

SLOVENSKÁ ANTROPOLÓGIA

Ročník 19

Číslo 2

SLOVENSKÁ ANTROPOLOGICKÁ SPOLOČNOSŤ PRI SAV

BRATISLAVA 2016

Registračné číslo MK SR EV 3533/10

ISSN 1336-5827

SLOVENSKÁ ANTROPOLÓGIA

Roč. 19, čís. 2

Skratka: *Slov. Antropol.*

**NAKLADATEL: SLOVENSKÁ ANTROPOLOGICKÁ SPOLOČNOSŤ PRI SAV
MLYNSKÁ DOLINA B2, 842 15 BRATISLAVA, SLOVENSKÁ REPUBLIKA**

e-mail editora: milanthurzo@gmail.com

EDITOR: Doc. RNDr. MILAN THURZO, CSc.

VÝKONNÝ REDAKTOR: RNDr. EVA NEŠČÁKOVÁ, CSc.

TECHNICKÁ ÚPRAVA: Mgr. SILVIA BODORIKOVÁ, PhD.

REDAKČNÁ RADA: Doc. RNDr. RADOSLAV BEŇUŠ, PhD.,

Prof. RNDr. IVAN BERNASOVSKÝ, DrSc., Mgr. SILVIA BODORIKOVÁ, PhD.,

RNDr. EVA NEŠČÁKOVÁ, CSc., RNDr. ALENA ŠEFČÁKOVÁ, PhD.,

Doc. RNDr. MILAN THURZO, CSc.

Sídlo vydavateľa: Vazovova 5, 812 43 Bratislava

Vydavateľ: Vydavateľstvo STU

Nakladateľstvo STU

IČO 00397 687

Dátum vydania: november 2016

Periodicita vydania: 2-krát ročne

Príspevky boli recenzované anonymne.

All contributions were reviewed anonymously.

VYDALA SLOVENSKÁ TECHNICKÁ UNIVERZITA V BRATISLAVE VO VYDAVATEĽSTVE STU

© SLOVENSKÁ ANTROPOLOGICKÁ SPOLOČNOSŤ PRI SAV BRATISLAVA 2016

ZBTB17 GENE SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN SLOVAK PATIENTS WITH DILATED CARDIOMYOPATHY

Iveta Boroňová¹, Jarmila Bernasovská¹, Ján Kmec², Ivan Bernasovský³, Soňa Mačeková¹, Eva Petrejščíková¹, Jana Gaľová¹, Danica Biroš Hronská¹

¹ Department of Biology, Faculty of Humanities and Natural Sciences, University of Prešov, 17. november street 1, 081 16 Prešov, Slovak Republic, email: iveta.boronova@unipo.sk

² Faculty of Health Care, University of Prešov, Partizánska 1, 080 01 Prešov, Slovak Republic, email: kmecj@fnspresov.sk

³ Center of Languages and Cultures of National Minorities, University of Prešov, 17. november street 1, 081 16 Prešov, Slovak Republic, email: ivan.bernasovsky@unipo.sk

Abstract: Dilated cardiomyopathy (DCM) is a primary myocardial disease characterized by progressive systolic dysfunction due to cardiac chamber dilatation and inefficient myocardial contractility. The phenotype of idiopathic DCM is characterized by cardiac muscle dysfunction in the absence of secondary causes. Genome-wide association studies (GWASs) on DCM indicate that the ZBTB17 gene rs10927875 single nucleotide polymorphism is associated with DCM. The aim of the study was to identify the distribution of ZBTB17 gene rs10927875 polymorphism in 70 Slovak patients with DCM and 80 healthy control subjects. Genomic DNA was extracted from leukocytes by a standard methodology. Genotyping was performed using the Custom Taqman®SNP Genotyping assays (Step One Applied Biosystems). The distribution of investigated genotypes of rs10927875 polymorphism within ZBTB17 gene in the cohort of Slovak patients with DCM was as follows: CC (35.7%), CT (55.7%), TT (8.6%), in controls: CC (43.8%), CT (51.2%), TT (5.0%). The risk allele T was more common among the patients with dilated cardiomyopathy than in normal controls (36.4% versus 30.6%), the differences were not statistically significant ($\chi^2=1.00$; $p=0.3162$) ($\chi^2=1.13$; $p=0.2874$). The results of our study suggest that ZBTB17 gene rs10927875 polymorphism may be a risk factor for susceptibility to DCM in Slovak patients with DCM. Further studies are necessary for obtaining of more reliable results on the larger population for clarification molecular mechanisms with practical use in clinical practice.

Key words: heart disease, genetics, genotyping, cardiomyopathies, molecular-genetic analyses, Central Europe

Introduction

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a disease of the heart muscle characterized by ventricular dilatation and impaired systolic function (Burkett and Hershberger 2005). This disorder is clinically heterogeneous, ranging differently in affected individuals with clinical presentations of severe symptoms, including heart failure, sudden death and asymptomatic individuals. Both genetic and non-genetic factors have been linked to DCM pathogenesis. Currently, myocarditis, immunological abnormalities, genetic factors, environmental factors, and persistent cardiotropic viral infections are all assumed to be causes of DCM (Maron et al. 2006, Richard et al. 2006).

DCM is genetically heterogeneous disease, it seems clear that multiple genes, including “genes encoding sarcomeric proteins” are involved in the pathophysiology of cardiac muscles (Richard et al. 2006). Research on DCM found that 20 – 50% of IDCM cases are caused by familial genetics (Burkett and Hershberger 2005, Zhang et al. 2015), which has been linked to rare mutations in more than 40 genes (Fatkin, Otway and Richmond 2010). In 90% of cases, inheritance is autosomal

dominant, while the autosomal recessive and X-linked inheritance cases are rare (Hershberger, Morales and Siegfried 2010). Multiple gene variants have been identified to be associated with DCM, with variable individual prevalence ranging from 1% to 10% (Karkkainen and Peuhkurinen 2007).

Single nucleotide polymorphism rs10927875 is located in an intron of ZBTB17 gene on the chromosome 1p36.2-p36.1. The locus of interest covers approximately 210 kb in a genomic region; exhibits strong LD; and spans several other genes, including SPEN (spen homolog, transcriptional regulator), HSPB7, CLCNKA (chloride channel Ka), and CLCNKB (chloride channel Kb) (Fig. 1).

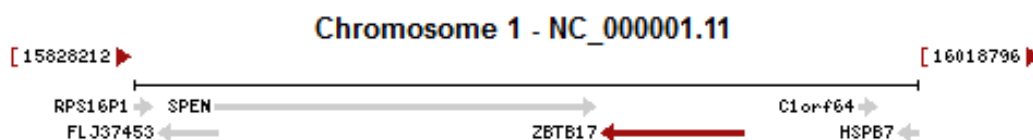


Fig. 1: Chromosome localization of ZBTB17 gene

The ZBTB17 gene encodes protein 17, which contains both zincfinger and BTB domains. Protein 17 is also known as myc-interacting protein 1 (MIZ-1) and is a transcription factor of 87 kDa containing 13 zinc finger domains at its carboxy-terminal end and a BTB/POZ domain at its N-terminus (Peukert et al. 1997). Recently, a GWAS (genome-wide association study) study on DCM indicated that the ZBTB 17 gene SNP rs10927875 was associated with DCM (Villard et al. 2011). Based on these findings, we hypothesized that the rs10927875 polymorphisms of ZBTB17 gene might be involved in the pathogenesis of dilated cardiomyopathies.

Subjects and methods

Analyzed survey consist of 70 patients with DCM and 80 healthy controls. The clinical diagnosis of idiopathic dilated cardiomyopathy was based on the revised criteria established by the World Health Organization (Richardson et al., 1996). After obtaining the medical history, all DCM patients underwent physical examination. Written informed consent was obtained from all subjects in order to use blood samples. Venous blood samples were collected from the patients with DCM and healthy control subjects. For DNA analysis, venous blood samples were collected in ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) tube. Genomic DNA was extracted from leukocytes by a standard methodology. Genotyping was performed using the Custom Taqman®SNP Genotyping assays (Step One Applied Biosystems). Statistical analysis was performed with the SPSS® version 17.0 statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) for Windows®. Fisher's exact test was used to computes P-values and 95% confidence intervals (CI) for the odds ratios (OR). A P-value <0.05 was considered statistically significant.

Results

70 DCM patients (mean age of 54.7 ± 12.5 years) and 80 healthy controls (mean age of 53.6 ± 11.9 years) were included in our study. Genotyping using the Custom Taqman®SNP Genotyping assays disclosed the genotype and allelic distribution of ZBTB17 gene rs10927875 polymorphism in DCM patients and controls (Table 1).

The distribution of investigated genotypes of rs10927875 polymorphism within ZBTB17 gene in the cohort of Slovak patients with DCM was as follows: CC (35.7%), CT (55.7%), TT (8.6%), in controls: CC (43.8%), CT (51.2%), TT (5.0%). Hardy-Weinberg equilibrium was tested for each group of participants using χ^2 test. Using this test we compared the genotype and allele frequencies between patients with dilated cardiomyopathy and controls. The risk allele „T“ was more frequent in patients with dilated cardiomyopathy than in controls (36.4% versus 30.6%). Also, the genotype

„TT“ was more frequent in DCM patients (8.6% vs. 5%). The differences were not statistically significant ($\chi^2=1.00$; $p=0.3162$) ($\chi^2=1.13$; $p=0.2874$), the odds ratio was 1.30 (95%CI 0.802-2.100) and 1.40 (95%CI 0.740-2.071), respectively. The results of this study suggest that the rs10927875 of ZBTB17 gene might play a role in pathogenesis of DCM.

Table 1: Genotype and allele distribution of ZBTB17 gene rs10927875 polymorphism in Slovak patients with dilated cardiomyopathy and controls

	Patients (n=70)			Controls (n=80)		
Genotype distribution	CC	25	35.7%	CC	35	43.8%
	CT	39	55.7%	CT	41	51.2%
	TT	6	8.6%	TT	4	5.0%
	χ^2 test = 1.00			$p=0.3162$		
Allele distribution	C	89	63.6 %	C	111	69.4 %
	T	51	36.4 %	T	49	30.6 %
	χ^2 test = 1.13			$p=0.2874$		

Discussion

Dilated cardiomyopathy represents a major cause of cardiovascular morbidity and mortality, often leading to the chronic heart failure and eventually requiring cardiac transplantation. Pathogenesis of dilated cardiomyopathies is modulated by the interaction of genetic and environmental risk factors. The response of cardiac tissue may be modulated by multiple genes that interact with each other, resulting in phenotype, which is likely the outcome of the interaction of the responsible genes with the genetic background and the environment (Brugada et al. 1997).

Mutations in both sarcomeric (Chang and Potter 2005) and cytoskeletal genes (Jefferies and Towbin 2010) have been implicated in DCM, but the variable expression and penetrance of each gene that harbors a different mutation result in vast clinical heterogeneity among patients.

Understanding the genetic heterogeneity of complex polygenic diseases like DCM is challenging. One of the many achievements in medical genetics over the past decades has been the ability to visualize sequence differences directly in DNA. These differences, or polymorphisms, serve as genetic markers of disease (Alameddine and Zafari 2002). The most common form of genetic variation is the SNP (single nucleotide polymorphism), defined according to the variation of a single nucleotide occurring in more than 1% of the population. The majority of SNPs are likely to be allelic variants that do not affect the expression or function of a protein. Such SNPs are commonly used as genetic markers to localize nearby disease-causing variations in linkage and association analyses. Single nucleotide polymorphisms that directly influence phenotype may be located within coding or regulatory regions of genes and can result in disease. In contrast, SNPs within regulatory regions tend to have more quantitative effects; for example, they may alter the expression level of a receptor or signaling protein, resulting in a more subtle variation in the associated phenotype (Ho et al. 2011). To date, only a few common susceptibility alleles for sporadic DCM have been identified from candidate-gene approaches (Rampersaud et al. 2010).

Recently, a GWAS was performed on a sporadic form of DCM in an European population. Another study screened approximately 2,000 candidate genes previously implicated in cardiovascular disease in more than 1,900 sporadic DCM cases in German and French populations. These studies showed that the SNP rs10927875 in ZBTB17 was associated with DCM (Stark et al. 2010, Villard et al. 2011). Preliminary data suggest that MIZ-1 (a transcription factor encoded by ZBTB17) may play a role in the transcriptional activation of numerous other genes (Adhikary et al.

2005). Buyandelger et al. (2015) revealed new functions for ZBTB17 gene in the heart, a transcription factor which may play a role as a novel cardiomyopathy gene.

In this study, we analyzed the relationship between DCM and SNP rs10927875 in the ZBTB17 gene. It has been shown that the „T“ allele and the „TT“ genotype of ZBTB17 gene rs10927875 polymorphism were more prevalent in DCM patients compared with the controls, the differences were not statistically significant ($p=0.3162$; $p=0.2874$). Our data, together with the results from previous GWAS on DCM, substantiate the importance of rs10927875 and related polymorphisms in the ZBTB17 locus for DCM susceptibility. As it is well known that both immunity and apoptosis play an important role in the pathology of DCM, the polymorphism rs10927875 in the ZBTB17 gene might be associated with DCM. Clearly, functional studies are required to support these hypotheses.

Conclusion

The results of the study suggest that rs10927875 polymorphism of ZBTB17 gene might be a risk factor for the susceptibility to DCM in Slovak patients. The biological mechanism explaining the association between the polymorphism rs10927875 of ZBTB17 gene and DCM risk remains unclear. Further studies are necessary to elucidate of the molecular basis of cardiomyopathies.

Acknowledgment

This study is the result of implementation of projects APVV-0644-12 and ITMS 26220120023.

References

- ADHIKARY, S., MARINONI, F., HOCK, A., HULLEMAN, E., POPOV, N., BEIER, R., BERNARD, S., QUARTO, M., CAPRA, M., GOETTIG, S., KOGEL, U., SCHEFFNER, M., HELIN, K., EILERS, M., 2005: The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell*, 123:409-421.
- ALAMEDDINE, F. M., ZAFARI, A. M., 2002: Genetic polymorphisms and oxidative stress in heart failure. *Congest. Heart. Fail.*, 8:157-164.
- BRUGADA, R., KELSEY, W., LECHIN, M., ZHAO, G., YU, Q. T., ZOGHBI, W., QUINONES, M., ELSTEIN, E., OMRAN, A., RAKOWSKI, H., WIGLE, D., LIEW, C. C., SOLE, M., ROBERTS, R., MARIAN, A. J., 1997: Role of candidate modifier genes on the phenotypic expression of hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Investig. Med.*, 45:542-551.
- BURKETT, E. L., HERSHBERGER, R. E., 2005: Clinical and genetic issues in familial dilated Cardiomyopathy. *Am. Coll. Cardiol.*, 45:969-981.
- BYAMBAJAV BUYANDELGER, B., MANSFIELD, C., KOSTIN, S., CHOI, O., ROBERTS, A.M., WARE, J.S., MAZZAROTTO, F., PESCE, F., BUCHAN, R., ISAACSON, R.L., VOUFFO, J., GUNKEL, S., KNÖLL, G., MCSWEENEY, S.J., WEI, H., PERROT, A., PFEIFFER, C., TOLIAT, M. R., ILIEVA, K., KRYSZTOFINSKA, E., LÓPEZ-OLANETA, M.M., GÓMEZ-SALINERO, J.M., SCHMIDT, A., NG, K., TEUCHER, N., CHEN, J., TEICHMANN, M., EILERS, M., HAVERKAMP, W., REGITZ-ZAGROSEK, V., HASENFUSS, G., BRAUN, T., PENNELL, D.J., GOULD, I., BARTON, P.J.R., LARA-PEZZI, E., SCHAFER, S., HUBNER, N., FELKIN, L.E., O'REGAN, D.P., PETRETTO, E., BRAND, T., MILTING, H., NÜRNBERG, P., SCHNEIDER, M.D., PRASAD, S., KNÖLL, R., 2015: ZBTB17 (MIZ1) Is Important for the Cardiac Stress Response and a Novel Candidate Gene for Cardiomyopathy and Heart Failure. *Circ. Cardiovasc. Genet.*, DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.113. 000690.
- FATKIN, D., OTWAY, R., RICHMOND, Z., 2010: Genetics of dilated cardiomyopathy. *Heart Fail. Clin.*, 6(2):129-140.
- HERSHBERGER, R. E., MORALES, A., SIEGFRIED, J.D., 2010: Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: A review for genetics professionals. *Genet. Med.*, 12(11):655-667.

- HO, E., BHINDI, R., ASHLEY, E.A., FIGTREE, G.A., 2011: Genetic analysis in cardiovascular disease: a clinical perspective. *Cardiol. Rev.*, 19:81-89.
- CHANG, A.N., POTTER, J.D., 2005: Sarcomeric protein mutations in dilated cardiomyopathy. *Heart Fail. Rev.*, 10:225-235.
- JEFFERIES, J.L., TOWBIN, J.A., 2010. Dilated cardiomyopathy. *Lancet*, 375:752-762.
- KARKKAINEN, S., PEUHKURINEN, K., 2007. Genetics of dilated cardiomyopathy. *Ann. Med.*, 39:91-107.
- MARON, B. J., TOWBIN, J. A., THIENE, G., ANTZELEVITCH, C., CORRADO, D., ARNETT, D., MOSS, A.J, SEIDMAN, C.E., YOUNG, J.B.; AMERICAN HEART ASSOCIATION, COUNCIL ON CLINICAL CARDIOLOGY, HEART FAILURE AND TRANSPLANTATION COMMITTEE, QUALITY OF CARE AND OUTCOMES RESEARCH AND FUNCTIONAL GENOMICS AND TRANSLATIONAL BIOLOGY INTERDISCIPLINARY WORKING GROUPS, COUNCIL ON EPIDEMIOLOGY AND PREVENTION, 2006: Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 113:1807-1816.
- PEUKERT, K., STALLER, P., SCHNEIDER, A., CARMICHAEL, G., HANEL, F., EILERS, M., 1997: An alternative pathway for gene regulation by Myc. *Embo. J.*, 16:5672-5686.
- RAMPERSAUD, E., KINNAMON, D.D., HAMILTON, K., KHURI, S., HERSHBERGER, R.E., MARTIN, E.R., 2010: Common susceptibility variants examined for association with dilated cardiomyopathy. *Ann. Hum. Genet.*, 74:110-116.
- RICHARD, P., VILLARD, E., CHARRON, P., ISNARD, R., 2006. The genetic bases of cardiomyopathies. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 48:79-89.
- RICHARDSON, P., MCKENNA, W., BRISTOW, M., MAISCH B, MAUTNER B, O'CONNELL J, OLSEN E, THIENE G, GOODWIN J, GYARFAS I, MARTIN I, NORDET P., 1996. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation*, 93:841-842.
- STARK, K., ESSLINGER, U.B., REINHARD, W., PETROV, G., WINKLER, T., KOMAJDA, M., ISNARD, R., CHARRON, P., VILLARD, E., CAMBIEN, F., TIRET, L., AUMONT, M.C., DUBOURG, O., TROCHU, J.N., FAUCHIER, L., DEGROOTE, P., RICHTER, A., MAISCH, B., WICHTER, T., ZOLLBRECHT, C., GRASSL, M., SCHUNKERT, H., LINSEL-NITSCHKE, P., ERDMANN, J., BAUMERT, J., ILLIG, T., KLOPP, N., WICHMANN, H.E., MEISINGER, C., KOENIG, W., 2010: Genetic association study identifies HSPB7 as a risk gene for idiopathic dilated cardiomyopathy. *PLoS Genet.*, 6: e1001167. 10.1371/journal.pgen.1001167.
- VILLARD, E., PERRET, C., GARY, F., PROUST, C., DILANIAN, G., HENGSTENBERG, C., RUPPERT, V., ARBUSTINI, E., WICHTER, T., GERMAIN, M., DUBOURG, O., TAVAZZI, L., AUMONT, M. C., DEGROOTE, P., FAUCHIER, L., TROCHU, J. N., GIBELIN, P., AUPETIT, J.F., STARK, K., ERDMANN, J., HETZER, R., ROBERTS, A.M., BARTON, P.J., REGITZ-ZAGROSEK, V., CARDIOGENICS, C., ASLAM, U., DUBOSCQ-BIDOT, L., MEYBORG, M., MAISCH, B., MADEIRA, H., 2011: A genome-wide association study identifies two loci associated with heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Eur. Heart. J.*, 32:1065-1076.
- ZHANG, X. L., QIU, X. B., YUAN, F., WANG, J., ZHAO, C. M., LI, R. G., XU, L., XU, Y. J., SHI, H. Y., HOU, X. M., QU, X. K., XU, Y. W., YANG, Y. Q., 2015: TBX5 loss-of-function mutation contributes to familial dilated cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 459(1):166-171.

VÝSKYT DEFORMÍT NÔH U DETÍ BRATISLAVSKÝCH ŠKÔL

Mária Fuchsová¹, Eva Neščáková², Miroslava Ďuričková², Dominika Phamová², Petra Uhrová², Tomáš Zeman², Silvia Bodoriková², Monika Zemanová³

¹ Centrum špeciálnopedagogického výskumu, Ústav špeciálnopedagogických štúdií, Pedagogická fakulta, Univerzita Komenského, Račianska 59, 813 34 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: fuchsova@fedu.uniba.sk

² Katedra antropológie Prírodovedeckej fakulty UK, Mlynská dolina B2, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: nescakova@fns.uniba.sk

³ Ústav antropologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika

Abstract: *The incidence of foot deformities in children from Bratislava schools (Slovakia).* The most common foot deformity is flat foot (*pes planus*), high arch of foot (*pes excavatus*) and juvenile bunion (*hallux valgus*). In our study, we focused on the presence of these deformities in the population of Bratislava children aged 6–12 years. We used the method of Chippaux-Šmirák index for analysis of the arch of foot. The results indicate that in the measured children aged 6–12 years the normal arched foot is most common. The occurrence of flat foot is more frequent than high foot and more common in boys. The high body mass has a major impact on long-term loading arch of the foot and it is the main cause of flat foot. The angle of the thumb magnifies in older girls, which increases the risk of hallux valgus deformity.

Key words: *pes planus, pes excavatus, hallux valgus*, children aged 6 to 12 years, Central Europe

Úvod

Noha je veľmi dômyselne vytvorený aparát slúžiaci k pohybu človeka. Narušenie prirodzeného vývinu obvykle vedie k postihnutiu funkčnej kapacity nohy (Kamínek, Gallo a Ditmar 2003). K najčastejším deformitám nohy patrí plochá a vysoká noha a vbočený palec. Plochá noha (*pes planus*) je deformita charakterizovaná výrazným znížením pozdĺžnej klenby nohy. V období rastu vzniká často flexibilná detská plochá noha, kedy dochádza k zvýšenému ochabnutiu väzív. Jej príčinou môže byť aj obezita, malnutícia, chronická únava alebo nevhodná obuv (Adamec 2005). Pri vysokej nohe (*pes excavatus*) je abnormálne vyklenutá pozdĺžna klenba nohy. Jej príčinou je nerovnováha činnosti svalov nohy a lýtka na kĺby nohy a často vzniká pri vrodených alebo získaných neurologických ochoreniach (Novotná 2001). Vbočený palec (*hallux valgus*) je u detí pomerne málo častá deformita nohy. Pacienti pred 20. rokom života sa obvyčajne sťažujú iba na pretrvávajúci pľuzgier a jeho kozmetický vzhľad. Odhaduje sa, že približne 40 až 50 % pľuzgierov v dospelosti má svoj počiatok už v detstve (Chell a Dhar 2014). V tejto štúdii sme sa zamerali na výskyt deformít v populácii detí z Bratislavy vo veku 6 až 12 rokov, kde hodnotíme, ako sa výskyt deformít mení vekom zvlášť u dievčat a chlapcov, a ako sa mení so zvyšujúcou sa telesnou hmotnosťou.

Súbor a metódy

Výskumu zaoberajúcim sa deformitou nohy sa dobrovoľne, so súhlasom zákonného zástupcu, zúčastnilo 297 detí (158 dievčat a 139 chlapcov) vo veku 6 až 12 rokov zo ZŠ Turnianskej a Spojenej školy Tilgnerovej v Bratislave. Plantografickou metódou, metódou odtlačkov nôh, sme hodnotili najväčšiu a najmenšiu šírku odtlačku nohy. Tieto rozmery sme použili na analýzu klenby

nohy pomocou metódy indexu Chippaux-Šmiřák (CHSI) na ľavej aj pravej nohe (Klementa 1988). Ak bol pomer najväčšej a najmensej šírky väčší ako 45 %, jedinec mal plochú nohu (1. stupeň – P1 = 45 % – 50 %, 2. stupeň – P2 = 50 % – 60 %, 3. stupeň – P3 = viac ako 60 %). Vysoká noha je určená vzdialenosťou medzi proximálnou a distálnou časťou plantogramu (1. stupeň – V1 = menej ako 1,5 cm, 2. stupeň – V2 = 1,5 cm – 3 cm, 3. stupeň – V3 = viac ako 3 cm). Štandardnými somatometrickými postupmi sa zistili rozmery telesnej výšky a telesnej hmotnosti, ktoré sme použili na výpočet Body mass indexu (BMI). Body mass index sme následne korelovali s indexom hodnotiacim klenbu nohy (indexom Chippaux-Šmiřák). Uhol palca sme hodnotili podľa Weisfloga (Riegerová, Žeravová a Peštuková 2003), ktorý pokladá uhol 9° za limitujúci. Palec sa pokladá za relatívne rovnobežný s osou nohy, ak má uhol palca menšiu hodnotu ako 9°. Pri uhle väčšom ako 9° možno hovoriť o deformite (ide o valgóznú polohu). Negatívna hodnota uhla (veľkosť uhla vyjadrená zápornou hodnotou) poukazuje na varóznú polohu palca.

