uzrokovanih patogenim mikroorganizmima i genotipizaciju otpornosti na lijekove (Mahanama i Wilson-Davies, 2021).

PCR je biokemijska reakcija umnažanja malog DNA ili RNA fragmenta. Reakcija se odvija korištenjem termostabilne DNA polimeraze koja katalizira sintezu komplementarnog DNA lanca prema jednolančanom DNA kalupu. Četiri su glavne komponente PCR reakcije: početnice, DNA kalup, termostabilna DNA polimeraza i nukleotidi (dNTPs). Početnice su posebno dizajnirani, kratki oligonukleotidi koji su komplementarni krajevima dijela DNA koji se želi umnožiti. DNA kalup sadrži regiju DNA koju se želi umnožiti i pruža početni materijal za reakciju. PCR reakcija se odvija u ponavljajućim ciklusima, a svaki ciklus se sastoji od 3 koraka: denaturacija DNA, hibridizacija početnica i elongacija početnica. Denaturacija se odvija na 94 °C i odvaja dvostruku uzvojnica DNA u jednolančanu DNA. Hibridizacija početnica odvija se na nižoj temperaturi, obično između 45 i 60 °C. te se početnice vežu za svoja komplementarna mjesta na DNA kalupu. Hibridizacijom se stvara dvostruka uzvojnica potrebna za vezanje DNA polimeraze i sintezu komplementarnog lanca. Elongacija se obično odvija na 72 °C. Budući da se oba lanca DNA kopiraju tijekom PCR procesa, dolazi do udvostručavanja broja kopija DNA. Končna količina DNA kopija po završetku PCR reakcije će iznositi 2^n , pri čemu je n broj ciklusa.

Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR) podrazumijeva mjerenje koncentracije DNA tijekom izvođenja reakcije korištenjem fluorescentnih boja. Metodu qPCR možemo podijeliti na temelju specifičnosti boja koje se koriste tijekom reakcije. Boje poput SYBR Green i EvaGreen nespecifično se vežu za dvostruku uzvojnica DNA te mjere ukupan broj DNA molekula umnoženih tijekom PCR reakcije. Drugi način mjerenja DNA je korištenjem specifičnih DNA proba koje su spregnute s fluoroforima. Metoda se temelji na fluorescentnom rezonantnom prijenosu energije (FRET) između dvije fluorofore (donora i akceptora). Donorska fluorofora prelazi u pobuđeno stanje i emitira svjetlost koju akceptorska fluorofora apsorbira i emitira svjetlost veće valne duljine, ukoliko se nalazi u neposrednoj blizini. Kako bi došlo do prijenosa energije 3 uvjeta moraju biti zadovoljena:

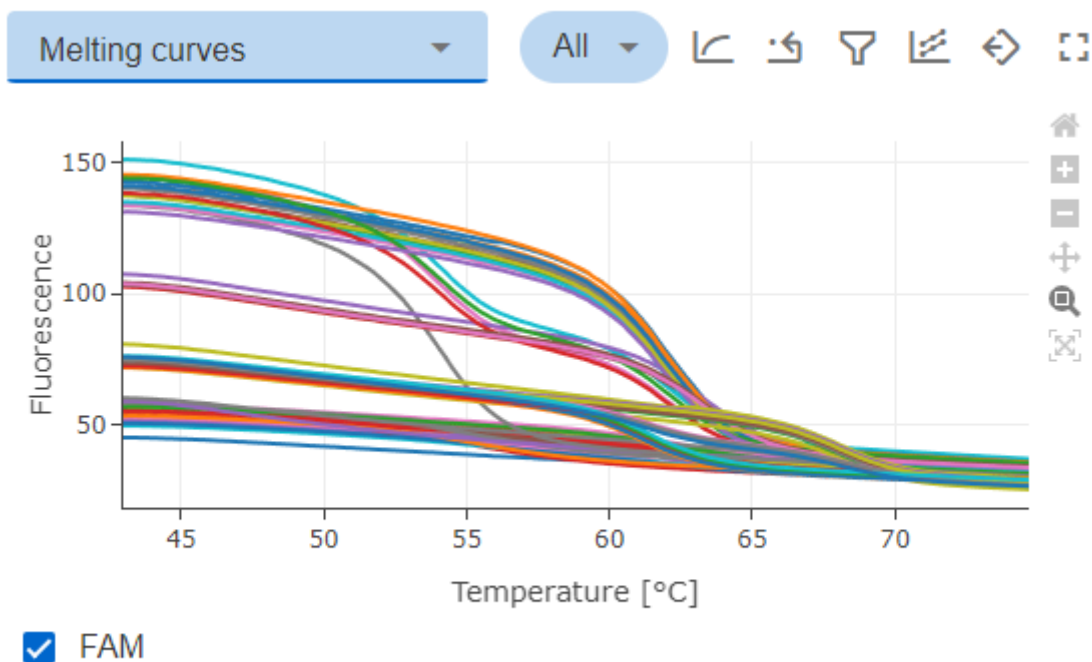
1. Fluorofore moraju biti u neposrednoj blizini
2. Orijentacija dipola donora i akceptora moraju biti paralelne
3. Emisijski spektar donora se mora preklapati sa eksitacijskim spektrom akceptora.

Metoda sa specifičnim DNA probama koje su spregnute s fluoroforima razvijena je u više različitih izvedbi. U izvedbi s hidrolizirajućim probama, obje fluorofore su vezane za jednu probu te se mjeri se fluorescencija donorske fluorofore koja raste nakon hidrolize probe. Proba hibridizira s jednolančanom DNA tijekom faze elongacije, a DNA polimeraza svojom 5' egzonukleaznom aktivnošću hidrolizira DNA probu pri čemu se donor udaljava od akceptora. S druge strane, u izvedbi s hibridizirajućim probama, boje su vezane na dvije različite probe, jedna na 3', a druga na 5' kraju. Nakon denaturacije DNA probe hibridiziraju sa specifičnim ciljnim sekvencama tako da su dvije fluorofore u neposrednoj blizini. Mjerenjem fluorescencije akceptora postiže se velika specifičnost jer fluorescentni signal poraste samo ako su obe nezavisne probe hibridizirale sa specifičnim ciljnim sekvencama DNA (Artika i sur., 2022).



