

Vpliv polimorfizmov v genih za alfa in beta fibrinogen na raven fibrinogena v plazmi*

The influence of alpha and beta fibrinogen genes' polymorphisms on plasma fibrinogen level*

Lili Steblovnik**

Ključne besede
fibrinogen – kri – genetika
polimorfizem (genetika)
polimerazna verižna reakcija

Key words
fibrinogen – blood – genetics
polymorphism (genetics)
polymerase chain reaction

Izvleček. Zvišana koncentracija fibrinogena v plazmi je dejavnik tveganja za srčnožilne bolezni. Na koncentracijo fibrinogena v plazmi vplivajo poleg starosti, sladkorne bolezni, arterijske hipertenzije, kajenja in zvišane koncentracije holesterola v plazmi tudi genetski dejavniki. Raziskave o vplivu polimorfizmov *TaqI*, *HaeIII* in *BclI* v genih za fibrinogen na koncentracijo fibrinogena v plazmi so pokazale nasprotujoče si rezultate. Preveriti smo želeli hipotezo, da polimorfizmi *TaqI*, *HaeIII* in *BclI* v genih za fibrinogen vplivajo na koncentracijo fibrinogena v plazmi pri zdravih prebivalcih Slovenije. V presečno raziskavo smo vključili 143 zdravih prostovoljcev. V vzorcih krvne plazme smo s koagulacijsko metodo določili koncentracijo fibrinogena. Z metodo verižne polimerazne reakcije in s cepljenjem z restrikcijskimi encimi *TaqI*, *HaeIII* in *BclI* smo v vzorcih izolirane DNA določili polimorfizme. Podatke smo statistično obdelali s Studentovim t-testom, analizo variance, testom hi-kvadrat in multiplo regresijo. Povprečna koncentracija fibrinogena v vzorcu je bila 2,78 g/l (95 % interval zaupanja 2,65–2,92 g/l), pri kadilcih višja kot pri nekadilcih (statistično nepomembno; $p = 0,40$). Povezanosti polimorfizma *TaqI* in koncentracije fibrinogena v plazmi nismo ugotovili. Na koncentracijo fibrinogena v plazmi sta pomembno vplivala polimorfizma *HaeIII* ($p = 0,04$) in *BclI* ($p = 0,04$) pri nekadilcih. Polimorfizem *HaeIII* je prispeval 5 % variance fibrinogena ($p = 0,03$). Pri kadilcih vpliv polimorfizmov *HaeIII* in *BclI* na koncentracijo fibrinogena ni bil statistično pomemben.

Abstract. Elevated plasma fibrinogen concentration is a risk factor for cardiovascular diseases. In addition to several factors such as advanced age, diabetes mellitus, cardiovascular diseases, elevated plasma cholesterol and glucose, and smoking, also genetic factors have been shown to influence plasma fibrinogen level. Studies on influence of *TaqI*, *HaeIII* and *BclI* polymorphisms on plasma fibrinogen concentration have shown contradictory results. Therefore, the influence of *TaqI*, *HaeIII* and *BclI* polymorphisms on plasma fibrinogen concentration was investigated in healthy subjects from Slovenia. 143 healthy volunteers were included in the cross-sectional study. Fibrinogen values were determined with a clotting assay. Polymorphisms were detected by polymerase chain reaction and digestion with *TaqI*, *HaeIII* and *BclI* restriction enzymes. Statistical analysis was performed with Student's t-test, analysis of variance, chi-squared test and multiple regression analysis. In all individuals mean plasma fibrinogen concentration was 2.78 g/l (95 % confidence interval 2.65–2.92 g/l), in smokers higher than in non-smokers (not significant; $p = 0.40$). Polymorphism *TaqI* was not associated with plasma fibrinogen level. There was a significant association between plasma fibrinogen concentration and *HaeIII* ($p = 0.04$) and *BclI* ($p = 0.04$) polymorphisms in the group of non-smokers. 5 % of the plasma fibrinogen variance in non-smokers could be attributed to the *HaeIII* polymorphism ($p = 0.03$). In smokers, there was no association between *HaeIII* and *BclI* polymorphisms and plasma fibrinogen level.

*Objavljeno delo je bilo nagrajeno s Prešernovo nagrado za študente v letu 1997.

**Lili Steblovnik, abs. med., Oddelek za medicinsko genetiko, Ginekološka klinika, Klinični center, 1525 Ljubljana.

Uvod

Fibrinogen je krvna beljakovina in ga poznamo predvsem kot dejavnik koagulacije. Trombin ga encimsko pretvarja v fibrin, glavno sestavino krvnih strdkov (1). Fibrinogen v visokih koncentracijah spodbuja zlepljanje trombocitov (2) in zaradi svojih reoloških lastnosti v veliki meri prispeva k viskoznosti krvi. V plazmi je običajno v koncentraciji od 2 do 3 g/l (3).

Prospektivne raziskave so pokazale, da je koncentracija fibrinogena v krvi, višja od 3,5 g/l, močan, neodvisen dejavnik tveganja za srčni infarkt in možgansko kap (4, 5). Fibrinogen ima pomembno vlogo tudi pri nastanku venskih tromboz (6). Zapleti srčnožilnih bolezni pa so pri bolnikih z višjimi koncentracijami fibrinogena pogostejši (7).

Na koncentracijo fibrinogena v plazmi vpliva več dejavnikov. Koncentracija se zviša kot odgovor na vnetje in poškodbo, ob uporabi hormonske kontracepcije, med nosečnostjo in po menopavzi, zvišuje pa se tudi s starostjo (8–11). Pri ljudeh s hiperlipidemijo (12–14), sladkorno boleznijo ali arterijsko hipertenzijo (15) opazamo višje koncentracije fibrinogena v plazmi kot pri zdravih ljudeh. Kajenje kot dejavnik okolja močno zvišuje koncentracijo fibrinogena (16). Zmerno uživanje alkoholnih pijač pa koncentracijo fibrinogena znižuje (9–11).

Koncentracija fibrinogena v plazmi je tudi genetsko določena (17). Vendar še ni popolnoma jasno, kako na koncentracijo fibrinogena v plazmi vplivajo razlike v strukturi genov za fibrinogen – polimorfizmi. Zapis za molekulo fibrinogena je v treh genih. V območju le-teh je opisanih nekaj polimorfizmov, ki bi zaradi svoje lege lahko pomembno vplivali na razlike v koncentraciji fibrinogena med posamezniki. Vendar so raziskave morebitnega vpliva pokazale nasprotujoče si rezultate. V raziskavah na prebivalcih Anglije in Švedske (18–20) so opisali pomembno višje koncentracije fibrinogena v plazmi pri ljudeh, ki so nosilci alelov tveganja v genih za fibrinogen. Aleli z večjim tveganjem naj bi bili alel T1 polimorfizma *TaqI*, alel A polimorfizma *HaeIII* in alel B2 polimorfizma *BclI*. Povezave med koncentracijo fibrinogena v plazmi in naštetimi polimorfizmi v genih pa pri norveški in irski raziskavi niso mogli potrditi (21, 22).