Na štatistické spracovanie údajov sa použil štatistický program SPSS vs. 17. Analýza sa zameriava na testovanie intersexuálnych rozdielov stredných hodnôt indexu Chippaux-Šmiřák použitím dvojvýberového t-testu alebo neparametrických testov – v závislosti od normality rozdelenia parametrov. Na vyjadrenie závislosti medzi priemernými hodnotami indexov Chippaux-Šmiřák a BMI, príp. vekom a uhlom palca, sa vypočítali korelačné koeficienty (r_p – normálne rozdelenie, r_s – ak dáta nemali normálne rozdelenie). V tab. 1 sú zobrazené základné štatistické údaje jednotlivých rozmerov a indexov.

Tab. 1: Základné štatistické údaje antropometrických rozmerov dievčat a chlapcov vo veku 6 až 12 rokov

Table 1: The basic statistics of anthropometric dimensions of girls and boys aged 6–12 years

Antropometrické rozmery – dievčatá	Priemer	Medián	Min	Max	SD
Uhol palca (ľavý) (°)	3,47	4,00	-18,00	17,00	5,66
Uhol palca (pravý) (°)	2,06	3,00	-22,00	18,00	6,68
Chippaux-Šmiřák index (ľavý)	27,20	27,27	4,29	60,87	10,46
Chippaux-Šmiřák index (pravý)	28,47	28,47	5,88	67,06	10,44
Body mass index	17,20	16,53	11,84	30,56	2,83
Antropometrické rozmery – chlapci	Priemer	Medián	Min	Max	SD
Uhol palca (ľavý) (°)	3,48	4,00	-18,00	16,00	6,31
Uhol palca (pravý) (°)	2,98	4,00	-13,00	23,00	6,47
Chippaux-Šmiřák index (ľavý)	32,51	31,70	6,94	82,81	13,40
Chippaux-Šmiřák index (pravý)	32,78	31,14	8,54	73,33	12,58
Body mass index	17,66	17,16	12,47	27,16	2,82

Výsledky a diskusia

Tab. 2 zobrazuje výskyt jednotlivých foriem nohy hodnotenej z plantogramov podľa metódy indexu Chippaux-Šmiřák u detí vo veku 6 až 12 rokov. Zistili sme, že deti skúmaného súboru majú najčastejšie normálne klenutú nohu, konkrétne 2. stupeň ($N_2 = 45,86 \% - 48,73 \%$). Výskyt plochej nohy sa pohyboval v rozpätí 3,18 % – 12,96 %, kým výskyt vysokej nohy sa pohyboval v rozpätí 4,34 % – 6,37 % (tab. 2). Reimers, Pedersen a Brodersen (1995) poukazujú na zvyšujúce sa percento výskytu vysokej nohy u detí od 3 do 16 rokov z dvoch na sedem percent. V našom súbore 6- až 12-ročných detí sa vysoká noha vyskytovala najčastejšie vo vekovej skupine 9-ročných (štyri dievčatá = 2,53 %; traja chlapci = 2,16 %). Vzhľadom na nízky počet detí, ktoré mali vysokú nohu, sme vzťah medzi výskytom deformity a vekom detí nezisťovali, preto nemôžeme jednoznačne potvrdiť, ako sa mení výskyt vysokej nohy v skupine našich detí od 6 do 12 rokov. Obojstrannú

plochosť nôh sme zaznamenali u troch dievčat (1,9 %) a desiatich chlapcov (7,19 %). Obojstrannú vysokú nohu malo 3,16 % dievčat a 2,16 % chlapcov (päť dievčat a traja chlapci). Obojstranne sa vyskytujúca plochá alebo vysoká noha je následne väčším liečebným a rehabilitačným problémom ako výskyt deformity jednostranný (Klementa 1988).

Tab. 2: Percentuálny výskyt normálnej, plochej a vysokej nohy u detí vo veku 6 až 12 rokov

Table 2: The percentage of normal, flat and high foot in children aged 6 to 12 years

		Dievčatá				Chlapci			
		Ľavá noha		Pravá noha		Ľavá noha		Pravá noha	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Normálne klenutá noha	N1	61	38,85	54	34,18	38	27,34	38	27,54
	N2	72	45,86	77	48,73	67	48,20	65	47,10
	N3	9	5,73	13	8,23	9	6,47	13	9,42
Plochá noha	P1	2	1,27	3	1,90	7	5,04	4	2,90
	P2	2	1,27	2	1,27	7	5,04	5	3,62
	P3	1	0,64	1	0,63	4	2,88	7	5,07
Vysoká noha	V1	4	2,55	2	1,27	2	1,44	3	2,17
	V2	4	2,55	4	2,53	5	3,60	2	1,45
	V3	2	1,27	2	1,27	0	0,00	1	0,72
Spolu		157	100,00	158	100,00	139	100,00	138	100,00

Poznámka: N1 = 0,1 – 25,0 %, N2 = 25,1 – 40,0 %, N3 = 40,1 – 45,0 %, P1 = 45 – 50 %, P2 = 50 – 60 %, P3 = viac ako 60 %, V1 = menej ako 1,5 cm, V2 = 1,5 cm – 3 cm, V3 = viac ako 3 cm

Pfeiffer et al. (2006) sa zaoberali výskytom plochej nohy u detí vo veku troch až šesť rokov. Percento výskytu plochej nohy u detí tejto vekovej skupiny predstavuje 44 %. Nižšie percento výskytu plochej nohy (9,76 % detí) v tejto štúdii možno pripisovať vyššiemu veku detí skúmaného súboru (6 – 12 rokov). Rose (1990) potvrdzuje, že kritickým vekom pre výskyt plochej nohy je práve vek šesť rokov a určenie plochej nohy pred týmto vekom môže viesť k nadhodnoteniu problému. Ezema, Abaraogu a Okafor (2014) zaznamenali prevalenciu plochej nohy u detí z Nigérie vo veku 6 až 10 rokov s hodnotou 22,4 %, kým deti zo Španielska vo veku 4 až 13 rokov mali zase nižší výskyt plochej nohy – menej ako 2,7 % (Pfeiffer et al. 2006). Nemôžeme preto vylúčiť ani etnické rozdiely v morfológii nohy.

Získané výsledky následne preukázali vyššiu pravdepodobnosť výskytu plochej nohy u chlapcov (11 – 13 %) ako u dievčat (3 – 4 %) vo veku 6 až 12 rokov. Štatisticky vyšší výskyt plochej nohy mali 8- a 11-roční chlapci na pravej nohe a 9- a 12-roční chlapci na ľavej nohe ($p < 0,05$, tab. 3). Tento vzťah potvrdzujú viaceré výskumy: výskum taiwanských autorov na vzorke 2083 detí vo veku 7 až 12 rokov (Chang et al. 2010) a výskum gréckych autorov na vzorke viac ako 5 000 detí vo veku 6 až 17 rokov (Mueller, Host a Norton 1993). Väčší výskyt plochej nohy u detí mužského pohlavia sa dá vysvetliť väčšou valgou zadnej časti nohy a zaostávaním vo vývine oproti dievčatám. Väčší výskyt plochej nohy u žien zaznamenal Eluwa et al. (2009) až vo vekovej skupine 20 až 30 rokov. Otázkou zostáva, v ktorom veku sa tento vzťah mení v smere jedincov ženského pohlavia. Výskum na základných a stredných školách v Bratislave naďalej pokračuje, preto v blízkej budúcnosti budeme možno schopní na danú výskumnú otázku odpovedať.

Ďalej sme zistili, že výskyt plochej nohy klesá so zvyšujúcim sa vekom. Štatistická významnosť tohto vzťahu sa potvrdila iba na ľavej nohe ($p < 0,05$ tab. 4). Podobné výsledky dosiahli viacerí autori (Ezema, Abaraogu a Okafor 2014, Pfeiffer et al. 2016). U šesťročných detí skúmaného súboru bola hodnota indexu Chippaux-Šmirák vyššia ako u 12-ročných detí, a to bez ohľadu na pohlavie,

rovnako na ľavej aj pravej nohe (tab. 3). Pozitívne zistenie mohol ovplyvniť fakt, že deti prvých ročníkov (6- až 7-ročné) naozaj nosili počas vyučovania ortopedickú obuv ako prezuvky.

Tab. 3: Intersexuálne rozdiely indexu Chippaux-Šmiřák v jednotlivých vekových skupinách

Table 3: The intersexual differences of Chippaux-Šmiřák's index in individual age groups

Vek	Dievčatá		Chlapci		Spolu		t-test	
	CHSI_L	CHSI_P	CHSI_L	CHSI_P	CHSI_L	CHSI_P	CHSI_L	CHSI_P
6,00 – 7,00	26,11	30,77	32,89	30,66	26,63	30,77	n.s.	n.s.
7,00 – 8,00	32,00	30,77	32,92	32,39	32,45	32,39	n.s.	n.s.
8,00 – 9,00	31,44	28,19	27,50	32,91	29,55	29,58	n.s.	*
9,00 – 10,00	24,47	27,03	31,58	30,83	28,57	30,00	*	n.s.
10,00 – 11,00	25,61	26,49	31,82	28,40	27,94	27,06	n.s.	n.s.
11,00 – 12,00	25,32	29,95	31,22	31,05	27,71	30,25	n.s.	*
12,00 – 13,00	18,82	22,97	32,97	29,79	19,74	24,58	*	n.s.

Poznámka: CHSI_L a CHSI_P – hodnota mediánu indexu Chippaux-Šmiřák na ľavej a pravej nohe, n.s. – nesignifikantné, * – $p < 0,05$

Tab. 4: Korelácie medzi vekom (6 – 12 rokov) a hodnotou indexu Chippaux-Šmiřák

Table 4: The correlation between chronological age and Chippaux-Šmiřák's index

		Dievčatá		Chlapci		Spolu	
		CHSI_L	CHSI_P	CHSI_L	CHSI_P	CHSI_L	CHSI_P
Vek	r_p	- 0,161	- 0,098	- 0,097	- 0,018	- 0,128	- 0,089
	p	0,590	0,247	0,285	0,837	0,032	0,135

Poznámka: r_p – hodnota Pearsonovho korelačného koeficientu vyjadrujúca závislosť medzi vekom a indexom určujúcim plochosť nôh (Chippaux-Šmiřák index – CHSI), p – najväčšia hodnota, pri ktorej ešte nezamietame nulovú hypotézu (H_0 = ukazovatele vek a index Chippaux-Šmiřák sú nezávislé)

Vysoká telesná hmotnosť má veľký vplyv na dlhodobé zaťažovanie a preťažovanie klenby nohy a tým aj na vznik plochej nohy (Riegerová, Žeravová a Peštuková 2003). Výsledky tejto štúdie preukázali vzťah medzi telesnou hmotnosťou a výskytom plochej nohy (tab. 5). So zvyšujúcou sa hodnotou BMI indexu sa zvyšovala hodnota indexu Chippaux-Šmiřák, čím sa zvyšuje riziko vzniku plochej nohy.

Tab. 5: Korelácie medzi hodnotou indexu BMI a indexu Chippaux-Šmiřák

Table 5: The correlation between BMI and Chippaux-Šmiřák's index

		Dievčatá		Chlapci		Spolu	
		CHSI_L	CHSI_P	CHSI_L	CHSI_P	CHSI_L	CHSI_P
BMI	r_s	0,213	0,197	0,073	0,079	0,161	0,132
	p	0,012	0,019	0,419	0,386	0,007	0,027

Poznámka:

r_s – hodnota Spearmanovho korelačného koeficientu vyjadrujúca závislosť medzi indexom obezity (BMI) a indexom určujúcim plochosť nôh (Chippaux-Šmiřák index – CHSI)

p – najväčšia hodnota, pri ktorej ešte nezamietame nulovú hypotézu (H_0 = ukazovatele BMI a index Chippaux-Šmiřák sú nezávislé)

Deformita hallux valgus u detí je pomerne zriedkavá. Viac ako 80 % detí, ktoré majú túto formu deformity, je ženského pohlavia, a približne u polovice z nich sa objavuje deformita pred desiatym rokom života (Chell a Dhar 2014). V skúmanom súbore sme zaznamenali výskyt vbočeného palca ($> 9^\circ$) u 11 % (pravá noha) a 14 % (ľavá noha) 6- až 12-ročných dievčat a 12 % (pravá noha) a 16 % (ľavá noha) 6- až 12-ročných chlapcov (tab. 6). Abnormálne hodnoty ($> 15^\circ$) dosiahli štyri dievčatá (2,53 %) a osem chlapcov (5,75 %).

Tab. 6: Percentuálne zobrazenie výskytu valgózneho ($> 9^\circ$) a varózneho ($< 0^\circ$) postavenia palca u detí vo veku 6 až 12 rokov

Table 6: The percentage of valgus and varus position of thumb in children aged 6 to 12 years

	Dievčatá (N = 158)				Chlapci (N = 139)			
	Ľavá noha		Pravá noha		Ľavá noha		Pravá noha	
	N	%	N	%	N	%	N	%
$> 9^\circ$	22	13,92	18	11,39	23	16,55	17	12,23
$< 0^\circ$	21	13,29	40	25,32	28	20,14	27	19,42

U dievčat sa uhol palca vekom (od 6 do 12 rokov) zvyšoval ($p < 0,05$, tab. 7), čím sa so zvyšujúcim vekom zvyšuje aj riziko deformity hallux valgus. Vyšší výskyt deformity u žien (v dospelosti v pomere 15:1) býva často spájaný s nosením priliehavej obuvi a topánok s vysokým opätkom. U žien navyše rýchlejšie dochádza k ochabnutiu väzív a svoju úlohu môže tiež zohrávať aj iná kostná anatomia nohy (Hecht a Lin 2014).

Tab. 7: Korelácie medzi vekom (6 – 12 rokov) a uhlom palca

Table 7: The correlation between age (6 to 12 years) and angle of thumb

		Dievčatá		Chlapci		Spolu	
		UP_L	UP_P	UP_L	UP_P	UP_L	UP_P
Vek	r_s	0,217	0,181	-0,179	-0,146	0,021	0,003
	p	0,008	0,027	0,053	0,101	0,727	0,083

Poznámka: UP_L a UP_P – hodnota uhlu palca na ľavej a pravej nohe, r_s – hodnota Spearmanovho korelačného koeficientu vyjadrujúca závislosť medzi vekom a uhlom palca, p – najväčšia hodnota, pri ktorej ešte nezamietame nulovú hypotézu (H_0 = ukazovatele vek uhol palca sú nezávislé)

Záver

Zo zistených údajov vyplýva, že u detí vo veku 6 až 12 rokov z Bratislavy sa najčastejšie vyskytuje normálne klenutá noha. Výskyt plochej nohy je v tejto vekovej skupine častejší ako výskyt vysokej nohy a častejší je u chlapcov. Vekom sa výskyt plochej nohy u oboch pohlaví znižuje. Veľká telesná hmotnosť má významný vplyv na dlhodobé zaťažovanie klenby nohy a tým aj na vznik plochej nohy. Výskyt vbočeného palca vo vekovej kategórii 6 až 12 rokov je nízky. Vekom sa jeho hodnota zvyšuje hlavne u dievčat, čím sa zvyšuje riziko vzniku deformity hallux valgus.

PodĎakovanie

Táto štúdia bola podporená projektom VEGA 1/0789/14.

Literatúra

- ADAMEC, O., 2005: Plochá noha v dětském věku – diagnostika a terapie. *Pediatr. praxi*, 4:194-196.
- ELUWA, M. A., OMINI, R. B., KPELA, T., EKANEM, T. B., AKPANTAH, A. O., 2009: The incidence of pes planus amongst Akwa Ibom State students in the University of Calabar. *The Internet Journal of Forensic Science*, 3(2):5 pars.
- EZEMA, C. I., ABARAOGU, U. O., OKAFOR, G. O., 2014: Flat foot and associated factors among primary school children: A cross-sectional study. *HKPJ*, 32:13-20.
- HECHT, P. J., LIN, T. J., 2014: Hallux Valgus. *Med. Clin. North. Am.*, 98:227-232.
- CHANG, J. H., WANG, S. H., KUO, C. L., SHEN, H. C., HONG, Y. W., LIN, L. C., 2010: Prevalence in Taiwanese school-aged children in relation to obesity, gender and age. *Eur. J. Pediatr.*, 168:447-452.
- CHELL, J., DHAR, S., 2014: Pediatric Hallux Valgus. *Foot Ankle Clin.*, 19(2):235-243.
- KAMÍNEK, P., GALLO, J., DITMAR, R., 2003: Pes equinovarus congenitus. Část I: Klinický obraz, diagnostika. *Pediatr. praxi*, 2:63-66.
- KLEMENTA, J., 1988: Somatometrie nohy. Praha, SPN, 228 s.
- MUELLER, M. J., HOST, J. V., NORTON, B. J., 1993: Navicular drop as a composite measure of excessive pronation. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.*, 83:198-202.
- NOVOTNÁ, H., 2001: Děti s diagnózou plochá noha: ve školní a mimoškolní TV, ZTV a v mateřských školách. Praha, Olympia, 38 s. ISBN 80-7033-699-4.
- PFEIFFER, M., KOTZ, R., LEDL, T., HAUSER, G., SLUGA, M., 2006: Prevalence of flat foot in preschool-aged children. *Pediatrics*, 118:634-639.
- REIMERS, J., PEDERSEN, B., BRODERSEN, A., 1995: Foot deformity and the length of the triceps surae in Danish children between 3 and 17 years old. *J. Pediat. Orthop.*, 4:71-73.
- RIEGEROVÁ, J., ŽERAVOVÁ, M., PEŠTUKOVÁ, M., 2003: Rozbor morfologie nohy u chlapců a dívek ve věku infans 2 a juvenis. *Česká antropologie*, 53:67-70.
- ROSE, G. K., 1990: Flat foot in children. *BMJ*, 301:1330-1331.
- RIEGEROVÁ, J., ŽERAVOVÁ, M., PEŠTUKOVÁ, M., 2003: A contribution to the foot morphology of school children and teenagers between the ages 12 – 18 in Moravia. *Slov. Antropol.*, 6(1):112-117.

POLYMORFIZMUS GÉNU FTO AKO RIZIKOVÝ FAKTOR PRE OBEZITU U PACIENTOV S DILATAČNOU KARDIOMYOPATIOU

Soňa Mačková¹, Iveta Boroňová¹, Jarmila Bernasovská¹, Ivan Bernasovský², Mariana Priganc¹, Michaela Zigová¹, Danica Biroš Hronská¹, Jana Gaľová¹, Iveta Tóthová¹, Peter Ferenc¹, Zuzana Varaliová¹, Matúš Mathia¹

¹ Katedra biológie, Fakulta humanitných a prírodných vied, Prešovská univerzita v Prešove, Ul. 17. novembra 1, 081 16, Prešov, Slovakia; email: macekovasona@gmail.com

² Centrum jazykov a kultúr národnostných menšín Prešovskej univerzity v Prešove, Ul. 17. novembra 15, 081 16, Prešov, Slovakia; email: ivan.bernasovsky@unipo.sk

Abstract: *Polymorphism of FTO gene as risk factor for obesity in patients with dilated cardiomyopathy.* The genetic variation of *FTO* gene is risk factor for obesity. Considering the obesity is serious cardiometabolic risk factor, its neurohormonal and metabolic abnormalities would contribute to the pathogenesis of cardiomyopathies. The aim of this study was to analyse the *FTO* rs9939609 A/T single nucleotide polymorphism in patients with dilated cardiomyopathy. A total of 47 patients were compared to 104 healthy controls. Genotyping was performed by the real-time polymerase chain reaction method using Taqman® SNP genotyping assay. On ANOVA analysis, we found significant differences in mean values of BMI ($p=0.004$). The frequency of risk allele A of rs9939609 polymorphism was significantly higher in obese (60%) than in non-obese (38%) patients with dilated cardiomyopathy (OR (95%CI)=2.353 (1.024–5.405), $p=0.044$). The *FTO* is associated with risk of obesity in patients with dilated cardiomyopathy. Awareness of the *FTO* risk genotype may help to identify to obesity susceptible individuals what could improve the overall approach to preventing and treating cardiomyopathies in clinical practice.

Key words: heart disease, genetics, neurohormonal and metabolic abnormalities, Central Europe

Úvod

Epidémia obezity predstavuje jednu z najzávažnejších výziev pre verejné zdravotníctvo, pretože zapríčiňuje zvýšenie morbidity, predčasnú mortalitu a v neposlednom rade zvyšuje náklady na zdravotnú starostlivosť spoločnosti.

Obezita je významným rizikovým faktorom, ktorý prispieva k vzniku a rozvoju mnohých metabolických a kardiovaskulárnych ochorení. U pacientov s obezitou je z dôvodu zabezpečenia vyšších metabolických potrieb zvýšený aj srdcový výkon (Lauer et al. 1991). Zvyšuje sa celkový objem krvi a dochádza k objemovému zaťaženiu ľavej srdcovej komory, v dôsledku čoho ľahšie vznikajú rôzne dysrytmie (Farský 2010). Obezita spôsobuje nielen mechanické zaťaženie ľavej komory, ale aj lipotoxické poškodenie myokardu a následný vývin ventrikulárnej kontraktilnej dysfunkcie. Myokardová lipotoxicita je proces, kedy pri obezite z dôvodu nerovnováhy medzi príjmom a využitím voľných mastných kyselín a triglyceridov, dochádza k ich akumulácii v kardiomyocytoch, čo môže viesť k dysfunkcii myokardu (Alpert et al. 2014). Riziko vzniku kardiomyopatie zvyšuje zvlášť morbidná obezita, ktorá súvisí s chronickým objemovým preťažením, poruchami elektrického rytmu, či ventrikulárnou hypertrofiou a dilatáciou (Alpert 2001). Pri obezite v dôsledku zvýšeného podielu tukového tkaniva tak dochádza ku vzniku neurohormonálnych a metabolických abnormalít, ako aj k hemodynamickým zmenám, ktoré môžu viesť k srdcovej remodelácii, prípadne k dysfunkcii myokardu a v konečnom dôsledku zapríčiniť srdcové zlyhanie až smrť (Lavie, Milani a Ventura 2009, Alpert et al. 2014).

Obezita je komplexné multifaktoriálne ochorenie, v patogenéze ktorého sa uplatňuje vzájomná interakcia metabolických, behaviorálnych, enviromentálnych a genetických faktorov. Vplyv genetickej zložky na rozvoj obezity je odhadovaný na 30 až 70 %. S rozvojom molekulárnej genetiky nastal pokrok aj vo výskume obezity s cieľom identifikovať gény, ktorých mutácie vedú k jej jednotlivým formám. Jedným z posledných identifikovaných génov polygénnej obezity je kandidátny gén *FTO* („fat mass and obesity associated“). *FTO* (s celkovým rozpätím viac než 400 kb) je lokalizovaný na chromozóme 16q12.2. Väčšina pravdepodobne funkčne zaujímavých polymorfizmov sa nachádza v prvom intróne (Loos a Bouchard 2008), tak ako aj polymorfizmus rs9939609, ktorý je považovaný za významný rizikový faktor pre obezitu (Frayling et al. 2007).

Kardiomyopatie majú celý rad príčin a je preto nevyhnutné zacieliť výskum na ich etiopatogenézu a analýzu rizikových faktorov, ktoré vedú k ich vzniku alebo zhoršujú samotný priebeh ochorenia.

Súbor a metodika

Cieľom štúdie bolo použitím metódy real-time PCR analyzovať polymorfizmus rs9939609 génu *FTO* u 47 pacientov s diagnostikovanou dilatačnou kardiomyopatiou (DKMP). Priemerný vek pacientov s DKMP bol $57,68 \pm 14,08$ rokov. Kontrolný súbor tvorilo 104 nepríbuzných jedincov bez výskytu akýchkoľvek kardiovaskulárnych komplikácií. Priemerný vek v kontrolnom súbore bol $40,78 \pm 14,95$ rokov. V súbore pacientov a kontrol boli štandardnými metódami vykonané antropometrické merania telesnej výšky (cm), telesnej hmotnosti (kg), obvodu pásu (cm) a obvodu bokov (cm) a následne boli vypočítané indexy BMI (pomer telesnej hmotnosti ku štvorcu telesnej výšky) a WHR (pomer obvodu pásu k obvodu bokov). Pre posúdenie obezity v súbore pacientov s DKMP boli vybrané kritické hodnoty BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ (WHO 1995). Všetci probandi štúdie podpísali informovaný súhlas v súlade s odporúčaniami Helsinskej deklarácie. Genomická DNA bola izolovaná z periférnej krvi podľa štandardného protokolu použitého komerčného extrakčného kitu (Promega, Madison, USA). Genotypizácia bola prevedená na prístroji 7500 Fast Real-time PCR Systém (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Na štatistickú analýzu dát boli použité parametrické testy v programe SPSS pre Windows verzia 19.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Rozdiely medzi skupinami boli testované použitím Pearsonovho chí-kvadrátového testu pre kategorické premenné a pre kontinuálne premenné bol podľa potreby použitý Studentov t-test a ANOVA. Asociačná analýza bola prevedená logistickou regresiou. Pre všetky testy bola za kritérium štatistickej významnosti zvolená hodnota $p < 0,05$.