Slika 4. Shema metode sa specifičnim hibridizirajućim probama (preuzeto prema Artika i sur., 2022)

Analiza krivulje taljenja DNA (engl. *melting curve analysis*) je tehnika kojom se mogu razlikovati jednonukleotidni polimorfizmi. Temelji se na svojstvu disocijacije DNA pri čemu će regije bogate AT sekvencama disocirati na nižim temperaturama u odnosu na regije bogate GC sekvencama. U analizi jednonukleotidnih polimorfizama koriste se posebno dizajnirane obilježene probe koje su komplementarne određenom alelu gena te s njime stvaraju homoduplekse. Te probe će hibridizirati i s mutiranim alelom stvarajući heteroduplekse, ali neće biti u potpunosti komplementarne slijedu DNA pa će disocirati na nižim temperaturama. Kako probe obilježene s fluoroforima disociraju od DNA, tako dolazi do promjene fluorescencije. Krivulje taljenja prikazuju ovisnost izmjerene fluorescencije o temperaturi, a na njima prisutne točke infleksije odgovaraju temperaturama taljenja (Wittwer i sur., 2024; Erali i Wittwer, 2010).



Slika 5. Krivulje taljenja (preuzeto sa softvera uređaja)

1.5. Vrednovanje kvalitativnih postupaka ispitivanja

Vrednovanje postupaka ispitivanja služi za nepristrano i objektivno procjenjivanje karakteristika metode ili analitičkog sustava koji se uvodi u rutinski rad. Cilj vrednovanja je

utvrditi ima li metoda dovoljnu analitičku kvalitetu za kliničku primjenu. Tijekom evaluacije prikupljaju se eksperimentalni podaci koji se statistički obrađuju kako bi se procijenila pogreška metode. Ta se pogreška uspoređuje s unaprijed definiranim analitičkim ciljevima, a na temelju objektivne usporedbe donosi se odluka o uvođenju metode u rutinski rad laboratorija (Saračević, 2013). Akreditacija laboratorija prema HR ISO 15189 normi predstavlja službenu potvrdu kompetentnosti za provođenje testiranja i mjerenja u skladu s međunarodnim standardima, što ulijeva povjerenje u rezultate i povećava konkurentnost laboratorija na tržištu. Akreditirani laboratorij mora zadovoljavati tehničke uvjete koje zahtjeva norma (osoblje, uvjeti smještaja i okruženja, laboratorijska oprema, procesi prije ispitivanja, procesi ispitivanja, procesi nakon ispitivanja, osiguranje kvalitete, izvješćivanje o rezultatima, izdavanje nalaza). Jedan od osnovnih zahtjeva za akreditaciju medicinskih laboratorija je validacija novih metoda.

Vrednovanje postupaka ispitivanja provodi se validacijom ili verifikacijom. Validacijom se dokazuje služi li metoda svrsi kojoj je namijenjena te se određuju karakteristike i ograničenja metode. Parametri koji se mogu ispitivati validacijom su: istinitost, preciznost, granica detekcije, ponovljivost, mjerna nesigurnost, granica kvantifikacije, linearnost (područje unutar kojeg su rezultati izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku), radno područje (raspon između gornje i donje koncentracijske granice analita u uzorku koju je moguće odrediti), selektivnost (mjera mogućnosti određivanja željenog analita u matrici) i robusnost (otpornost postupka na male namjerne promjene parametara metode. Verifikacijom se provjera istinitost tehničkih specifikacija koje proizvođač navodi na osnovu provedenog procesa validacije i potrebno ju je provesti kada se validirana metoda po prvi puta uvodi u laboratorij i kada se promijene neki uvjeti u laboratoriju koji utječu na metodu (Vukasović, 2016).

Analitička preciznost definirana je kao bliskost slaganja između mjerenja određenog analita u istom uzorku u ponovljenim mjerenjima. U molekularnoj dijagnostici analitička preciznost može se definirati kao bliskost slaganja između rezultata nezavisnih analiza dobivenih iz istog uzorka. Analitička točnost definira se kao bliskost rezultata mjerenja određenog analita stvarnoj vrijednosti tog analita. Analitička točnost u kvalitativnim metodama predstavlja udio pravilno klasificiranih rezultata, odnosno onih koji su stvarno pozitivni (TP) i stvarno negativni (TN). Komponente analitičke točnosti su analitička osjetljivost i analitička specifičnost. Analitička osjetljivost u kvalitativnim metodama 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. Kvalitativne metode se mogu uspoređivati pomoću Cohenovog kappa koeficijenta, odnosno *Inter-rater agreement kappa* statističkog testa koji definira snagu usporedivosti. Ispitivanje je potrebno provesti na minimalno 30 uzoraka, pri čemu treba uključiti barem 10 uzoraka za svaku očekivanu kategoriju, kako bi se mogao izračunati pouzdani kappa koeficijent. Granica detekcije u molekularnoj dijagnostici predstavlja najmanju količinu DNA potrebnu za uspješno dobivanje rezultata određene analize (Vukasović, 2016).

2. Obrazloženje teme

U Odjelu za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice promijenjen je analitički sustav za genotipizaciju polimorfizama FV G1619A (faktor V Leiden; rs6025), MTHFR C677T (rs1801133) i PAI-1 5G/4G (rs1799768). Instaliran je novi analizator Roche Diagnostics LightCycler® PRO (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska) koji je zamijenio dotadašnji analizator Roche Diagnostics LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska). Cilj ovog rada bio je vrednovati analitički sustav LightCycler® PRO validacijom analitičkih karakteristika mjernih postupaka genotipizacije polimorfizama FV G1619A, MTHFR C677T i PAI-1 5G/4G 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

Kao uzorak u genotipizaciji polimorfizama FV Leiden, PAI-1 5G/4G i MTHFR C677T koristi se DNA izolirana iz pune krvi. Izolacija DNA provedena je pomoću komercijalnog sustava za izolaciju DNA, a kao uzorak za izolaciju DNA korištena je puna venska krv izvađena u epruvetu sa K₃EDTA antikoagulansom.

Laboratorijska oprema:

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

Reagensi i potrošni materijali:

- *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Basel, 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, Hamburg, Njemačka)

- plastične jednokratne sterilne epruvete volumena 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- izopropanol 99.7 % (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- etanol apsolutni (T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska)
- voda za PCR (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska)
- menzura volumena 100 mL

Protokol:

- **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. 1 sat prije početka izolacije potrebno je temperirati *Elution Buffer* na 70°C
2. U jednokratnoj sterilnoj epruveti volumena 1,5 mL pomiješa se 200 µL uzorka, 200 µL *Binding Buffera* i 40 µL proteinaze K te se inkubira 10 minuta na temperaturi 70°C
3. Dodaje se 100 µL izopropanola te se vorteksira 10 sekundi, a zatim se epruveta kratko centrifugira
4. Sadržaj epruvete se prebacuje u *High Filter Tube* te se kolona začepi i centrifugira 1 minutu na 8000 g
5. Eluat se baca, dodaje se 500 µL *Removal Buffera* te se centrifugira 1 minutu pri 8000g
6. Eluat se baca, dodaje se 500 µL *Wash Buffera* te se centrifugira 1 minutu pri 8000g
7. Eluat se baca, dodaje se 500 µL *Wash Buffera* te se centrifugira 1 minutu pri 8000g
8. Eluat se baca te se centrifugira 10 sekunda pri 13000g
9. Eluat se baca, dodaje se 200 µL *Elution Buffera* te se centrifugira 1 minutu pri 8000g
10. Eluat sadrži pročišćenu izoliranu DNA koja se pohranjuje na 4°C

