

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra biochemie

POLYMORFISMY GENU PXR V ČESKÉ POPULACI

Diplomová práce

Praha 2006

Kateřina Polívková

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele prof. MUDr. Františka Perlíka, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Praha, 4. 5. 2006

Kateřina Polívková

Především bych chtěla poděkovat svému školiteli profesoru MUDr. Františku Perlíkovi, DrSc. za odborné rady, pomoc a trpělivost při sepisování této diplomové práce.

Za zasvěcení do problematiky a za odbornou pomoc při experimentální i teoretické části práce děkuji svému konzultantovi MUDr. Ondřeji Slanařovi.

Dále bych chtěla poděkovat kolektivům Farmakologického ústavu 1. Lékařské fakulty UK a Oddělení klinické farmakologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, hlavně paní Evě Vlachové za sběr vzorků krve a jejich následné zpracování.

V neposlední řadě také děkuji své rodině za trpělivost a velkou podporu během studia.

OBSAH	strana
Seznam zkratk	6
1. Úvod	9
2. Literární přehled	10
2.1 Nukleární receptory	10
2.2 Gen PXR	12
2.3 Gen MDR1	22
2.4 Idiopatické střevní záněty	27
2.4.1 Léčba idiopatických střevních zánětů	29
3 Hypotéza a cíl práce	34
3.1 Hypotéza	34
3.2 Cíl práce	34
4 Metody	35
4.1 Použité reagensie	35
4.2 Studované skupiny populace	36
4.3 Izolace DNA z krve	36
4.3.1 Izolace DNA vysolovací metodou	37
4.3.2 Izolace DNA pomocí „QIAmp Blood Mini Kitu“	38
4.3.3 Příprava gelů	39
4.4 Genotypování	40
4.4.1 Obecná charakteristika genotypování	40
4.4.1.1 PCR	41
4.4.1.2 RFLP	44
4.4.2 Metodika stanovení polymorfismu v pozici - 25 385	45
4.4.3 Metodika stanovení polymorfismu v pozici - 24 113	46
4.4.4 Metodika stanovení polymorfismu v pozici 7 635	48
4.4.5 Metodika stanovení polymorfismu v pozici 10 799	49
4.5 Zpracování výsledků	51

5.	Výsledky	53
5.1	Frekvence výskytu polymorfismů genu PXR v české populaci u souboru nemocných a kontrol	54
5.1.1	Polymorfismus v pozici -25 385	54
5.1.2	Polymorfismus v pozici -24 113	58
5.1.3	Polymorfismus v pozici 7 635	62
5.1.4	Polymorfismus v pozici 10 799	66
5.2	Frekvence výskytu variantních alel	70
6	Diskuse	71
7	Souhrn	74
	Seznam použité literatury	76

SEZNAM ZKRATEK

A	adenin
ABC	ATP vazebné domény („ATP Binding Cassette“)
ASA	aminosalicyláty
bp	páry bází
C	cytosin
CAR	konstitutivní androstanový receptor (NR113)
CD	Crohnova nemoc (Crohn's disease)
CI	konfidenční interval
CNS	centrální nervová soustava
CsA	ciclosporin A
CYP	cytochrom P450
CV-1	buněčná kultura fibroblastů z ledvin
dH ₂ O	destilovaná voda
dATP	deoxyadenosintrifosfát
DBD	DNA vazebná doména
dCTP	deoxycytidintrifosfát
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
Dobr	soubor dobrovolníků
DR-3	část DNA, ve které dochází k přímému opakování třinukleotidové sekvence (directed repeat)
dTTP	deoxythymidintrifosfát
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová

ER-6	část DNA, kde dochází k obrácenému opakování šestinukleotidové sekvence (everted repeat)
F	primer ve směru 5'>3' původního vlákna DNA (forward)
FXR	farnesoidový X receptor (NR1H4)
g	gravitační tíhové zrychlení
G	guanin
GR	glukokortikoidový receptor (NR3C1)
inj. H ₂ O	injekční voda
ISZ	idiopatické střevní záněty
ISZpac	soubor pacientů, kteří trpí některým z idiopatických střevních zánětů
LBD	ligand vázající doména
LCA	lithocholová kyselina
LXR	žatrní X receptor (NR1H3)
NR	nukleární receptor
MDR	MultiDrug Resistance
mRNA	mediátorová RNA
ort	soubor pacientů ortopedie, kteří netrpí žádným z ISZ
ort léčená	soubor pacientů ortopedie, kteří berou dlouhodobě farmaka
ort neléčená	pacienti ortopedie, kteří nejsou dlouhodobě léčeni
ot./min	otáčky centrifugy za minutu
PCB	polychlorované bifenyly
PCN	pregnenolon 16 α -carbonitril
PCR	polymerázová řetězová reakce
P-gp	P-glykoprotein
PPAR α	receptor- α aktivovaný proliferátory peroxisomů (NR1C1)
PXR	pregnanový X receptor (NR1I2)
PXR/RXR	heterodimer, forma ve které je PXR schopen vazby
R	primer ve směru 3'>5' původního vlákna DNA (reverse)

RAR	receptor kyseliny retinové (NR1B1)
RBC pufr	lyzační pufr pro erytrocyty (Red Blood Cells)
RFLP	analýza délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
RNA	ribonukleová kyselina
RXR	receptor 9-cis retinové kyseliny (NR2B1)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
SXR	steroidní X receptor
T	thymin
TNF- α	faktor α nekrotizující tumor (tumor necrosis factor)
u	jednotka aktivity enzymu
UC	ulcerózní kolitida (ulcerative colitis)
v	variantní alela
v/v	homozygot pro variantní alely
VDR	vitamin D receptor
v/wt	heterozygot
wt	alela bez přítomnosti polymorfismů, tzv. „wild-type“
wt/wt	homozygot pro alely bez přítomnosti polymorfismů

1 ÚVOD

Každý organismus se musí denně bránit nejen látkám, které na něj působí z vnějšího prostředí (xenobiotikům), ale i látkám, které si vytvoří jeho vlastní tělo (endobiotikům). Hlavní obrannou složkou jsou enzymy metabolizující léčiva – členové nadrodiny cytochromů P450 (CYP). Nadrodinu lidských cytochromů P450 tvoří 17 rodin, ze kterých jsou pouze první tři – CYP1, CYP2 a CYP3 – zodpovědné za metabolismus léčiv a xenobiotik. Xenobiotika i léčiva jsou pozměněna na více polární sloučeniny a ty jsou pak snadněji vyloučeny z těla. Další z důležitých součástí ochranného mechanismu těla vůči různým chemickým látkám je také člen rodiny nukleárních receptorů – pregnanový X receptor (PXR).