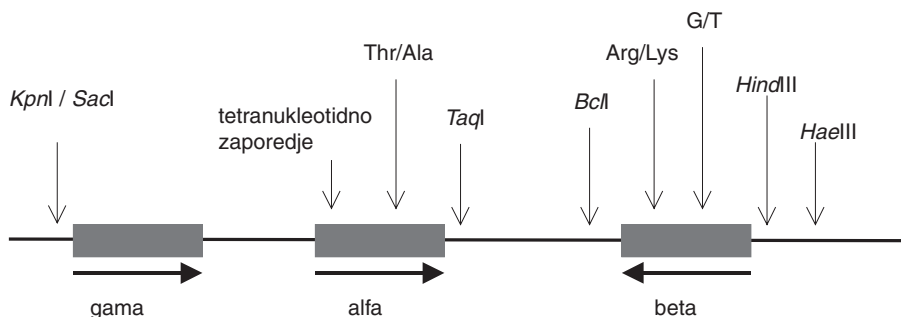
Molekularna genetika fibrinogena

Človeški fibrinogen je glikoprotein, sestavljen iz treh parov strukturno različnih polipeptidnih verig – $A\alpha$, $B\beta$ in γ . Vsaka polipeptidna veriga ima zapis v svojem genu (alfa, beta in gama gen), ti pa se nahajajo v okoli 50 kb veliki gruči, na dolgi ročici 4. kromosoma (23).

V območju genov za fibrinogen je znanih več polimorfizmov (slika 1) (24, 25). Nekateri naj bi vplivali na sintezo fibrinogena in s tem na njegovo koncentracijo v plazmi.

Polimorfizem *TaqI* najdemo v območju gena za verigo $A\alpha$ fibrinogena. Označuje ga cepilno mesto za encim *TaqI*. Opisali so vpliv polimorfizma *TaqI* na koncentracijo fibrinogena v plazmi (26), vendar vpliva v vseh raziskavah niso mogli potrditi (22).

Polimorfizem *HaeIII* se nahaja v promotorskem delu gena za verigo $B\beta$ fibrinogena. Je točkovna mutacija, zamenjava adenina za gvanin na mestu –445 od začetka gena beta. Določimo ga lahko z encimsko cepitvijo z encimom *HaeIII* (27). Sinteza verige $B\beta$ fibrinogena



Slika 1. Shematičen prikaz polimorfizmov v območju alfa, beta in gama genov za fibrinogen. Polimorfizme označujejo cepilna mesta za restrikcijske encime (*KpnI/SacI*, *TaqI*, *BclI*, *HindIII* in *HaeIII*), zamenjave aminokislin (*Thr/Ala*, *Arg/Lys*), tetranukleotidno zaporedje in točkovna mutacija *G/T* (zamenjava gvanina za timin).

naj bi bila regulatorna stopnja pri sintezi celega fibrinogena, zato predpostavljamo, da ima polimorfizem vlogo pri določanju koncentracije fibrinogena v plazmi.

V območju gena beta je tudi polimorfizem *BclI*. Označuje ga cepilno mesto za encim *BclI*. V raziskavi na prebivalcih Anglije (18) so ugotovili močan vpliv na koncentracijo fibrinogena v plazmi, česar pa pri Norvežanih niso mogli potrditi (22). Več alelov B2 so odkrili pri bolnikih v primerjavi s kontrolno skupino v raziskavi o periferni arterijski bolezni (28).

Namen naloge

Preveriti smo želeli hipotezo, da polimorfizmi *HaeIII* in *BclI* (gen za verigo B β fibrinogena) in *TaqI* (gen za verigo A α fibrinogena) pomembno vplivajo na koncentracijo fibrinogena v plazmi pri zdravih prebivalcih Slovenije.

Metode

Preiskovanci

V raziskavo smo zajeli 143 zdravih prostovoljcev iz Slovenije, ki si niso bili v sorodu. Preiskovanci so bili zdravstveni delavci, študentje medicine in njihovi znanci. Stari so bili od 20 do 60 let (povprečno 39,5 let). 61 preiskovancev je bilo moškega spola in 82 ženskega. V anamnezi niso imeli bolezni, za katere je znano, da vplivajo na koncentracijo fibrinogena v plazmi (sladkorna bolezen, srčnožilne bolezni). V zadnjem mesecu dni pred vključitvijo v raziskavo nihče od preiskovancev ni bil poškodovan in nihče ni jemal zdravil. V času odvzema krvi nobena od žensk ni bila noseča, nobena ni jemala hormonskih kontracepcijskih sredstev ali hormonskih nadomestnih zdravil. Ob vključitvi v raziskavo smo jim izmerili višino in telesno maso in izračunali indeks telesne mase (BMI) po enačbi $BMI = \text{telesna masa (kg)} / (\text{telesna višina})^2 \text{ (m}^2\text{)}$. Zabeležili smo tudi kadilske navade preiskovancev: 57 je bilo kadilcev, 78 nekadilcev in 8 bivših kadilcev. Bivše

kadilce smo uvrstili v skupino nekadilcev, ker so abstinirali tri mesece pred odvzemu krvi.

Prostovoljci so pisno privolili k sodelovanju. Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravstvo Republike Slovenije.

Odvzem krvi

Preiskovancem smo odvzeli kri med pol osmo in deveto uro zjutraj, potem ko so 20 minut počivali v sedečem položaju. Preiskovanci so bili tešči in vsaj 24 ur niso pili alkoholnih pijač. Kri smo odvzeli iz komolčne vene, s čim krajšim zažemom nadlahti.

Za biokemične preiskave smo odvzeli 10 ml krvi v epruveto brez dodatkov. Z 10-minutnim centrifugiranjem vzorca pri sobni temperaturi smo pripravili serum. Krvne maščobe in krvni sladkor smo določili iz svežega seruma.

Za določitev fibrinogena smo odvzeli 9 ml krvi v ohlajeno, vakuumsko, silikonizirano, stekleno epruveto z dodatkom 0,13 mol/l natrijevega citrata. Do centrifugiranja smo epruvete s krvjo hranili v ledeni kopeli. Največ eno uro po odvzemu smo pripravili plazmo s centrifugiranjem citrirane krvi 30 minut pri 2000 × g in temperaturi 4°C. Plazmo smo odpi-petirali v manjše plastične epruvete in jo do laboratorijskega testiranja shranili pri -70°C.

Za izolacijo DNA smo odvzeli 5 ml krvi v vakuumsko epruveto s K₃-EDTA (Becton Dickinson, Vacutainer System Europe). Vzorec smo z obračanjem epruvete dobro premešali z antikoagulantom in ga do obdelave shranili na -70°C.

Biokemične preiskave

Koncentracijo glukoze v krvi smo določili z encimsko metodo, z reagenti proizvajalca Dialab (Dunaj, Avstrija). Glukoza v serumu se je ob dodatku heksokinaze in adenzin-5-trifosfata (ATP) pretvorila v glukoza-6-fosfat. Ta je nato dehidrogeniral z glukoza-6-fosfatno dehidrogenazo ob prisotnosti nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD). Ob tem se je spremenila absorbanca vzorca, ki smo jo merili pri 340 nm (29).

Celotni holesterol smo določali z encimsko metodo. Uporabili smo reagente proizvajalca Dialab (Dunaj, Avstrija). Holesterolne estre v vzorcih in standardu smo s holesterolno esterazo hidrolizirali v prosti holesterol in maščobne kisline. Nato smo prosti holesterol oksidirali s holesterolno oksidazo. Nastali vodikov peroksid je v prisotnosti peroksida-ze in fenola oksidiral 4-aminofenazon v obarvano spojino, katere absorbanco smo merili pri 500 nm (30).

Določanje koncentracije fibrinogena v plazmi

Koncentracijo fibrinogena v vzorcih plazem smo določali z modificirano metodo po Clausu (31) s tovarniško pripravljenimi reagenti (Multifibren U, Behring, Nemčija). Plazmo smo segreli na 37°C in jo koagulirali s presežkom trombina. Koagulacijski čas, ki smo ga merili, je bil odvisen od koncentracije fibrinogena v vzorcu.

Koagulacijski čas smo merili s koagulacijskim aparatom (Fibrintimer, Behring, Nemčija). Aparat smo umerili s kontrolnima plazmama z znanima koncentracijama fibrinogena

(Plazma P in N, Behring, Nemčija) in s štirimi standardi (koncentracije fibrinogena 1,1 g/l; 2,4 g/l; 3,5 g/l in 5,0 g/l; Behring, Nemčija).