3.2. Određivanje koncentracije i čistoće izolirane DNA

Koncentracija i čistoća DNA određena je mikrovolumnim spektrofotometrom. Mikrovolumni spektrofotometar mjeri apsorbancije na 230, 260 i 280 nm u 1 μ L otopine DNA. Apsorbancija izmjerena na 260 nm razmjerna je koncentraciji DNA, apsorbancija izmjerena na 280 nm koncentraciji proteina, dok je apsorbancija izmjerena na 230 nm razmjerna koncentraciji gvanidin-HCl. Omjeri apsorbancija A260/A280 i A260/A230 koriste se za procjenu čistoće izolirane DNA. Prihvatljivi uzorci DNA imaju omjer A260/A280 od 1,7 do 2,0 te omjer A260/A230 od 1,8 do 2,4.

Laboratorijska oprema:

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

Reagensi i potrošni materijali:

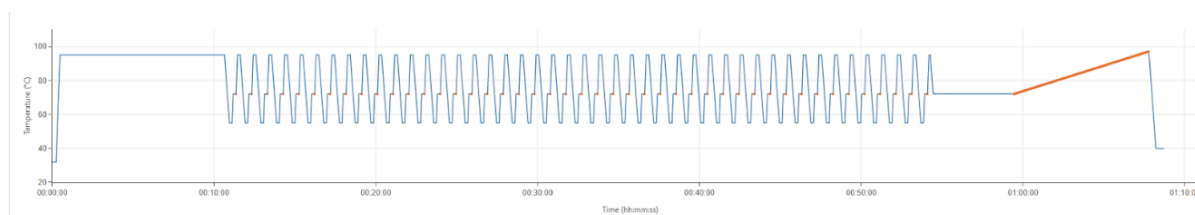
- plastični jednokratni sterilni nastavci za pipete s filterom volumena 10 μ L (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- *Elution Buffer*, sadržan u *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska)
- staničevina

Protokol:

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

3.3. Genotipizacija polimorfizama FV, MTHFR i PAI-1

Genotipizacija polimorfizama FV G1691A, MTHFR G20210A i PAI-1 5G/4G provedena je na analitičkom sustavu LightCycler® PRO (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska) uz korištenje LightMix in-vitro diagnostics kit Factor V (Leiden) (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka), Light Mix in-vitro diagnostics kit MTHFR C677T (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka) i LightMix in-vitro diagnostics kit PAI-1 (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka). Genotipizacija polimorfizama provedena je lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu uz analizu krivulje taljenja. Tijekom analize krivulje taljenja temperatura se postupno povećava te SimpleProbe oligomer disocira pri specifičnoj temperaturi (T_m). Mutacija u toj regiji destabilizira oligomer-DNA hibrid te uzrokuje snižavanje temperature pri kojoj oligomer disocira. Za svaku seriju uzoraka potrebno je koristiti negativnu kontrolu, pozitivnu kontrolu DNA heterozigotnog genotipa (HT) i DNA standarde za divlji genotip (WT) i mutirani genotip (MT).



Slika 6. Shema uvjeta temperature (os ordinata) i trajanja (os apscisa) pojedinih faza qPCR-a i taljenja DNA.

Reagensi i potrošni materijali:

- plastični jednokratni nastavci za pipete s filterom volumena 10 μ L i 100 μ L (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- pločice s 96 reakcijskih jažica LightCycler® 480 Multiwell (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska)
- adhezivna folija LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska)
- LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics GmbH, Basel, 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 MgCl₂
- otopina MgCl₂, 25 mM
- voda za PCR
- LightMix in-vitro diagnostics kit Factor V (Leiden) (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka), sadrži:
 - Parametar Specific Reagents (PCR) – specifične početnice i hibridizacijske sonde, liofilizat
 - Positive Heterozygous Control – pozitivni kontrolni uzorak DNA heterozigotnog genotipa (FV 1619 GA), liofilizat
 - Genotyping Standard Wildtype – genotipizirajući standard DNA genotipa divljeg tipa (FV 1619 GG), liofilizat
 - Genotyping Standard Mutant – genotipizirajući standard DNA mutiranog homozigotnog genotipa (FV 1619 AA), liofilizat
- Light Mix in-vitro diagnostics kit MTHFR C677T (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka), sadrži:
 - Parametar Specific Reagents (PCR) – specifične početnice 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.
- LightMix in-vitro diagnostics kit PAI-1 (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka), sadrži:
 - Parametar Specific Reagents (PCR) – specifične početnice 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

Protokol:

- **Priprema otopine LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe:**
 1. Otopinu 1b odmrznuti zagrijavanjem epruvetice na 30°C - 35°C od 3 do 5 minuta
 2. Kratko centrifugirati epruvetice 1a i 1b te pripaziti da su otopine bez vidljivih čestica
 3. Dodati 60 µL otopine 1b u otopinu 1a i lagano promiješati s pipetom, pazeći da se ne stvaraju mjehurići
 4. Epruveticu kratko centrifugirati kako bi se zaostale kapljice spustile sa stijenki
- **Priprema otopine specifičnih početnica i hibridizacijskih sonda** (jednaka je za sva 3 polimorfizma uz korištenje zasebne smjese specifičnih početnica i hibridizacijskih sonda):
 1. Centrifugirati epruveticu sa smjesom specifičnih početnica i hibridizacijskih sonda 1 minutu na 10.000 okretaja po minuti
 2. Provjeriti da se talog nalazi na dnu epruvetice
 3. Dodati 66 µL vode za PCR
 4. Inkubirati otopinu 20 sekundi na sobnoj temperaturi, a zatim vorteksirati 10 sekundi
 5. Kratko centrifugirati kako bi se zaostale kapi spustile sa stijenki epruvetice
- **Priprema pozitivne kontrole i genotipizirajućih standarda** (jednaka je za sva 3 polimorfizma uz korištenje zasebnih pozitivnih kontrola odnosno genotipizirajućih standarda):
 1. Centrifugirati epruveticu s pozitivnom kontrolom odnosno genotipizirajućim standardom 1 minutu na 10000 okretaja po minuti
 2. Provjeriti da se talog nalazi na dnu epruvetice
 3. Otopiti talog u 80 µL vode za PCR
 4. Inkubirati otopinu 20 sekundi na sobnoj temperaturi, a zatim vorteksirati 10 sekundi
 5. Kratko centrifugirati kako bi se zaostale kapi spustile sa stijenki epruvetice
- **Priprema reakcijske smjese za PCR** (jednaka je za sva 3 polimorfizma uz korištenje zasebnih pripremljenih otopina specifičnih početnica i hibridizacijskih sonda i zasebnih pripremljenih otopina pozitivnog kontrolnog uzorka odnosno

genotipizirajućeg standarda; postupak je naveden za pripremu jedne reakcijske smjese):