Endobiotika a xenobiotika (včetně hormonů, žlučových kyselin, karcinogenů, léčiv a všeho co se nachází v jídle nebo v prostředí kolem nás) jsou potenciálně toxické látky. Míra jejich toxicity závisí jen na množství, kterému jsme vystaveni.

Nukleární receptory působí také jako metabolické a toxikologické senzory, které umožňují přizpůsobení a upravení metabolických cest tak, aby se organismus lépe bránil nadměrné expozici nepříznivým podmínkám. Tyto receptory mohou ovlivnit homeostázu až do té míry, že se mohou podílet na vzniku mnoha známých metabolických nemocí, např.: obezita, inzulinová rezistence, diabetes mellitus typu 2, hyperlipidemie, atheroskleróza a mohou částečně podpořit vysokou incidenci těchto chorob [1].

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

Nukleární receptory (NR) jsou hlavními složkami pro zprostředkování lékové indukce. Jejich ligandy jsou často malé a lipofilní, vlastnostmi velmi podobné xenobiotickým a endobiotickým sloučeninám jako jsou steroidy, žlučové kyseliny nebo mastné kyseliny. Ligandy těchto receptorů se vyskytují v potravě, v léčivech, ale i v okolí kolem nás. Kvůli neustálým změnám životního stylu se zvýšilo i množství ligandů NR, kterým jsme každodenně vystaveni. Hlavními důvody jsou strava, nedostatek tělesného pohybu a často i zbytečné užívání mnoha léčivých přípravků.

Podrodina nukleárních receptorů NR11 hraje klíčovou roli při mnohých fyziologických procesech, kterých se účastní také cytochromy P450 (CYP) a NR11 je jejich regulátorem – viz tabulka 2.1.1.

Srovnávací genomickou studií bylo zjištěno, že nadrodina nukleárních receptorů má 48 členů u člověka, 49 u myši a 47 u potkanů [2].

Nukleární receptory mají strukturu charakterizovanou ligand-nezávislou AF-1 transaktivační doménou v N-terminální části molekuly, vysoce konzervovanou DNA vazebnou doménu (tvoří ji dva zinkové prsty rozpoznávající specifickou DNA sekvenci) a ligand vázající doménu, která obsahuje ligand-závislou AF-2 transaktivační doménu v C-terminální části molekuly [1]. Struktura ligand vázající domény genu PXR je zobrazena na obrázku 2.2.1 na straně 14.

Tabulka 2.1.1: Regulace cytochromů P450 pomocí nukleárních receptorů podle Okey *et al.* [2].

Nukleární receptor	Induktor	Regulovaný CYP
CAR (NR1I3)	phenobarbital 5 β -pregnan-3,2-dion	2A6, 2B6, 2C9, 3A4, 2C19
FXR (NR1H4)	žlučové kyseliny	7A1
GR (NR3C1)	dexamethason	3A4, 2B6, 2C8, 2C19, 1A1
LXR (NR1H3)	oxysteroly	7A1, 3A4, 2B6
PPAR α (NR1C)	statiny fibráty (hypolipidemika)	4A
PXR (NR1I2)	PCN, rifampicin hyperforin	2A6, 3A4, 3A5, 3A7, 2B6, 2C9, 2C19, 1A1, 1A2
RAR (NR1B1)	trans retinové kyseliny	26A1
VDR (NR1I1)	1,25-dihydroxyvitamin D ₃	3A4, 2B6, 2C9, 24

V závorkách u názvů receptorů jsou uvedeny jejich zkratky: CAR znamená konstitutivní androstanový receptor, FXR je farnesoidový X receptor, GR je glukokortikoidový receptor, LXR je jaterní X receptor, PPAR α je receptor- α aktivovaný proliferátory peroxisomů, PXR je pregnanový X receptor, RAR je receptor kyseliny retinové a VDR značí receptor vitamínu D.

Někteří členové rodiny nukleárních receptorů, jako jsou konstitutivní androstanový receptor (CAR), pregnanový X receptor (PXR) nebo receptor vitamínu D (VDR), jsou zodpovědné za xenobiotiky a endobiotiky zprostředkovanou indukci CYP3A genů [3]. Nedávné studie poukázaly na to, že nukleární receptor NR1I2 (pregnanový X receptor – PXR) zprostředkovává xenobiotickou indukci genů CYP3A navázáním se na PXR odpovědné elementy v regulačních oblastech těchto genů [4, 5].

Nukleární receptory, kromě regulace enzymů metabolizujících léčiva, regulují také expresi některých transportních proteinů nadrodiny ABC (ATP Binding Cassette). Výskyt polymorfismu (záměny báze v sekvenci DNA) v některém z těchto receptorů může ovlivnit farmakokinetiku léčiva a terapeutickou odpověď pacientů.

Frekvence výskytu jednonukleotidových polymorfismů nukleárních receptorů je mnohem nižší v kódujících oblastech než v nepřekládaných oblastech nebo v intronech. Polymorfismus v nepřekládané oblasti na 3' konci sekvence DNA velmi často ovlivňuje stabilitu transkripce. Zatím žádný z nukleárních receptorů neobsahuje polymorfismus, který by byl vhodný pro diagnostiku nemocí ani pro předpověď „clearance“ léčiva a jeho terapeutický účinek [2].