Výsledky a diskusia

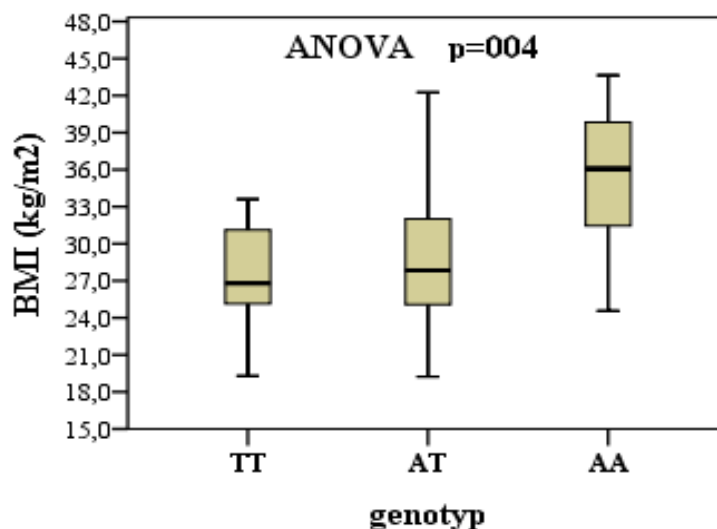
Deskriptívna charakteristika vyšetrovaného súboru pacientov s dilatačnou kardiomyopatiou a kontrolného súboru je uvedená v tab. 1. V distribúcii genotypov analyzovaného polymorfizmu rs9939609 génu *FTO* nebola ani v jednej skupine pozorovaná štatisticky významná odchýlka od Hardy-Weinbergovej rovnováhy (tab. 2). Distribúcia genotypových a alelových frekvencií polymorfizmu rs9939609 génu *FTO* v analyzovanom súbore pacientov s DKMP a v kontrolnom súbore je znázornená v tab. 2. Rozloženie genotypov v skupine pacientov v porovnaní s kontrolnou skupinou nebolo štatisticky významné ($p = 0,895$), rovnako ako ani riziková alela A nebola zaznamenaná v štatisticky významne vyššej frekvencii v skupine pacientov (48 %) v porovnaní s kontrolami (45 %) ($p = 0,665$).

Gén *FTO* je jedným z posledných identifikovaných génov polygénnej obezity. Frayling et al. (2007) ako prví identifikovali bežný variant rs9939609 v géne *FTO* ako rizikový faktor pre obezitu. Jedinci homozygotní pre rizikovú alelu A vážili o 3 – 4 kg viac v porovnaní s tými, ktorí rizikovú alelu nemali. Každá riziková alela zvyšuje BMI približne o 0,40 – 0,66 kg/m^2 resp. o 1,3 – 2,1 kg telesnej hmotnosti (Frayling et al. 2007). Podobne sme aj my v súbore pacientov s dilatačnou kardiomyopatiou pozorovali významný rozdiel v priemerných hodnotách indexu BMI medzi jednotlivými genotypmi (obr. 1). U jedincov s genotypom bez rizikovej alely (TT) bola priemerná hodnota BMI $27,461 \pm 4,183 \text{ kg/m}^2$, kým jedinci s genotypom AT mali priemernú hodnotu $29,061 \pm$

5,331 kg/m² a jedinci s mutantným genotypom (AA) mali priemernú hodnotu BMI až 35,096 ± 6,610 kg/m² (p = 0,004). Signifikantný rozdiel medzi jednotlivými genotypmi bol okrem BMI, podobne ako v iných štúdiách (Scuteri et al. 2007, Peeters et al. 2008, Andreasen et al. 2008), pozorovaný aj v priemerných hodnotách telesnej hmotnosti (dáta nie sú uvedené).

Obr. 1: Rozdiel v hodnotách BMI (priemer ± SD) medzi genotypmi polymorfizmu rs9939609 génu *FTO* u pacientov s DKMP

Fig. 1: Differences in BMI values (mean ± SD) between genotypes of rs9939609 polymorphism of *FTO* gene in patients with DCMP



Tab. 1: Deskriptívna charakteristika súboru pacientov s DKMP a kontrolného súboru
Table 1: Descriptive characteristics of DCM patients and controls

Súbor	Pacienti s DKMP (N = 47)	Kontroly (N = 104)	P hodnota
Parameter	Priemer ± SD	Priemer ± SD	
Vek	57,68 ± 14,08	40,78 ± 14,95	< 0,001
Telesná výška v cm	173,21 ± 10,31	170,47 ± 8,64	0,092
Telesná hmotnosť v kg	90,02 ± 20,14	74,61 ± 16,03	< 0,001
BMI (kg/m ²)	29,94 ± 5,95	25,61 ± 4,75	< 0,001
Obvod pásu v cm	105,59 ± 15,58	86,74 ± 14,39	< 0,001
Obvod bokov v cm	108,67 ± 11,62	101,60 ± 9,23	< 0,001
WHR	0,97 ± 0,08	0,85 ± 0,10	< 0,001

Vysvetlivky: DKMP – dilatačná kardiomyopatia, N – počet jedincov, SD – smerodajná odchýlka, BMI – index telesnej hmotnosti, WHR – pomer obvodu pásu k obvodu bokov

Pre detailnejšiu analýzu sme súbor pacientov s DKMP rozdelili podľa WHO kategorizácie BMI na jedincov s hodnotou BMI ≥ 30 kg/m² (obézni pacienti s DKMP) a súbor jedincov BMI < 30 kg/m² (neobézni pacienti s DKMP). Zistili sme signifikantné rozdiely v genotypovej distribúcii (p = 0,040). V skupine obéznych pacientov s DKMP sme detegovali 38,1 % jedincov s homozygotným genotypom AA, 42,9 % jedincov s heterozygotným genotypom AT a 19 % jedincov s genotypom TT. V súbore neobéznych pacientov bola frekvencia genotypu AA len 7,7 %, genotypu AT 61,5 % a genotypu TT 30,8 % (tab. 3). Frekvencia rizikovej alely bola u obéznych pacientov 60 %, kým u jedincov bez výskytu obezity len 38 %. Asociačná analýza odhalila, že prítomnosť mutantnej alely A predstavuje vyššie riziko obezity (OR (95 % CI) = 2,353 (1,024–5,405), p = 0,044).

Tab. 2: Frekvencia polymorfizmu rs9939609 génu *FTO* u pacientov s DKMP a u kontrolného súboru

Table 2: Frequency of rs9939609 polymorphism of *FTO* gene in DCM patients and controls

Polymorfizmus rs9939609 A/T		Pacienti s DKMP (N = 47)	Kontroly (N = 104)	P hodnota
Genotyp	TT	12 (25,5 %)	29 (27,9 %)	0,895
	AT	25 (53,2 %)	56 (53,8 %)	
	AA	10 (21,3 %)	19 (18,3 %)	
HWE		p = 0,652	p = 0,375	
Rozdiel genotypovej distribúcie		$\chi^2 = 0,221$; df = 2		
Frekvencia alely	A	48 %	45 %	0,665
Alelová asociácia		OR (95 % CI) = 1,114 (0,684 – 1,815)		

Vysvetlivky: DKMP – dilatačná kardiomyopatia, N – počet jedincov, HWE – Hardy-Weinbergova rovnováha, χ^2 – chí kvadrát, df – stupeň voľnosti, OR – odds ratio = pravdepodobnosť výskytu, (95%CI)-interval spoľahlivosti

Tab. 3: Alelová a genotypová frekvencia polymorfizmu rs9939609 génu *FTO* u obéznych a neobéznych pacientov s dilatačnou kardiomyopatiou

Table 3: Allele and genotype frequency of rs9939609 polymorphism of *FTO* gene in obese and nonobese patients with dilated cardiomyopathy

Polymorfizmus rs9939609 A/T		Obézni pacienti s DKMP (N = 21)	Neobézni pacienti s DKMP (N = 26)	P hodnota
Genotyp	TT	4 (19,0 %)	8 (30,8 %)	0,040
	AT	9 (42,9 %)	16 (61,5 %)	
	AA	8 (38,1 %)	2 (7,7 %)	
Rozdiel genotypovej distribúcie		$\chi^2 = 6,434$; df = 2		
Frekvencia alely	A	60 %	38 %	0,044
Alelová asociácia		OR (95 % CI) = 2,353 (1,024-5,405)		

Vysvetlivky: DKMP – dilatačná kardiomyopatia, N – počet jedincov, χ^2 – chí kvadrát, df – stupeň voľnosti, OR – odds ratio = pravdepodobnosť výskytu, (95%CI) – interval spoľahlivosti

Záver

Vyhodnotením výsledkov genetickej analýzy sme zistili štatisticky významnú asociáciu genetického variantu rs9939609 génu *FTO* s obezitou u pacientov s dilatačnou kardiomyopatiou.

Obezita je komorbidita, ktorá predstavuje závažné metabolické a kardiovaskulárne riziká, preto je jej prítomnosť u pacientov s kardiomyopatiou nežiadúca. Testovanie genetických rizikových markerov pre obezitu u pacientov s dilatačnou kardiomyopatiou má potenciál využitia v klinickej praxi pri individuálnom zostavovaní ich preventívneho alebo terapeutického programu s cieľom eliminácie komplikácií kardiomyopatií a zlepšenia ich prognózy. Genetické faktory predisponujú k obezite, avšak fenotypová expresia je podmienená a modifikovaná vplyvmi životného prostredia, čo treba zohľadniť v prevencii a liečbe rizikových jedincov. Platí to najmä vtedy, ak

nefarmakologické intervencie zamerané na redukciiu hmotnosti, ako diétny plán a zvýšenie fyzickej aktivity, môžu u týchto pacientov priaznivo ovplyvniť neurohumorálnu rovnováhu a kardiometabolické rizikové faktory (Alpert et al. 2014).

PodĎakovanie

Táto štúdia bola podporená z projektu ITMS 26220120041 a APVV-0644-12.

Literatúra

ANDREASEN, C. H., STENDER-PETERSEN, K. L., MOGENSEN, M. S., TOREKOV, S. S., WEGNER, L., ANDERSEN, G., NIELSEN, A. L., ALBRECHTSEN, A., BORCH-JOHNSSEN, K., RASMUSSEN, S. S., CLAUSEN, J. O., SANDBAEK, A., LAURITZEN, T., HANSEN, L., JØRGENSEN, T., PEDERSEN, O., HANSEN, T., 2008: Low Physical Activity Accentuates the Effect of the FTO rs9939609 Polymorphism on Body Fat Accumulation. *Diabetes*, 57: 95-101.

ALPERT, M. A., 2001: Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. *Am. J. Med. Sci.*, 321:225-236.

ALPERT, M. A., LAVIE, C. J., AGRAWAL, H., AGGARWA, K. B., KUMAR, S. A., 2014: Obesity and heart failure: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Transl. Res.*, 164(4):345-356.

FARSKÝ, Š., 2010: Obezita a kardiovaskulárny systém. *Via pract.*, 7(5):207-209.

FRAYLING, T. M., TIMPSON, N. J., WEEDON, M. N., ZEGGINI, E., FREATHY, R. M., LINDGREN, C. M., PERRY, J. R., ELLIOTT, K. S., LANGO, H., RAYNER, N. W., SHIELDS, B., HARRIES, L. W., BARRETT, J. C., ELLARD, S., GROVES, C. J., KNIGHT, B., PATCH, A. M., NESS, A. R., EBRAHIM, S., LAWLOR, D. A., RING, S. M., BEN-SHLOMO, Y., JARVELIN, M. R., SOVIO, U., BENNETT, A. J., MELZER, D., FERRUCCI, L., LOOS, R. J., BARROSO, I., WAREHAM, N. J., KARPE, F., OWEN, K. R., CARDON, L. R., WALKER, M., HITMAN, G. A., PALMER, C. N., DONEY, A. S., MORRIS, A. D., SMITH, G. D., HATTERSLEY, A. T., MCCARTHY, M. I., 2007: A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, 316:889-894.

LAUER, M. S., ANDERSON, K. M., KANNEL, W. B., LEVY, D., 1991: The impact of obesity on left ventricular mass and geometry. The Framingham Heart Study. *Jama*, 266:231-236.

LAVIE, C. J., MILANI, R. V., VENTURA, H. O., 2009: Obesity and cardiovascular disease: risk factors, paradox and impact of weight loss. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 53:1925-1932.

LOOS, R. J., BOUCHARD, C., 2008: FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity. *Obes. Rev.*, 9:246-250.

PEETERS, A., BECKERS, S., VERRIJKEN, A., ROEVEN, P., PEETERS, P. VAN GAAL, L., VAN HUL, W., 2008: Variants in the FTO gene are associated with common obesity in the Belgian population. *Mol Genet Metab.*, 93:481-484.

SCUTERI, A., SANNA, S., CHEN, W. M., UDA, M., ALBAI, G., STRAIT, J., NAJJAR, S., NAGARAJA, R., ORRÚ, M., USALA, G., DEI, M., LAI, S., MASCHIO, A., BUSONERO, F., MULAS, A., EHRET, G. B., FINK, A. A., WEDER, A. B., COOPER, R. S., GALAN, P., CHAKRAVARTI, A., SCHLESSINGER, D., CAO, A., LAKATTA, E., ABECASIS, G. R., 2007: Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS. Genet.* 3(7):e115.

WHO, 1995: World Health Organization Expert committee: Physical status; the use and interpretation of anthropometry. Technical Report series 854, Geneva.

PATERNÁLNA LÍNIA I U PACIENTOV S ISCHEMICKOU CHOROBOU SRDCA ZO SLOVENSKA

Eva Petrejčíková, Marta Mydlárová Blaščáková, Jaroslava Hubcejová, Michaela Fecenková, Iveta Boroňová, Jarmila Bernasovská

Katedra biológie, Fakulta humanitných a prírodných vied, Prešovská univerzita v Prešove, 17. Novembra 1, 08116 Prešov. E-mail: petrejci@unipo.sk

Abstract: *Paternal lineage I in patients with ischemic heart disease from Slovakia.* The hypothesis of recent studies confirms that males carrying the paternal lineage I are more likely to suffer from ischemic heart disease than males with other Y-haplogroup. We tested 190 patients with ischemic heart disease and 180 males of control group using Y-SNPs. Results indicated that haplogroup I is not associated with significantly increased risk of ischemic heart disease compared to other ancient lineages ([OR] 1.0830, 95 % CI 0.6694-1.7523, $p=0.7454$). Haplogroup I was not significantly more common in patients than in controls (24.21 % [n=46] vs. 22.47 % [n=41]). We didn't find association between I-haplogroup and traditional heart risk factors such as body mass index, cholesterol levels, blood sugar levels, high blood pressure or smoking.

Key words: cardiovascular risk factors, polymorphisms, Y-haplogroup, Y-chromosome, Central Europe

Úvod

Kardiovaskulárne ochorenia patria na Slovensku medzi choroby s až 2,5-násobne vyššou úmrtnosťou ako vo väčšine krajín vyspelej Európy. Príčina tohto stavu vychádza z faktu, že deväť z desiatich občanov Slovenskej republiky má minimálne jeden rizikový faktor, väčšina má dva až tri rizikové faktory súvisiace s kardiovaskulárnym rizikom (Kamenský a Pella 2010). Rastúce množstvo dôkazov naznačuje, že špecifická oblasť chromozómu Y tzv. MSY (male specific region of Y chromosome) môže byť ďalším rizikovým faktorom v etiológii ischemickej choroby srdca (ICHS) u mužov. Viaceré štúdie potvrdzujú asociáciu jednonukleotidových polymorfizmov (SNP – single nucleotide polymorphism) MSY oblasti s krvným tlakom, s hladinou cholesterolu a infarktom myokardu (Charchar et al. 2012, Tomaszewski et al. 2010). MSY oblasť je rozdelená do hlavných 20 haploskupín, ktoré sú geograficky aj etnicky orientované. Fylogenetické štúdie zistili, že jedna z najbežnejších európskych línii Y chromozómu – haploskupina I, je spojená so zvýšeným rizikom ischemickej choroby srdca (Bloomer et al. 2013, Charchar et al. 2012). Evolučne rozpoznávacím znakom tejto haploskupiny je, že nebola nájdená v paleolitických pozostatkoch mimo Európy. Nositelia pravdepodobne prišli z oblasti Stredného východu ako lovci a zberači v období paleolitu približne pred 25 000 rokmi (Semino et al. 2000). Haploskupina I je rozdielne distribuovaná po celej Európe: má vyššiu prevalenciu v Škandinávii (15 – 40 %) a nižší výskyt v južnej Európe (3 – 15 %) (Rootsi et al. 2004). Práve v krajinách ako je Španielsko, Francúzsko a krajiny Apeninského polostrova, je mortalita na kardiovaskulárne ochorenia signifikantne nižšia než v severných krajinách Európy (Vollset 2010).

Vychádzajúc z vyššie uvedených tvrdení našim cieľom bolo stanoviť možnú asociáciu polymorfizmov Y chromozómu charakterizujúcich paternálnu líniu I s ischemickou chorobou srdca aj u slovenských pacientov a zaradiť ju medzi rizikové faktory uvedeného ochorenia. Súčasný výskum kardiovaskulárnych chorôb je zameraný na identifikáciu genetických a environmentálnych faktorov, ako aj na sledovanie najdôležitejších rizikových faktorov (fajčenie, cukrovka, obezita,

hypertenzia). Preto sme zisťovali aj to, či haploskupina I na chromozóme Y bude mať vplyv aj na hodnotu tradičných rizikových faktorov ICHS v skupine sledovaných probandov.

Súbor a metódy

Genomická DNA bola extrahovaná z periférnej krvi a bukalných sterov 190 pacientov s ICHS a 180 zdravých jedincov kontrolného súboru s využitím komerčného kitu ReliaPrep Blood and Tissue gDNA MiniPrep System (Promega) podľa vopred stanoveného protokolu. Jedinci kontrolného súboru boli zdraví bez kardiovaskulárneho ochorenia. Všetci sledovaní jedinci pochádzali z oblasti východného Slovenska. U probandov sme sledovali klinické, biochemické a antropometrické parametre: vek, BMI (hmotnosť v kg/výška v m²), krvný tlak, lipidový profil (HDL, LDL, tChol, triglyceroly), glukózu, prítomnosť diabetes mellitus, fajčenie (pozri tabuľky). Všetci zúčastnení podpísali informovaný súhlas o použití vzorky DNA na vedecko-výskumné účely.

Výber Y-SNP polymorfizmov, ktoré charakterizujú potencióálne rizikóvu haploskupinu I v slovenskej populácii, bol stanovený na základe International Society of Genetic Genealogy (ISOGG 2016). V analyzovaných súboroch sme sledovali prítomnosť 3 Y-SNP polymorfizmov: M253 (rs9341296) stanovujúc sublíniu I1 (C->T), P215 (rs17307294) stanovujúc sublíniu I2 (A->G) a P37.2 (rs199865681) stanovujúc sublíniu I2a1 (T->C). Genotypová analýza vybraných Y-SNP polymorfizmov sa uskutočnila metódou Real-time PCR.

Na zistenie štatisticky významných rozdielov v biochemických, antropometrických a klinických parametroch medzi pacientmi s Y-chromozómovou haploskupinou I a pacientmi s inou haploskupinou, ako aj medzi pacientmi a kontrolnou skupinou zdravých jedincov, bol použitý Studentov t-test a χ^2 test využitím štatistického programu GraphPad softvér (GraphPad Software 2016). Stanovila sa aj hodnota relatívneho rizika (OR-odds ratio, pomer šancí) podľa Altmana (Altman 1991) prostredníctvom softvéru MedCalc verzia 16.2.1 (MedCalc Software 2016).

Výsledky a diskusia

Genotypovou analýzou vzoriek DNA sme zistili, že nositeľmi paternálnej línie I je 46 pacientov s ICHS (24,21 %) a 41 zdravých jedincov z kontrolného súboru (22,47 %). Zistené percentuálne zastúpenie haploskupiny I je v oboch sledovaných skupinách nižšie, než je frekvenčné zastúpenie tejto paternálnej línie v populácii žijúcej na východnom Slovensku bez ohľadu na zdravotný status (30,12 %) (Petrejčiková et al. 2014). Pri stanovení hodnoty relatívneho rizika sme nezistili asociáciu medzi haploskupinou I a zvyšujúcim sa rizikom vzniku ischemickej choroby srdca u slovenských pacientov (odds ratio [OR] 1,0830; 95 % CI 0,6694 – 1,7523; p = 0,7454). Databáza 23andMe nepredpokladá asociáciu SNP polymorfizmov haploskupiny I s akýmkoľvek kardiovaskulárnym fenotypom, ako je srdcový infarkt, vysoký cholesterol, vysoký krvný tlak a tiež ischemická choroba srdca (23andMe Research 2012). K opačným výsledkom dospela štúdia Charchara et al. (2012), ktorá predpokladá až o 56 % vyššiu pravdepodobnosť vzniku ICHS u mužov s líniou I v porovnaní s mužmi s inej Y-chromozómovej haploskupiny. Títo autori zároveň zistili, že muži s haploskupinou I majú rozdiely v génoch zapojených do imunitných a zápalových reakcií.

Pri sledovaní klinických charakteristík v skupine pacientov a v kontrolnom súbore sme pozorovali štatisticky signifikantné rozdiely vo veku, v priemerných hodnotách BMI, v hladinách HDL a LDL cholesterolu, triacylglycerolov a tiež v prevalencii diabetes mellitus (tab. 1). Tab. 2 sumarizuje klinické charakteristiky pacientov s ICHS rozdelených podľa toho, či sú nositeľmi potencióálne rizikóvej haploskupiny I. Neboli zistené žiadne signifikantné rozdiely v priemerných hodnotách sledovaných parametrov medzi pacientmi s líniou I a pacientmi s inou haploskupinou.

Tab. 1: Klinické parametre pacientov s ICHS a kontrolného súboru zdravých jedincov
Table 1: Clinical parameters in patients with ICHS and in control group

	Pacienti (N = 190)		Kontrolný súbor (N = 180)		p
	x	SD	x	SD	
Vek (roky)	61,84	9,94	58,32	9,50	***
BMI (hmotnosť v kg/výška v m ²)	28,89	3,69	28,01	3,92	*
Systolický tlak (mm Hg)	138,20	16,37	137,22	18,07	n.s
Diastolický tlak (mm Hg)	82,20	10,26	81,61	9,03	n.s
Glu (mmol/l)	5,42	1,97	5,14	1,91	n.s
S-HDL (mmol/L)	1,19	0,35	1,41	0,47	***
S-LDL (mmol/L)	2,72	0,83	2,55	0,59	*
tChol (mmol/L)	4,47	1,26	4,69	1,64	n.s
S-TAG (mmol/L)	1,71	0,83	1,52	0,71	*
	N	%	N	%	
Diabetes mellitus	32	16,84	13	7,22	**
Fajčenie	53	27,89	49	27,22	n.s

N – počet probandov, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s – nesignifikantné, x – aritmetický priemer, SD – smerodajná odchýlka, BMI – body mass index, S – sérum, Glu – glukóza, tChol – celkový cholesterol; TAG – triacylglycerol

*N – the number of probands, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s – non-significant, x – mean, SD – standard deviation, BMI – body mass index, S – serum, Glu – glucose, tChol – total cholesterol; TAG – triacylglycerol*

Tab. 2: Klinické parametre pacientov s haploskupinou I a pacientov s inou haploskupinou
Table 2: Clinical parameters of patients stratified by haplogroup status

	Pacienti s haploskupinou I (N = 46)		Pacienti s inou haploskupinou (N = 144)		p
	x	SD	x	SD	
Vek (roky)	64,02	11,21	61,15	9,44	n.s
BMI (hmotnosť v kg/výška v m ²)	28,61	3,74	28,98	3,69	n.s
Systolický tlak (mm Hg)	139,04	16,15	137,93	16,49	n.s
Diastolický tlak (mm Hg)	83,17	11,95	81,89	9,68	n.s
Glu (mmol/l)	5,38	1,72	5,43	2,05	n.s
S-HDL (mmol/L)	1,13	0,31	1,21	0,36	n.s
S-LDL (mmol/L)	2,79	0,88	2,70	0,82	n.s
tChol (mmol/L)	4,48	1,23	4,47	1,28	n.s
S-TAG (mmol/L)	1,76	0,91	1,69	0,81	n.s
	N	%	N	%	n.s
Diabetes mellitus	8	17,39	24	16,66	n.s
Fajčenie	12	26,08	41	28,47	n.s

N – počet probandov, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s – nesignifikantné, x – aritmetický priemer, SD – smerodajná odchýlka, BMI – body mass index, S – sérum, Glu – glukóza, tChol – celkový cholesterol; TAG – triacylglycerol

*N – the number of probands, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s – non-significant, x – mean, SD – standard deviation, BMI – body mass index, S – serum, Glu – glucose, tChol – total cholesterol; TAG – triacylglycerol*

Na základe týchto výsledkov môžeme konštatovať, že paternálna línia I nemá vplyv na hodnoty tradičných rizikových faktorov ischemickej choroby srdca. K rovnakému výsledku dospela štúdia od Bloomera et al. (2013), kde autori potvrdzujú, že tradičné kardiovaskulárne rizikové faktory, ako je krvný tlak, BMI, lipidy a inzulínová rezistencia, nie sú asociované s haploskupinou I a nepredpokladajú ju ani s inou líniou. Napriek týmto výsledkom sa vedci stále prikláňajú

k názoru, že určité SNP polymorfizmy chromozómu Y môžu mať vplyv na zdravie mužov a citlivosť na bežné ochorenia vrátane kardiovaskulárnych ochorení.