Potrebno je otpipetirati:

1. 5.2 μL vode za PCR
2. 0.8 μL otopine MgCl_2 , 25 mM
3. 1.0 μL pripremljene otopine specifičnih početnica i hibridizacijskih sondi
4. 1.0 μL pripremljene otopine LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe
5. 2.0 μL otopine izolirane DNA ili pripremljene otopine pozitivnog kontrolnog uzorka odnosno genotipizirajućeg standarda

3.3.2. Metoda određivanja genotipa FV G1691A

Za genotipizaciju polimorfizma FV G1691A koristili smo LightMix in-vitro diagnostics kit Factor V (Leiden) (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka). Fragment duljine 110 parova baza se umnaža koristeći specifične početnice. Fragment se analizira pomoću SimpleProbe oligomera koji se veže na regiju gdje je prisutna mutacija. Kod divljeg genotipa vrh krivulje nalazi se na 61°C, a kod mutiranog homozigota na 53°C. Heterozigot će imati dva manja vrha na 61°C i 53°C.

Tablica 2 . Shema očitavanja genotipa prema krivulji taljenja za FV G1691A

Genotip	Mutirani homozigot FV 1691A/A	Heterozigot FV 1691G/A	Divlji tip FV 1691G/G
Broj vrhova	1	2	1
Temperatura taljenja	51 - 53°C	51 - 53°C i 59 - 61°C	59 - 61°C

3.3.3. Metoda određivanja genotipa MTHFR C677T

Za genotipizaciju polimorfizma MTHFR C677T koristili smo LightMix in-vitro diagnostics kit MTHFR C677T (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka). Fragment duljine 288 parova baza se umnaža koristeći specifične početnice. Fragment se analizira pomoću SimpleProbe oligomera koji se veže na regiju gdje je prisutna mutacija. Kod divljeg genotipa vrh krivulje nalazi se na 68°C, a kod mutiranog homozigota na 61°C. Heterozigot će imati dva manja vrha na 68°C i 61°C.

Tablica 3 . Shema očitavanja genotipa prema krivulji taljenja za MTHFR C677T

Genotip	Mutirani homozigot MTHFR 677T/T	Heterozigot MTHFR 677C/T	Divlji tip MTHFR 677C/C
Broj vrhova	1	2	1
Temperatura taljenja	58 - 61°C	58 - 61°C i 65 - 68°C	65 - 68°C

3.3.4. Metoda određivanja genotipa PAI-1 5G/4G

Za genotipizaciju polimorfizma PAI-1 5G/4G koristili smo LightMix in-vitro diagnostics kit PAI-1 (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka). Fragment duljine 345 parova baza se umnaža koristeći specifične početnice. Fragment se analizira pomoću SimpleProbe oligomera koji se veže na regiju gdje je prisutna mutacija. Kod divljeg genotipa vrh krivulje nalazi se na 60°C, a kod mutiranog homozigota na 53°C. Heterozigot će imati dva manja vrha na 60°C i 53°C.

Tablica 4. Shema očitavanja genotipa prema krivulji taljenja za PAI-1 5G/4G

Genotip	Mutirani homozigot PAI-1 4G/4G	Heterozigot PAI-1 5G/4G	Divlji tip PAI-1 5G/5G
Broj vrhova	1	2	1
Temperatura taljenja	52 - 55°C	52 - 55°C i 59 - 62°C	59 - 62°C

3.3.5. Roche Diagnostics Lightcycler® PRO system



Slika 7. Roche Diagnostics Lightcycler® PRO system (preuzeto s www.diagnostics.roche.com)

Roche Diagnostics Lightcycler® PRO system je analizator koji se može koristiti za različite vrste genskih analiza, uključujući detekciju, apsolutnu kvantifikaciju, relativnu kvantifikaciju/analizu genske ekspresije, analizu genske varijacije pomoću analize krivulje taljenja ili završne točke, te za analizu metilacije. Ova tehnologija kombinira PCR, praćenje fluorescencije u stvarnom vremenu i analizu krivulje taljenja. Praćenjem fluorescencije u svakom ciklusu moguće je pratiti umnožavanje nukleinske kiseline i odrediti količinu ciljnog produkta (kvantifikacija), dok se očitanjem promjena temperature u analizi krivulje taljenja može provesti kvalitativna analiza i genotipizacija uzorka. Roche Diagnostics Lightcycler® PRO system je CE-IVD certificirani analizator koji može istovremeno analizirati do 384 uzorka unutar 1 sata. Uređaj može koristiti dva tipa cikličkih grijača koji su dizajnirani za pločice s 96 i 384 reakcijske jažice. Detekcijska jedinica je fluorescentni fotometar koji se sastoji od sedam ekscitacijskih i emisijskih filtera. Bilo koja kombinacija ekscitacijskog i emisijskog filtera tvori fluorescencijski kanal. U tablici 5 prikazani su optimalni fluorescencijski kanali.

Tablica 5. Optimalni fluorescencijski kanali i pripadajuće fluorescencijske boje

Eksitacijske valne duljine	Emisijske valne duljine	Optimalne boje
432,5 nm	474,2 nm	Cyan 500
494 nm	523,4 nm	FAM
541 nm	565,3 nm	HEX
574,1 nm	601,2 nm	Red 610
620,7 nm	636,2 nm	Red 640
656,7 nm	675,3 nm	Cy5
687 nm	724,7 nm	Cy5,5

3.4. Provođenje validacije metoda genotipizacije

3.4.1. Ispitivanje analitičke nepreciznosti metode

Analitička nepreciznost za genotipizaciju sva tri polimorfizma ispitana je u pet neovisnih ponavljanja tijekom pet radnih dana. Korišteni su komercijalni kontrolni uzorci proizvođača odnosno genotipizirajući standardi s poznatim ciljnim vrijednostima divljeg tipa i mutiranog homozigota. Uzorci su između serija zauzimali nasumične položaje na reakcijskoj pločici s 96 reakcijskih jažica. Analitička nepreciznost je izračunata prema formuli:

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

3.4.2. Ispitivanje analitičke netočnosti metode

Analitička osjetljivost za genotipizaciju sva tri polimorfizma ispitana je u pet neovisnih serija tijekom pet radnih dana genotipizacijom pet uzoraka s poznatom pozitivnom ciljnom vrijednosti mutiranog homozigota. Kao uzorak su korišteni zasebni komercijalni genotipizirajući standardi. Analitička osjetljivost izračunata je prema formuli:

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

gdje je SP- broj stvarno pozitivnih uzoraka; LN - broj stvarno negativnih uzoraka.