Největší výskyt jednonukleotidových polymorfismů, ve kterých záměnou bazí nedochází k záměně aminokyselin, nukleárních receptorů je u PXR. Nukleární receptor PXR je obzvláště důležitý, protože je hlavním regulátorem indukce *CYP3A* a také se účastní na regulaci *CYP2B* a *CYP2C*.

2.2 GEN PXR

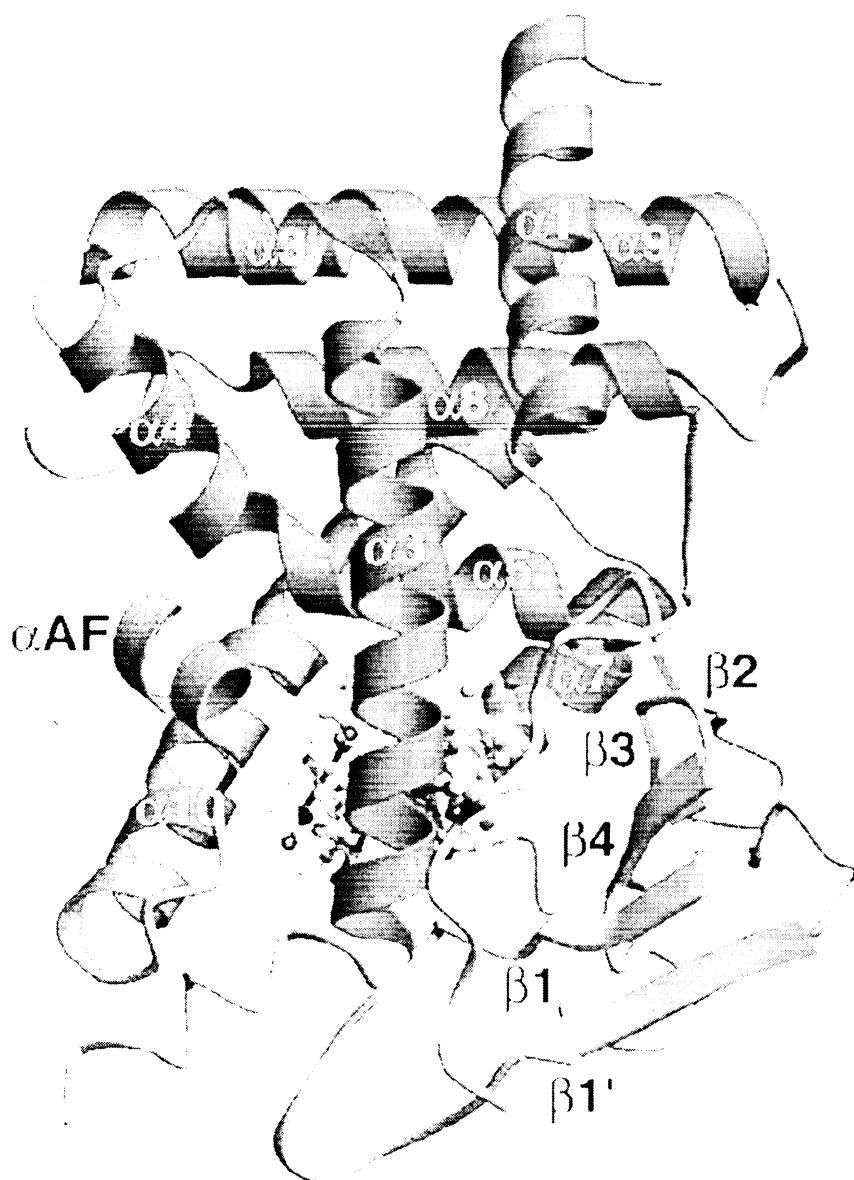
Identifikace a charakterizace pregnanového X receptoru (PXR) měla velmi důležitou roli v pochopení obranného mechanismu těla vůči xenobiotikům. Tento nukleární receptor byl poprvé naklonován v roce 1997 podle sekvence nalezené v Mouse Expressed Sequence Tag databázi [6].

Jeho jméno vzniklo na základě zjištění, že vysoké koncentrace 21-uhlíkatých steroidů (známých jako pregnany) aktivují tento receptor [7]. Lidský PXR byl nezávisle klonován třemi různými skupinami a získal alternativní názvy – pregnany aktivovaný receptor (PAR) nebo steroidní a xenobiotický receptor (SXR) [8].

PXR má všechny charakteristické vlastnosti nukleárního receptoru včetně vysoce konzervované DNA vazebné domény (DBD) o cca 70 aminokyselinových zbytcích a ligand vazající doménu (LBD) o cca 300 aminokyselinových zbytcích na C-terminální části proteinu. Objasnění struktury PXR a rozpoznávání různých chemikálií (exogenních i endogenních) je důležité pro pochopení jak jsou tyto jedovaté sloučeniny z těla eliminovány a mělo by také zlepšit schopnost předvídat možné lékové interakce.

Nejdůležitější část struktury receptoru tvoří ligand vazající doména, která se skládá z 12 α -helixů a dvou β -skládaných listů. Tyto α -helixy jsou složeny tak aby tvořily hydrofóbní kapsu [9]. Objem této kapsy je mnohem větší než u jiných nukleárních receptorů díky výskytu dvou β -skládaných listů, které nikde jinde nebyly nalezeny. Neobvyklé vazebné vlastnosti ligandů má PXR díky velkému objemu a hydrofobitě své ligand vazající domény.

Homology PXR pro další druhy (králík, potkan, myš, ryby a dokonce i pes) byly naklonovány [10], receptory ukazují významné mezidruhové rozdíly v sekvenci jejich domén vazajících ligand (LBD) [11]. Homology pro tyto živočišné druhy mají více než 90% identitu v DNA vazebné doméně, ale v ligand vazající doméně je větší míra rozdílnosti. Např. člověk a myš mají 96% identitu v DBD, ale jen 77% identitu v LBD [12], člověk a králík mají 94% identitu v DBD a 82% identitu v LBD [13]. Mezidruhové rozdíly v aktivaci PXR jsou založeny limitovaným stupni homologie DNA sekvence mezi různými živočišnými druhy a člověkem, které sdílí pouze 75 – 80 % identity v jejich ligand vazající doméně [1].