Záver

Na základe výsledkov nemôžeme potvrdiť teóriu o asociácii haploskupiny I so zvyšujúcim sa rizikom vzniku ischemickej choroby srdca u slovenských pacientov. Rovnako sme v našej štúdii vylúčili akýkoľvek vplyv tejto paternálnej línie na tradičné kardiovaskulárne faktory. Hypotéza o rizikovej paternálnej línii I bola motivovaná pozorovaním, že ICHS je častejšia u mužov ako u žien. Fyzické rozdiely medzi mužmi a ženami sú do značnej miery závislé na prítomnosti, alebo neprítomnosti chromozómu Y, ale to nemusí nutne znamenať, že určité variácie na chromozóme Y majú vplyv na riziko vzniku ochorenia u mužov. V budúcnosti je potrebných viacero štúdií na identifikáciu kauzálnych variantov Y chromozómu, ktoré zvyšujú náchylnosť na ischemickú chorobu srdca.

PodĎakovanie

Riešenie úlohy sa realizovalo v rámci projektu VEGA č. 1/0563/14 Asociácia Y-chromozómu s ochorením koronárnych tepien.

Literatúra

23andME RESEARCH, 2012: Second Opinion: Haplogroup I Likely Not Linked to Heart Disease. Online. Available: <<https://blog.23andme.com/news/second-opinion-haplogroup-i-likely-not-linked-to-heart-disease/#HiCZOPUQlGZpLQZh.99>>.

ALTMAN, D. G., 1991: Practical statistics for medical research. London, Chapman and Hall, 611 s.

BLOOMER, L. D., NELSON, C. P., EALES, J., DENNIFF, M., CHRISTOFIDOU, P., DEBIEC, R., MOORE, J., CONSORTIUM, C., ZUKOWSKA-SZCZECOWSKA, E., GOODALL, A. H., THOMPSON, J., SAMANI, N. J., CHARCHAR, F. J., TOMASZEWSKI, M., 2013: Male-specific region of the Y chromosome and cardiovascular risk: phylogenetic analysis and gene expression studies. *Arterioscl. Throm. Vas.*, 33(7):1722-1727.

GRAPHPAD SOFTWARE, 2016: GraphPad QuickCalcs. Online. Available: <<http://www.graphpad.com/quickcalcs>>.

CHARCHAR, F. J., BLOOMER, L. D. S., BARNES, T. A., COWLEY, M. J., NELSON, C. P., WANG, Y., DENNIFF, M., DEBIEC, R., CHRISTOFIDOU, P., NANKERVIS, S., DOMINICZAK, A. F., BANI-MUSTAFA, A., BALMFORTH, A. J., HALL, A. S., ERDMANN, J., CAMBIEN, F., DELOUKAS, P., HENGSTENBERG, C., PACKARD, C., SCHUNKERT, H., OUWEHAND, W. H., FORD, I., GOODALL, A. H., JOBLING, M. A., SAMANI, N. J., TOMASZEWSKI, M., 2012: Inheritance of coronary artery disease in men: an analysis the role Y chromosome. *Lancet*, 379:915-922.

ISOGG, 2016: Y DNA Haplogroup Tree 2016. Online. Available: <<http://isogg.org/tree/>>.

KAMENSKÝ, G., PELLA, D. (ed.), 2010: Cesta k prevencii ochorení srdca a ciev. Edícia Vzdelaný pacient. Bratislava, AEPress, 143 s..

MEDCALC SOFTWARE, 2016. Online. Available: <<https://www.medcalc.org/index.php>>.

PETREJČIKOVÁ, E., ČARNOGURSKÁ, J., HRONSKÁ, D., BERNASOVSKÁ, J., BOROŇOVÁ, I., GABRIKOVÁ, D., BÔŽIKOVÁ, A., MAČEKOVÁ, S., 2014: Y-SNP analysis versus Y-Haplogroup Predictor in the Slovak population. *Anthropol. Anz.*, 71(3):275-285.

SEMINO, O., PASSARINO, G., OEFNER, P. J., LIN, A. A., ARBUZOVA, S., BECKMAN, L. E., DE BENEDICTIS, G., FRANICALACCI, P., KOUVATSI, A., LIMBORSKA, S., MARCIKIAE, M., MIKA, A., MIKA, B., PRIMORAC, D., SANTACHIARA-BENERECETTI, A.

S., CAVALLI-SFORZA, L. L., UNDERHILL, P. A., 2000: The genetic legacy of Paleolithic Homo sapiens sapiens in extant Europeans: a Y chromosome perspective. *Science*, 290:1155-1159.

ROOTSI, S., MAGRI, C., KIVISILD, T., BENUZZI, G., HELP, H., BERMISHEVA, M., KUTUEV, I., BARAĆ, L., PERIĆ, M., BALANOVSKY, O., PSHENICHNOV, A., DION, D., GROBEI, M., ZHIVOTOVSKY, L. A., BATTAGLIA, V., ACHILLI, A., AL-ZAHERY, N., PARIK, J., KING, R., CINNIOĞLU, C., KHUSNUTDINOVA, E., RUDAN, P., BALANOVSKA, E., SCHEFFRAHN, W., SIMONESCU, M., BREHM, A., GONCALVES, R., ROSA, A., MOISAN, J. P., CHAVENTRE, A., FERAK, V., FÜREDI, S., OEFNER, P.J., SHEN, P., BECKMAN, L., MIKEREZI, I., TERZIĆ, R., PRIMORAC, D., CAMBON-THOMSEN, A., KRUMINA, A., TORRONI, A., UNDERHILL, P.A., SANTACHIARA-BENERECETTI, A. S., VILLEMS, R., SEMINO, O., 2004: Phylogeography of Y-chromosome haplogroup I reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe. *Am. J. Hum. Genet.*, 75(1):128-137.

VOLLSET, S. E., 2010: Does the southern European cardiovascular mortality advantage extend to total mortality? 50-year trends in death risks between 40 and 70 years of age in Western European men and women. *Scand. J. Public Health*, 38:127-134.

TOMASZEWSKI, M., DEBIEC, R., BRAUND, P. S., NELSON, C. P., HARDWICK, R., CHRISTOFIDOU, P., DENNIFF, M., CODD, V., RAFELT, S., VAN DER HARST, P., WATERWORTH, D., SONG, K., VOLLENWEIDER, P., WAEBER, G., ZUKOWSKA-SZCZECHOWSKA, E., BURTON, P. R., MOOSER, V., CHARCHAR, F. J., THOMPSON, J. R., TOBIN, M. D., SAMANI, N. J., 2010: Genetic architecture of ambulatory blood pressure in the general population: insights from cardiovascular gene-centric array. *Hypertension*, 56(6):1069-1076.

ANALÝZA A POROVNANIE GENETICKÝCH VARIANTOV SCN5A GÉNU VO VYBRANEJ SKUPINE SLOVENSKÝCH KARDIOMYOPATICKÝCH PACIENTOV

Mariana Priganc¹, Michaela Zigová¹, Jarmila Bernasovská¹, Iveta Boroňová¹, Ján Kmec^{2,3}

¹ Prešovská univerzita v Prešove, Fakulta humanitných a prírodných vied, Katedra biológie, Ul. 17. novembra č.1, 080 01 Prešov, Slovenská republika, email: mariana.priganc@gmail.com

² Fakultná nemocnica s poliklinikou J. A. Reimana, Kardiocentrum, Hollého 14, 08001 Prešov, Slovenská republika

³ Prešovská univerzita v Prešove, Fakulta zdravotníckych odborov, Katedra urgentnej zdravotnej starostlivosti, Partizánska 1, 080 01 Prešov, Slovenská republika

Abstract: *Analysis and comparison of genetic variants of SCN5A gene in a selected group of cardiomyopathy patients from Slovakia.* Mutations in SCN5A gene are potentially cause of dilated cardiomyopathy. The aim of present study was molecular-genetic analysis of sequencing variants of selected exons of SCN5A gene and comparison of obtained data with database Ensembl. Screening of SCN5A gene variants of three exons was performed on selected cohort of 38 unrelated Slovak patients with clinical diagnosis of dilated cardiomyopathy. Molecular-genetic results confirmed the presence of missense and synonymous sequencing variants in exons 12 and 21 of SCN5A gene based on data compared with database Ensembl. In our study 4.94% missense and 2.20% synonymous variants were detected.

Key words: heart disease, genetics, molecular-genetic analyses, database Ensembl, Central Europe

Úvod

Mutácie génov kódujúcich iónové kanály, do skupiny ktorých patrí SCN5A gén, môžu byť príčinou vzniku kardiomyopatií (Moreau et al. 2013, Zaklyazminskaya a Dzemeshevich 2016). SCN5A gén kóduje α -podjednotku srdcového sodíkového kanála (NaV1.5), vytvárajúcu póry sprostredkujúce tok Ca^{2+} (Swan et al. 2014). SCN5A gén je predominantne exprimovaný v srdci, a sodíkové kanály zohrávajú dôležitú úlohu v procese srdcovej kondukcie a repolarizácie (Grant 2009, Akylbekova et al. 2014).

Dilatačná kardiomyopatia (DKM) predstavuje veľkú heterogénnu skupinu myokardiálnych ochorení, ktorá je charakterizovaná dilatáciou ľavej komory, systolickou dysfunkciou a/alebo kontrakčnou dysfunkciou pravej komory (Dellefave a McNally 2010). Primárnou príčinou vzniku DKM je génová mutácia s negatívne dominantným mechanizmom účinku. SCN5A mutácie vykazujú autozomálne dominantný typ dedičnosti s neúplnou penetranciou, s predominantným výskytom u mužov (Elliot, Lambiase a Kumar 2011). Podľa údajov databázy Domain Mapping of Disease Mutations bolo v SCN5A gène opísaných 402 mutácií vrátane frameshift, splice site mutácií v kódujúcich oblastiach a missense zámen (Peterson et al. 2010).

Mutácie SCN5A génu spôsobujú exprimáciu abnormálneho proteínu, ktorý je zodpovedný za inaktiváciu sodíkového kanála, čím dochádza k zníženiu nárastu membránového potenciálu, opakovanému otváraniu sodíkového kanála a trvalému vtoku sodíka do bunky (Wang et al. 2009, Antzelevitch a Nof 2008). Mechanizmy podieľajúce sa na vzniku SCN5A-asociovej DKM nie sú úplne objasnené (Gu et al. 2012).

Pri určovaní molekulárno-genetickej predispozície kardiomyopatií zohráva dôležitú úlohu genetická variabilita a výskyt veľkého počtu variantov s nejasným klinickým významom.

Klasifikáciu, komplexný prehľad detekovaných sekvenčných variantov a ich patogenicity, prípadnej asociácie s konkrétnym fenotypovým prejavom poskytujú viaceré databázy, vrátane databázy Ensembl (www.ensembl.org).

Cieľom predkladanej štúdie boli analýzy sekvenčných variantov vybraných exónov SCN5A génu detegované v skupine pacientov s diagnostikovanou dilatačnou kardiomyopatiou a ich porovnanie s údajmi uvádzanými v databáze Ensembl, s cieľom zistiť najfrekvencovanejšie typy variantov u DKM pacientov.

Súbor a metódy

Molekulárne analýzy sa vykonali v súbore 38 nepříbuzných pacientov z východného Slovenska s klinickou diagnózou dilatačná kardiomyopatia. Do štúdie bol taktiež zahrnutý kontrolný súbor – 26 zdravých jedincov bez anamnézy kardiovaskulárnych ochorení. Písomný informovaný súhlas sa získal od všetkých probandov zapojených do štúdie. Probandom sa odobrala vzorka periférnej krvi v spolupráci s odborníkmi z klinickej praxe. Na extrakciu DNA sa použil komerčný kit Relia PrepTM Blood gDNA isolation kit (Promega, Madison, USA). Vybrané exóny SCN5A génu (12, 20 a 21) sa analyzovali metódou Sangerovho sekvenovania na automatickom sekvenačnom zariadení 3500XL Genetic Analyzer (Life Technologies, Foster City, California) pomocou terminačného kitu BigDye v3.1 (Life Technologies, Foster City, California). Získané výsledky boli manuálne porovnané s referenčnou sekvenciou SCN5A génu databázy Ensembl (reference SCN5A ENSG00000183873, www.ensembl.org) a vyhodnotené štandardnými štatistickými metódami použitím v programovom systéme Statistica.

Výsledky a diskusia

Mutačný skríning vybraných exónov SCN5A génu sa realizoval pomocou metódy Sangerovho sekvenovania. Databáza Ensembl opisuje 182 všetkých možných sekvenčných variantov v exónoch 12, 20 a 21 SCN5A génu, z ktorých bolo v našom súbore pacientov potvrdených 7,14 % variantov. V štúdiu sme sa orientovali na analýzu missense a synonymných variantov v záujme detekcie nukleotidových substitúcií vedúcich k missense alebo synonymným aminokyselinovým zámienam v našom súbore pacientov s DKM, potvrdili sme prítomnosť už opísaných sekvenčných variantov v databáze Ensembl (tab. 1).

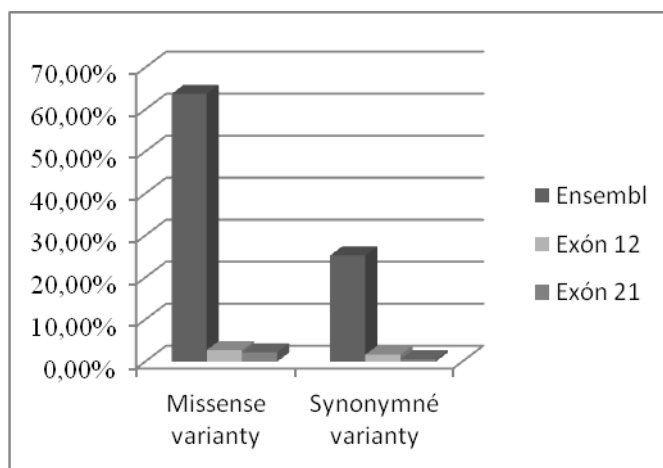
Tab. 1: Počty detegovaných sekvenčných variantov v databáze Ensembl a v súbore DKM pacientov.

Table 1: Numbers of detected sequencing variants in Ensembl database and in cohort of DCM patients

	Databáza Ensembl				DKM pacienti			
	exón 12	exón 20	exón 21	spolu	exón 12	exón 20	exón 21	spolu
Missense varianty	65	22	29	116	5	0	4	9
Synonymné varianty	27	10	9	46	3	0	1	4
Σ	92	32	38	162	8	0	5	13

Vo vybraných exónoch 12, 20 a 21 SCN5A génu sme potvrdili 7,76 % missense, z celkového počtu detegovaných missense variantov uvádzaných v databáze Ensembl. Z počtu 46 synonymných variantov uvádzaných v databáze Ensembl pre dané exóny sme detegovali 8,70 % synonymných variantov. V exóne 20 neboli u žiadneho pacienta s DKM, ani v kontrolnom súbore, potvrdené

sekvenčné varianty. V našej štúdii sme zaznamenali 4,94 % missense a 2,20 % synonymných variantov. Naše analýzy potvrdili očakávaný trend vysokej prevalencie missense mutácii zaznamenaný aj v databáze Ensembl. Obr. 1 znázorňuje percentuálne zastúpenie detegovaných missense a synonymných variantov v exónoch 12 a 21 SCN5A génu v porovnaní s množstvom potenciálnych variantov uvádzaných v databáze Ensembl.



Obr. 1: Percentuálne vyjadrenie distribúcie detegovaných variantov v exónoch 12 a 21 SCN5A génu v analyzovanom súbore pacientov s DKM v porovnaní s celkovým množstvom variantov uvádzaných v databáze Ensembl.

Fig. 1: The percentage of detected sequencing variants distribution in exons 12 and 21 of SCN5A gene in group of patients with the DCM in comparison with the total number of variants according to Ensembl database.

Z celkového počtu 65 missense a 27 synonymných variantov prítomných v exóne 12 SCN5A génu sme na základe údajov databázy Ensembl detegovali 7,69 % missense a 11,11 % synonymných variantov. V exóne 21 SCN5A génu, bolo z celkového počtu 29 missense variantov potvrdených 13,79 % missense sekvenčných variantov a z 9 možných synonymných variantov bol detekovaný jeden variant (11,11 %).

U 19 pacientov (50,00 %) a 11 jedincov kontrolného súboru (42,31 %) sa potvrdila prítomnosť sekvenčných variantov v exóne 12 SCN5A génu. Minimálne jeden sekvenčný variant v exóne 21 SCN5A génu bol detegovaný u 52,63 % pacientov a u 19,23 % jedincov kontrolného súboru. U 31,58 % pacientov analyzovaného súboru sekvenčné varianty vybraných exónov SCN5A génu neboli detegované. Mutácie SCN5A génu sú zodpovedné za vznik viacerých fenotypov vrátane kardiomyopatií (Abriel 2014). Databáza Domain Mapping of Disease Mutations zahŕňa celkový počet 359 mutácií SCN5A génu asociovaných s konkrétnym fenotypovým prejavom ochorenia (Peterson et al. 2010). Gosselin-Badaroudine, Moreau a Chahine (2014) uvádzajú, že len 17 detekovaných mutácií je v asociácii s fenotypovými prejavmi DKM. SCN5A asociovaná DKM je potvrdená približne v 2 % prípadov (Sinagra, Camerini a Mestroni 2012). V porovnaní s údajmi zaznamenanými v databáze Ensembl (36,82 % variantov asociovaných s fenotypovým prejavom ochorenia), v našom analyzovanom súbore bolo 0,55 – 1,65 % sekvenčných variantov asociovaných so špecifickým ochorením.

Záver

Sekvenčné varianty SCN5A génu sú opisované v pozitívnej asociácii s dilatačnou kardiomyopatiou. Výsledky molekulárno-genetických analýz v predkladanej štúdii potvrdili prítomnosť missense a synonymných sekvenčných variantov vo vybraných exónoch SCN5A génu

u DKM pacientov na základe porovnania s údajmi uvádzanými v databáze Ensembl, pričom v našej štúdii sme zaznamenali 4,94 % missense a 2,20 % synonymných variantov. V porovnaní s ostatnými sekvenčnými variantmi vybraných exónov SCN5A génu zaznamenanými v databáze Ensembl, vykonané analýzy potvrdili očakávaný trend vyššej prevalencie missense variantov.

PodĎakovanie

Štúdia sa realizovala s podporou projektov APVV-0644-12 a ITMS 26220120023.

Literatúra

ABRIEL, H. (ed.), 2014: Cardiac Sodium Channel Disorders. USA, Elsevier Health Sciences, 355 s.

AKYLBKOVA, E. L., PAYNE, J. P., NEWTON-CHEH, C., MAY, W. L., FOX, E. R., WILSON, J. G., SARPONG, D. F., TAYLOR, H. A., MAHER, J. F., 2014: Gene-environment interaction between SCN5A-1103Y and hypokalemia influences QT interval prolongation in African Americans: The Jackson Heart Study. *Am. Heart J.*, 167:116-122.

ANTZELEVITCH, C. H., NOF, E., 2008: Brugada Syndrome: Recent Advances and Controversies. *Curr. Cardiol. Rep.*, 10:376-383.

DELLEFAVE, L. and E. McNALLY, 2010. The genetics of dilated cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol.*, 25. (3): 198-204.

ELLIOT, P., LAMBIASE, P. D., KUMAR, D., 2011: Inherited Cardiac Disease. New York: Oxford University Press.

GRANT, A. O., 2009: Cardiac Ion Channels. *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.*, 2:185-194.

GU, L., GAO, G., KASTURIRANGAN, S., RUTLEDGE C., DAY S., DUDLEY, S. C., 2012: Cardiac Sodium Channel (SCN5A) mRNA Splicing Abnormalities In Hypertrophic Cardiomyopathy [Abstract]. *Circulation*, 126: A16473.

GOSSELIN-BADAROUNDINE, P., MOREAU, A., CHAHINE, M., 2014: Nav1.5 mutations linked to dilated cardiomyopathy phenotypes. Is the gating pore current the missing link? *Channels (Austin)*, 8:90-94.

MOREAU, A., GOSSELIN-BADAROUNDINE, P., DELEMOTTE, L., KLEIN, M. L., CHAHINE, M., 2013: Gating pore currents are defects in common with two Nav1.5 mutations in patients with mixed arrhythmias and dilated cardiomyopathy. *J. Gen. Physiol.*, 145(2):93-106.

PETERSON, T. A., ADADEY, A., SANTANA-CRUZ, I., SUN, Y., WINDER, A., KANN, M. G., 2010: DMDM: Domain Mapping of Disease Mutations. *Bioinformatics*, 26(19):2458-2459.

SINAGRA, G., CAMERINI, F., MESTRONI, L., 2012. Genetic Cardiomyopathies: A Clinical Approach. Springer Science & Business Media, 166 s.

SWAN, H., AMAROUCH, M. Y., LEINONEN, J., MARJAMAA, A., KUCERA, J. P., LAITINEN-FORSBLOM P. J., LAHTINEN, A. M., PALOTIE, A., KONTULA, K., TOIVONEN, L., ABRIEL, H., WIDEN, E., 2014: A Gain-of-Function Mutation of the SCN5A Gene Causes Exercise-Induced Polymorphic Ventricular Arrhythmias. *Circ. Cardiovasc. Genet.*, 7(6):771-81.

WANG, P., HSIA, H. H., AL-AHMAD, A., ZEL, P. C., 2009: Ventricular Arrhythmias and Sudden Cardiac Death: Mechanism, Ablation, and Defibrillation. John Wiley & Sons, 360 s.

ZAKLYAZMINSKAYA, E. A DZEMESHKEVICH, S., 2016: The role of mutations in the SCN5A gene in cardiomyopathies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863 (7 Pt B):1799-1805.

DETEKCIA SEKVENČNÝCH VARIANTOV VYBRANÝCH EXÓNOV SCN5A GÉNU U SLOVENSKÝCH PACIENTOV S HYPERTROFICKOU KARDIOMYOPATIOU V ZÁVISLOSTI OD RODINNEJ ANAMNÉZY

Michaela Zigová¹, Mariana Priganc¹, Iveta Boroňová¹, Jarmila Bernasovská¹, Ján Kmec^{2,3}

¹ Prešovská univerzita v Prešove, Fakulta humanitných a prírodných vied, Katedra biológie, Ul. 17. novembra č.1, 080 01 Prešov, Slovensko, e-mail: michaela.zigova@smail.unipo.sk

² Fakultná nemocnica s poliklinikou J. A. Reimana, Kardiocentrum, Hollého 14, 08001 Prešov, Slovensko, e-mail: kmecj@fnspresov.sk

³ Prešovská univerzita v Prešove, Fakulta zdravotníckych odborov, Katedra urgentnej zdravotnej starostlivosti, Partizánska 1, 080 01 Prešov, Slovensko

Abstract: *Detection of sequencing variants of selected SCN5A gene exons in Slovak patients with hypertrophic cardiomyopathy according to family history.* The aim of the study was to clarify the relationship between SCN5A gene sequencing variants of exons 12, 20, 21 and positive family history of hypertrophic cardiomyopathy. Genetic testing was performed in 22 unrelated hypertrophic cardiomyopathy patients and 26 controls using Sanger sequencing method. Only two potentially pathogenic variants were detected. Patients with positive family history and with presence of potentially pathogenic variant rs764018276 have several clinical symptoms. Molecular-genetic testing of family members of hypertrophic cardiomyopathy patients with a positive family history and genotypes is recommended in future research.

Key words: heart, monogenic genetic disorder, molecular-genetic testing, genetic modifier, pathogenic variants, Central Europe

Úvod

Dedičné formy kardiomyopatií, predovšetkým hypertrofická kardiomyopatia (HKM), sú príčinou srdcových porúch a srdcového zlyhania vo všetkých vekových kategóriách, častejšie u mladých jedincov (MacRae 2010). HKM je monogénne ochorenie srdcového svalu s mendelovským typom dedičnosti (Od'Rourke et al. 2010). HKM sa vyznačuje penetranciou závislou od veku, heterogenitou na alelovej a nealelovej úrovni a variabilnou expresivitou. Rutinné klinické testy nevyučujú riziko rozvoja ochorenia. Genetické analýzy umožňujú odhaliť genetické zmeny skôr, ako sa ochorenie symptomatologicky prejaví (Germans et al. 2007). Genetické testovanie bolo navrhnuté ako súčasť skríningu rizikových jedincov s cieľom určiť predispozíciu k HKM, čiastočne predikovať klinický obraz a riziko náhlej smrti na základe typu postihnutého génu alebo lokalizácie mutácie v špecifickom géne (Frenneaux 2004). Procesy zapojené do molekulárno-genetického testovania HKM sú zložité. V dnešnej dobe je známych ~20 génov a viac ako 1 500 individuálnych patogénnych variantov asociovaných s hypertrofickou kardiomyopatiou (Cirino a Ho 2014). Väčšina z nich sú heterozygotné mutácie s privátnym výskytom v konkrétnej rodine, s absenciou údajov o fenotypových prejavoch asociovanými so špecifickými mutáciami (Dzau a Liew 2008). V patogenéze hypertrofickej kardiomyopatie pôsobia ďalšie genetické (nové mutácie, mnohopočetné mutácie, lókusová a alelová heterogenita, jednonukleotidové polymorfizmy) a negenetické faktory, ktoré sú zodpovedné za fenotypovú heterogenitu ochorenia (Hershberger et al. 2009).