Analitička specifičnost za genotipizaciju sva tri polimorfizma ispitana je u pet neovisnih serija tijekom pet radnih dana genotipizacijom pet uzoraka s poznatom negativnom ciljnom vrijednosti. Kao uzorak korištena je slijepa proba, odnosno voda za PCR. Analitička osjetljivost izračunata je prema formuli:

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

gdje je SN - broj stvarno negativnih uzoraka; LP - broj lažno pozitivnih uzoraka.

Analitička netočnost izračunata je prema formuli:

$$\text{Analitička netočnost (\%)} = [1 - (\frac{SP+SN}{SP+SN+LP+LN})] \times 100;$$

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

3.4.3. Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom

Ponovljivost drugom metodom ispitana je u dvije serije na ukupno 40 uzoraka različitih genotipova usporedbom rezultata dobivenih na novom analitičkom sustavu Roche Diagnostics LightCycler® PRO s rezultatima koji su ranije određeni na analitičkom sustavu Roche Diagnostics LightCycler® 480. Korišteni su uzorci DNA otprije poznatih pacijenata i uzorci DNA iz programa vanjske procjene kvalitete RfB (Referenzinstitut für Bioanalytik, Bonn, Njemačka). Ponovljivost drugom metodom analizirana je pomoću Inter-rater agreement kappa statističkog testa koristeći statistički program Medcalc. Tablica prikazuje način interpretacije dobivene *kappa* vrijednosti.

Tablica 6. Interpretacija *kappa* vrijednosti

κ	Interpretacija*
0 – 0.20	Slučajna podudarnost
0.21– 0.39	Minimalna podudarnost
0.40 – 0.59	Slaba podudarnost
0.60 – 0.79	Osrednja podudarnost
0.80 – 0.90	Snažna podudarnost
>0.90	Gotovo savršena podudarnost

3.4.4. Ispitivanje granice detekcije

Granica detekcije ispitana je izvođenjem PCR-a na seriji razrjeđenja uzorka DNA kako bi se utvrdila minimalna količina DNA potrebna za uspješno izvođenje reakcije. Korišteni su uzorci DNA od prije poznatih pacijenata s heterozigotnim alelima. Razrjeđenje je izvedeno u omjerima 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 i 1:64.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Rezultati

4.1.1. Ispitivanje analitičke nepreciznosti

Tablica 7. Ispitivanje analitičke nepreciznosti za FV G1691A

FV G1691A				
Ponavljjanje	Uzorak	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Podudarnost
1	WT Standard	G/G	G/G	DA
	MT Standard	A/A	A/A	DA
2	WT Standard	G/G	G/G	DA
	MT Standard	A/A	A/A	DA
3	WT Standard	G/G	G/G	DA
	MT Standard	A/A	A/A	DA
4	WT Standard	G/G	G/G	DA
	MT Standard	A/A	A/A	DA
5	WT Standard	G/G	G/G	DA
	MT Standard	A/A	A/A	DA
Podudarnost			100%	
Analitička nepreciznost			0%	

Tablica 8. Ispitivanje analitičke nepreciznosti za MTHFR C677T

MTHFR C677T				
Ponavljjanje	Uzorak	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Podudarnost
1	WT Standard	C/C	C/C	DA
	MT Standard	T/T	T/T	DA
2	WT Standard	C/C	C/C	DA
	MT Standard	T/T	T/T	DA
3	WT Standard	C/C	C/C	DA
	MT Standard	T/T	T/T	DA
4	WT Standard	C/C	C/C	DA
	MT Standard	T/T	T/T	DA
5	WT Standard	C/C	C/C	DA
	MT Standard	T/T	T/T	DA
Podudarnost			100%	
Analitička nepreciznost			0%	

Tablica 9. Ispitivanje analitičke nepreciznosti za PAI-1 4G/5G

PAI-1 4G/5G				
Ponavljjanje	Uzorak	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Podudarnost
1	WT Standard	5G/5G	5G/5G	DA
	MT Standard	4G/4G	4G/4G	DA
2	WT Standard	5G/5G	5G/5G	DA
	MT Standard	4G/4G	4G/4G	DA
3	WT Standard	5G/5G	5G/5G	DA
	MT Standard	4G/4G	4G/4G	DA

4	WT Standard	5G/5G	5G/5G	DA
	MT Standard	4G/4G	4G/4G	DA
5	WT Standard	5G/5G	5G/5G	DA
	MT Standard	4G/4G	4G/4G	DA
Podudarnost			100%	
Analitička nepreciznost			0%	

Unaprijed definirani kriterij za analitičku nepreciznost iznosi 0%. Zadani kriterij zadovoljen je za sva 3 ispitivana polimorfizma na analitičkom sustavu Lightcycler PRO.

4.1.2. Ispitivanje analitičke netočnosti

Tablica 10. Ispitivanje analitičke netočnosti za FV G1691A na analitičkom sustavu LightCycler PRO

FV G1691A					
Ponavljanje	Uzorak	Analitička osjetljivost		Analitička specifičnost	
		Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost
1.	HT Positive Control	G/A	G/A	/	/
	H20	/	/	neg	neg
2.	HT Positive Control	G/A	G/A	/	/
	H20	/	/	neg	neg
3.	HT Positive Control	G/A	G/A	/	/
	H20	/	/	neg	neg
4.	HT Positive Control	G/A	G/A	/	/
	H20	/	/	neg	neg

5.	HT Positive Control	G/A	G/A	/	/
	H2O	/	/	neg	neg
Broj stvarno pozitivnih (SP)			5		
Broj lažno negativnih (LN)			0		
Broj stvarno negativnih (SN)			5		
Broj lažno pozitivnih (LP)			0		
Analitička osjetljivost			100%		
Analitička specifičnost			100%		
Analitička netočnost			0%		

Tablica 11. Ispitivanje analitičke netočnosti za MTHFR C677T na analitičkom sustavu LightCycler PRO