Izolacija DNA iz krvi

DNA smo izolirali s tovarniško pripravljenimi reagenti (Wizard™ Genomic DNA Purification Kit, Promega, ZDA). Vzorcju krvi smo z dodajanjem reagentov razgradili celične in jedrne membrane ter ribonukleinske kisline. S precipitacijo smo odstranili beljakovine in z etanolom oborili DNA. DNA smo nato na zraku posušili in jo raztopili v tovarniško pripravljenem topilu.

Koncentracijo izolirane DNA smo določali s spektrofotometrom pri valovni dolžini svetlobe 260 nm. Upoštevali smo, da ekstinkcija $A_{260} = 1$ ustreza koncentraciji DNA 50 ng/ μ l (32).

Določanje polimorfizmov

Polimorfizme v genih za fibrinogen smo določili z encimskim cepljenjem delov DNA, ki smo jih pred tem pomnožili z verižno polimerazno reakcijo.

Pomnoževanje delov DNA z verižno polimerazno reakcijo

Verižna polimerazna reakcija (*PCR – polymerase chain reaction*) je postopek, pri katerem s pomočjo spreminjanja temperatur in z encimom Taq polimerazo v ugodnih pogojih pomnožimo želeni del DNA med dvema začetnima oligonukleotidoma. Ugodne pogoje zagotavlja primerno razmerje vzorčne DNA, obeh začetnih oligonukleotidov, deoksinukleotidtrifosfatov (dNTP) in magnezijevih ionov v pufri. Reakcija ima tri faze, ki se glede na količino želenega produkta večkrat ponovijo (običajno od 25- do 30-krat). V prvi fazi pri visoki temperaturi poteka denaturacija vzorčne DNA. V drugi fazi temperaturo znižamo, da se na željena mesta vzorčne DNA pripnejo začetni oligonukleotidi. Le-ti v tretji fazi predstavljajo osnovo za podaljševanje z encimom polimerazo. Tako iz majhne količine osnovne DNA dobimo 2^n kopij želenega odseka (n je število ponovitev ciklov).

Verižna polimerazna reakcija je potekala v grelnem bloku (PTC-200, MJ Research, ZDA).

Za 25 μ l reakcijske mešanice smo uporabili:

- 50 ng DNA,
- 2,5 μ l 0,2 mM dNTP (dNTP mix, Gibco BRL, New York, ZDA),
- 1,25 μ l 0,5 mM obeh začetnih oligonukleotidov (Gibco BRL, New York, ZDA),
- 0,75 μ l 1,5 mM $MgCl_2$ (Gibco BRL, New York, ZDA),
- 2,5 μ l 1 \times PCR-pufra (Gibco BRL, New York, ZDA),
- 1 enoto Taq polimeraze (Gibco BRL, New York, ZDA) in
- dopolnili do 25 μ l z bidestilirano vodo.

Pomnoževali smo tri odseke DNA. Za vsakega smo uporabili drugačen protokol (tabela 1) in različna zaporedja začetnih oligonukleotidov (27). Za pomnoževanje dela DNA na α -verigi gena za fibrinogen smo uporabili naslednji zaporedji začetnih oligonukleotidov:

TaqI-R: 5'-AGC CGT GCC TAT CTT TG-3',

TaqI-F: 5'-TGT CTC AGG TAC ATT TAG C-3'.

Zaporedja začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje odsekov DNA na β -verigi gena za fibrinogen pa so bila:

Bcl-R: 5'-ACC TGG TTT CTC TGC CAC AAG-3',

Bcl-F: 5'-AAT AGT TCT CAT ACC ACA GTG T-3',

*Hae*III-R: 5'-AAG AAT TTG GGA ATG CAA TCT CTG CTA CCT-3',

*Hae*III-F: 5'-CTC CTC ATT GTC GTT GAC ACC TTG GGA C-3'.

Tabela 1. Temperaturni protokoli verižne polimerazne reakcije za tri različne polimorfizme. ZD – začetna denaturacija, D – denaturacija, P – pripenjanje, PD – podaljševanje in KP – končno podaljševanje.

	veriga α (<i>Taq</i> I)			veriga β (<i>Hae</i> III)			veriga β (<i>Bcl</i> I)		
ZD	1 x	95°C	5 min	1 x	95°C	7 min	1 x	95°C	7 min
D	36 x	95°C	1 min	36 x	95°C	1 min	37 x	95°C	1 min
P		55°C	1 min		60°C	1 min		62°C	1 min
PD		72°C	1 min		72°C	1 min		72°C	1,5 min
KP	1 x	72°C	2 min	1 x	72°C	5 min	1 x	72°C	5 min

Cepljenje PCR-produktov s pomočjo restrikcijskih encimov

Za cepljenje z encimom *Hae*III smo 18 μ l PCR-produkta dodali 2 μ l pufru (REACT[®]2, Gibco BRL, New York, ZDA) in 10 enot encima *Hae*III (Gibco BRL, New York, ZDA). Vzorce smo inkubirali čez noč pri 37°C.

Za cepljenje z *Bcl*I smo 18 μ l PCR produkta dodali 2 μ l pufru (REACT[®]2, Gibco BRL, New York, ZDA) in 5 enot encima *Bcl*I (Gibco BRL, New York, ZDA) in zmes 3 ure inkubirali pri 50°C.

Za cepljenje s *Taq*I smo 18 μ l PCR produkta dodali 2 μ l pufru (REACT[®]2, Gibco BRL, New York, ZDA), 2 μ l govejega serumskega albumina (Acetylated BSA, Promega, ZDA) in 1–2 enoti encima *Taq*I (Gibco BRL, New York, ZDA). Zmes smo inkubirali pri 65°C 1 uro in 30 minut.

Analiza produktov

Produktom verižne polimerazne reakcije in cepitve z encimi smo dodali po 3 μ l barvila bromofenol modro in jih ločili z elektroforezo na 2% agaroznem gelu, ki je vseboval etidijev bromid.

Elektroforetska ločba je tekla 2 uri pri napetosti 60 V. Gel smo nato presvetlili na UV-transiluminatorju. V strukturo dvojnovijačne molekule DNA vrinjen etidijev bromid je ob presvetlitvi z UV-svetlobo fluoresciral. Velikost fragmentov smo določili s primerjanjem z ustreznim dolžinskim standardom (Φ X174 RF DNA/*Hae*III Fragments, Gibco BRL, New York, ZDA). Gel smo fotografirali in s pomočjo elektronskega čitalca spravili v obliko računalniškega zapisa.

Statistične metode

Spremenljivke, ki so se razporejale normalno (BMI), smo izrazili z aritmetično sredino s 95 % intervalom zaupanja. Razporeditev ostalih spremenljivk (koncentracije fibrinogena, holesterola in glukoze v plazmi) smo normalizirali z logaritmiranjem, vrednosti pa prikazali kot antilogaritmirane aritmetične sredine s 95 % intervalom zaupanja.

Povezavo koncentracije fibrinogena z ostalimi spremenljivkami smo ocenili s Pearsonovim korelacijskim koeficientom. Razlike v spremenljivkah med skupinama kadilcev in nekadilcev smo analizirali s Studentovim t-testom. Z analizo variance smo prikazali razlike v koncentraciji fibrinogena med posameznimi genotipi. Vpliv presnovnih spremenljivk in genotipov na koncentracijo fibrinogena v plazmi pa smo vrednotili z modelom multiple regresije.

Frekvence alelov smo določili s štetjem. S testom hi-kvadrat smo analizirali odstopanje števila opazovanih genotipov od pričakovanega števila. Pričakovano število smo izračunali s predpostavko, da so genotipi v Hardy-Weinbergovem ravnovesju.