Cieľom štúdie bolo analyzovať vybrané exóny SCN5A génu, ktorý je pokladaný za potenciálny modifikátor fenotypových prejavov ochorenia u HKM pacientov s pozitívnou a negatívnou rodinnou anamnézou.

Súbor a metodika

Analyzovaný súbor tvorili pacienti s klinickou diagnózou hypertrofickej kardiomyopatie (13 mužov a deväť žien), stanovenou na základe výsledkov štandardných klinických vyšetrení. Diagnózu a rodinnú anamnézu určili odborní lekári, špecialisti v odbore kardiológia. Do štúdie bolo zaradených 22 HKM pacientov (KMP 1 – KMP 22) z východného Slovenska, s priemerným vekom $58,23 \pm 16,18$ rokov, a súbor 26 zdravých kontrolných jedincov ($54,84 \pm 18,62$ rokov).

Po podpísaní informovaného súhlasu sa pacientom odobrala vzorka periférnej krvi na molekulárno-genetické analýzy. Na izoláciu genomickej DNA sa použil komerčný izolačný kit ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega USA). Na analýzu vybraných exónov SCN5A génu sa použila metóda Sangerovho sekvenovania, s využitím zariadenia 3500XL Genetic Analyzer (Life Technologies, Foster City, California), terminačného kitu Big Dye version v3.1 (Life Technologies, Foster City, California) a štandardných protokolov. Sekvencie použitých primerov boli navrhnuté softvérom Primer3 (v.0.4.0, Madison USA). Dáta sa následne vyhodnocovali sekvenáčnymi (DNA Sequencing Analysis Software. Version 5.1, SeqScape® Software Version 2.7), predikčnými (SIFT/PolyPhen 2 -PP2) a štatistickými (Fisherov exaktný test a Studentov t-test pre nezávislé vzorky) softvérmi.

Výsledky

Priemerný vek v súbore pacientov bol $58,23 \pm 16,18$ rokov. Pacienti boli na základe rodinnej anamnézy rozdelení do dvoch skupín (tab. 1). Štatisticky významný rozdiel v špecifických charakteristikách medzi súbormi sa nepotvrdil.

Tab. 1: Klinická charakteristika sledovaných slovenských HKM pacientov

Table 1: Clinical characteristics of investigated Slovak HCM patients

	RA + (N = 6)	RA – (N = 16)	p ($< 0,05$)
Pohlavie (M/Ž)	3/3	10/6	NS ^a
Vek (roky)	$64,83 \pm 12,98$	$55,75 \pm 16,92$	NS ^b
BMI	$28,27 \pm 7,80$	$30,71 \pm 4,87$	NS ^b
LVOTO	3/6	5/16	NS ^a
LVEF (%)	$58,33 \pm 2,89$	$58,89 \pm 8,44$	NS ^b
IVS >12mm	3/6	8/16	NS ^a
DD stredne ťažká - ťažká	1/6	3/16	NS ^a
MD	3/6	10/16	NS ^a
NYHA I-II/III-IV	5/1	15/1	NS ^a
ICD	1/6	4/16	NS ^a

^a – Fisherov exaktný test ^b – Studentov t-test pre nezávislé vzorky, DD – diastolická dysfunkcia, ICD – implantabilný kardioverter defibrilátor, IVS – intraventrikulárne septum, LVEF – ejekčná frakcia ľavej komory, LVOTO – obštrukcia ľavého výtokového traktu, MD – mitrálna dysfunkcia, M/Ž – muži/ženy, NS – štatisticky nesignifikantný, +/- RA – pozitívna/negatívna rodinná anamnéza

Molekulárno-genetické analýzy potvrdili prítomnosť siedmich špecifických sekvenčných variantov vo vybraných exónoch (12, 20, 21) SCN5A génu (tab. 2). Predikčné softvéry preukázali potenciálne patogénny účinok dvoch detekovaných sekvenčných variantov exónu 21 (rs137854616 a rs764018276) v oboch skupinách (RA+, RA-) pacientov, ktoré sa v kontrolnom súbore nepotvrdili.

Tab. 2: Detegované varianty vo vybraných exónoch SCN5A génu u slovenských pacientov s HKM
 Tab. 2: Variants detected in selected SCN5A gene exons of Slovak HCM patients

Vzorka	RA	rs	SIFT/PP2	vzorka	RA	Rs	SIFT/PP2
KMP1	-	rs764018276	DC/Pro	KMP8	-	rs764018276	DC/Pro
KMP2	-	rs145733679	T/Ben	KMP13	+	rs45627438	T/Ben
		rs1805124	T/Ben			rs753677814	T/Ben
		rs764018276	DC/Pro				
KMP3	-	rs145733679	T/Ben	KMP15	+	rs1805124	T/Ben
		rs199473118	T/Ben			rs753677814	T/Ben
		rs45627438	T/Ben			rs764018276	DC/Pro
KMP6	-	rs1805124	T/Ben	KMP17	+	rs764018276	DC/Pro
		rs137854616	DC/Pro				
KMP7	-	rs1805124	T/Ben	KMP18	-	rs764018276	DC/Pro
		rs764018276	DC/Pro				

Ben – benígny variant, DC – ochorenie vyvolávajúci variant (disease causing), P – potenciálne patogénny variant (Probably damaging), T – tolerovaný variant, -/+ RA – pozitívna/negatívna rodinná anamnéza

Potenciálne patogénny sekvenčný variant rs764018276 sa potvrdil len u dvoch pacientov s pozitívnou rodinnou anamnézou. V exónoch 12 a 20 neboli detegované žiadne potenciálne patogénne sekvenčné varianty.

Diskusia

Klinické hodnotenie a genetické testovanie pacientov s HKM je pomerne zložitá pre multifaktoriálnu etiológiu ochorenia. Aj napriek tomu, že sa u probanda s klinickou diagnózou hypertrofickej kardiomyopatie nepotvrdí prítomnosť mutácie asociovanej s kardiomyopatiou v kandidátnych génoch, genetický pôvod ochorenia nemožno vylúčiť (Charron et al. 2010). Genetické testovanie napomáha stanovenie diagnózy, má predikčný charakter u asymptomatických príbuzných a význam pri odlíšení kardiomyopatií od iných patologických resp. fyziologických stavov (Maron 2003). Molekulárno-genetický skrining veľkého počtu génov vedie k identifikácii mnohých vzácnych nesynonymných genetických variantov nejasného významu (Fokstuen et al. 2011). Proces odlíšenia kauzálnych mutácií od bežných polymorfizmov nie je jednoduchý, predovšetkým ak ide o missense zámenu. V tomto prípade do značnej miery pomáhajú predikčné softvéry. Detekcia a analýza sekvenčných variantov má potenciálne diagnostický a terapeutický význam, podieľa sa na objasňovaní fenotypovej variability HKM (Tester a Ackerman 2011).

Predkladaná štúdia je prvotná štúdia na Slovensku, ktorá analyzuje sekvenčné varianty SCN5A génu u pacientov s pozitívnou a negatívnou rodinnou anamnézou HKM. Vo vybranej vzorke pacientov s HKM sme detegovali sekvenčné varianty v exónoch 12, 20, 21 SCN5A génu pomocou metódy Sangerovho sekvenovania. Asociácia uvedených sekvenčných variantov SCN5A génu s HKM doposiaľ nie je potvrdená. Bottillo et al. (2016) detegovali zriedkavé jednonukleotidové varianty v SCN5A géne u HKM pacientov. Lopes et al. (2013) na základe výsledkov predchádzajúcej štúdie predpokladajú, že SCN5A gén a jeho mutácie môžu u HKM pacientov vystupovať ako potenciálny modifikujúci faktor fenotypových prejavov.

V súbore pacientov s HKM sme v 45,45 % prípadov potvrdili prítomnosť siedmich nesynonymných aminokyselinových zámien. Pozitívna rodinná anamnéza sa zistila u 13,64 %

pacientov s minimálne jedným identifikovaným missense variantom. Len dva varianty z celkového množstva sa vyhodnotili predikčnými softvérmi ako potenciálne patogénne a ich prítomnosť sa potvrdila u 36,36 % pacientov. Sekvenčný variant rs137854616 sa opisuje v asociácii s fenotypovými prejavmi Brugada syndrómu (Crawford et al. 2015). V našej štúdii bol detegovaný u pacienta (HKM 6) s výraznou obštrukciou ľavého výtokového traktu (LVOT), bez pozitívnej rodinnej anamnézy HKM. Druhý potenciálne patogénny sekvenčný variant, bez bližšie špecifikovanej asociácie s fenotypovými prejavmi ochorenia (rs764018276), sa detegoval v súbore pacientov s HKM v siedmich prípadoch. Uvedený sekvenčný variant bol detegovaný u 9,09 % pacientov s klinicky potvrdenou pozitívnou rodinnou anamnézou, LVOT obštrukciou a implantovaným ICD. Naše analýzy potvrdili, že pacienti so sekvenčným variantom rs764018276 a pozitívnou rodinnou anamnézou mali závažnejšie klinické symptómy v porovnaní s ostatnými sledovanými pacientmi.

Záver

Predkladaná štúdia ako prvá na Slovensku opisuje sekvenčné varianty vybraných exónov SCN5A génu u slovenských HKM pacientov v závislosti od rodinnej anamnézy. Molekulárno-genetické analýzy potvrdili potenciálne patogénny efekt dvoch sekvenčných variantov (rs137854616, rs764018276). Pacienti so sekvenčným variantom rs764018276 a pozitívnou rodinnou anamnézou mali závažnejšie klinické symptómy v porovnaní s ostatnými pacientmi. Mutačný skrining SCN5A génu u pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami vrátane HKM má zásadný význam pre pacientov a ich rodinných príslušníkov, čo odôvodňuje odporúčanie molekulárno-genetického testovania príslušníkov rodín pacientov s pozitívnym genotypom a rodinnou anamnézou.

Pod'akovanie

Štúdia bola realizovaná s podporou projektu APVV-0644-12 a ITMS 26220120041.

Literatúra

BOTTILLO, I., D'ANGELANTONIO, D., CAPUTOB, V., PAIARDINIC, A., LIPARIA, M., DE BERNARDO, C., GIANNARELLID, D., PIZZUTIB, A., MAJORE, S., CASTORI, M., ZACHARA, E., RE, F., GRAMMATICO, P., 2016: Molecular analysis of sarcomeric and non-sarcomeric genes in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Gene*, 577(2):227-235.

CHARRON, P., ARAD, M., ARBUSTINI, E., BASSO, C., BILINSKA, Z., ELLIOTT, P., HELIO, T., KEREN, A., MCKENNA, W. J., MONSERRAT, L., PANKUWEIT, S., PERROT, A., RAPEZZI, C., RISTIC, A., SEGGEWISS, H., VAN LANGEN, I., TAVAZZI, L., 2010: Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *EHJ*, 31(22):2715-2726.

CIRINO, A. L., HO, C., 2014: Hypertrophic Cardiomyopathy Overview. *GeneReviews® [Internet]*, Online. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1768/>. 13 April 2015.

CRAWFORD, R. R., HIGDON, A. N., CASEY, D. B., GOOD, D. E., MUNGRUE, I. N., 2015: Multiple lithium-dependent Brugada syndrome unmasking events in a bipolar patient. *Clin. Case Rep.*, 3(1):14-18.

DZAU, V. J., LIEW, Ch. – Ch., 2008: Cardiovascular Genetics and Genomics for the Cardiologist. Oxford, John Wiley & Sons, 328 s. ISBN 9780470765944.

FOKSTUEN, S., MUNOZ, A., MELACINI, P., ILICETO, S., PERROT, A., OZCELIK, C., JEANRENAUD, X., RIEUBLAND, C., FARR, M., FABER, L., SIGWART, U., MACH, F., LERCH, R., ANTONARAKIS, S. E., BLOUIN, J. L., 2011: Rapid detection of genetic variants in hypertrophic cardiomyopathy by custom DNA resequencing array in clinical practice. *J. Med. Genet.*, 48(8):572-576.

FRENNEAUX, M. P., 2004: Assessing the risk of sudden cardiac death in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*, 90(5):570-575.

GERMANS, T., WILDE, A. A. M., VAN ECHTELD, C. J. A., KAMP, O., PINTO, Y. M., VAN ROSSUM, A. C., 2007: Structural abnormalities of the left ventricle in hypertrophic cardiomyopathy mutation carriers detectable before the development of hypertrophy. *Neth. Heart J.*, 15(4):161-163.

HERSHBERGER, R. E., COWAN, J., MORALES, A., SIEGFRIED, J. D., 2009: Progress With Genetic Cardiomyopathies Screening, Counseling, and Testing in Dilated, Hypertrophic, and Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *Circ. Heart Fail.*, 2(3):253-261.

LOPES, L. R., ZEKAVATI, A., SYRRIS, P., HUBANK, M., GIAMBARTOLOMEI, C., DALAGEORGOU, C., JENKINS, S., MCKENNA, W. UK10K CONSORTIUM, PLAGNOL, V., ELLIOTT, P. M., 2013: Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing. *J. Med. Genet.*, 50(4):228-239.

MACRAE, C., 2010: Genetics of Cardiomyopathy and Heart Failure. An Issue of Heart Failure Clinics. *Heart Fail. Clin.*, 6(2):129-270.

MARON, B. J., 2003. Sudden death in young athletes. *N. Engl. J. Med.*, 349(11):1064-1075.

OD'ROURKE, R. A., WALSH R. A., FUSTER V. et al., 2010: Kardiologie. Horstův manual pro praxi. Praha, Grada, 800 s. ISBN 9788024731759.

TESTER, D. J., ACKERMAN, M. J., 2011: Genetic Testing for Potentially Lethal, Highly Treatable Inherited Cardiomyopathies/Channelopathies in Clinical Practice. *Circulation*, 123(9):1021-1037.

KOSTROVÝ NÁLEZ Z HRONOVIEC (OKR. LEVICE, SLOVENSKO) DATOVANÝ DO OBDOBIA ENEOLITU

Silvia Bodoriková¹, Peter Tóth², Zora Bielichová³

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra antropológie, Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava, Slovensko, email: bodorikova@fns.uniba.sk

² Univerzita Komenského v Bratislave, Filozofická fakulta, Katedra archeológie, Gondova 2, 814 99 Bratislava, Slovensko, email: peter.toth@uniba.sk

³ Archeologický ústav Slovenskej akadémie vied, Akademická 2, 949 21 Nitra, Slovensko, email: zora.miklikova@gmail.com

Abstract: *Skeletal remains from Hronovce (Levice district, Slovakia) dated to the Eneolithic.* The skeletal remains and pottery from the site Hronovce-Vozokany were dated to the Middle Eneolithic Period, exactly to the late classical Baden culture (Baden III-IVa). Skeletal remains belonged to a female in the age of 35–45 years (adultus II–maturus I). The distal ends of both ulnae were deformed. The traumatic changes (e.g. the injury of distal radioulnar joint or Colles' fracture) which led to a nutritional disorder of carpal joints and weakening of the bones are considered. The degenerative-productive changes are present in the cervical vertebrae; arthritis is most pronounced on the body of the third and fourth cervical vertebrae. The heavy occlusal tooth wear was found in all teeth, and may not only be related to the consumption of abrasive food, but in this case it is possible to consider the use of teeth as the work tool. The analysis of stable isotopes $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ (-19.9, resp. +10.7) showed that a female had consumed terrestrial food typical for the temperate zone of Central Europe (cereals, vegetable food, meat from domestic and wild animals).

Key words: Archaeology, Anthropology, Archeozoology, Baden culture, Slovakia

Úvod

V máji roku 2009 boli v obci Hronovce (okr. Levice), v miestnej časti Vozokany, objavené kostrové pozostatky ľudského jedinca. Archeologická lokalita sa nachádza na severovýchodnom okraji obce a je situovaná na vysokej sprašovej terase na pravom brehu rieky Hron, pokrytej pomerne hrubou vrstvou černoze. Nálezisko leží v nadmorskej výške 136 m n. m. a prevýšenie od súčasnej riečnej hladiny predstavuje približne 10 m.

Ľudský skelet spolu s nálezmi keramiky a zvieracích kostí bol nájdený na pozemku pána Raczkého. Kostrové pozostatky „vypadli“ v dôsledku erózie nespevnenej klenby zo stropu pivnice. Všetky nálezy prevzal od pána Raczkého pán Szabó, ktorý ich uschoval do roku 2014. Následne si ich od neho prevzal archeológ Peter Tóth, ktorý nálezovú situáciu aj zdokumentoval.

Materiál a metódy

Mapovanie archeologických lokalít bolo realizované v programe QGIS, pričom bol využitý už existujúci súpis lokalít (Sachße 2010a, b, Tóth 2014).

Kostrové pozostatky exhumovaného jedinca sa analyzovali štandardnými morfometrickými a morfoskopickými metódami (Martin a Saller 1957, Knussmann 1988). Pohlavie jedinca sa odhadlo na základe stupňa rozvoja morfologických znakov na lebke (Acsádi a Nemeskéri 1970), ľavej ramennej kosti a oboch stehnových kostiach (Ferembach, Schwidetzky a Stloukal 1980). Vek dožitia bol odhadnutý na základe obliterácie endokranných švov a zmien vnútornej štruktúry hlavice ramennej a stehrovej kosti (Acsádi a Nemeskéri 1970, Ferembach, Schwidetzky a Stloukal 1980). Telesná výška bola počítaná podľa viacerých metód (Manouvrier 1894, Pearson 1899,

Telkkä 1950, Bach 1965, Rother 1978, Trotter a Gleser 1958, Sjøvold 1990). Vývinové anomálie a patologické zmeny boli sledované makroskopicky.

Počas antropologickej analýzy bola odobraná vzorka kompakty z dlhej kosti, ktorá bola zaslaná do laboratória Beta Analytic Limited v Londýne (Veľká Británia). Pomocou metódy AMS bolo realizované rádiokarbónové datovanie nálezu a zároveň bol stanovený obsah izotopov $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$.

Archeozoologický materiál bol analyzovaný štandardnými morfometrickými a morfoskopickými metódami (Kolda 1936, Schmid 1972, Silver 1969). Základný opis nálezov obsahuje druhové a anatomické určenie, odhad veku a pohlavia a registráciu modifikácií podľa Lyman (1994). Zvyšky boli kvantifikované na základe počtu identifikovaných fragmentov (NISP) a minimálneho počtu jedincov (MNI).

Výsledky

Rekonštrukcia nálezovej situácie

Pivnica obdĺžnikového pôdorysu s rozmermi 230 x 140 cm bola vykopaná do žltej spraše. Vo východnej polovici stropu pivnice bol porušený archeologický kontext približne oválneho tvaru s dĺžkou cca 137 cm a šírkou 110 cm. Kontext vyplňala šedohnedá až šedočierna hlina, v ktorej sa nachádzalo množstvo archeobotanického materiálu, predovšetkým mikrouhlíky (L. Petr, ústna informácia). Vo výplni sa našlo 17 črepov, takmer celá miniatúrna miska, 26 zvieracích kostí a dva kusy mazanice. Okrem toho sa tu nachádzala aj ľudská kostra, nálezové okolnosti však už dnes nie je možné verifikovať. Navyše sa kostra do dnešných čias zachovala nekompletná. Z týchto dôvodov nie je možné posúdiť, v akej polohe ľudský skelet pôvodne ležal, či šlo o pohreb v primárnej polohe alebo bola kostra do kontextu uložená v sekundárnej polohe.

Na základe vyššie uvedených okolností je isté, že ľudská kostra sa nachádzala v sídliskovom prostredí. Archeologický kontext preto môžeme interpretovať dvoma spôsobmi (obr. 1.2 a 1.3). Keďže strop pivnice má klenbový charakter (obr. 1.1), ako prvá alternatíva prichádzala do úvahy sídlisková vrstva. V neprospech tejto interpretácie svedčí jej hĺbka od súčasného povrchu (približne 200 cm), ako aj skutočnosť, že vo výklenku, situovanom v severnej časti pivnice, sa pokračovanie kultúrnej vrstvy v rovnakej nivelete nepozorovalo (obr. 1.2). Preto je pravdepodobnejšie, že ľudská kostra ležala na dne sídliskovej jamy (obr. 1.3).

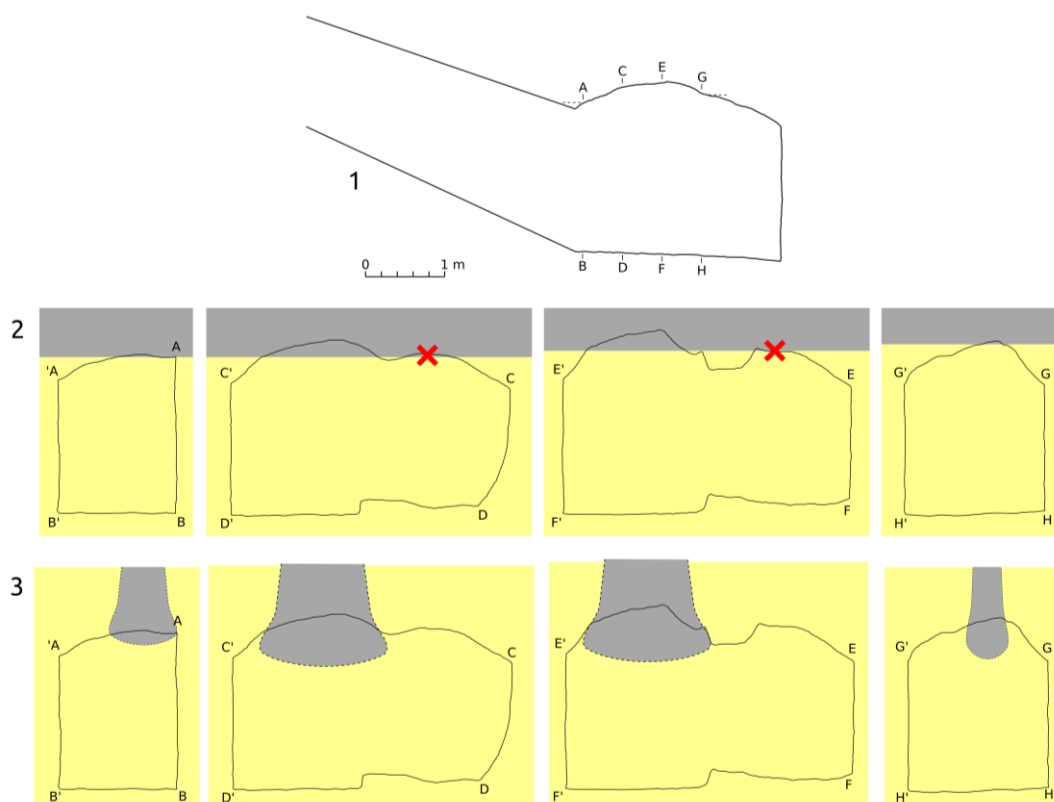
Absolútne a relatívne datovanie

Odobratá vzorka kompaktnéj kosti (č. vzorky Beta-442430: HRO01) bola pomocou AMS metódy konvenčne datovaná do 4500 ± 30 rokov BP. Po kalibrácii (2-sigma) je výsledný dátum stanovený na 3350 – 3090 calBC. Uvedené datovanie korešponduje s chronologickým zaradením keramiky, pochádzajúcej z výplne sídliskovej jamy. Kostrový nález i keramický materiál teda spadá do obdobia stredného eneolitu, konkrétne do obdobia mladšej klasickej badenskej kultúry (Baden III-IVa; Wild et al. 2001).

Výsledky antropologickej analýzy

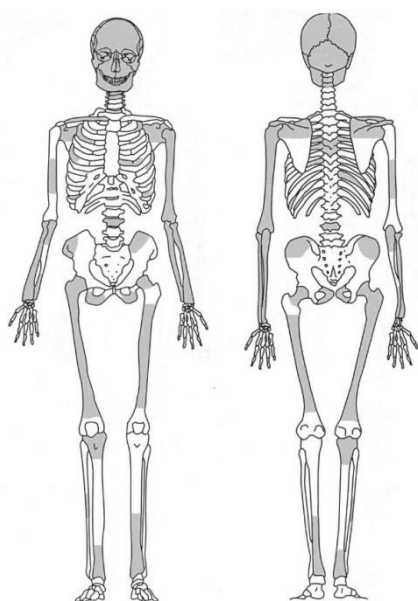
Kostra bola neúplná a väčšina kostí (lopatky, pravá ramenná a lakt'ová kosť, rebrá, panvové kosti, dlhé kosti dolných končatín) bola vo fragmentárnom stave. V pomerne dobrom stave sa zachovala lebka, ľavá ramenná, ľavá lakt'ová a ľavá vretenná kosť. Zo stavcov boli prítomné len tri krčné (C2, C3 a telo C4), dva hrudníkové a jeden drienkový stavec. Drobné kosti rúk a nôh neboli prítomné (obr. 2).

Zachovaných bolo 14 zubov, šesť zubov vypadlo počas života a 10 zubov bolo postmortálne stratených. V prípade ľavej hornej druhej a tretej stoličky je ťažké určiť, či vypadli počas života alebo až posmrtné, pretože na alveolárnej kosti sú zápalové zmeny. Ak vypadli počas života, muselo to byť krátko pred smrťou. Zachovanosť jednotlivých zubov je na obr. 3.