MTHFR C677T					
Ponavljjanje	Uzorak	Analitička osjetljivost		Analitička specifičnost	
		Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost
1.	HT Positive Control	C/T	C/T	/	/
	H2O	/	/	neg	neg
2.	HT Positive Control	C/T	C/T	/	/
	H2O	/	/	neg	neg
3.	HT Positive Control	C/T	C/T	/	/
	H2O	/	/	neg	neg
4.	HT Positive Control	C/T	C/T	/	/
	H2O	/	/	neg	neg
5.	HT Positive Control	C/T	C/T	/	/

	H20	/	/	neg	neg
Broj stvarno pozitivnih (SP)			5		
Broj lažno negativnih (LN)			0		
Broj stvarno negativnih (SN)			5		
Broj lažno pozitivnih (LP)			0		
Analitička osjetljivost			100%		
Analitička specifičnost			100%		
Analitička netočnost			0%		

Tablica 12. Ispitivanje analitičke netočnosti za PAI-1 4G/5G na analitičkom sustavu LightCycler PRO

PAI-1 4G/5G					
Ponavljjanje	Uzorak	Analitička osjetljivost		Analitička specifičnost	
		Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost
1.	HT Positive Control	5G/4G	5G/4G	/	/
	H20	/	/	neg	neg
2.	HT Positive Control	5G/4G	5G/4G	/	/
	H20	/	/	neg	neg
3.	HT Positive Control	5G/4G	5G/4G	/	/
	H20	/	/	neg	neg
4.	HT Positive Control	5G/4G	5G/4G	/	/
	H20	/	/	neg	neg
5.	HT Positive Control	5G/4G	5G/4G	/	/
	H20	/	/	neg	neg

Broj stvarno pozitivnih (SP)	5
Broj lažno negativnih (LN)	0
Broj stvarno negativnih (SN)	5
Broj lažno pozitivnih (LP)	0
Analitička osjetljivost	100%
Analitička specifičnost	100%
Analitička netočnost	0%

Unaprijed definirani kriterij za analitičku osjetljivost iznosi 100%. Zadani kriterij zadovoljen je za sva 3 ispitivana polimorfizma na analitičkom sustavu Lightcycler PRO. Unaprijed definirani kriterij za analitičku specifičnost iznosi 100%. Zadani kriterij zadovoljen je za sva 3 ispitivana polimorfizma na analitičkom sustavu Lightcycler PRO. Unaprijed definirani kriterij za analitičku netočnost iznosi 0%. Zadani kriterij zadovoljen je za sva 3 ispitivana polimorfizma na analitičkom sustavu Lightcycler PRO.

4.1.3. Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom

Tablica 13. Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom za FV G1691A na analitičkom sustavu LightCycler PRO

FV G1691A			
LightCycler PRO	LightCycler 480 II		
	AA	GA	GG
AA	11	0	0
GA	0	14	0
GG	0	0	15
Podudarnost	100%		
Kappa koeficijent (95%CI)	1,000 (1,000 - 1,000)		

Tablica 14. Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom za MTHFR C677T na analitičkom sustavu LightCycler PRO

MTHFR C677T			
LightCycler PRO	LightCycler 480 II		
	CC	CT	TT
CC	15	0	0
CT	0	13	0
TT	0	0	12
Podudarnost	100%		
Kappa koeficijent (95%CI)	1,000 (1,000 - 1,000)		

Tablica 15. Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom za PAI-1 4G/5G na analitičkom sustavu LightCycler PRO

PAI-1 4G/5G			
LightCycler PRO	LightCycler 480 II		
	4G/4G	4G/5G	5G/5G
4G/4G	14	0	0
4G/5G	0	16	0
5G/5G	0	0	10
Podudarnost	100%		
Kappa koeficijent (95%CI)	1,000 (1,000 - 1,000)		

Unaprijed definirani kriterij *Kappa* koeficijenta za ponovljivost drugom metodom je 1. Zadani kriterij zadovoljen je za sva 3 ispitivana polimorfizma na analitičkom sustavu Lightcycler PRO te je usporediv sa analitičkim sustavom LightCycler 480 II.

4.1.4. Ispitivanje granice detekcije

Tablica 16. Ispitivanje granice detekcije za FV G1691A na analitičkom sustavu LightCycler PRO

FV G1691A			
Razrjeđenje		Količina DNA	Uspješnost reakcije
1.	1:2	15,0 ng	DA
2.	1:4	7,5 ng	DA
3.	1:8	3,8 ng	DA
4.	1:16	1,9 ng	DA
5.	1:32	1,0 ng	DA
6.	1:64	0,5 ng	NE
Granica detekcije		1 ng	

Tablica 17. Ispitivanje granice detekcije za MTHFR C677T na analitičkom sustavu LightCycler PRO

MTHFR C677T			
Razrjeđenje		Količina DNA	Uspješnost reakcije
1.	1:2	15,0 ng	DA
2.	1:4	7,5 ng	DA
3.	1:8	3,8 ng	DA
4.	1:16	1,9 ng	DA
5.	1:32	1,0 ng	DA
6.	1:64	0,5 ng	DA
Granica detekcije		0,5ng	

Tablica 18. Ispitivanje granice detekcije za PAI-1 4G/5G na analitičkom sustavu LightCycler PRO

PAI-1 4G/5G			
Razrjeđenje		Količina DNA	Uspješnost reakcije
1.	1:2	25,0 ng	DA
2.	1:4	12,5 ng	DA
3.	1:8	6,3 ng	DA
4.	1:16	3,2 ng	DA
5.	1:32	1,6 ng	DA
6.	1:64	0,8 ng	DA
Granica detekcije		0,8 ng	

Granice detekcije za sve tri metode genotipizacije polimorfizama iznose 1,5 ng prema deklaraciji proizvođača. Rezultati ispitivanja granice detekcije iznose 1 ng za FV G1691A, 0,5 ng za MTHFR C677T i 0,8 ng za PAI-1 4G/5G. Rezultati ispitivanja sukladni su navodima proizvođača.