Pri preizkušanju domnev smo kot statistično pomembno upoštevali vrednost p , manjšo od 0,05. Statistično analizo smo naredili s pomočjo računalniškega programa (Statistica, ver. 4.5A, Stat Soft Inc. 1993, ZDA).

Rezultati

Osnovne značilnosti preiskovancev

Osnovne značilnosti preiskovancev so prikazane v tabeli 2. Povprečna vrednost fibrinogena v plazmi za vse preiskovance je bila 2,78 g/l. Koncentracija fibrinogena se je spreminjala s starostjo, z BMI ter s koncentracijama holesterola in glukoze (tabela 3). Med spoloma ni bilo statistično pomembnih razlik v koncentraciji fibrinogena ($p = 0,37$). Koncentracija fibrinogena je bila pri kadilcih višja kot pri nekadilcih, vendar ne statistično pomembno. Dosedanje raziskave so pokazale pomemben vpliv kajenja na koncentracijo fibrinogena v plazmi, zato smo statistično obdelavo naredili posebej pri nekadilcih in kadilcih.

Tabela 2. Osnovne značilnosti preiskovancev (srednje vrednosti s 95 % intervali zaupanja). N – število bolnikov, BMI – indeks telesne mase.

	Vsi N = 143	Nekadilci N = 86	Kadilci N = 57	p
Fibrinogen (g/l)	2,78 2,65–2,92	2,73 2,57–2,91	2,86 2,63–3,10	0,40
Starost (leta)	39,5 37,7–41,3	41,7 39,4–44,2	36,1 33,5–38,7	<0,01
BMI (kg/m²)	25,2 24,5–25,8	25,5 24,7–26,4	24,5 23,4–25,5	0,10
Holesterol (mmol/l)	5,08 4,89–5,28	5,27 5,02–5,53	4,82 4,54–5,13	0,02
Glukoza (mmol/l)	4,99 4,87–5,10	5,18 5,01–5,34	4,72 4,57–4,86	<0,01

Tabela 3. Korelacijski koeficienti po Pearsonu za povezave med koncentracijo fibrinogena v plazmi in ostalimi spremenljivkami. *N* – število bolnikov, *BMI* – indeks telesne mase.

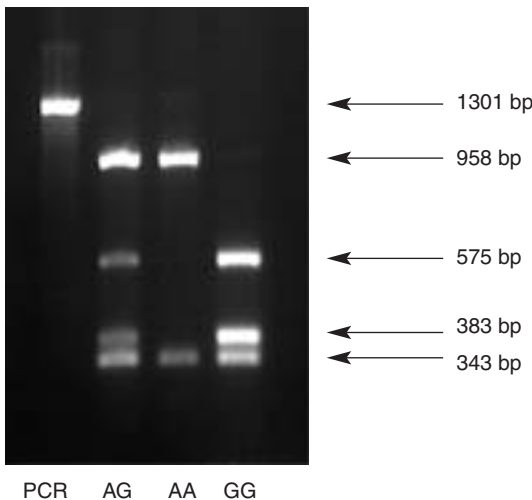
	Vsi N = 143	Nekadilci N = 86	Kadilci N = 57
Starost (leta)	0,22*	0,31*	0,17
BMI (kg/m ²)	0,33*	0,41*	0,26
Holesterol (mmol/l)	0,25*	0,26*	0,29*
Glukoza (mmol/l)	0,28*	0,45*	0,10

* vrednosti so statistično značilne ($p < 0,05$)

Analiza polimorfizmov

Polimorfizem *HaeIII*

Pomnoževali smo 1301 baznih parov dolg del DNA, ki je poleg stalnega vključeval tudi spremenljivo cepilno mesto za encim *HaeIII*. Gvanin na spremenljivem mestu (alel G) je povzročil dvakratno cepljenje dela DNA z encimom *HaeIII*. Če je bil na spremenljivem mestu namesto gvanina adenin (alel A), je prišlo do cepitve le na stalnem cepilnem mestu (slika 2). Glede na število in razporeditev fragmentov DNA, ki smo jih prikazali z elektroforetsko ločbo, smo določili genotipe (tabela 4). Izračunali smo, da se alel G pojavlja s frekvenco 0,74, alel A pa s frekvenco 0,26. Število posameznih genotipov smo primerjali z izračunanim pričakovanim številom in ugotovili popolno Hardy-Weinbergovo ravnovesje (tabela 4).



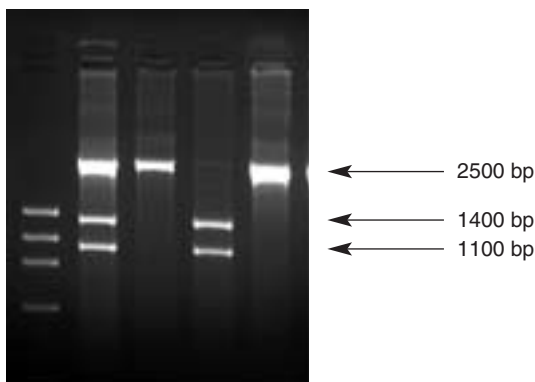
Slika 2. Elektroforetska ločba produktov cepitve pri polimorfizmu *HaeIII*. PCR – nerazgrajen, 1301 baznih parov dolg fragment PCR-produkta; AG, AA in GG – genotipi polimorfizma *HaeIII*, ki jih označujejo produkti cepitve različnih dolžin; bp – bazni pari.

Tabela 4. Primerjava opazovanega števila genotipov pri preiskovancih s pričakovanim številom genotipov po Hardy-Weinbergovem ravnovesju. $\chi^2 = 0,28$; ni statistično značilno. N – število bolnikov.

Genotip	Opazovano		Pričakovano	
	N	delež	N	delež
GG	79	0,55	78,3	0,55
AG	53	0,37	55	0,38
AA	11	0,08	9,6	0,07

Polimorfizem *BclI*

Za določitev polimorfizma *BclI* smo pomnoževali 2500 baznih parov dolg del DNA in ga nato cepili z encimom *BclI*. Alel B2 je vključeval cepilno mesto, alel B1 pa ne (slika 3). Frekvenca alela B1 je bila 0,78, alela B2 pa 0,22. Po primerjavi zastopanosti genotipov v vzorcu s pričakovanim številom smo ugotovili popolno Hardy-Weinbergovo ravnovesje (tabela 5).



ΦX B1B2 B1B1 B2B2 PCR

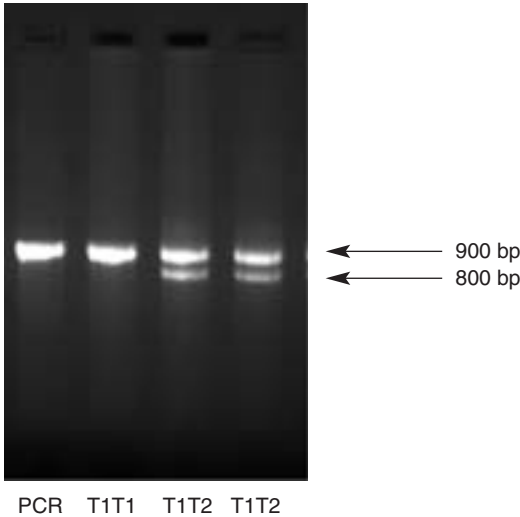
Slika 3. Elektroforetska ločba produktov cepitve pri polimorfizmu *BclI*. ΦX – dolžinski standard ΦX174; B1B2, B1B1 in B2B2 – genotipi polimorfizma *BclI*, ki jih označujejo produkti cepitve različnih dolžin; PCR – nerazgrajen produkt PCR; bp – bazni pari.