Obr. 1: Hronovce-Vozokany. Interpretácia nálezovej situácie: 1 – pozdĺžny rez pivnicou; 2 – sídlisková vrstva; 3 – sídlisková jama. Priečne rezy pivnicou (2, 3) sú orientované pohľadom z vchodu do pivnice (smerom z V na Z). Nepokračovanie kultúrnej vrstvy je znázornené krížikom (kresba: P. Tóth)

Fig. 1: Hronovce-Vozokany. Interpretation of the field situation: 1 – longitudinal section of the cellar; 2 – settlement layer; 3 – settlement pit. Cross sections of the cellar (2, 3) are viewed from the cellar entrance (i. e. from E to W). Discontinuation of the cultural layer is marked by cross (drawing: P. Tóth)



Obr. 2: Zachovanosť kostrových pozostatkov (zachované kosti sú označené sivou farbou)

Fig. 2: Preserved skeletal remains (marked in grey color)

Pravý horný kvadrant								Ľavý horný kvadrant							
IV	PM	x	x	IV	x	IV	IV	IV	IV	x	x	PM	PM	IV?	PM?
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
x	x	x	x	PM	PM	PM	PM	PM	x	x	PM	PM	x	x	x
Pravý dolný kvadrant								Ľavý dolný kvadrant							

x - zub prítomný

IV - intravitálne stratený zub

PM - postmortálne stratený zub

Obr. 3: Zachovanosť zubov
Fig. 3: The presence of teeth

Na základe rozvoja morfológických diagnostických znakov na lebke, ľavej ramennej kosti a oboch stehnových kostiach bol vypočítaný stupeň sexualizácie $DS = -0,54$, čo indikuje ženské pohlavie.

Na základe obliterácie endokranných švov na lebke, zmien vnútornej štruktúry hlavice ramennej a stehnovej kosti (Acsádi a Nemeskéri 1970, Ferembach, Schwidetzky a Stloukal 1980) bol vek dožitia odhadnutý na 39,33 roka. Vzhľadom na to, že ide len o odhad veku, treba počítať s odchýlkou min. ± 5 rokov. Danú ženu môžeme teda zaradiť do vekovej kategórie Adultus II až Maturus I (35 – 45 rokov).

Na základe rozmerov bola lebka stredne dlhá ($M1 = 172$ mm), úzka ($M8 = 136$ mm) a vysoká ($M17 = 136$ mm), tvár bola nízka ($M47 = 100$ mm) a stredne široká ($M45 = 120$ mm), očné široké a stredne vysoké ($M51 = 42$ mm, $M52 = 35$ mm), nos stredne široký a stredne vysoký ($M54 = 25$ mm, $M55 = 50$ mm). Na základe indexov bola mozgovňa mezokranná ($I1 = 79,1$), hypsikranná ($I2 = 79,1$) a akrokranná ($I3 = 100,0$), tvár euryprosopná ($I38 = 83,3$), očné mesokonchné ($I42 = 83,3$) a nosový otvor mesorhinný ($I48 = 50,0$; obr. 4).



Obr. 4: Lebka analyzovaného jedinca; pohľad zľava, spredu a sprava

Fig. 4: The skull of analysed individual; the view from the left, anterior and right side

Na výpočet telesnej výšky mohli byť použité len rozmery dlhých kostí ľavej hornej končatiny (tab. 1). Najmenšia telesná výška bola vypočítaná podľa Rothera (1978) $144,6 \pm 2,4$ cm, najväčšia telesná výška podľa Bacha (1965) $155,3 \pm 7,3$ cm. Podľa klasifikácie Martina a Sallera (1957) spadá do kategórie podstredná postava.

Tab. 1: Telesná výška vypočítaná na základe rozmerov dlhých kostí ľavej hornej končatiny (v cm)

Table 1: Stature calculation based on the dimensions of long bones of the left upper limb (in cm)

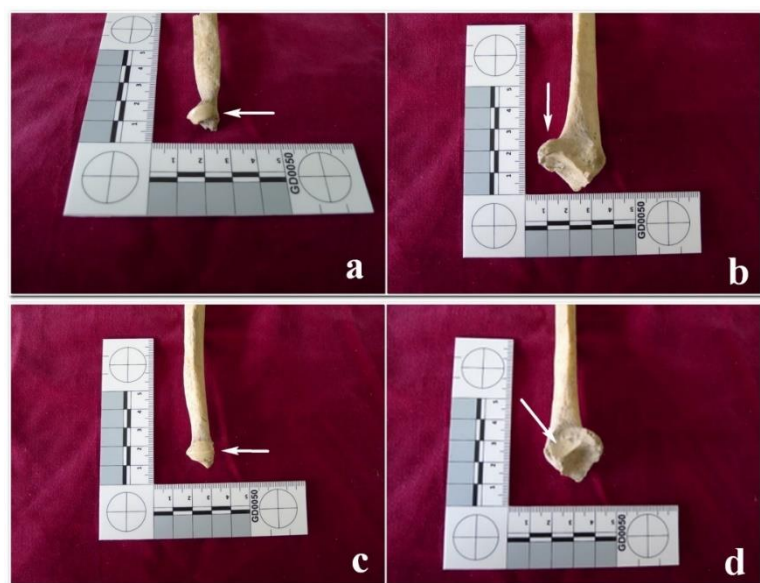
Výška postavy	dx	sin
Manouvrier (1894)	x	148,4
Pearson (1899)	x	146,7
Telkkä (1950)	x	149,7
Bach (1965)	x	155,3
Rother (1978)	x	144,6
Trotter, Gleser (1958)	x	151,4
Sjovold (1990)	x	152,7

Patologické zmeny sa vyskytujú na distálnych koncoch oboch lakt'ových kostí, pričom výraznejšie je deformovaná pravá *ulna* (obr. 5). Distálny koniec pravej lakt'ovej kosti je v oblasti metafýzy nápadne stenčený (obr. 5) a *circumferentia articularis* je výrazne eburnovaná (obr. 6a). Na distálnom konci pravej vretennej kosti sú na okraji *facies articularis carpea* artrotické zmeny (obr. 6b) a kĺbová plôška *incisura ulnaris* je takisto eburnovaná. Ľavá lakt'ová kosť nie je v oblasti distálnej metafýzy stenčená, ale je výrazne porotická z dorzálnej strany. *Caput ulnae* je podobne ako na pravej ulne výrazne eburnovaná (obr. 6c). Eburnácia je takisto na zodpovedajúcej kĺbovej ploche *incisura ulnaris* na ľavej vretennej kosti (obr. 6d). Vzhľadom na to, že *ossa carpalia* chýbajú, nie je ľahké jednoznačne stanoviť príčinu daných patologických zmien. Uvažujeme, že by mohlo ísť o postraumatické zmeny, v dôsledku ktorých došlo k poruche výživy zápästných kĺbov a oslabeniu kostí. Mohlo ísť napr. o poranenie distálneho rádioulnárneho kĺbu alebo o Collesovu zlomeninu. V dôsledku distorzie distálneho rádioulnárneho kĺbu (narazenia zápästia) dochádza k pomliaždeniu, natrhnutiu alebo až pretrhnutiu mäkkých tkanív, svalov, väzov alebo kĺbového puzdra. Nedostatočná liečba môže viesť k rozvoju chronickej bolesti alebo až k poruchám hybnosti. Collesova zlomenina vzniká pri páde na ruku v dorzálnej flexii a pronácii a vretenná kosť sa zlomí 2 – 3 cm od zápästného kĺbu. V polovici prípadov dochádza aj k zlomenine *processus styloideus ulnae*. Okrem toho môže prísť aj k pretrhnutiu väzov alebo k luxácii (vyklbeniu) v rádioulnárnom kĺbe. Vzhľadom na to, že zápästné kosti chýbajú, nedá sa urobiť presnejšia diagnostika.



Obr. 5: Patologické zmeny na distálnych koncoch kostí predlaktia

Fig. 5: Pathological changes in the distal ends of antebrachial bones



Obr. 6: Patologické zmeny na distálnych koncoch kostí predlaktia. a – eburnácia na *caput ulnae dex.*, b – artrotické zmeny na okraji *facies articularis carpea* pravej vretennej kosti, c – eburnácia na *caput ulnae sin.*, d – eburnácia na *incisura ulnaris* ľavej vretennej kosti

Fig. 6: Pathological changes in the distal ends of antebrachial bones. a – eburnation in the right ulnar head, b – arthritic changes in the periphery of *facies articularis carpea* in the right radius, c – eburnation in the left ulnar head, d – eburnation in *incisura ulnaris* of the left radius

Na krčných stavcoch sú prítomné degeneratívno-produktívne zmeny. Výrazne postihnuté je telo tretieho (obr. 7) a štvrtého krčného stavca. Ide o deformačnú artrózu, ktorá je u starších považovaná za prejav prirodzeného starnutia spojivových tkanív, ale u mladších jedincov býva vyvolaná dlhodobým nadmerným preťažovaním kĺbov, prekonanými zápalmi, vrodenými deformitami kĺbov, metabolickými ochoreniami, a pod. (Horáčková, Strouhal a Vargová 2004).

Patologické zmeny sa vyskytli aj na chrupe. Zubný kaz bol prítomný len na jednom zube a to na ľavej dolnej druhej stoličke (zub 37), lokalizovaný bol na bukálnej strane koreňov. Na maxile v periapikálnej oblasti pravého druhého a ľavého prvého premolára (zuby 15 a 24) boli vytvorené periapikálne granulómy. Všetky zuby sú výrazne abradované, zrejme aj tieto dva granulómy vznikli po otvorení dreňovej dutiny zuba ako následok hlbokkej abrázie. Výrazná abrázia zubov nemusí súvisieť len s konzumáciou hrubozrnnej a výrazne abrazívnej potravy, ale v tomto prípade je možné uvažovať o používaní zubov ako pracovného nástroja (obr. 8.).

Zaujímavosťou je, že postmortálne stratené horné druhé stoličky boli dvojkoreňové.



Obr. 7: Deformačná artróza na spodnej ploche tela tretieho krčného stavca

Fig. 7: Arthritis deformans in the lower surface of the body of the third cervical vertebra



Obr. 8: Výrazná abrázia zubov maxilly (a) a mandibuly (b)

Fig. 8: Heavy occlusal tooth wear in maxillary (a) nad mandibular (b) teeth

Zloženie stravy

Z kompakty dlhej kosti bol v laboratóriu Beta popri AMS datovaní stanovený aj obsah izotopov $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$. Hodnoty $\delta^{13}\text{C} = -19,9$ a $\delta^{15}\text{N} = +10,7$ sú typické pre jedincov konzumujúcich suchozemskú stravu v miernom pásme strednej Európy (obilniny, rastlinná potrava, mäso z domácich i divožijúcich druhov zvierat; Ogrinc a Budja 2005, Smrčka, Bůžek a Zocová 2008).

Výsledky archeozoologickej analýzy

K analýze sa zachoval veľmi malý súbor archeofaunálnych zvyškov (NISP = 26), ktorého interpretačné možnosti sú obmedzené, predovšetkým z pohľadu hodnotenia vekovej a pohlavnej štruktúry jedincov. Obsahoval osteozoologický i malakozoologický materiál. Pozostáva z 23 kostí a zubov cicavcov a troch vápenatých schránok mäkkýšov. Identifikovali sme dva až tri druhy hospodárskych zvierat – ovce/kozy (*Ovis/Capra*) a svine (*Sus sp.*). Vzhľadom na nízky vek jedincov predpokladáme, že u svine ide skôr o jej domácu formu (*Sus domesticus*). Schránky sladkovodných mäkkýšov reprezentujú jedince z čeľade korýtkovitých (*Unionidae*). Vo vzorke dominujú zvyšky domácich cicavcov, a ak zohľadníme i neisté určenie nálezov, tak prevažujú zvyšky ovce/kozy (NISP = 10) nad ošípanou (NISP = 7). Z hľadiska minimálneho počtu jedincov je ale ich zastúpenie vyrovnané (2:2).

V súbore sme zaznamenali výskyt jedincov veľmi nízkeho veku. Našli sa kosti plodu/veľmi mladého jahňaťa vo veku približne 0 – 2 mesiace. Tento vek nie je ideálny z pohľadu zabíjania zvierat za účelom konzumácie ich mäsa. Rovnako u ošípanej je vhodné vyberať na porážku skôr samcov, no vo vzorke máme doložené kosti samice.

Väčšina kostí nenesie ani stopy sekania či rezania – porciovania v rámci jatočného a kuchynského spracovania tiel zvierat. Jedinú výnimku predstavuje sánka a časť lebky svine, kde možno uvažovať o antropogénnych zásahoch. Nebol zaznamenaný ani jediný prípad ohryzenia kostí psom. Kostí nevykazujú žiadne stopy po kontakte s otvoreným ohňom.

Prítomnosť veľmi mladých jedincov a samíc v analyzovanom súbore, ako aj absencia kuchynských zásahov a ohryzu šelmami, typických skôr pre sídliskový odpad, v zásade podporujú hypotézu hrobového kontextu prezentovaného nálezu z Hronoviec. A hoci sú hodnotené zvieracie kosti fragmentárne a málo početné a teda neposkytujú možnosť jednoznačných záverov, možno sa domnievať, že reprezentujú súčasť hrobových milodarov. Schránky korýtok/mäkkýše z čeľade *Unionidae* mohli byť ich súčasťou. Okrem rituálnych aspektov, nálezy poskytujú svedectvo o lokálnom chove malých prežúvavcov a ošípanej, ako aj využití sladkovodných zdrojov v súvislosti s hospodárskymi stratégiami obyvateľstva.

Súpis zvieracích kostí – základná determinácia:

1. neurčený malý prežúvavec, *costa sin.*, >3/4 kosti, juvenis – adultus
2. neurčený malý prežúvavec, *costa dex.*, >1/2 kosti, juvenis – adultus; čerstvý zlom na distálnom konci
3. ovca domáca, *mandibula dex.*, >1/2 kosti, *dentes premolares dx.*, neonatus, dentálny vek cca 0 – 2 mesiace; staré zlomy
4. ovca/koza, *metatarsus*, diafýza, >3/4 kosti, foetus/neonatus, vek cca 0 mesiacov; staré zlomy
5. ovca/koza?, *vertebra lumbares*, foetus/neonatus; staré zlomy
6. ovca/koza?, *costa*, >1/2 kosti, foetus/neonatus; staré zlomy
7. ovca/koza?, *costa*, <1/2 kosti, foetus/neonatus; staré zlomy
8. ovca/koza?, *costa*, <1/2 kosti, neonatus/juvenis; staré zlomy
9. ovca/koza?, *ulna*, >1/2 kosti, foetus/neonatus; staré zlomy
10. neurčený malý prežúvavec, veľmi malý fragment indet., foetus/neonatus; staré zlomy
11. ovca/koza?, *femur*, diafýza, veľký fragment, juvenis – adultus; staré zlomy
12. ovca/koza?, *tibia*, diafýza, veľký fragment, juvenis – adultus; staré zlomy
13. ovca/koza?, *tibia*, diafýza, veľký fragment; staré zlomy
14. sviňa domáca, *ulna*, >3/4 kosti, diafýza, juvenis – adultus, postkranálny vek cca do 3,5 roka; čerstvý zlom distálne
15. sviňa domáca?, *neurocranium*, os parietale, juvenis – adultus, staré zlomy
16. sviňa domáca?, *splanchnocranium*, os frontale/maxillare, juvenis – adultus, čerstvé zlomy
17. sviňa domáca?, *splanchnocranium*, os frontale/maxillare, juvenis – adultus, čerstvé zlomy
18. sviňa domáca?, *splanchnocranium*, os frontale/maxillare, juvenis – adultus, čerstvé zlomy

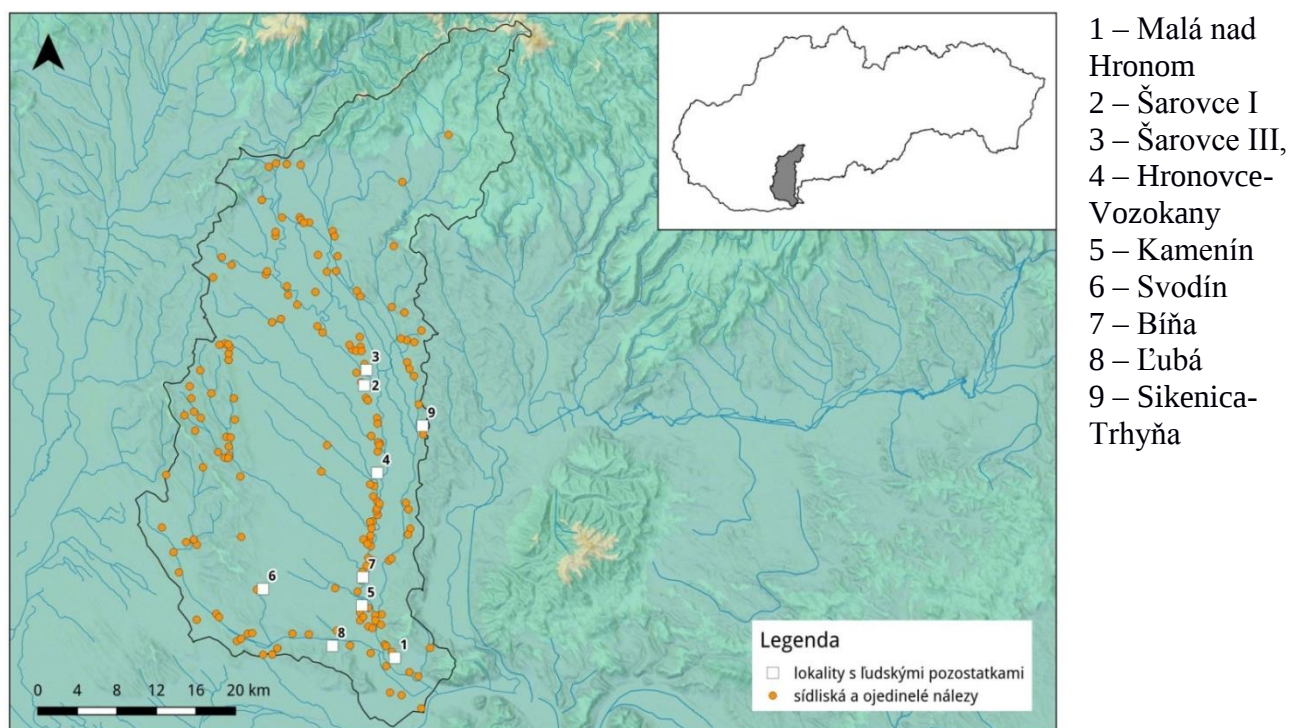
19. sviňa domáca?, *mandibula sin.*, *caninus inf. sin.*, *premolars inf. sin.*, veľký fragment, samica, juvenis – subadultus, dentálny vek 2 – 6 mesiacov, staré zlomy, stopa po záseku?
20. sviňa domáca?, *premaxilla sin.*, *incisivus sup. sin.*, veľký fragment, juvenis – adultus, čerstvé zlomy
21. neurčený cicavec, veľmi malý fragment
22. neurčené zviera, veľmi malý fragment
23. neurčené zviera, veľmi malý fragment
24. sladkovodný lastúrník (korýtko), temer kompletne zachovaná lastúra s približnou dĺžkou 35 mm, bezfarebný povrch lastúry pravdepodobne modifikovaný korienkami rastlín
25. sladkovodný lastúrník (korýtko), fragment lastúry
26. sladkovodný lastúrník (korýtko), veľmi malý fragment lastúry

Diskusia

V regióne dolného Pohronia je z celého trvania badenskej kultúry (stupne Baden I-IV) známych 175 lokalít (obr. 9), ktoré pozostávajú hlavne zo sídlisk a ojedinelých nálezov. Len na deviatich z nich sa vyskytli ľudské kostrové pozostatky v sídliskovom prostredí (menšia skupinka hrobov, hroby v sídliskových jamách) alebo na pohrebisku situovanom v nepoužívanej časti sídliska (tab. 2). Pre badenskú kultúru v celej oblasti rozšírenia je charakteristickým prejavom nepomer medzi počtom sídliskových lokalít a pohrebísk (Nevizánsky 2008, Šuteková 2005). Teda oblasť dolného Pohronia z tohto rámca nijako nevybočuje. Na začiatku badenskej kultúry (stupeň Baden I) bola charakteristickým prejavom pohrebného ritu kremácia. Ľudské i zvieracie pozostatky sa len ojedinele objavujú na sídliskách. Pokiaľ sa nachádzajú, stretávame sa s inhumáciou (Sachße 2010a).

V priebehu vývoja badenskej kultúry klesá počet pohrebísk a ľudské i zvieracie pozostatky (prevažne hovädzí dobytok, ovca/koza) sa čoraz častejšie začínajú vyskytovať v sídliskovom prostredí (Sachße 2010a). Prevládajúcim spôsobom pochovávaní je inhumácia. Ľudské pohreby boli do sídliskových jam ukladané už od neolitu, predovšetkým v kultúre s mladšou lineárnou keramikou. Sú známe aj v lengyelskej kultúre a bežne sa objavujú aj v kultúrach doby bronzovej a halštatskej. Obzvlášť typické sú pre badenskú kultúru (Kličová 2001, Němejcová-Pavúková 1986).

Menšia skupinka 3 kostrových hrobov v sídliskovom prostredí bola objavená v Šarovciach III (obr. 9, tab. 2). Kostry boli do hrobu uložené v skrčenej polohe na pravom i ľavom boku. V hroboch sa nenachádzali žiadne nálezy, prípadne obsahovali len ojedinelé črepy. V ostatných prípadoch (obr. 9; tab. 2) boli kostry nájdené v jamách, ktoré neboli špeciálne určené na hrobové účely, ale vždy v zahĺbených objektoch, ktoré už stratili svoju pôvodnú funkciu (zásobné jamy, pece). Jamy sa nachádzali roztrúsené po celom priestore sídliska, len v prípade Svodína sa koncentrovali na juhovýchodnom a východnom okraji sídliska (Nevizánsky 2008, Němejcová-Pavúková 1986). V sídliskových jamách sa v rôznych hĺbkach nachádzali kostrové pozostatky jedného jedinca (Šarovce I, III, Hronovce-Vozokany, Svodín) alebo troch jedincov (Kamenín, Svodín). Kostry ležali v skrčenej polohe na pravom alebo ľavom boku. Zaujímavé je zloženie súboru z hľadiska pohlavia a veku, prevažne sú zastúpené ženy a deti (cca 23 pohrebov), v 3 – 4 prípadoch šlo o mužov. V jamách sa často nachádzali črepy, ojedinele aj menšie poškodené nádoby (Šarovce I, Hronovce-Vozokany, obr. 3:4), prípadne boli bez nálezov (Šarovce III, Kamenín). Pozoruhodným je nález dvoch medených drôtených náušnic, ktoré sa našli pod lebkou jedinca v jame 20/1955 zo Šaroviec III. V blízkosti skeletu bola objavená silicitová čepieľka a na dne jamy hojný archeobotanický materiál (uhlíky; Novotný 1976).



Obr. 9: Lokality badenskej kultúry na dolnom Pohroní (podľa Sachße 2010a, Tóth 2014)

Fig. 9: *Spatial distribution of Baden culture sites in Lower Hron Valley (after Sachße 2010a, Tóth 2014)*

Okrem ľudských pozostatkov sa v jamách vyskytovali aj kostry domácich zvierat, či už samostatne (Svodín) alebo v kombinácii s ľudskými skeletmi (Šarovce I, Hronovce, Svodín). Šlo o celé kostry zvierat (Šarovce I, Svodín), prípadne ojedinelé zvieracie kosti (Hronovce-Vozokany). Z hľadiska druhového zastúpenia sa najčastejšie vyskytoval hovädzí dobytok (Svodín), ovca/koza (Hronovce-Vozokany), ošípaná (Hronovce-Vozokany) a pes (Šarovce I). Pozoruhodným je výskyt plodu, resp. novorodenca ovce/kozy a vysoký počet mladých jedincov v súbore zvieracích kostí z Hronoviec-Vozokán. Vychádzajúc z reprodukčného cyklu možno usúdiť, že k úmrtiu/usmrteniu plodu/novorodenca ovce/kozy došlo na konci zimy alebo na začiatku jari.

Pohreby v sídliskovom prostredí sa dostávajú do nového svetla vďaka výsledkom veľkoplošného archeologického výskumu lokality Balatonöszöd. V rokoch 2001 – 2002 bola odkrytá plocha o rozlohe cca 76 000 m², na ktorej bolo preskúmaných viac než 3100 objektov. Badenskej kultúre (stupne Baden I-III) patrilo približne 1200 z nich. Ľudské a zvieracie skelety sa našli v 75 objektoch (Horváth 2004, 2008, 2010, 2012). Horváth (2010) delí pohreby na sídliskách do troch kategórií. Prvú kategóriu tvoria veľké spoločné obety, ktoré pozostávali z viacerých zvierat alebo ich častí, ktoré sa často vyskytovali spolu s ľudskými skeletmi alebo hrobovou výbavou. Takéto jamy mohli byť zaplnené jednorazovou udalosťou alebo počas viacerých za sebou nasledujúcich ceremónií. Ďalšiu skupinu predstavujú ľudské skelety, ktoré interpretuje ako krvavé obety alebo intramurálne pohreby (t. j. pohreby v sídliskovom prostredí). Často sa v týchto jamách nachádzali aj zvieracie skelety. Tretiu skupinu predstavujú zvieracie kostry v sídliskových jamách, ktoré by mohli reprezentovať krvavé obety alebo zvieracie pohreby. Pri analýze ľudských a zvieracích skeletov boli dokumentované aj stopy násillia. Pozorované boli taktiež opálené kosti, ktoré sa nachádzali vo vrstve premiešanej s popolom a mazanicou. Opakovanie tohto aktu svedčí o tom, že šlo o súčasť opakujúcej sa ceremoniálnej choreografie (Horváth 2010, 2012).