4.2. Rasprava

Trombofilija je skup poremećaja koji povećavaju sklonost organizma stvaranju krvnih ugrušaka (tromba), što može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih komplikacija kao što su duboka venska tromboza i plućna embolija. Na razvoj trombofilije utječu brojni nasljedni i stečeni čimbenici rizika. Nasljedni rizični čimbenici uključuju genske polimorfizme faktor V Leiden (FV G1691A), PAI-1 5G/4G i MTHFR C677T. Cilj ovog rada bio je vrednovati analitički sustav LightCycler® PRO validacijom analitičkih karakteristika mjernih postupaka genotipizacije FV G1691A, PAI-1 5G/4G i MTHFR C677T metodom lančane reakcije polimeraze uz analizu krivulje taljenja na sustavu prije korištenja u rutinskom radu. Rezultati validacije mogu utjecati na daljnju kliničku primjenu poboljšanjem:

- pouzdanosti rezultata: Visoka osjetljivost i specifičnost omogućuju pouzdano korištenje ovih metoda u kliničkoj praksi za precizno genotipiziranje pacijenata
- brzine dijagnostike: Validacija olakšava rano otkrivanje osoba s visokim rizikom za trombozu, što poboljšava prevenciju i upravljanje rizikom kod osjetljivih skupina

- podrške personaliziranoj terapiji: Omogućuje prilagodbu terapije (antikoagulansi, profilaksa u trudnoći) za nositelje genetskih polimorfizama povezanih s trombozom
- implementacije: Uspješna validacija na LightCycler® PRO uređaju omogućuje pouzdanu primjenu novih metoda u rutinskoj laboratorijskoj praksi

Ispitani su analitička nepreciznost, analitička osjetljivost, analitička specifičnost, analitička netočnost, 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.

5. Zaključak

Rezultati validacije mjernih postupaka genotipizacije polimorfizama FV G1691A (rs6025), MTHFR C677T (rs1801133) i PAI-1 4G/5G (rs1799768) na analitičkom sustavu LightCycler® PRO (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska) u potpunosti su zadovoljili unaprijed definirane analitičke kriterije kvalitete. Ispitani mjerni postupci mogu se uvesti u rutinski rad u kliničkoj praksi za precizno genotipiziranje pacijenata.

6. Popis kratica, oznaka i simbola

VTE	venski tromboembolizam
APC	aktivirani protein C
AT	antitrombin
FRET	fluorescencijski rezonantni prijenos energije
FVL	faktor V Leiden
DVT	duboka venska tromboza
PE	plućna embolija
DOAK	direktni oralni antikoagulansi
APCR	aktivirani protein C rezistencija
APTV	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
MTHFR	metilentetrahidrofolat reduktaza
MS	metionin sintetaza
SAM	S-adenozil metionin
SAH	S-adenozil homocistein
PAI-1	inhibitor aktivatora plazminogena - 1
PCR	lančana reakcija polimeraze
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
RNA	ribonukleinska kiselina
dNTP	deoksiribonukleozid-trifosfat
A260	apsorbancija na valnoj duljini 260 nm
A280	apsorbancija na valnoj duljini 280 nm
A230	apsorbancija na valnoj duljini 230 nm
T _m	temperatura taljenja
WT	divlji genotip
MT	mutirani genotip
HT	heterozigotni genotip
SP	stvarno pozitivan
SN	stvarno negativan
LP	lažno pozitivan
LN	lažno negativan
κ	<i>kappa</i> koeficijent

7. Literatura

APCR assays, https://practical-haemostasis.com/Thrombophilia/apcr_assays, pristupljeno 7.10.2024.

Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes (Basel)*. 2022, 13(12).

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.

Campello E, Spiezia L, Adamo A, Simioni P. Thrombophilia, risk factors and prevention. *Expert Review of Hematology*. 2019, 147-158.

Canene-Adams K. General PCR. *Laboratory Methods in Enzymology: DNA*. 2013, 291–298.

Chopard R, Albertsen IE, Piazza G. Diagnosis and Treatment of Lower Extremity Venous Thromboembolism A Review. *JAMA*. 2020, 324(17), 1765-1776.

Colling ME, Tourdot BE, Kanthi Y. Inflammation, Infection and Venous Thromboembolism. *Circulation Research*. 2021, 128, 2017-2036.

Dicks AB, Moussallem E, Stanbro M, Walls J, Gandhi S, Gray BH. A Comprehensive Review of Risk Factors and Thrombophilia Evaluation in Venous Thromboembolism. *J. Clin. Med*. 2024, 13, 362.

Erali M, Wittwer CT. High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods*. 2010, 50(4):250-61.

Fan S, Yang B, Zhi X, Wang Y, Zheng Q, Sun G. Combined genotype and haplotype distributions of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms: A cross-sectional descriptive study of 13,473 Chinese adult women. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(48).

Kearon C, Kahn SR. Long-term treatment of venous thromboembolism. *Blood*. 2020, 135(5), 317-325.

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

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

Lovričević I, Franjić BD, Tomičić M, Vrkić N, De Syo D, Hudorović N, Sonicki Z i Lončar R. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) 677 CT Genetic Polymorphism in 228 Croatian Volunteers. *Coll. Antropol.* 2004, 28, 2: 647–654.

Lutsey PL, Zakai NA. Epidemiology and prevention of venous thromboembolism. *Nature Reviews Cardiology*. 2023, 20, 248-262.

Mahanama A, Wilson-Davies E. Insight into PCR testing for surgeons. *Surgery (Oxf)*. 2021;39(11):759-768.

Middeldorp S, Nieuwlaat R, Baumann Kreuziger L, Coppens M, Houghton D, James AH, Lang E, Moll S, Myers T, Bhatt M, Chai-Adisaksopha C, Colunga-Lozano LE, Karam SG, Zhang Y, Wiercioch W, Schünemann HJ, Iorio A. American Society of Hematology 2023 guidelines for management of venous thromboembolism: thrombophilia testing. *Blood Adv*. 2023, 7(22), 7101-7138.

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.

Moore GW. Thrombophilia Screening: Not So Straightforward. *Semin Thromb Hemost*. 2024, 50, 1131–1152.

Optimizing PCR: Proven Tips and Troubleshooting Tricks, <https://www.the-scientist.com/optimizing-pcr-proven-tips-and-troubleshooting-tricks-71660>, pristupljeno 8.10.2024.

Pavlov M, Čelap I. Plasminogen activator inhibitor 1 in acute coronary syndromes. *Clinica Chimica Acta*. 2019, 41: 52-58.

Pastori D, Menichelli D, Valeriani E, et al. Factor V Leiden Thrombophilia. *GeneReviews*. 2024., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1368/>, pristupljeno 30.10.2024.

Rosing J, Govers-Riemslog JWP, Yukelson L i Tans G. Factor V Activation and Inactivation by Venom Proteases. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 2001, 31(3-6), 241–246.

Saračević A, Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada: Validacija i verifikacija metoda, Zagreb: Medicinska naklada, 2013, str. 7-20.

Selby R. No resistance to activated protein C resistance—but choose wisely. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2019, 17, 9, 1443 - 1445

Seo H, Oh H, Park H, Park M, Jang Y, Lee M. Contribution of dietary intakes of antioxidants to homocysteine-induced low density lipoprotein (LDL) oxidation in atherosclerotic patients. *Yonsei Med J*. 2010, 51(4):526-33.

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, 2721.