Tabela 5. Primerjava opazovanega števila genotipov pri preiskovancih s pričakovanim številom genotipov po Hardy-Weinbergovem ravnovesju. $\chi^2 = 2,06$; ni statistično značilno. N – število bolnikov.

Genotip	Opazovano		Pričakovano	
	N	delež	N	delež
B1B1	87	0,62	85,2	0,61
B1B2	43	0,31	48,0	0,34
B2B2	10	0,07	6,8	0,05

Polimorfizem *TaqI*

V območju alfa gena za fibrinogen smo določali polimorfizem *TaqI*. Z verižno polimerazno reakcijo smo pomnoževali 900 baznih parov dolg del DNA in ga nato cepili z encimom *TaqI* (slika 4). Alel T1 je bil s frekvenco 0,73 pogostejši, pri njem do cepitve ni prišlo. Alel T2, ki se je pojavljal s frekvenco 0,27, pa je označevalo cepilno mesto za encim *TaqI*. S primerjavo števila genotipov iz vzorca s pričakovanim številom smo potrdili Hardy-Weinbergovo ravnovesje (tabela 6).



PCR T1T1 T1T2 T1T2

Slika 4. Elektroforska ločba produktov cepitve pri polimorfizmu *TaqI*. PCR – produkt PCR; T1T1 in T1T2 – genotipa polimorfizma *TaqI*, ki ju označujejo produkti cepitve različnih dolžin (100 baznih parov dolg produkt pri genotipu T1T2 ni prikazan); bp – bazni pari. Genotip T2T2 označujeta produkta cepitve dolžin 800 in 100 baznih parov (ni prikazano).

Tabela 6. Primerjava opazovanega števila genotipov pri preiskovancih s pričakovanim številom genotipov po Hardy-Weinbergovem ravnovesju. $\chi^2 = 0,28$; ni statistično značilno. N – število bolnikov.

Genotip	Opazovano		Pričakovano	
	N	delež	N	delež
T1T1	80	0,56	76,2	0,54
T1T2	49	0,34	56,3	0,39
T2T2	14	0,10	10,4	0,07

Povezava med polimorfizmi in koncentracijo fibrinogena v plazmi

Polimorfizem *HaeIII*

Koncentracija fibrinogena se med genotipskimi skupinami vseh preiskovancev skupaj ni pomembno razlikovala (tabela 7). Tudi v skupini kadičev pomembnih razlik ni bilo. Pokazale

pa so se pri nekadilcih. Heterozigoti so imeli statistično pomembno višjo koncentracijo fibrinogena. Zaradi majhnega števila homozigotov AA in domnevne povezave alela A z višjimi koncentracijami fibrinogena (26) smo skupini heterozigotov in homozigotov AA združili v skupino z vsaj enim alelom A.

Tabela 7. Genotipske skupine polimorfizma *HaeIII* s srednjimi vrednostmi fibrinogena (g/l) s 95 % intervalom zaupanja. N – število bolnikov.

	GG	GA	AA	p
Vsi	2,69 2,51–2,88 N = 79	2,94 2,71–3,18 N = 53	2,75 2,32–3,28 N = 11	0,20
Kadilci	2,87 2,51–3,28 N = 28	2,80 2,49–3,16 N = 24	3,01 2,05–4,41 N = 5	0,89
Nekadilci	2,60 2,40–2,80 N = 51	3,05 2,73–3,40 N = 29	2,56 2,06–3,18 N = 6	0,04

Ugotovili smo, da je koncentracija fibrinogena pri nekadilcih v skupini z vsaj enim alelom A statistično pomembno višja kot v skupini homozigotov za alel G ($p = 0,03$). Kadilci so imeli višjo povprečno koncentracijo fibrinogena kot nekadilci, vendar med posameznimi genotipi v skupini kadilcev ni bilo opaznih razlik (slika 5).

Polimorfizem *BclI*

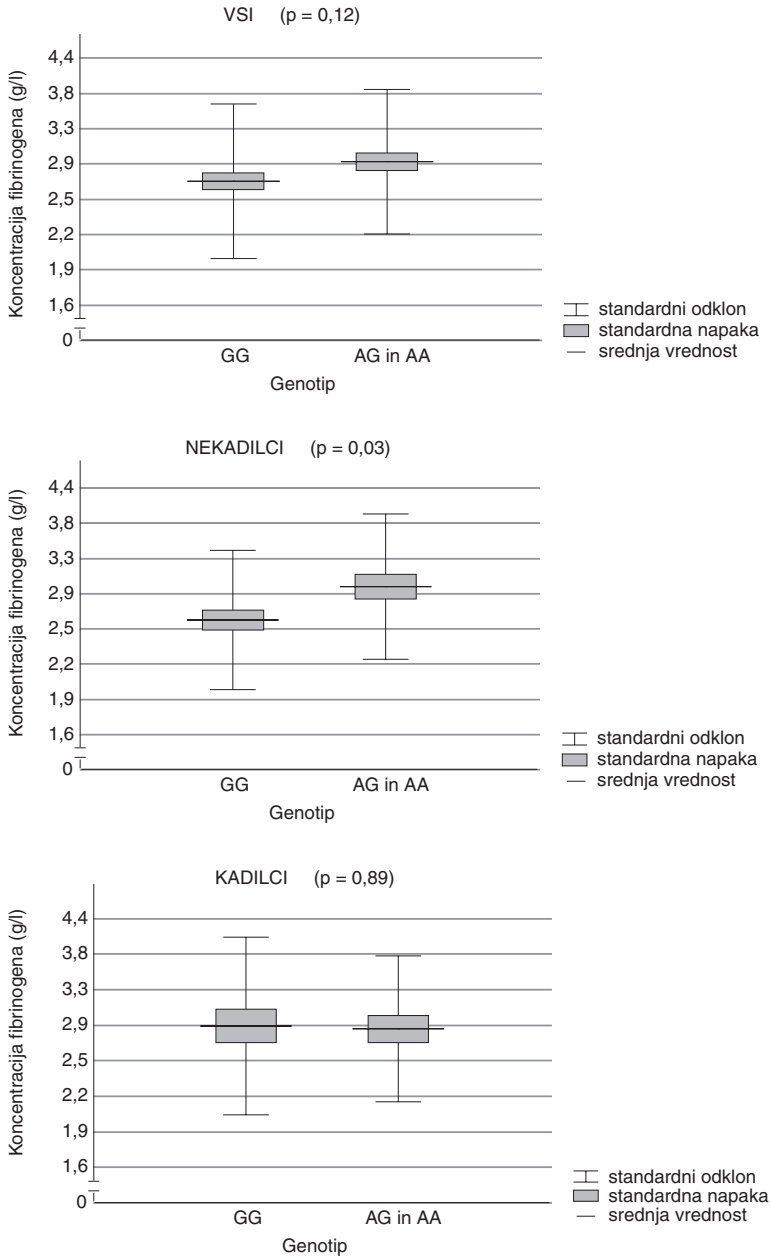
Pri vseh preiskovancih skupaj statistično pomembnih razlik v koncentraciji fibrinogena med genotipskimi skupinami ni bilo. Vendar pa so bile pomembne razlike v skupini nekadilcev. Statistično pomembno višjo povprečno vrednost fibrinogena so imeli heterozigoti (slika 6). V skupini kadilcev smo opazili najvišjo povprečno vrednost fibrinogena pri homozigotih za alel B2, ki pa ni bila statistično pomembna.