Obrázek 2.2.1: Struktura LBD lidského PXR podle [9]. Obrázek ukazuje pozici polárních zbytků v molekule – jsou označeny číslicemi 142, 177, 198 a 431. Změnou některého z těchto polárních zbytků dojde i ke změně objemu LBD a tím i jeho vazebných vlastností, proto je pozice i povaha polárních zbytků velmi důležitá pro specifickou aktivaci PXR [14]. β -skládané listy označené jako $\beta 1$ a $\beta 1'$ nebyly u žádného jiného nukleárního receptoru nalezeny. Tato jedinečná struktura dovoluje navázání různorodých ligandů ve více prostorových orientacích. Aktivace PXR je

zodpovědná za lékové interakce a proto znalost struktury LBD umožňuje předvídání možných nežádoucích účinků.

PXR se váže jako heterodimer s receptorem 9-cis retinové kyseliny (RXR, NR2B1). Komplex PXR/RXR se váže na DR-3 a ER-6 odpovědné elementy, kde DR-3 (directed repeat) znamená oblast přímého opakování třínukleotidové sekvence a ER-6 (everted repeat) značí oblast, kde došlo k obrácenému opakování šestinukleotidové sekvence [15, 16].

Neaktivovaný PXR se vyskytuje ve formě komplexu s korepresorem, který inhibuje jeho transkripční aktivitu. Po navázání ligandu do ligand vazebné domény dojde ke změně konformace molekuly, transkripční korepresor se uvolní a navázání příslušného koaktivátoru usnadní transkripci. Tvorba specifického komplexu receptoru s koregulátorem je zodpovědná za vylepšování biologické odpovědi na interakci ligand-receptor a podléhá variabilitě odpovědi genů na různé ligandy [1].

Aktivovaný nukleární receptor (látky schopné aktivace zobrazeny v tabulce 2.2.1) stimuluje expresi cílových genů navázáním na krátký úsek DNA, který se vyskytuje v regulačních oblastech těchto cílových genů.

PXR je hojně exprimován v játrech a gastrointestinálním traktu u lidí, myši, potkanů i králíků. U hlodavců byla nalezena i slabší exprese v ledvinách a žaludku [17]. PXR je exprimován ve tkáních, kde je CYP3A indukován.

Objevení funkce PXR jako primárního regulátoru exprese *CYP3A* v játrech a střevech mělo důležitý dopad na průběh vývoje léčiv [7]. *CYP3A* metabolizuje většinu léčiv [18] a i neúmyslná aktivace PXR u lidí může vést k nežádoucím lékovým interakcím nebo ke vzniku toxické hladiny metabolitu daného léčiva [7].

CYP3A jsou velmi důležité, neboť tvoří nejhojnější skupinu cytochromů P450 zastoupených v játrech a ve střevech, a metabolizují

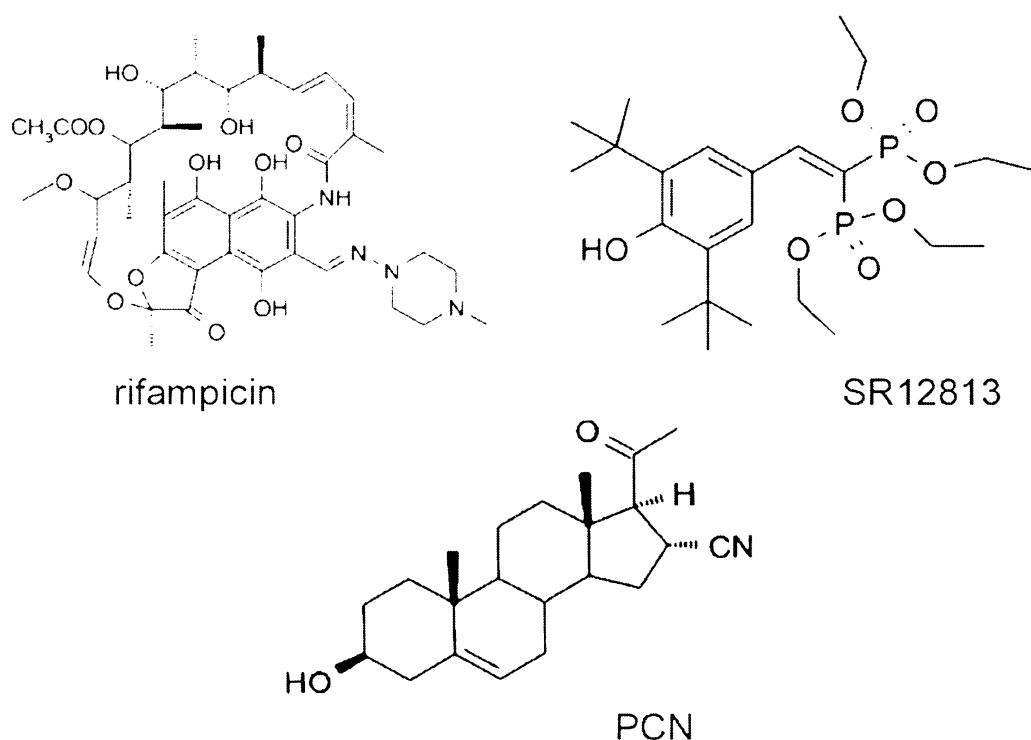
rozličné spektrum chemických látek. *CYP3A* mohou být indukovány různými xenobiotiky, stejně tak jako zvýšenou koncentrací žlučových kyselin [19]. *CYP3A4* zprostředkovává důležité lékové interakce a je zodpovědný za metabolismus více než 50 % léčiv, která jsou v současnosti využívána v medicíně [13, 20-22].