Stevens SM, Woller SC, Bauer KA, Kasthuri R, Cushman M, Streiff M, Lim W, Douketis JD. Guidance for the evaluation and treatment of hereditary and acquired thrombophilia. *J Thromb Thrombolysis*. 2016, 41 , 154–164.

Takhviji V, Zibara K, Maleki A, Azizi E, Hommayoun S, Tabatabaei M, Ahmadi SE, Soleymani M, Ghalesardi OK, Farokhian M, Davari A, Paridar P, Kalantari A, Khosravi A. A

case-control study on factor V Leiden: an independent, gender-dependent risk factor for venous thromboembolism. *Thromb J.* 2021, 19;19(1):74

Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M i suradnici. *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi.* Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 376-382.

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

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

Vukasović I. *Upravljanje kvalitetom u medicinskom laboratoriju, tumačenje zahtjeva u revidiranom upitniku za samoprocjenu.* Zagreb, Medicinska naklada, 2016, str. 73-88.

Wan L, Li Y, Zhang Z, Sun Z, He Y, Li R. Methylene tetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases. *Translational Psychiatry*, 2018, 8, 242.

Wittwer CT, Hemmert AC, Kent JO, Rejali NA. DNA melting analysis. *Mol Aspects Med.* 2024, 97:101268.

Yamashita Y, Morimoto T, Kimura T. Venous thromboembolism: Recent advancement and future perspective. *Journal of Cardiology.* 2022, 79, 79-89.

Yasar Yildiz S, Kuru P, Toksoy Oner E, Agirbasli E. Functional Stability of Plasminogen Activator Inhibitor-1. *The Scientific World Journal.* 2014, 858293.

Zaremska E, Ślusarczyk K, Wrzosek M. The Implication of a Polymorphism in the Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene in Homocysteine Metabolism and Related Civilisation Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 193.

8. Sažetak/Summary

8.1. Sažetak

Trombofilija je skup poremećaja koji povećavaju sklonost organizma stvaranju krvnih ugrušaka (tromba), što može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih komplikacija kao što su duboka venska tromboza i plućna embolija. Nasljedni rizični čimbenici uključuju genske polimorfizme faktor V Leiden (FV G1691A), PAI-1 5G/4G i MTHFR C677T. U Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice instaliran je novi analitički sustav LightCycler® PRO (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska) koji bi se koristio za genotipizaciju navedenih polimorfizama. Cilj ovog rada bio je vrednovati analitički sustav LightCycler® PRO validacijom analitičkih karakteristika mjernih postupaka genotipizacije FV G1619A, PAI-1 5G/4G i MTHFR C677T metodom lančane reakcije polimeraze uz analizu krivulje taljenja prije korištenja u rutinskom radu. Ispitani su analitička nepreciznost, analitička osjetljivost, analitička specifičnost, analitička netočnost, 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

Thrombophilia is a collection of disorders which increase an organism's tendency to form blood clots, which can lead to serious health complications like deep venous thrombosis and pulmonary embolism. Hereditary risk factors include gene polymorphisms for factor V Leiden (FV G1691A), PAI 5G/4G, and MTHFR C677T. New analytical system for genotyping aforementioned polymorphisms, LightCycler® PRO (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska), was installed in the Clinical Department of Chemistry University Hospital Center Sestre milosrdnice. This study aimed to evaluate new analytical system LightCycler® PRO by validating analytical characteristics of genotyping polymorphisms FV G1691A, PAI-1 5G/4G, and MTHFR C677T using real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis. Analytical imprecision, analytical sensitivity, analytical specificity, analytical inaccuracy, repeatability using another method, and limit of detection were examined. All parameters fully met the pre-defined analytical quality criteria and therefore the evaluated methods can be accepted for routine work.

9. Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Klinički zavod za kemiju Kliničkog bolničkog centra
Sestre milosrdnice
Vinogradska cesta 29, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Vrednovanje sustava LightCycler® PRO System za genotipizaciju polimorfizama FV Leiden, MTHFR i PAI-1

Filip Markić

SAŽETAK

Trombofilija je skup poremećaja koji povećavaju sklonost organizma stvaranju krvnih ugrušaka (tromba), što može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih komplikacija kao što su duboka venska tromboza i plućna embolija. Nasljedni rizični čimbenici uključuju genske polimorfizme faktor V Leiden (FV G1691A), PAI-1 5G/4G i MTHFR C677T. U Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice instaliran je novi analitički sustav LightCycler® PRO (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska) koji bi se koristio za genotipizaciju navedenih polimorfizama. Cilj ovog rada bio je vrednovati analitički sustav LightCycler® PRO validacijom analitičkih karakteristika mjernih postupaka genotipizacije FV G1691A, PAI-1 5G/4G i MTHFR C677T metodom lančane reakcije polimeraze uz analizu krivulje taljenja prije korištenja u rutinskom radu. Ispitani su analitička nepreciznost, analitička osjetljivost, analitička specifičnost, analitička netočnost, 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: 47 stranica, 7 grafičkih prikaza, 18 tablica i 39 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Factor V Leiden, MTHFR, PAI-1, LightCycler® PRO, genotipizacija polimorfizama

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

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

Dr. sc. Anita Somborac Bačura, *izvanredna profesorica* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

Rad prihvaćen: studeni 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
The Clinical Institute for Chemistry of the Clinical Hospital Center Sestre
milosrdnice
Vinogradska cesta 29, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

Evaluation of the LightCycler® PRO System for genotyping FV Leiden, MTHFR and PAI-1 polymorphisms

Filip Markić

SUMMARY

Thrombophilia is a collection of disorders which increase an organism's tendency to form blood clots, which can lead to serious health complications like deep venous thrombosis and pulmonary embolism. Hereditary risk factors include gene polymorphisms for factor V Leiden (FV G1691A), PAI 5G/4G, and MTHFR C677T. New analytical system for genotyping aforementioned polymorphisms, LightCycler® PRO (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska), was installed in the Clinical Department of Chemistry University Hospital Center Sestre milosrdnice. This study aimed to evaluate new analytical system LightCycler® PRO by validating analytical characteristics of genotyping polymorphisms FV G1691A, PAI-1 5G/4G, and MTHFR C677T using real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis. Analytical imprecision, analytical sensitivity, analytical specificity, analytical inaccuracy, repeatability using another method, and limit of detection were examined. All 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: 47 pages, 7 graphics, 18 tables and 39 references. The original is in Croatian language.

Keywords: Factor V Leiden, MTHFR, PAI-1, LightCycler® PRO, polymorphism genotyping

Mentor: **Mario Štefanović, PhD**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Mario Štefanović, PhD**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Anita Somborac Bačura, PhD, *Associate Profesor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ivana Čelap, PhD, *Assistant Profesor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2024.