Polimorfizem *TaqI*

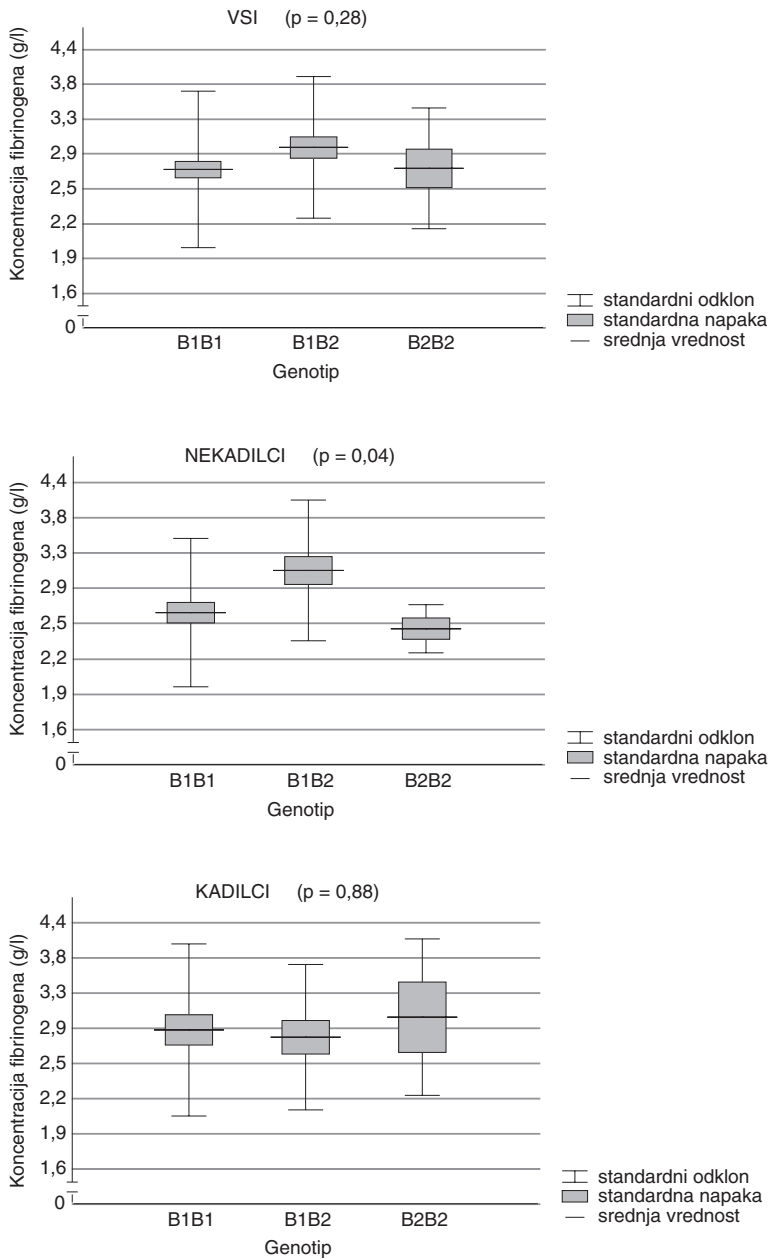
Skupina homozigotov za alel T2 pri vseh preiskovancih (pa tudi posebej pri kadilcih in nekadilcih) je imela nižjo koncentracijo fibrinogena v plazmi kot ostale genotipske skupine, vendar razlike niso bile statistično pomembne (slika 7).

Rezultati multiple regresije

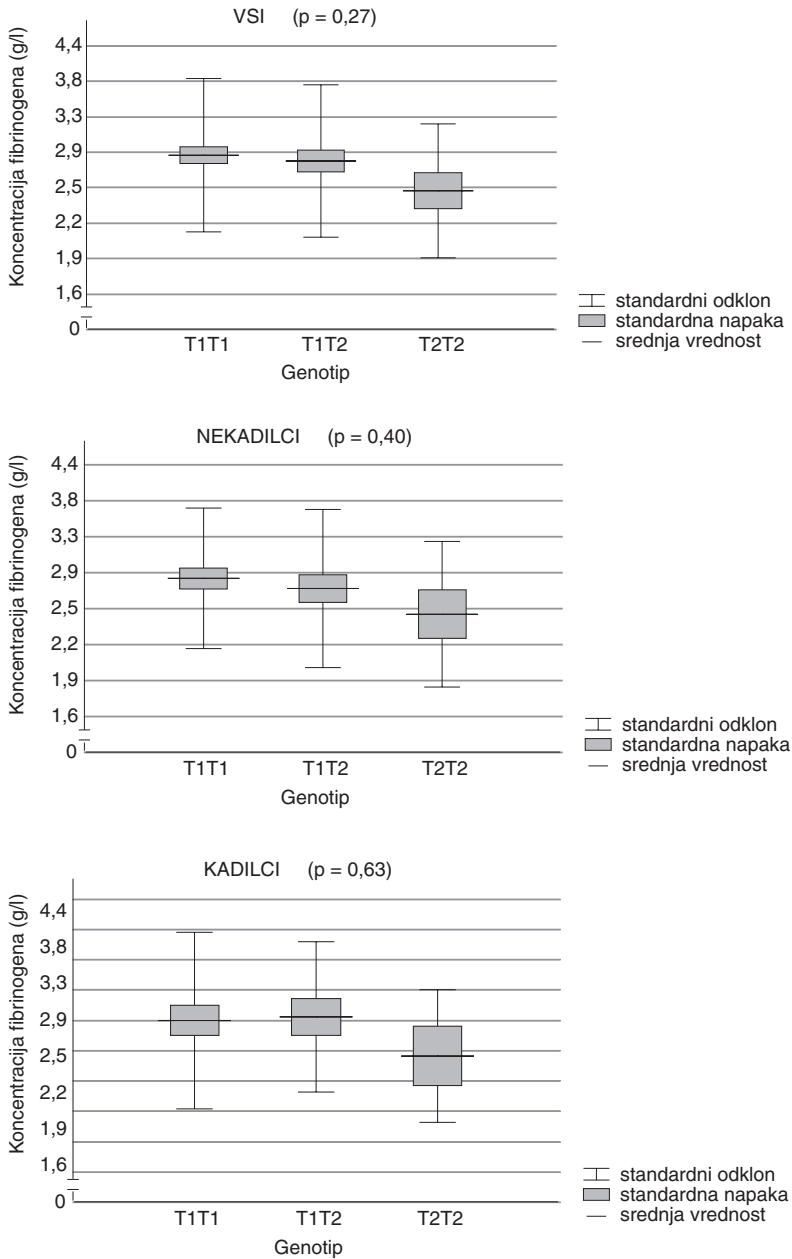
Koncentracija fibrinogena se je pri preiskovancih povezovala s starostjo, z BMI ter s koncentracijama holesterola in glukoze. Zato smo z modelom multiple regresije ocenili prispevek posameznih spremenljivk k variabilnosti fibrinogena. Kot odvisno spremenljivko smo vnesli koncentracijo fibrinogena, kot neodvisne pa tiste, ki so se pomembno povezovala s fibrinogenom v modelu linearne regresije (tabela 3).



Slika 5. Koncentracija fibrinogena v plazmi pri različnih genotipih polimorfizma HaeIII.



Slika 6. Koncentracija fibrinogena v plazmi pri različnih genotipih polimorfizma BclI.



Slika 7. Koncentracija fibrinogena v plazmi pri različnih genotipih polimorfizma TaqI.

V modelu multiple regresije so vse spremenljivke (starost, BMI, koncentraciji holesterola in glukoze, polimorfizmi *Haelll*, *Bcll* in *Taql*) skupaj razložile 15 % variance fibrinogena, od tega jih 11 % razloži samo BMI ($p = 0,01$). Polimorfizmi pri vseh preiskovancih skupaj niso vplivali na varianco fibrinogena.