Mezi geny, které PXR reguluje patří nejen cytochromy P450, ale také i aldehyd dehydrogenáza, UDP-glukuronosyltransferáza, sulfonyltransferáza, glutathion-S-transferáza a také transportní protein MDR1 (multidrug resistance protein 1) [23].

Tabulka 2.2.1: Látky schopné aktivovat PXR pro různé živočišné druhy

Živočišný druh	Účinnost aktivace <i>PXR</i>		
	největší	střední	slabá
myš	cyproteronacetát PCN mifepriston 5β-pregnan-3,20-dion	dexamethason spironolakton pregnenolon progesteron	clotrimazol lovastatin phenobarbital rifampicin kortikosteron
potkan	cyproteronacetát PCN mifepriston 5β-pregnan-3,20-dion	dexamethason spironolakton progesteron	rifampicin phenobarbital clotrimazol kortikosteron
králík	dexamethason rifampicin	clotrimazol cyproteronacetát PCN phenobarbital mifepriston spironolakton 5β-pregnan-3,20-dion	pregnenolon kortikosteron
člověk	clotrimazol rifampicin 5β-pregnan-3,20-dion	lovastatin nifedipin phenobarbital mifepriston kortikosteron	dexamethason cyproteronacetát PCN spironolakton aldosteron

Mezi látky, které aktivují gen *PXR* patří antibiotika (rifampicin), glukokortikoidy (dexamethason) a antiglukokortikoidy (pregnenolon 16 α -carbonitril), které jsou současně induktory exprese CYP3A.



Obrázek 2.2.2: Látky aktivující *PXR*, kde PCN znamená pregnenolon 16 α -carbonitril a jako SR12813 je označena účinná látka léčiva snižujícího cholesterol.

PXR a indukce CYP3A

Podrodina *CYP3A* je u lidí a jiných savců jednou z hlavních součástí metabolismu xenobiotik nejen díky své široké substrátové specifitě, ale i hojností výskytu v játrech a ve střevech, které jsou xenobiotikům nejvíce vystaveny.

Indukce *CYP3A* nastává působením řady látek a po jejich odstranění se koncentrace *CYP3A* vrací na původní hodnoty. Možnost indukce *CYP3A* po určitou omezenou dobu vytváří předpoklady pro velmi důležité lékové interakce.

Mezi substráty indukující *CYP3A4* patří léčiva nifedipin, diltiazem, lidocain, lovastatin, erythromycin, ciclosporin, rifampicin, dexamethason, dále také phenobarbital a vitamin D a *CYP3A4* je jimi indukován v lidských hepatocytech [3]. Pochopení molekulárních pochodů vedoucích k indukci *CYP3A* a zjištění, zda tyto geny mají stejné regulační mechanismy, umožňuje vytvoření lepších modelů pro předvídání lékových interakcí.

Pro důkaz o tom, že *PXR* slouží jako hlavní regulátor transkripce izozymů *CYP3A* svědčí např. [24] :

- a) *PXR* se vyskytuje v játrech a ve střevech. V těchto tkáních je také největší výskyt izozymů *CYP3A* a jsou zde indukovány k odpovědi na vystavení xenobiotikům.
- b) *PXR* je aktivován induktory *CYP3A*. *PXR* je také aktivován téměř všemi xenobiotiky a jinými chemikáliemi, které stimulují expresi *CYP3A* [8]. V aktivaci *PXR* existují velké mezidruhové rozdíly. Např. lidský *PXR* je na rozdíl od myší aktivován antibiotikem rifampicinem a léčivem snižujícím cholesterol (označeném jako SR 12813). U myší je *PXR* aktivován uměle vytvořeným steroidem 5-pregnen-3 β -ol-20-on 16 α -carbonitrilem (PCN), kdežto lidský *PXR* jím aktivován není [11, 25]. Tyto mezidruhové rozdíly se vyskytují taktéž v indukci *CYP3A* genu [14].
- c) Dalším zajímavým znakem *PXR* jsou mezidruhové rozdíly u ligandových aktivátorů, které korelují

s mezidruhovými rozdíly a prokázanou indukcí *CYP3A* jako odpovědí na tyto aktivátory [26].