Tab. 2: Lokality s ľudskými a zvieracími kostrovými pozostatkami na sídliskách na dolnom Pohroní
 Table 2: Sites with human and animal skeletal remains in settlement area in Lower Hron Valley

Lokalita	Datovanie	Typ objektu	Počet objektov	Popis	Literatúra
1. Malá nad Hronom	Boleráz	Hrob	4	3 žiarové a 1 symbolický (?) hrob	Němejcová-Pavúková 1974, Ožďáni 1984, Nevizánsky 1985, 2005, Nevizánsky, Ožďáni a Jakab 1995 – 1996, Sachße 2010b
2. Šarovce I	Baden II	Pohreb v sídliskovej jame	2	Kostrové pozostatky, dospelý jedinec, dieťa + pes	Novotný 1958a, 1958b, 1958c, 1976, Nevizánsky 1985, Sachße 2010b, Veit 1996
3. Šarovce III	Baden II	Hrob + pohreb v sídliskovej jame	3 + 1	Kostrové pozostatky	Novotný 1958a, 1958b, 1958c, 1976, Nevizánsky 1985, Sachße 2010b, Veit 1996
4. Hronovce-Vozokany	Baden III-IVa	Pohreb v sídliskovej jame?	1	Kostrové pozostatky, žena + zvieracie kosti (ovca/koza, ošípaná)	
5. Kamenín	Baden III-IVa	Pohreb v sídliskovej jame	1	Kostrové pozostatky, žena (30 – 40 r.) + dieťa (7 – 8 r.) + muž (?)	Jakab 1980, Nevizánsky 1999
6. Svodín	Baden III-IVa	Pohreb v sídliskovej jame, peci	?	Samostatné zvieracie (dobytok) a ľudské pohreby (20 kostier, prevažne ženy a deti), ľudské a zvieracie skelety v jednej jame	Němejcová-Pavúková 1975, 1980, 1986, Nevizánsky 1985, Sachße 2010b, Struhár 2001
7. Bíňa	Badenská kultúra	Pohreb v sídliskovej jame	1	Kostrové pozostatky	Prášek 1996
8. Ľubá	Badenská kultúra	?	?	?	Chropovský 1948
9. Sikenica-Trhyňa	Badenská kultúra	?	?	?	Novotný 1954

Interpretačné možnosti nálezu z Hronoviec-Vozokán, zúžené charakterom nálezových okolností, možno vnímať v širšom kontexte. Dôležitým faktom je prítomnosť mikrouhlíkov vo výplni sídliskovej jamy, ako aj vysoký podiel zvieracích kostí, patriacich mladým alebo veľmi mladým jedincom. Ojedinelé zvieracie kosti, ako aj fragmenty keramiky a poškodenú nádobu nemožno dávať do súvislosti s hrobovou výbavou (Nevizánsky 2008). Nemožno vynechať ani skutočnosť, že ženský skelet bol pomerne robustný a zuby extrémne obrúsené, pravdepodobne v dôsledku intenzívnej pracovnej činnosti. Z týchto dôvodov nález z Hronoviec-Vozokán zaraďujeme do druhej skupiny nálezov skeletov na sídliskách (Horváth 2010). Hoci na kostre neboli pozorované žiadne stopy násilia, na základe charakteru archeologických nálezov a analogicky k ďalším lokalitám by mohol byť interpretovaný aj ako obeť, ktorá sa mohla odohrať niekedy medzi 34. – 31. storočím pred n. l. na konci zimy, prípadne na začiatku jari. Uvedená ceremónia sa musela uskutočniť podľa vopred známej choreografie (Horváth 2010), počas ktorej bol obetovaný aj plod/novorodenec ovce/kozy. Dôležitú úlohu mohol počas ceremónie zohrávať aj oheň.

Záver

Kostrový nález i keramický materiál z lokality Hronovce-Vozokany (okr. Levice) bol datovaný do obdobia stredného eneolitu, konkrétne do obdobia mladšej klasickej badenskej kultúry (Baden III-IVa). Kostrové pozostatky patrili žene vo veku 35 – 45 rokov (Adultus II – Maturus I). Distálne konce kostí oboch predlaktí boli stenčené a deformované. Mohlo ísť o postraumatické zmeny (napr. o poranenie distálneho rádioulnárneho kĺbu alebo o Collesovu zlomeninu) v dôsledku ktorých došlo k poruche výživy zápästných kĺbov a oslabeniu kostí. Na krčných stavcoch sú prítomné degeneratívno-produktívne zmeny, deformačná artróza je najvýraznejšia na tele tretieho krčného stavca. Žena mala výrazne abradované zuby, čo nemusí súvisieť len s konzumáciou hrubozrnnej a výrazne abrazívnej potravy, ale v tomto prípade je možné uvažovať o používaní zubov ako pracovného nástroja. Analýza stabilných izotopov $\delta^{13}\text{C}$ (-19,9) a $\delta^{15}\text{N}$ (+10,7) ukázala, že žena konzumovala suchozemskú stravu typickú pre mierne pásmo strednej Európy (obilniny, rastlinná potrava, mäso z domácich i divožijúcich druhov zvierat).

Okrem kostrových pozostatkov ženy sa v sídliskovej jame nachádzal aj osteozoologický a malakozoologický materiál. Identifikované boli kosti ovce (*Ovis aries*) a svine domácej (*Sus domesticus*) a schránky sladkovodných mäkkýšov z čeľade korýtkovitých (*Unionidae*). Zaujímavý je výskyt veľmi mladých jedincov, predovšetkým plodu/veľmi mladého jahňata vo veku cca 0 – 2 mesiace. Väčšina kostí nenesie žiadne badateľné stopy sekania či rezania, t. j. porciovania, za účelom prípravy mäsa zvierat na konzumáciu. Jedinú výnimku predstavuje sánka svine a časť jej lebky, kde možno uvažovať o antropogénnych zásahoch na kostiach.

Hoci na kostre neboli pozorované žiadne stopy násillia, na základe analógií k ďalším lokalitám by nález mohol byť interpretovaný aj ako obeť, ktorá sa mohla odohrať na konci zimy, prípadne na začiatku jari. Počas ceremónie mohol byť obetovaný aj plod/novorodenec ovce/kozy.

Pod'akovanie

Štúdia bola podporená Grantom Univerzity Komenského č. UK/286/2016, APVV-14-0550, APVV-15-0491 a VEGA 1/0411/16. Ďakujeme Cs. Szabóovi za poskytnutie informácií o náleze, odovzdanie nálezov na spracovanie a pomoc pri dokumentovaní nálezovej situácie, M. Bóczovej za umožnenie vstupu na pozemok, L. Tóthovi a G. Tóthovej za pomoc pri dokumentovaní nálezovej situácie a archeologických nálezov, ako aj J. Mellnerovej za konzultáciu ohľadom datovania keramického materiálu.

Literatúra

ACSÁDI, G., NEMESKÉRI, J., 1970: History of human Life Span and Mortality. Budapešť, Akadémiai Kiadó, 347 s.

BACH, H., 1965: Zur Berechnung der Körpergröße aus den langen Gliedmassenknochen weiblicher Skelette. *Anthrop. Anz.* 29:12-21.

FEREMBACH, D., SCHWIDETZKY, I., STLOUKAL, M., 1980: Recommendations for Age and Sex Diagnoses of Skeleton. *J. Hum. Evol.*, 9:517-459.

HORÁČKOVÁ, L., STROUHAL, E., VARGOVÁ, L., 2004: Základy paleopatologie. In: Malina, J. (ed.): Panoráma biologické a sociokultúrní antropologie. Modulové učební texty pro studenty antropologie a „příbuzních“ oborů. Brno, Nadace Universitas Masarykiana v Brně, Akademické nakladatelství CERM v Brně, Masarykova univerzita v Brně, Nakladatelství a vydavatelství NAUMA v Brně, 263 s.

HORVÁTH, T., 2004: Late Copper Age settlement in Balatonőszöd, Hungary. *Acta Archaeologica Carpatica*, 39:59-85.

HORVÁTH, T., 2008: Balatonőszöd – an unusual Baden settlement? In: Furholt, M., Szmyt, M., Zastawny, A., Schalk, E., (ed.): The Baden complex and the outside world. Bonn, Dr. Rudolf Habelt, GmbH, s. 71-87.

- HORVÁTH, T., 2010: Transcendent phenomena in the Late Copper Age Boleráz/Baden settlement uncovered at Balatonőszöd-Temetői dűlő: human and animal „depositions“. Online. Available: <http://www.jungsteinsite.unikiel.de/2010_horvath/2010_Horvath_low.pdf> 21.10.2016
- HORVÁTH, T., 2012: Animal deposits in the Late Copper Age settlement of Balatonőszöd-Temetői dűlő, Hungary. In: Pluskowski, A. (ed.): The ritual killing and burial of animals. European perspectives. Oxford, Oxbow Books, s. 115-136.
- CHROPOVSKÝ, B., 1948: Ľubá. Nálezová správa č. j. 751/48. Nitra (depon in: Archeologický ústav SAV).
- JAKAB, J., 1980: Antropologická charakteristika kostier z Kamenína. AVANS v roku 1978, Nitra, AÚ SAV, s. 115-117.
- KLIČOVÁ, J., 2001: Doklady pohrebného ritu na sídliskách z obdobia neolitu a eneolitu na Slovensku. In: Metlička, M. (ed.): Otázky neolitu a eneolitu našich zemí. Plzeň, Západočeské muzeum v Plzni, s. 218-232.
- KNUSSMANN, R., 1988: Anthropologie. Handbuch der vergleichenden Biologie des Menschen. Band I: Wesen und Methoden der Anthropologie. Stuttgart, G. Fisher Verlag, 742 s.
- KOLDA, J., 1936: Srovnávací anatomie zvířat domácích se zřetelem k anatomii člověka. Brno, Novina, 914 s.
- LYMAN, R. L., 1994: Vertebrate Taphonomy. Cambridge, Cambridge University Press, 524 s.
- MANOUVRIER, L., 1894: La détermination de la tailed'après les grands os des membres. Memoires de la Société d'Antropologie de Paris, zv. 4. [citované podľa Martina a Sallera 1957].
- MARTIN, R., SALLER, K., 1957: Lehrbuch der Anthropologie. Stuttgart, G. Fisher Verlag, 661 s.
- NĚMEJCOVÁ-PAVÚKOVÁ, V., 1974: Beitrag zum Kennen der Postboleráz-Entwicklung der Badener Kultur. *Slovenská archeológia*, 22:237-360.
- NĚMEJCOVÁ-PAVÚKOVÁ, V., 1975: Systematický výskum vo Svodíne v rokoch 1971-1974. AVANS v roku 1974, Nitra, AÚ SAV, s. 66-67.
- NĚMEJCOVÁ-PAVÚKOVÁ, V., 1980: Výsledky systematického výskumu vo Svodíne. AVANS v roku 1979, 1980, Nitra, AÚ SAV, s. 145-147.
- NĚMEJCOVÁ-PAVÚKOVÁ, V., 1986: Vorbericht über die systematischen Grabungen in Svodín in den Jahren 1971-1983. *Slovenská archeológia*, 34:133-173.
- NEVIZÁNSKY, G., 1985: Grabfunde und Überbauerscheinungen der Träger der Badener Kultur im zentralen Gebiet des Karpatenbeckens. *Slovenská archeológia*, 33:249-270.
- NEVIZÁNSKY, G., 1999: Novšie výskumy sídlisk ľudu badenskej kultúry na južnom Slovensku. *Slovenská archeológia*, 47:69-87.
- NEVIZÁNSKY, G., 2005: Nové poznatky o bolerázskej skupine na západnom Slovensku. In: Cheben, I., Kuzma, I. (ed.): Otázky neolitu a eneolitu našich krajín – 2004. Nitra, Archeologický ústav SAV, s. 241-272.
- NEVIZÁNSKY, G., 2008: Nepublikované hrobové nálezy badenskej kultúry z juhozápadného Slovenska. *Študijné zvesti Archeologického ústavu SAV*, 44:193-202.
- NEVIZÁNSKY, G., OŽDÁNI, O., JAKAB, J., 1995 – 1996: Ein Brandgräberfeld der Badener Kultur in Malá nad Hronom. *Saarbrücker Studien und Materialien zur Altertumskunde*, 4-5:251-269.
- NOVOTNÝ, B., 1954: Sikenica-Trhyňa. Nálezová správa č. 645/54. Nitra, AÚ SAV, ms. (depon in: Archeologický ústav SAV).
- NOVOTNÝ, B., 1958a: Slovensko v mladšej dobe kamennej. Bratislava, Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, 65 s.
- NOVOTNÝ, B., 1958b: Počiatky výtvarného prejavu na Slovensku. Bratislava, Slovenské vydavateľstvo krásnej literatúry, 257 s.
- NOVOTNÝ, B., 1958c: Nové nálezy kanelované keramiky na dolnom Pohroní. *Archeologické rozhledy*, 10:605-617.

- NOVOTNÝ, B., 1976: Šarovce. Bratislava, Univerzita Komenského, 197 s.
- OGRINC, N., BUDJA, M., 2005: Paleodietary reconstruction of a Neolithic population in Slovenia: A stable isotope approach. *Chem. Geol.*, 218:103-116.
- OŽDÁNI, O., 1984: Záchranný výskum v Malej nad Hronom. AVANS v roku 1983, 1984, Nitra, AÚ SAV, s. 171.
- PAVELKA, J., ORNA, J., 2011: Výsledky analýzy potravinových zbytků na pozdně středověké keramice z Plzně. *Acta Fakulty filozofické Západočeské univerzity v Plzni*, 3:84-98.
- PEARSON, K., 1899: Mathematical contribution to the theory of evolution. V. On the reconstruction of stature of prehistoric races. *Philosophical Transactions of the Royal Society A.*, 192:169-244.
- POWER, R. C., SALAZAR-GARCÍA, D. C., WITTIG, R. M., HENRY, A. G., 2014: Assessing use and suitability of scanning electron microscopy in the analysis of micro remains in dental calculus. *J. Archaeol. Sci.* 49:160-169.
- PRÁŠEK, K., 1996: Pokračovanie výskumu v Bíni. AVANS v roku 1994, Nitra, AÚ SAV, s. 142.
- ROTHER, P., 1978: Zur Rekonstruktion der Körperhöhe. In: Hunger, h., Leopold, D. (ed.): Identification. Johann Ambrosius Barth, Leipzig, s. 199-200.
- SACHSE, C., 2010a: Untersuchungen zu den Bestattungssitten der Badener Kultur. Teil I. Bonn, Dr. Rudolf Habelt, GmbH, 331 s.
- SACHSE, C., 2010b: Untersuchungen zu den Bestattungssitten der Badener Kultur. Teil II. Bonn, Dr. Rudolf Habelt, GmbH, 128 s.
- SCHMID, E., 1972: Atlas of animal bones. Amsterdam – London – New York, Elsevier, 159 s.
- SILVER, I. A., 1969: The ageing of domestic animals. In: Brothwell, D., Higgs, E. (ed.): Science in archaeology. 2. vyd., London, Thames and Hudson, s. 283-302.
- SJØVOLD, T., 1990: Estimation of stature from long bones utilizing the line of organic correlation. *Hum. Evol.*, 5(5):431-447.
- SMRČKA, V., BŮZEK, F., ZOCOVÁ, J., 2008: C and N stable isotopes in a set of 17 skeletons from the Vedrovice cemetery. *Anthropologie (Brno)*, 46:227-231.
- STRUHÁR, V., 2001: K výskytu zvieracích depónií v badenskej kultúre. In: Metlička, M. (ed.): Otázky neolitu a eneolitu našich zemí – 2000. Plzeň, Západočeské muzeum v Plzni, s. 191-200.
- ŠUTEKOVÁ, J., 2005: Špecifiká pohrebného ritu v eneolite (so zreteľom na pohrebiská v oblasti Karpatskej kotliny). In: Cheben, I., Kuzma, I., (ed.): Otázky neolitu a eneolitu našich krajín – 2004. Nitra, AÚ SAV, s. 321-334.
- TELKKÄ, A., 1950: On the prediction of human stature from the long bones. *Acta Anatomica*, 9:103-117.
- TÓTH, P., 2014: Stratégia, dynamika a štruktúra osídlenia v neolite až staršej dobe bronzovej medzi Ponitím a Poipľím. ms. -555 s. (dizertačná práca; depon in: Archeologický ústav SAV, Univerzita Komenského).
- TROTTER, M., GLEESER, G., 1952: Estimation of stature from long bones of American Whites and Negros. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 10(4):463-514.
- VEIT, U., 1996: Studien zum Problem der Siedlungsbestattungen im europäischen Neolithikum. Münster, Waxmann, 449 s.
- WILD, E. M., STADLER, P., BONDÁR, M., DRAXLER, S., FRIESINGER, H., KUTSCHERA, W., PRILLER, A., ROM, W., RUTTKAY, E., STEIER, P., 2001: New chronological frame for the Young Neolithic Baden Culture in Central Europe (4th millennium BC). *Radiocarbon*, 43:1057-1064.

PRELIMINARY OSTEOLOGICAL INVESTIGATIONS FROM THE SZADA-PUSZTASZENTJAKAB CEMETERY IN HUNGARY

Iulia Rusu

School of History, Archaeology and Religion, Cardiff University, John Percival Building, Colum Drive, Cardiff, Wales, United Kingdom; email: rusu_iulia2005@yahoo.com

Abstract: Full osteological investigations have been undertaken at the Szada-Pusztaszentjakab cemetery in Hungary in 2015 and 2016, involving 206 actual graves and 68 bags of stray finds. The present article will only discuss the first category. The main focus of the investigations was to determine existent paleopathological conditions connected to population health, achieved by the recording of afflictions such as porotic hyperostosis or hypoplasia. Future plans of integrated isotope analyses will reveal further insights into both communal and individual dietary practices.

Keywords: historical anthropology, palaeopathology, porotic hyperostosis, hypoplasia, Central Europe

Introduction

Centuries-long migrations from the east led the Hungarian tribes to settle in the Carpathian Basin at the end of the 9th century. This was accompanied by social and economic change – from a semi-nomadic lifestyle to a sedentary one, and from paganism to Christianity – which in turn may have brought shifts in population health.

Material and Methods

Following the archaeological investigations from 2013 and 2014, osteological materials (late medieval, 12th–14/15th c. A.D.) were sent to the Gödöllő Museum, where osteological analysis commenced in 2015 and were concluded in 2016 in March. Analyses were undertaken in order to define state of completion and fragmentation level, determine age/sex and paleopathological data, and undertake measurements (cranial/postcranial). However, only partial data is discussed in this paper.

For determining age, Scheuer and Black (2000), Brooks and Suchey (1990), Brothwell (1981), and Buikstra and Ubelaker (1994) methods were used in examining the pubic symphysis changes, length of long bones (in the case of infants), medial aspect of the clavicle, the iliac crest, dental attrition, fusion of bones and auricular surface morphology. Sex was determined using Buikstra and Ubelaker (1994) method in examining the skull and pelvis, while for the recording of paleopathological conditions, Mann and Hunt (2005) method was consulted.

Results

Demography and Paleopathology

From a total of 232 individuals, 206 individuals provided enough data in order to allow demographic reconstruction. Henceforth, a total of 56 males, 52 females, 16 juveniles and 57 infants were recorded, to which we add 14 probable males and 11 probable females (Chart 1). In terms of age at death, there is a clear distinction between males and females. While the average life expectancy was between 30 and 40 years, females exhibit a much earlier age at death than males, which is usually attributed to child bearing and may also be connected to various bacterial infections.

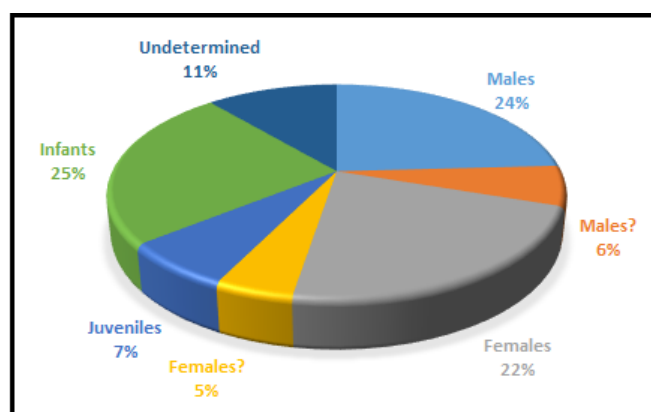


Chart 1. Demographic data from Szada

Paleopathological investigations provide important elements regarding population life ways: while nutritional/bacterial conditions may indicate population health – signaling possible dietary practices and environmental factors – the osteoarticular afflictions reveal important aspects of communal/individual activity. Although all present conditions have been recorded, the current article will only discuss the most essential of them. A chart relating to secondary afflictions is provided however (Chart 2).

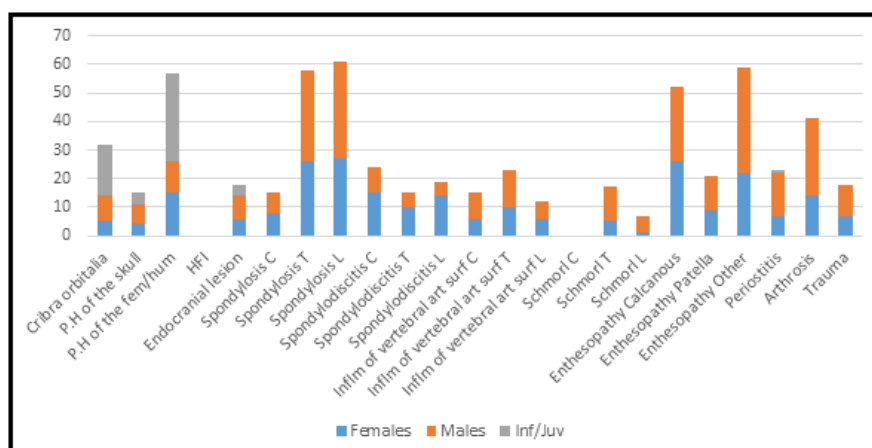


Chart 2: Paleopathological recordings from Szada

Nutritional/bacterial diseases

At Szada, from a total of 206 individuals, 104 cases of porotic hyperostosis (PH) have been recorded, regardless of age and gender. From these, 31% represent cribriform orbitalia (CO), 14% PH (skull) and 55% PH of the femoral/humeral head (C F/H PH). Looking at these numbers from a gender based perspective; CO was mostly recorded within the Infant/Juvenile category, which amassed to 56% of cases. A very pronounced case was recorded in a 4- to 6-year-old infant from grave 302 (Fig. 1). Further calculations have shown that infants were followed by males with 28%, and finally by females with only 16%. Porotic hyperostosis found on the cranial vault is only represented by a small number of cases (15) and shows that the most afflicted were the males (46%), followed by both females and infants/juveniles with the same number of cases (4) reaching only 27% each. The C F/H PH, however, were the most registered. Regardless of whether we refer to the femur or the humerus, 57 such cases were recorded. From these, 55% belonged to infants/juveniles, 26% to females and 19% to males.

Secondary to PH, but essential when investigating population welfare, hypoplastic lines or enamel hypoplasia, appears in 50 cases in the Szada-Pusztaszentjakab cemetery. Based on the calculations, the most affected are the males (42% - 21 cases), followed by females (24 % - 12 cases), infants (18% - nine cases), juveniles (12% - six cases) and two unsexed individuals (4%).

There are afflictions such as endocranial lesions (EL), which are usually associated with meningitis typically resulting from bacterial infection, too. However, vitamin deficiency may also

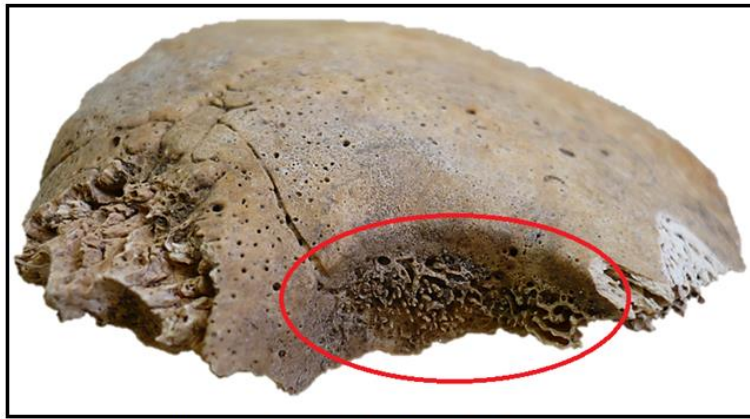


Figure 1. Grave 302 - Cribra Orbitalia

be a starting point (especially vitamin C deficiency) (Lewis 2004). Vitamin C is essential for collagen formation and maintenance of bone and teeth integrity, as well as injury healing and iron absorption regulation (Cecconi, Mallegni, and D'Anastasio. 2007).

Szada has yielded 18 cases of EL. From these, eight cases affect males (graves 166, 178, 385, 392/1, 393, 407, 420, 486), six cases females (graves 187, 195, 310, 386, 439, 456) and four cases infants/juveniles

(graves 237, 246, 354, 361). While nutritional deficiencies are taken into account at this stage, these alone could not have caused endocranial lesions. The safest route is to assume that this affliction is caused by more than one element. Accordingly, we have tried grouping EL with some of the nutritional diseases, in order to observe just how common these appear simultaneously. Results show only five cases of EL alone (graves 166, 195, 246, 386, and 407), while all the others have been supplemented by one or two of either PH, CO or hypoplasia.