V skupini nekadilcev so neodvisne spremenljivke (starost, BMI, koncentraciji holesterola in glukoze, polimorfizmi *Haelll*, *Bcll* in *Taql*) razložile kar 30 % variance, od tega 24 % BMI, starost in presnovne spremenljivke. Polimorfizem *Haelll* je v skupini nekadilcev razložil 5 % variance fibrinogena ($p = 0,03$), polimorfizma *Bcll* in *Taql* skupaj pa 3 % variance ($p = 0,20$).

Pri kadilcih je bila s koncentracijo fibrinogena povezana le koncentracija holesterola, ki je razložila 8 % variance fibrinogena.

Razpravljanje

Frekvence genotipov pri 143 preiskovancih so bile v Hardy-Weinbergovem ravnovesju. Niso se pomembno razlikovale od frekvenc pri prebivalcih drugih držav (18–22).

Pri vseh preiskovancih skupaj nismo ugotovili pomembne povezave med koncentracijo fibrinogena v plazmi in polimorfizmi *Haelll*, *Bcll* in *Taql*. Vendar pa je bila naša skupina preiskovancev sestavljena iz dveh podskupin: kadilcev in nekadilcev, ki sta se razlikovali v koncentraciji fibrinogena. Ugotovili smo, da je bila povprečna koncentracija fibrinogena v plazmi pri kadilcih višja kot pri nekadilcih. Kljub temu da razlika ni bila statistično pomembna, smo zaradi znanega vpliva kajenja (16) predpostavljali, da je kajenje vplivalo na koncentracijo fibrinogena v plazmi. Verjetno je izločanje fibrinogena iz hepatocitov zaradi aktivacije vnetnih mehanizmov, ki jo povzroči kajenje, pri kadilcih bolj stimulirano kot pri nekadilcih (33). Zdi se, da ta regulatorni mehanizem prevlada nad drugimi mehanizmi regulacije koncentracije fibrinogena. V prid tej domnevi so tudi naši rezultati, ki so pokazali, da so bile povezave med koncentracijo fibrinogena v plazmi in starostjo, BMI ter koncentracijo glukoze pri kadilcih šibkejše kot pri nekadilcih (tabela 2). Zato smo se odločili obravnavati vpliv polimorfizmov ločeno za obe podskupini preiskovancev. Izkazalo se je, da smo vpliv polimorfizmov lahko dokazali le pri nekadilcih, medtem ko pri kadilcih povezave med polimorfizmi in fibrinogenom niso bile pomembne.

Ugotovili smo, da je pri nekadilcih od vseh treh polimorfizmov na koncentracijo fibrinogena v plazmi najbolj vplival polimorfizem *Haelll*. Poleg pomembnega vpliva starosti, BMI in presnovnih spremenljivk, ki so skupaj razložile 24 % variance, je polimorfizem *Haelll* razložil 5 % variance fibrinogena. Podobne rezultate so prav tako pri nekadilcih dobili z raziskavo na prebivalcih Anglije (26). V raziskavi na Irskem (21) pa polimorfizem *Haelll* ni bil povezan z variacijami fibrinogena v populaciji.

Ugotovili smo tudi statistično pomembno višjo povprečno koncentracijo fibrinogena pri nekadilcih, heterozigotnih za polimorfizem *Bcll*. Vendar pa homozigoti za alel B2 niso imeli višjih koncentracij fibrinogena, kot bi pričakovali, če je alel B2 dejansko povezan z višjo koncentracijo fibrinogena. Število homozigotov B2 v naši študiji je bilo namreč bistveno manjše kot število homozigotov B1 in heterozigotov in tudi premajhno

za potrditev te predpostavke (tabela 5). Zato na podlagi naše študije ne moremo nedvomno trditi, da je pri prebivalcih Slovenije alel B2 povezan z višjo koncentracijo fibrinogena v plazmi. Potrebna bi bila raziskava večjega obsega, ki bi ugotovila, ali lahko v naši študiji ugotovljeno statistično pomembno razliko v koncentracijah fibrinogena pri genotipskih skupinah polimorfizma *Bcl* pripišemo alelu B2. To so ugotovili v raziskavi na prebivalcih Anglije, kjer je bila prisotnost alela B2 povezana z višjimi koncentracijami fibrinogena v plazmi (18). Njihovi rezultati so pokazali, da je ta polimorfizem prispeval 15% variance koncentracije fibrinogena. V nasprotju z omenjeno raziskavo v raziskavi na monozigotnih dvojčkih z Norveške niso ugotovili povezave med *Bcl* in koncentracijo fibrinogena (22), vendar pa preiskovancev niso ločili glede na kadilske navade. Zato je možno, da je kajenje zabilisalo vpliv polimorfizma.

Pri tretjem, polimorfizmu *TaqI*, statistično pomembnega vpliva polimorfizma na fibrinogen nismo ugotovili niti pri kadilcih niti pri nekadilcih. Naši rezultati so tako skladni z rezultati angleške (26) in norveške (22) raziskave. Kljub odsotnosti povezave med tem polimorfizmom in fibrinogenom v zgoraj navedenih raziskavah smo ta polimorfizem proučevali zaradi opisanega vpliva polimorfizma *TaqI* v povezavi s polimorfizmom *HaeIII* (26). V tej raziskavi so ugotovili, da imajo preiskovanci iz Anglije z genotipom T1T1/AA višjo koncentracijo fibrinogena kot sonarodnjaki z ostalimi genotipi. Vendar v naši raziskavi polimorfizem *TaqI* tudi v kombinaciji s polimorfizmom *HaeIII* ni vplival na koncentracijo fibrinogena (rezultati niso prikazani).

Mehanizmi vpliva polimorfizmov v genih za fibrinogen na koncentracijo fibrinogena še niso pojasnjeni. Predlaganih je več hipotez. Polimorfizem sam je lahko funkcionalna sprememba, ki vpliva na afiniteto jedrne beljakovine in s tem na uravnavanje prepisa gena (19). Tak mehanizem je najbolj verjeten za polimorfizem *HaeIII*, ki se nahaja v promotorskem delu gena beta. Ker sinteza B β -verige fibrinogena uravnava sintezo cele molekule fibrinogena (34), je vpliv tega polimorfizma na koncentracijo fibrinogena v plazmi razumljiv. Rezultati naše študije tak mehanizem dopuščajo.

Genetski polimorfizem je lahko tudi sprememba, ki nima funkcionalnega vpliva. Glede na rezultate naše in drugih raziskav (22, 26) je takšen polimorfizem *TaqI* v genu za fibrinogen $A\alpha$.

Genetski polimorfizem je lahko vzrok sinteze strukturno spremenjene verige fibrinogena. Zaradi takega polimorfizma lahko nastane fibrinogen, ki ima take lastnosti, da povečuje aterogeni potencial in s tem razvoj srčnožilnih bolezni. Pri tem pa koncentracija fibrinogena v plazmi ni nujno povišana. Na ta način razlagajo vpliv polimorfizma *Bcl* na razvoj srčnožilnih bolezni v nekaterih študijah, kjer so ugotovili pomembno pogostejše pojavljanje alela B2 pri bolnikih s temi boleznimi (28). Polimorfizem *Bcl*, ki pri prebivalcih Slovenije verjetno prispeva k razlikam v koncentraciji fibrinogena, bi lahko bil vzrok tudi za sintezo strukturno drugačnega fibrinogena. Zanimiva bi bila raziskava pojavljanja alelov polimorfizma *Bcl* pri bolnikih s srčnožilnimi boleznimi v primerjavi z zdravimi, ki bi razložila vlogo polimorfizma *Bcl* kot dejavnika tveganja za srčnožilne bolezni.