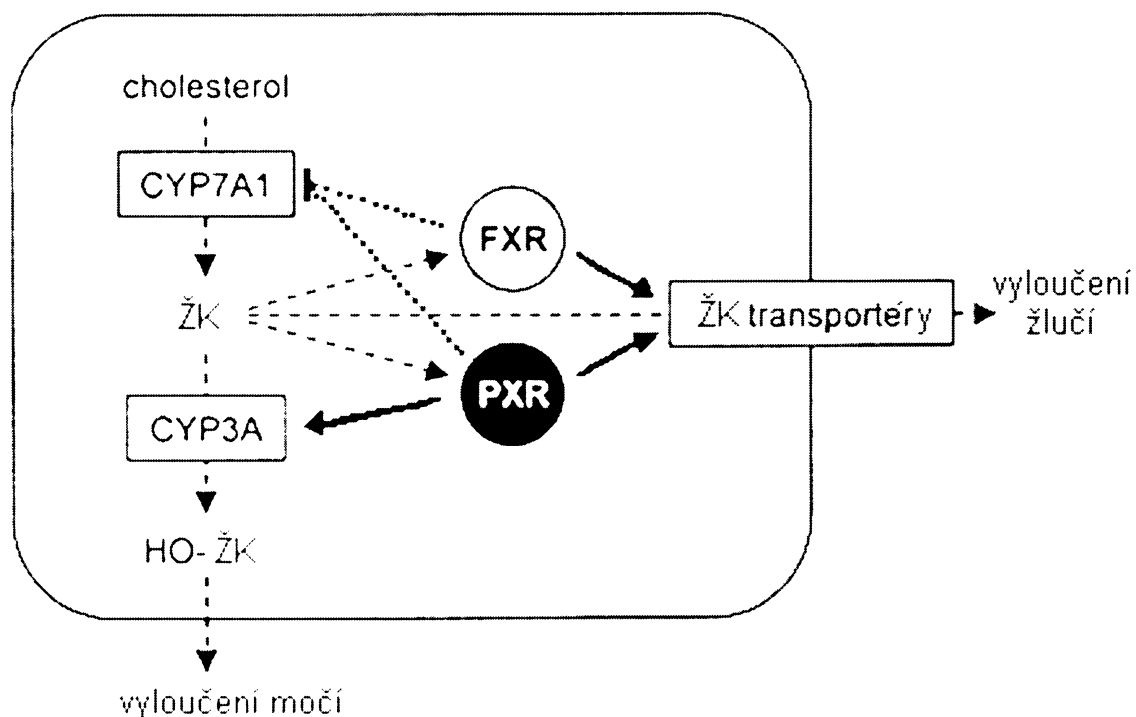
- d) PXR se váže k promotérům *CYP3A* ve formě heterodimeru PXR/RXR.
- e) *CYP3A* jsou dysregulovány u PXR „knockoutovaných“ myši. Jejich „clearance“ xenobiotik byla snížena. *Cyp3a11* nebyl v játrech PXR „knockoutovaných“ myši indukován ani po působení PCN ani po působení dexamethasonu.
- f) PXR „knockoutované“ myši nejevily žádné viditelné změny, normálně se vyvíjely a reprodukovaly. Hlavním rozdílem mezi nimi a myšmi, které měly fungující *PXR*, byla senzitivita k léčbě chemikáliemi metabolizovanými *Cyp3a11*. Zjištění, že *Cyp3a11* nebyl u PXR knockoutovaných myši indukován ani PCN ani dexamethasonem vedlo k závěru, že *PXR* slouží jako hlavní regulátor exprese *CYP3A*. Také studie, kterou prováděl Xie *et al.* na PXR „knockoutovaných“ myších, potvrdila nezbytnou přítomnost *PXR* pro indukcii *CYP3A* genů [27].

PXR a metabolismus žlučových kyselin

PXR reguluje i mnoho genů, které jsou zodpovědné za metabolismus žlučových kyselin (ovlivnění metabolismu žluč. kyselin je znázorněno na následující straně - obrázek 2.2.3). Byly provedeny studie zda mohou i žlučové kyseliny aktivovat *PXR* [28]. Aktivace kyselinou cholovou nebyla účinná, ale za použití lithocholové kyseliny (LCA) nebo jejích 3-keto derivátů byla aktivace *PXR* již účinnější. Za normálního zdravotního stavu jsou koncentrace LCA v játrech a v krvi velmi nízké. Při

vysokých koncentracích LCA dochází k aktivaci *PXR*, který je regulátorem exprese genů obsažených v detoxikaci a eliminaci žlučových kyselin z těla [13].

Staudinger ve své studii předpokládal, že *PXR* je schopný ochránit játra před toxickými účinky kyseliny lithocholové. Ke studii použil zdravé a *PXR* „knockoutované“ myši. Myším byla podávána LCA buď současně s PCN (ten je u hlodavců aktivátorem *PXR*) nebo bez něj. U všech myši, které nedostávaly současně s LCA i PCN, byl velmi častý výskyt poškození jater kyselinou lithocholovou. Současné podávání PCN u zdravých myši vedlo k výraznému poklesu výskytu poškození jater. Naopak, tento ochranný efekt (podávání PCN) se neuplatnil u *PXR* „knockoutovaných“ myši. Tedy aktivace *PXR* chrání játra myši před toxickými účinky LCA [29]



Obrázek 2.2.3: Schéma ovlivnění metabolismu žlučových kyselin pomocí *PXR* podle [13]. *PXR* a *FXR* jsou receptory žlučových kyselin. Žlučové kyseliny váží a aktivují *PXR* a *FXR* v játrech. To způsobí potlačení exprese *CYP7A1* a syntézy žlučových kyselin, následnou stimulaci

expresi transportéru žlučových kyselin a exkreci žlučových kyselin do žluči. PXR také stimuluje expresi *CYP3A* a hydroxylaci žlučových kyselin, které jsou pak vyloučeny z těla močí.

ŽK značí žlučové kyseliny, tečkovaná čára znázorňuje potlačení exprese a plná čára znázorňuje aktivaci exprese.

Antibiotikum rifampicin a rostlinné antidepresivum třezalka tečkovaná aktivují lidský *PXR*, působí anticholestaticky, což teoreticky umožňuje využití *PXR* agonistů v léčbě nemocí charakterizovaných nadměrnou kumulací žlučových kyselin nebo jiných toxinů v játrech [13].

Třezalka tečkovaná, která je běžně používána jako přírodní antidepresivum, vyvolává četné interakce s léčivými látkami jako jsou například orální kontracepce, imunosupresivum ciclosporin, inhibitor HIV proteázy indinavir a antikoagulant warfarin [30]. Následnými studiemi bylo zjištěno, že přípravky z třezalky aktivují *PXR* a zároveň indukují expresi *CYP3A4* v lidských jaterních buňkách [31]. Analýza, hledající chemikálii zodpovědnou za tyto interakce, určila hyperforin, který se váže s vysokou afinitou přímo na *PXR* [30]. Všechny tyto výsledky vedou k předpokladu, že jakékoliv přípravky obsahující třezalku tečkovanou budou interagovat s léčivými látkami, která jsou metabolizována *CYP3A4* (více než polovina používaných léčiv).

Studie X. Coumoula *et al.* se zabývala vlivem organochloridových pesticidů. Jejich studie poskytla důkaz o tom, že organochloridové pesticidy slouží jako aktivátory lidského *PXR* genu a následně aktivují také expresi genu *CYP3A4* [32].

Aktivace genu *PXR* xenobiotiky představuje jednu z nejdůležitějších lékových interakcí. Aktivace *PXR* a následná indukce *CYP3A* a jiných genů předepisovanými léky (např. rifampicin, dexamethason, ritonavir aj.) mohou způsobit urychlení metabolismu jiných léčiv - tedy léčiva aktivující

PXR snižují účinnost jiných léčiv a to velmi často i s následky ohrožení života.