Osteoarticular afflictions

Recordings have confirmed that most osteoarticular afflictions are those found on the vertebrae – spondylosis, spondylodiscitis, inflammation of articular joints and Schmorl's nodes. A total of 268 cases involve just this section of the body and are mostly confined to the lower back (except spondylodiscis, which is mostly found on the cervical vertebrae).

From these, 26 cases of Schmorl's nodes have been identified. Investigations have concluded different stages of the disease, ranging from debut to severe cases, where the affliction has been seen to spread all the way to the spinal cord, causing pain. No affected cervical vertebrae were recorded. From the total number of cases, 17 were located on the thoracic and seen on the lumbar vertebrae. As for gender, males were undeniably more affected than females. Occasionally, their development was associated with specific diseases which produce weakening of the subchondral bone and resultant disruption of the cartilaginous endplate and metastatic deposits in the vertebral column. The lesions are also seen in the lower thoracic/lumbar spine, resulting from biomechanical stress on these vertebrae when transmitting force from the upper to the lower body during daily activity. Metabolic deficiencies and/or increased body mass have also been forwarded as possible causes (Plomp, Roberts and Viðarsdóttir 2012).

Discussion

Having a total number of 104 PH and 50 hypoplasia cases, plus the other contributing infectious diseases, is it safe to assume that the Szada cemetery belonged to a modest community (in terms of health). Various evidence of increased decline in population health has been identified in the past, based on recordings of the above mentioned nutritional afflictions, from other cemeteries in Hungary, which are apparently connected with sedentary life. In these regards, Marcsik, Fóthi and Hegyi (2002) believe that *“the adoption of sedentary farming was apparently accompanied by a*

decline in the overall quality of nutrition”. Consideration has also been given in terms of gender-based predilection to certain diseases. While some authors report that females are more affected by CO because of their physiology (menstruation, pregnancy, childbirth) leading to the loss of more iron, others have recorded no fundamental differences in the spread of CO based on gender. In the case of Szada, we see that females are actually the less affected (16 % - 5 cases), while 28% (9 cases) belong to males, which further denotes the fact that gender is not an influential characteristic of this affliction. A Chi-square test found no statistical significance ($p=0.3$).

Conclusions and future plans

The most interesting facts resulting from osteological investigations at Szada are undoubtedly connected to health. While some diseases show a fairly gender-based preference, a high death rate of infants can likewise be seen (this is however usual for the Medieval period).

Having identified probable nutritional stress among most individuals, the obvious next step is to allow integrated isotope analyses to reveal more details regarding dietary practices.

Acknowledgments

Sincerest appreciations for the Gödöllő Museum, for housing and aiding in all osteological investigations.

Bibliography

CECCONI, E., MALLEGGNI, F., D'ANASTASIO, 2007: Endocranial lesions in a subadult of the cemetery of San Sebastiano's Church, Saluzzo, Piedmont, Italy (XV century). *J. Paleopathol.*, 19(1-3):11-18.

BROTHWELL, D. R., 1981: Digging up Bones. Oxford, Oxford University Press, 208 pp.

BROOKS, S. T., SUCHEY, J. M., 1990: Skeletal age determination based on the os pubis: A comparison of the Acsadi Nemeskéri and Suchey-Brooks methods, *Hum. Evol.*, 5(3):227-238.

BUIKSTRA, J. E., UBELAKER, D. H. (ed.), 1994: Standards for Data Collection from Human Skeletal Remains, Arkansas Archaeological Survey Research Series, No. 44, Fayetteville.

LEWIS, M. E., 2004: Endocranial Lesions in Non-adult Skeletons: Understanding their aetiology, *Int. J. Osteoarcheol.*, 14:82-97.

MANN, R., HUNT, R., 2005: Photographic regional atlas of bone disease. A guide to pathologic and normal variation in the human skeleton. Third edition, Springfield, Illinois, USA, 297 pp.

MARCSIK, A., FÓTHI, E., HEGYI, A., 2002, Paleopathological changes in the Carpathian Basin in the 10th and 11th centuries, *Acta Biologica Szegediensis*, 46(1-2): 95-99.

PLOMP, K. A., ROBERTS, C. A., VIÓARSDÓTTIR, U. S., 2012: Vertebral morphology influences the development of Schmorl's nodes in the lower thoracic vertebrae, *Am. J. Phys. Anthropol.*, 149(4):572-82.

SCHEUER, L., BLACK, S., 2000: Developmental Juvenile Osteology, Amsterdam, 587 pp.

GENETICKÁ DETEKCE SRPKOVITÉ ANÉMIE U JEDINCŮ Z OBDOBÍ KULTURY ZVONCOVITÝCH POHÁRŮ POCHÁZEJÍCÍCH Z LOKALITY HOŠTICE I ZA HANOU

Kristýna Brzobohatá, Kateřina Garguláková, Eva Drozdová

Laboratoř biologické a molekulární antropologie, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 735, 605 00 Brno, Česká republika; email: brzobohata@sci.muni.cz

Abstract: *Genetic detection of sickle cell anemia in individuals from the Beaker culture necropolis Hoštice I za Hanou* Bell Beaker Culture necropolis was found near the village Hoštice za Hanou in 2002. Women's and children's skeletons from this area were characterized by a high frequency of occurrence porotic hyperostosis (PH) and cribra orbitalia (CO). These pathologies are often associated with anemia. Anemia caused by malnutrition in this population was excluded; therefore it has been tested incidence of sickle cell allele as an alternative cause. Fluorescently labeled TaqMan® probes were designed for detection of SNPs rs334. Allelic discrimination was successful; wild type allele was detected in 14 of the 16 samples. Mutant allele was detected only in positive plasmid controls. Sickle cell anemia did not cause porotic hyperostosis and cribra orbitalia in population from Hoštice I za Hanou.

Key words: porotic hyperostosis, cribra orbitalia, ancient DNA, rs334, real time qPCR allelic discrimination

Úvod

Pohřebiště lidu kultury zvoncovitých pohárů (KZP) na lokalitě Hoštice I za Hanou bylo zkoumáno v letech 2002 – 2003 pracovníky Ústavu archeologické památkové péče v Brně. Jedná se o dosud největší pohřebiště z tohoto období nalezené na území České republiky (Bálek et al. 2003). Původ a rozšíření KZP do Evropy není dodnes zcela objasněn, existují nicméně archeologické doklady o jejím výskytu v severní Africe (Balout 1958). Geografický rozsah zabírá prostor mezi severozápadní Afrikou až po Malopolsko (Turek 2006). Příslušníci KZP žili v malých skupinách, hospodařili a patrně i kočovali. U KZP se již předpokládá částečná genetická adaptace na zemědělský způsob života (Drozdová et al. 2011). Na ploše cca 1ha bylo nalezeno 157 hrobů se 143 jedinci (38 mužů, 38 žen, zbytek nedospělci nebo neurčitelné). Na kosterním materiálu byla provedena antropologická analýza a také řada specializovaných analýz. Veškeré výsledky jsou shrnuty v publikaci Drozdové et al. (2011) „Hoštice I za Hanou. Výsledky antropologické analýzy lidu kultury zvoncovitých pohárů.“ V rámci specializovaných analýz populace z Hoštic za Hanou bylo provedeno i hodnocení paleopatologického stavu skeletů a jeho porovnání s dalšími nalezišti (Shbat et al. 2009; Smrčka a Tvrdý 2009). U žen byl patrný vyšší výskyt porotické hyperostózy (PH) na lebečních kostech (Drozdová a Smrčka 2011). Příčina PH není dodnes vysvětlena, ale nejčastěji se dává do souvislosti s anémií (Baxarias a Herrerin 2008). Na základě provedené analýzy stopových prvků byla vyloučena malnutrice (Smrčka et al. 2011). Jako další možná příčina anémie se tedy nabízí geneticky podmíněná anémie – hemoglobinopatie. Tuto teorii by bylo možno vztáhnout i domnělý původ kultury ve Středomoří, kde se mutantní alely způsobující hemoglobinopatie vyskytují s vyšší četností a dále informace, že příslušníci KZP žili v malých komunitách, kde se mohla vyskytovat vysoká míra homozygotnosti. Srpkovitá anémie (SA) je spolu s talasemií celosvětově nejrozšířenější hemoglobinopatií. SA je způsobena jednonukleotidovým polymorfismem (SNP), nejčastěji v lokusu rs334 (A >T) v genu HBB kódujícím beta globin

(11p15.5; Odivre et al. 2011). Dochází k změně konformace proteinu, což způsobuje typický srpkovitý tvar červených krvinek. Distribuce polymorfni alely HbS je podmíněna dvěma faktory - pozitivním selekčním tlakem na heterozygoty, kteří jsou odolnější vůči nákaze malárií (Allison 1954) a migrací. PH u historických populací může mít souvislost s geneticky podmíněnými anémiemi, jakou je i srpkovitá anémie (Hershtkovitz et al. 1991).

Cílem experimentu bylo zavedení metody detekce SNP rs334 na vzorcích starobylé DNA (aDNA), návrh plasmidového konstruktů jako pozitivní kontroly, návrh alelově specifických TaqMan sond®, optimalizace složení reakční směsi a podmínek cyklování a analýza kosterních pozůstatků s porotickými změnami z lokality Hoštice za Hanou.

Materiál a metody

Kosterní pozůstatky z Hoštic I za Hanou byly už dříve použity pro určení pohlaví prostřednictvím analýzy aDNA (Vaňharová 2008). Ze souboru vzorků pulverizované kostní tkáně byly na základě paleopatologické analýzy (Drozdová a Smrčka 2011) vybrány ty, u nichž byl popsán výskyt porozity. Jejich charakteristika je shrnuta v tab. 1.

Tab. 1: Souhrn a charakteristika analyzovaných vzorků. Název vychází z číslování hrobů *in situ*. Pohlaví, věk a paleopatologická charakteristika vycházejí z publikace Drozdová et al. (2011).

Table 1: Summary and characteristics of the analyzed samples. Name of the sample is based on the numbering of the graves in situ. Gender, age and paleopathological characteristics are based on publications Drozdová et al. (2011).

Vzorek	Tkáň	Pohlaví	Věk	Porozita
H806	dlouhá kost	dítě	6 let	os parietale dx., sin.
H836	lebka	dítě	8 let	glabella
H842	žebro	dítě	12 let	eminentia cruciformis, CO v dx.
H846	dlouhá kost	dítě	13 – 15 let	squama occipitalis, rozhraní os occipitalis a parietale
H847	dlouhá kost	dítě	5 let	os occipitale, os parietale
H851	žebro	nedospělý	15 – 20 let	processus palatinus maxillae, os occipitale, os coxae, caput femori dx., os frontale; CO dx.
H852	dlouhá kost	nedospělý	15 – 18 let	trochlea humeri dx., incisura trochlearis sin., ulna dx., femur dx., talus dx. I sin., calcaneus dx. I sin.
H857	lebka	dítě	11 let	os occipitale, ossa parietalia, CO dx.
H858	dlouhá kost	nedospělý	15 – 20 let	glabella, os temporale, os parietale dx.
H893	dlouhá kost	nedospělý	17 – 20 let	os parietale sin., CO dx.
H899	lebka	muž	20 – 25 let	arcus superciliaris dx., ossa parietalia, CO sin.
H905	dlouhá kost	dítě	9 let	těla krčních obratlů
H933	dlouhá kost	dítě	12 – 15 let	os frontale
H942	dlouhá kost	dítě	8 – 12 let	os frontale
H946	lebka	dítě	5 – 6 let	os parietale dx.
H950	dlouhá kost	dítě	13 – 15 let	processus palatinus maxillae, CO dx. i sin.

Veškeré laboratorní analýzy byly prováděny v Laboratoři biologické a molekulární antropologie (LBMA) za protikontaminačních opatření doporučených v publikaci Cooper a Poinar (2001). aDNA byla purifikována pomocí kolon MinElute® SpinColumn (Qiagen) protokolem dle Yanga et al. (1998) a přečištěna kolonami OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research). Kvantita aDNA byla stanovena forenzním kitem Plexor® HY (Promega). Pro detekci rs334 byla zvolena metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (real time qPCR) v módu alelové diskriminace (AD). Pro polymorfismus rs334 byla navržena sada fluorescenčně značených sond TaqMan® a shodný pár primerů: forward 5'-TCAAACAGACACCATGGTGCAT-3', reverse

5'-CCCCACAGGGCAGTAACG-3'; sondy: rs334_MUT, značena FAM: 5'-TGACTCCTGTGGAGAA-3'; 5'-TGACTCCTGTGGAGAA-3 značena VIC: 5'-TGACTCCTGAGGAGAA-3'. Jako pozitivní kontrola pro WT alelu byla použita Plexor® HY Male DNA (50 ng/μl; Promega®) a pro MUT alelu byl navržen plasmidový konstrukt pUC57kan se vloženou sekvencí mutantní alely (Sigma Aldrich). Složení reakční směsi bylo optimalizováno pro charakteristiky aDNA, byla přidána AmpliTaq Gold® a BSA (Sutlovic et al. 2005; Chung et al. 2004). Reakční směs se skládala z 11, 50 μl 2x TaqMan® Genotyping Master Mix; 1, 25 μl 20x SNP Genotyping Assay; 0,5 μl AmpliTaq Gold® DNA polymerase; 0,5 μl BSA a 11,25 μl templátové DNA. Objem reakce činil 25 μl. Amplifikace probíhala na AB 7500 System, software sds v2.1. a podmínky cyklování byly následující: počáteční denaturace: 95° C, 2 minuty, cyklování 50x: denaturace 95° C, 15 sekund; annealing/extenze 60° C, 1 minutu; disociační analýza – defaultní nastavení. Vzorky byly analyzovány v duplexu, reakce proběhla ve dvou nezávislých analýzách.

Výsledky

Izolace aDNA proběhla úspěšně, koncentrace aDNA byla stanovena v 15 vzorcích z 16. Kalibrační křivka byla sestavena na základě ředící řady standardní DNA s ředícím faktorem 10. Účinnost reakce byla 98,67 %. Výsledky kvantifikace vzorků jsou shrnuty v tab. 2.

Funkčnost navržených TaqMan® sond a plasmidových konstruktů byla ověřena kontrolní reakcí na standardizované DNA. Real time qPCR probíhala na starobylých vzorcích nejúspěšněji, byl – li do reakční směsi přidán 1 μl BSA a 0, 5 μl AmpliTaq Gold® DNA polymerase. Heterozygot byl získán smísením 10 μl Plexor® HY Male Genomic DNA (Promega) a naředěného plasmidového konstruktu v koncentraci 10⁴ plasmidů na 1 μl H₂O. Po optimalizaci reakce proběhlo samotné genotypování. Alelová diskriminace proběhla úspěšně u 14 vzorků u 16. U vzorku H946 a H950 i při opakování analýzy selhala PCR a nedošlo k nárůstu fluorescence. U všech vzorků z Hoštic I za Hanou byla detekována pouze alela HbA. Detekce alely HbS u plasmidových kontrol proběhla úspěšně. Výsledky analýz jsou shrnuty v tab. 2 U negativních kontrol nebyla během analýz detekována DNA.

Tab. 2: Výsledky alelové diskriminace (genotyp) a koncentrace detekované DNA v pg/μl

Table 2: Results of the allelic discrimination (genotype) and the concentration of detected DNA (pg/μl)

	Vzorek	Genotyp	pg/μl		Vzorek	Genotyp	pg/μl
1	H806	HbAA	unteter.	9	H858	HbAA	239,5
2	H836	HbAA	256,5	10	H893	HbAA	239,8
3	H842	HbAA	244,4	11	H899	HbAA	312,9
4	H846	HbAA	319,0	12	H905	HbAA	373,5
5	H847	HbAA	278,4	13	H933	HbAA	350,6
6	H851	HbAA	310,0	14	H942	HbAA	280,7
7	H852	HbAA	245,0	15	H946	unteter.	308,2
8	H857	HbAA	221,8	16	H950	unteter.	205,5

Diskuze

Kosterní materiál z Hoštic I za Hanou vykazoval četný výskyt cribra orbitalia (CO) a porotické hyperostózy (Smrčka a Drozdová 2011). Ze souboru bylo vybráno 16 jedinců se znaky PH a CO, u nichž byl analyzován SNP rs334 zodpovědný srpkovitou anémií. Izolace aDNA byla úspěšná, ačkoliv byl kosterní materiál značně fragmentován, což bylo potvrzeno už následnou kvantifikací. Genetický materiál byl detekován v 15 vzorcích z 16 celkových (93,75 %). Při kvantifikaci nebyla detekována inhibice, což je dokladem, že předčišťovací krok kvalitě vzorků pomohl. Metoda

alelové diskriminace na principu real time qPCR alelově specifikovala 14 vzorků z 16 (88,88 %). U žádného jedince však nebyla detekována srpkovitá alela. Zcela jistě lze vyloučit eventualitu selhání detekce HbS, protože souběžná detekce plasmidových kontrol proběhla bez problémů. Vezmeme-li v potaz teorii, že PH je způsobena anémií, je nutno se zaměřit na další možné příčiny. Z analýzy stopových prvků je možné vyvodit, že anémie u jedinců z Hoštice nebyla spojena s malnutricí (Smrčka et al. 2011). Lze tedy uvažovat o dalších typech hemoglobinopatií. V genu HBB se vyskytuje řada dalších SNP, které jsou příčinou i jiných forem onemocnění (<http://www.snpedia.com/index>), nejčastěji talasemie alfa nebo beta, které, obdobně jako SA, vykazují abnormality na kostech ve formě PH a CO (Stamatoyannopoulos et al. 2001). Jejich geografická distribuce také odpovídá výskytu SA, protože i talasemie poskytuje svým přenašečům rezistenci k onemocnění malárií (Weatherall a Clegg 1981). Metoda alelové diskriminace založené na real time qPCR je snadno modifikovatelná i na detekci dalších SNP zodpovědných za jiné typy hemoglobinopatií.

Závěr

Cílem experimentu bylo zavedení metody detekce srpkovité alely (SNP rs334) u starobylé DNA. Vzorky, na nichž byla metoda zavedena, pocházely z lokality náležící ke kultuře zvoncovitých pohárů – Hoštice I za Hanou a všech jedinců byly přítomná PH a CO. U 14 vzorků z 16 jedinců se podařilo stanovit genotyp pro daný polymorfismus. U všech vzorků byla detekována wild type alela rs334 A, mutantní alela rs334 T se amplifikovala pouze u kontrolních plasmidů. Detekce genotypu rs334 byla zavedena úspěšně, ale nepodařilo se určit příčinu PH a CO u jedinců z Hoštice I za Hanou.

Literatura

- ALLISON, A. C., 1954: The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(4):312-318.
- BÁLEK, M., BERKOVEC, T., KOS, P., LEČBYCH, M., MATĚJÍČKOVÁ, A., PARMA, D., PŘICHYSTAL, M., ŠMÍD, M., 2003: Předběžné výsledky první etapy záchranného archeologického výzkumu v trase dálnice D1 Vyškov – Modřice, *Přehledy výzkumů*, 44:137-150.
- BALOUT, L., 1958: Algérie préhistorique. Paris, Arts et métiers graphiques, 182 s.
- BAXARIAS, J., HERRERÍN, J., 2008: The handbook atlas of paleopathology. Zaragoza, Generalitat de Catalunya, Museu d'Arqueologia de Catalunya, 588 s.
- COOPER, A., POINAR, H. N., 2000: Ancient DNA: Do It Right or Not at All. *Science*, 289(5482):1139.
- CHUNG, D. T., DRABEK, J., OPEL, K. L., BUTLER, J. M., MCCORD, B. R., 2004: A study on the effects of degradation and template concentration on the amplification efficiency of the STR Miniplex primer sets. *J. Forensic Sci.*, 49:733-740.
- DROZDOVÁ, E., 2011: Úvod. In: Drozdová, E., Balueva, T., Benešová, J., Bůzek, F., Erban, V., Kanický, V., Matějčíková, A., Nejezchlebová, H., Ovesná, P., Smrčka, V., Vaňharová, M., Veselovskaya, E., Zocová, J. (ed.): Hoštice I za Hanou: Výsledky antropologické analýzy pohřebiště lidu kultury zvoncovitých pohárů. Brno, Masarykova univerzita, s. 7-9.
- DROZDOVÁ, E., SMRČKA, V., 2011: Paleopatologická analýza skeletů z pohřebiště Hoštice I za Hanou. In: Drozdová, E., Balueva, T., Benešová, J., Bůzek, F., Erban, V., Kanický, V., Matějčíková, A., Nejezchlebová, H., Ovesná, P., Smrčka, V., Vaňharová, M., Veselovskaya, E., Zocová, J. (ed.): Hoštice I za Hanou: Výsledky antropologické analýzy pohřebiště lidu kultury zvoncovitých pohárů. Brno, Masarykova univerzita, s. 128-165.
- HERSHTKOVITZ, I., 1991: Possible congenital hemolytic anemia in prehistoric coastal inhabitants of Israel. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 85(1):7-13.

- ODIVRE, M. H., VERGER, E., SILVA-PINTO, A. C., 2011: Pathophysiological insights in sickle cell disease. *Indian J. Med. Res.*, 134:532-7.
- SHBAT, A., RŮŽIČKOVÁ, I., HERLOVÁ, P., 2009: Skeletal health of late Neolithic populations from Bohemia. *Antropologie (Brno)*, 47(3):195-214.
- SMRČKA, V., TVRDÝ, Z., 2009: Skeletal evidence for diseases in the Neolithic of Moravia. *Antropologie (Brno)*, 47(3): 295-303.
- SMRČKA, V., DROZDOVÁ, E., BŮZEK, F., KANICKÝ, V., ZOCOVÁ, J. 2011: Rekonstrukce složení stravy prostřednictvím poměru stabilních izotopů uhlíku a dusíku a obsahu stopových prvků v kostní tkáni lidí z pohřebiště Hoštice I za Hanou. In: Drozdová, E., Balueva, T., Benešová, J., Bůzek, F., Erban, V., Kanický, V., Matějčíková, A., Nejezchlebová, H., Ovesná, P., Smrčka, V., Vaňharová, M., Veselovskaya, E., Zocová, J. (ed.): Hoštice I za Hanou: Výsledky antropologické analýzy pohřebiště lidu kultury zvoncovitých pohárů. Brno, Masarykova univerzita, s. 71-186.
- STAMATOYANNOPOULOS, G., MAJERUS, P. W., PERLMUTTER, R. M., VARMUS, H., 2001: Molecular basis of blood diseases. 3. vyd., Philadelphia. The W. B. Saunders Publishing Co., 1056 s.
- SUTLOVIĆ, D., GOJANOVIĆ, M. D., ANĐELINOVIĆ, Š., GUGIĆ, D., PRIMORAC, D., 2005: Taq Polymerase Reverses Inhibition of Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction by Humic Acid. *Croat. Med. J.*, 46(4): 556-562.
- TUREK, J., 2006: Období zvoncovitých pohárů v Evropě. *Archeologie ve středních Čechách*, 10:275-368.
- VANĚHAROVÁ, M., 2008: Determinace pohlaví u dětí a nedospělých jedinců z eneolitického pohřebiště Hoštice I za Hanou. -172 s., ms. (Disertační práce, depon in: Brno, MU Přírodovědecká fakulta).
- WEATHERALL, D. J., CLEGG, J. B., 1981: The Thalassemia syndromes. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 846 s.
- YANG, D. Y., ENG, B., WAYE, J. S., DUAR, J. C., SAUNDERS, S. R., 1998: Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 105(4): 539-543.

OBSAH

BOROŇOVÁ, I., BERNASOVSKÁ, J., KMEC, J., et al.: Zbtb17 gene single nucleotide polymorphisms in Slovak patients with dilated cardiomyopathy.....	1
FUCHSOVÁ, M., NEŠČÁKOVÁ, E., ĎURÍČKOVÁ, M., et al.: Výskyt deformít nôh u detí bratislavských škôl.....	6
MAČEKOVÁ, S., BOROŇOVÁ, I., PRIGANC, M., et al.: Polymorfizmus génu FTO ako rizikový faktor pre obezitu u pacientov s dilatálnou kardiomyopatiou.....	12
PETREJČÍKOVÁ, E., MYDLÁROVÁ BLAŠČÁKOVÁ, M., HUBCEJOVÁ, J., et al.: Paternálna línia i u pacientov s ischemickou chorobou srdca.....	17
PRIGANC, M., ZIGOVÁ, M., BERNASOVSKÁ, J., et al.: Analýza a porovnanie genetických variantov scn5a génu vo vybranej skupine slovenských kardiomyopatických pacientov.....	22
ZIGOVÁ, M., PRIGANC, M., BOROŇOVÁ, I., et al.: Detekcia sekvenčných variantov vybraných exónov scn5a génu u slovenských pacientov s hypertrofickou kardiomyopatiou v závislosti od rodinnej anamnézy.....	26
BODORIKOVÁ, S., TÓTH, P., BIELICHOVÁ, Z.: Kostrový nález z Hronoviec (okr. Levice, Slovensko) datovaný do obdobia eneolitu.....	31
RUSU, I.: Preliminary osteological investigations from the Szada-Pusztaszentjakab cemetery in Hungary.....	44
BRZOBOHATÁ, K., GARGULÁKOVÁ, K., DROZDOVÁ, E.: Genetická detekce srpkovité anémie u jedinců z období kultury zvoncovitých pohárů pocházejících z lokality Hoštice I za Hanou.....	48