Na razvoj srčnožilnih bolezni vplivajo negenetski (kajenje, debelost, zvišani koncentraciji holesterola in glukoze v serumu) in genetski dejavniki. Oboji so povezani in možno

je, da s spreminjanjem negenetskih dejavnikov tveganja vplivamo na izražanje genetskih dejavnikov. Polimorfizmi genov za fibrinogen, kot eden izmed genetskih dejavnikov, predstavljajo kamenček v mozaiku patofiziologije srčnožilnih bolezni. Tako naša študija predstavlja osnovo za raziskave o vlogi genetskih dejavnikov pri razvoju srčnožilnih bolezni pri prebivalcih Slovenije.

Zaključki

Ugotovili smo, da polimorfizma *HaeIII* in *BclI* v genu za verigo B β fibrinogena pomembno vplivata na koncentracijo fibrinogena v plazmi zdravih prebivalcev Slovenije, ki ne kajajo. Polimorfizem *TaqI* v genu za verigo A α fibrinogena na koncentracijo fibrinogena v plazmi zdravih prebivalcev Slovenije ne vpliva.

Zahvala

Dr. Mojci Stegnar in dr. Borutu Peterlinu, ki sta kot mentorja krmarila moj čoln po divjih vodah raziskovanja, hvala za nasvete in pomoč.

Vsem, ki so življenje Laboratorija za molekularno genetiko, hvala za nepozabno leto.

Osebu Laboratorija kliničnega oddelka za angiologijo lepa hvala za pomoč.

Literatura

1. Henschen A, McDonagh J. Fibrinogen, fibrin and factor XIII. In: Zwaal RFA, Hemker HC, eds. *Blood coagulation*. Amsterdam: Elsevier, 1986: 171–239.
2. Meade TW, Vickers MW, Thopson SG, et al. Epidemiological characteristics of platelet aggregability. *BMJ* 1985; 290: 428–32.
3. Barthels M, Poliwođa H. *Gerinnungsanalysen*. Stuttgart: Thieme, 1993: 239.
4. Meade TW. Fibrinogen in ischaemic heart disease. *Eur Heart J* 1995; 16: Suppl A: 31–5.
5. Qizilbash N. Fibrinogen and cerebrovascular disease. *Eur Heart J* 1995; 16: Suppl A: 42–6.
6. Koster T, Rosendaal FR, Reitsma PH, van der Velden PA, Briët E, Vandenbroucke JP. Factor VII and fibrinogen levels as risk factors for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1994; 71: 6: 719–22.
7. Ernst E. The role of fibrinogen as cardiovascular risk factor. *Atherosclerosis* 1993; 100: 1–12.
8. Fey GH, Fuller GM. Regulation of acute phase gene expression by inflammatory mediators. *Mol Biol Med* 1987; 4: 323–8.
9. Meade TW, Chakrabarti R, Haines AP, North WRS, Stirling Y. Characteristics affecting fibrinolytic activity and plasma fibrinogen concentrations. *BMJ* 1979; i: 153–6.
10. Folsom AR, Wu KK, Davis CE, Conlan MG, Sorlie PD, Szklo M. Population correlates of plasma fibrinogen and factor VII, putative cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* 1991; 91: 191–205.
11. Krobot K, Hense HW, Cremer P, Eberle E, Keil U. Determinants of plasma fibrinogen: relation to body weight, waist-to-hip ratio, smoking, alcohol, age and sex: results from the Second MONICA Augsburg Survey 1989–90. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 780–8.
12. Palareti G. Fibrinogen measurement in various clinical conditions: a comparison of five different methods. In: Ernst E, Koenig W, Lowe GDO, Meade TW, eds. *Fibrinogen, a »new« cardiovascular risk factor*. Oxford: Blackwell, 1992: 64–7.
13. DiMinno G, Silver MJ, Cerbone AM, Rainone A, Postiglione A, Mancini M. Increased fibrinogen binding to platelets from patients with familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 203.
14. Elkeles RS, Chakrabarti R, Vickers M, Stirling Y, Meade TW. Effect of treatment of hyperlipidemia in haemostatic variables. *BMJ* 1980; 281: 973.

15. Lee AJ, Smith WSC, Lowe GDO, Tunstall-Pedoe H. Plasma fibrinogen and coronary risk factors: The scottish hearth health study. *J Clin Epidemiol* 1990; 43: 913–9.
16. Wilkes HC, Kelleher C, Meade TW. Smoking and plasma fibrinogen. *Lancet* 1988; 1: 307.
17. Hamsten A, Iselius L, de Faire U, Blombäck M. Genetic and cultural inheritance of plasma fibrinogen concentration. *Lancet* 1987; 2: 988.
18. Humphries SE, Cook M, Dubowitz M, Stirling Y, Meade TW. Role of genetic variation at the fibrinogen locus in determination of plasma fibrinogen concentrations. *Lancet* 1987; i: 1452–5.
19. Thomas AE, Green FR, Kelleher CH, et al. Variation in the promotor region of the β -fibrinogen gene is associated with plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers. *Thromb Haemostas* 1991; 65: 487–90.
20. Green F, Hamsten A, Blombäck M, Humphries S. The role of β -fibrinogen genotype in determining plasma fibrinogen levels in young survivors of myocardial infarction and healthy controls from Sweden. *Thromb Haemost* 1993; 70: 915–20.
21. Connor JM, Fowkes FGR, Wood J, Smith FB, Donnan PT, Lowe GDO. Genetic variation at fibrinogen gene loci and plasma fibrinogen levels. *J Med Genet* 1992; 29: 480–2.
22. Berg K, Kierluf P. DNA polymorphisms at fibrinogen loci and plasma fibrinogen concentration. *Clin Genet* 1989; 36: 229–35.
23. Kant JA, Forance AJ Jr, Saxe D, Simon MI, McBride OW, Crabtree GR. Evolution and organisation of the fibrinogen gene locus on chromosome 4: gene duplication accompanied by transposition and inversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 2344–8.
24. Humphries SE, Imam AM, Robbins TP, et al. The identification of a DNA polymorphism of the α -fibrinogen gene, and the regional assignment of the human fibrinogen genes to 4q26-qter. *Hum Genet* 1984; 88: 148–53.
25. Green F, Humphries S. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Baillieres Clin Haematol* 1994; 7: 3: 675–81.
26. Thomas AE, Green FR, Lamlum H, Humphries HE. The association of combined α and β fibrinogen genotype on plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers. *J Med Genet* 1995; 32: 585–9.
27. Thomas A, Lamlum H, Humphries S, Green F. Linkage disequilibrium across the fibrinogen locus as shown by five genetic polymorphisms, G/A⁻⁴⁵⁵ (*Hae*III), C/T⁻¹⁴⁸ (*Hind*III/*Alu*I), T/G⁺¹⁶⁸⁹ (*Ava*II) and BcII (β fibrinogen) and *Taq*I (α fibrinogen), and their detection by PCR. *Hum Mutat* 1994; 3: 79–81.
28. Fowkes FGR, Connor JM, Smith FB, Wood J, Donnan PT, Lowe GDO. Fibrinogen genotype and risk of peripheral atherosclerosis. *Lancet* 1992; 339: 693–6.
29. Bondar RJJ, Mead DC. Evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from leuconostoc mesenteroides in the hexokinase method for determining glucose in serum. *Clin Chem* 1974; 20: 586–90.
30. Allain CC, Poon LS, Chan GSG. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1970; 20: 470–5.
31. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haemat* 1957; 17: 237–46.
32. Sambrook J, Fritsch T, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: E. 5.
33. Holt PG. Immune and inflammatory function in cigarette smokers. *Thorax* 1987; 42: 241.
34. Roy SN, Mukhopadhyay G, Redman CM. Regulation of fibrinogen assembly. Transfection of HepG2 cells with B β cDNA specifically enhances synthesis of the three component chains of fibrinogen. *J Biol Chem* 1990; 265: 6389–93.