PXR je schopný indukovat i *CYP2B*, ale aktivace podrodiny *CYP2B* phenobarbitalovými induktory [33] je zprostředkována jiným nukleárním receptorem – a to *CAR* – konstitutivním androstanovým receptorem [34]. *CAR* také patří mezi receptory schopné rozpoznávat xenobiotika, ale má mnohem větší substátovou specifitu. Přesto, že ještě není dostupná přesná krystalová struktura *CAR*, je zjištěno, že tato specifita je způsobená menším objemem ligand vazebné domény oproti *PXR*, který má objem LBD zvětšený rozvinutím dvou α -helixů ($\alpha 6$ a $\alpha 7$ v obrázku 2.2.1 na straně 14). *CAR* také tvoří heterodimer s *RXR*, který pak aktivuje transkripci genů.

Některé studie ukázaly, že *PXR* mohou zkříženě regulovat své cílové geny *CYP2B* a *CYP3A* [35, 36]. Tato zkřížená aktivace je vysvětlena tím, že komplexy *PXR/RXR* a *CAR/RXR* mohou vázat a aktivovat odpovědné elementy v některém z *CYP3A* a *CYP2B* genů. *PXR* i *CAR* také regulují i *MDR1* a *CYP2C9* [34, 37].

Alelické varianty genu *PXR* již byly identifikovány – viz práce Zhanga *et al.* a Koyana *et al.*, podle kterých jsem postupovala [16, 38]. Zatím nebyla zjištěna žádná souvislost mezi výskytem polymorfismu a změněnou expresí genu [39].

2.3 GEN *MDR1*

Na přenosu endogenních látek přes membránu se podílejí také transportní proteiny rodiny ABC (obsahující ATP vazebné domény, „ATP Binding Cassette“). Tyto transmembránové proteiny váží ATP a jeho energii využívají k aktivnímu transportu látek ven z buňky.

Změny v expresi transmembránových transportních proteinů přenášejících léčiva mohou ovlivnit detoxifikaci v játrech, distribuci léčiva v organismu a lékovou rezistenci nádorových buněk. Genová exprese

transmembránových transportérů, jako je MDR1, je regulována komplexem PXR/SXR [40].

Nejlépe charakterizována byla podrodina ABCB, hlavně ABCB1 (P-glykoprotein/MDR-1), který patří mezi nejvýznamnější. Zkratku MDR lze přeložit jako MultiDrug Resistance, což označuje možnost vzniku rezistence funkcí tohoto přenašeče na určitá léčiva.

Zájmem studie Kauffmanna *et al.* bylo zjistit jaký mají vliv vybrané léčivé látky a toxiny na expresi lidského *MDR1* genu [41].

P-glykoprotein (P-gp, P značí permeabilitu) byl poprvé popsán už v roce 1976, ale jeho funkce byla zjištěna až v roce 1993. Jeho vliv na rezistenci vůči některým léčivům byl objeven o další tři roky později [42].

P-gp je proteinový produkt genu *MDR-1*. Je exprimován v různých tkáních a jeho biologická funkce záleží na tkáni, ve které se nachází [43] viz tabulka 2.3.1. V membránách zdravých buněk (např. v placentě, ledvinách, plicích, tenkém střevě, atd.) zprostředkovává vylučování přirozených toxinů z potravy, karcinogenů, steroidů, hormonů a jiných látek [42].

Tabulka 2.3.1: Funkce P-glykoproteinu v různých tkáních.

Tkáň	Funkce P-gp
tenké a tlusté střevo	sekrece léčiv do lumen střev
játra	sekrece léčiv do žluči
ledviny	sekrece léčiv do moči
centrální nervový systém	ochrana CNS před xenobiotiky
placenta	ochrana plodu před xenobiotiky

P-gp je přítomen nejen ve zdravých, ale i v nádorových, buňkách. Při opakovaném podávání léčiva se aktivita P-gp zvyšuje – vylučování transportovaných látek se zrychluje a může dojít až ke vzniku rezistence na podávané léčivo. To znamená, že opakovaným podáváním léčiva dochází k indukci aktivity P-gp [42, 44]. Vyvolání indukce aktivity P-gp je zprostředkováno pomocí nukleárního receptoru [45] – jedná se o pregnanový X receptor (PXR) [17].

Indukce P-gp je tkáňově specifická a bylo prokázáno, že k největší změně aktivity podáváním induktorů dochází v ledvinách a naopak k nejmenší indukci dochází v placentě [42].

P-glykoprotein, který se vyskytuje ve střevech, má významnou funkci v absorpci a eliminaci mnoha xenobiotik – je jejich transportérem z buněk ven. Kromě genetické predispozice je exprese genu ovlivněna také expozicí různým léčivům.

P-gp má širokou substrátovou specifitu. Transportuje většinou látky hydrofóbní a amfipatické povahy. Tabulka 2.3.2. na následující straně ukazuje, že substráty jsou velmi různorodé. Patří mezi ně např. účinné látky některých cytostatik, antibiotik, antivirotik, chemoterapeutik a jiných léčiv.

Tabulka 2.3.2: Rozdělení substrátů P-glykoproteinu podle [42].

ANTIBIOTIKA	KARDIOVASKULÁRNÍ	CENTRÁLNÍ
amoxicillin	LÉČIVA	NERVOVÝ
cefoperazon	amiodaron	SYSTÉM
erythromycin	atorvastatin	desipramin
clarithromycin	digitoxin	phenobarbital
	digoxin	phenytoin
ANTIVIROTIKA	diltiazem	fluphenazin
amprenavir	dipyridamol	haloperidol
chinin	felodipin	carbamazepin
chinacrin	chinidin	levodopa
indinavir	lidocain	morphin
mefloquin	losartan	naphazodon
nelfinavir	nicardipin	quetiapin
saquinavir	nifedipin	třezalka
ritonavir	prazosin	tečkovaná
	propranolol	venlafaxin
	reserpin	
CYKlickÉ PEPTIDY	simvastatin	CYTOSTATIKA
ciclosporin	spironolacton	actinomycin D
tacrolimus	trazodon	daunorubicin
valinomycin	verapamil	doxorubicin
		etoposid
CHEMOTERAPEUTIKA	OSTATNÍ LÉČIVA	colchicin
ciprofloxacin	cimetidin	mitomycin
grepafloxacin	itraconazol	paclitaxel
ofloxacin	ketoconazol	taxol
rifampicin	omeprazol	teniposid
	ondansetron	vinblastin
STEROIDY	pantoprazol	vincristin
aldosteron	probenecid	
dexamethason	ranitidin	
	vitamin E	

Názvosloví upraveno podle brevíře Pharmindexu 2003. Tyto substráty P-gp mohou být zdrojem toxických účinků.

U genu *MDR1* bylo již objeveno více než 20 jednonukleotidových polymorfismů, ze kterých jen devět mění sekvenci aminokyselin P-gp. Tyto

polymorfismy také mění míru exprese P-gp – např. polymorfismus značený C3435T v exonu 26 [46], kde T je variantní alela. Jedinci s genotypem CC mají přibližně dvakrát vyšší míru exprese P-gp ve střevech než jedinci s genotypem TT a heterozygoti CT mají nejčastěji střední míru exprese P-gp ve střevech [43].

Cílem Frommovy studie bylo zjistit jak ovlivňují polymorfismy genu *MDR1* tkáňovou expresi P-gp a odezvu organismu na léčiva [43].

Nedávno byly popsány polymorfismy genu *MDR1*, které ovlivňují expresi P-glykoproteinu ve zdravých tkáních s následnými změnami lékové dispozice, účinnosti léčiv a zvýšeným rizikem vzniku některých nemocí. Exprese P-gp je také ovlivněna některými léčivy a steroidními hormony. Např. antibiotikum rifampicin (viz obrázek 2.2.2) neindukuje pouze *CYP3A4*, ale jeho účinkem dochází také ke zdatelné indukci střevního P-gp [47].

Některé z mutací genu *MDR1* vedou k mírně pozměněné expresi a funkci lidského P-glykoproteinu a jsou spojeny s rizikem vzniku některých na genotypu závislých nemocí a s pozměněnou reakcí organismu na léčiva. *MDR1* polymorfismy mohou zvyšovat riziko výskytu nemoci jako je například Parkinsonova choroba. P-gp je nezbytnou součástí bariéry mezi krví a mozem a ovlivňuje permeabilitu léčiv, která vstupují do centrální nervové soustavy (CNS) [48]. Nízká exprese P-glykoproteinu v této bariéře způsobuje nižší účinnost ochrany CNS před neurotoxickými xenobiotiky a zvýšené riziko rozvoje Parkinsonovy choroby.

Další rolí střevního P-gp je chránit organizmus před bakteriálními toxiny, které by mohly projít střevní stěnou. Tuto hypotézu potvrdila studie Panwaly *et al.*, která dokázala, že *mdr1a* P-gp „knockoutované“ myši jsou snadno náchylné rozvoji mnoha spontánních střevních zánětů pokud jsou chovány za specifických podmínek vylučujících výskyt patogenů [43]. Podávání antibiotik P-gp „knockoutovaným“ myším zabránilo rozvoji nemoci a příznaky aktivního střevního zánětu ustoupily.

Exprese a funkce P-gp není ovlivněna pouze výskytem polymorfismu v genu *MDR1*, ale také jinými faktory (např. vystavením xenobiotikům). Nynější studie se snaží dokázat zda jsou lidé, kteří mají v genu *MDR1* nějaký polymorfismus, více náchylní ke vzniku střevního zánětu.

2.4 IDIOPATICKÉ STŘEVNÍ ZÁNĚTY

Idiopatické střevní záněty patří k autoimunním onemocněním a jejich původ vzniku je zatím neznámý.

Mezi idiopatické střevní záněty patří Crohnova nemoc (CD) a ulcerózní kolitida (UC). U obou těchto nemocí nebyl nalezen mikrobiální původce – v tabulce 2.4.1 je uveden přehled některých mikrobiálních nálezů podle [49].

Tabulka 2.4.1: Mikrobiální nálezy zjištěné u pacientů s ISZ

Mikrobiální nález	Autoři
patogenní <i>E. coli</i> s vysokou adherencí	Burke, 1987, 1988
EHEC (entero-hemoragické <i>E. coli</i>)	Von Wulffen, 1989
<i>Salmonella typhimurium</i>	Taylor – Robinson, 1989
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> - Linda	Chiodini, 1984
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Doman, 1989
nespecifikované mikrobiální antigeny	Hazenberg, 1989
více činitelů: <i>Yersiniae</i> + <i>chlamydie</i>	Höring, 1989
zvýšené kvantum anaerobů	Ruseler – Van Embden, 1983, 1987
<i>Proteus species</i>	Kanareykina, 1987
<i>Candida albicans</i>	Nagy, 1989
<i>Candida</i> + <i>Saccharomyces species</i>	McKenzie, 1990

Za jednoho z možných původců vzniku ISZ byly také považovány genetické vlivy. Hlavním důvodem genetického výzkumu byl vysoký výskyt obou chorob v rodinách, zvláště u jednovaječných dvojčat [50].

V devadesátých letech minulého století byly objeveny geny, které jsou spojeny s výskytem idiopatických střevních zánětů. Tyto geny byly nazvány IBD-1,2,3 až IBD-4. Gen IBD-1 se vyskytuje i u 4% zdravých jedinců, ovšem u nemocných s CD byl zaznamenán výskyt až u 10 – 20% jedinců bělošské populace [49]. Taktéž gen IBD-4 je spojen s výskytem CD na rozdíl od genů IBD-2 a IBD-3, které souvisejí více s ulcerózní kolitidou než s Crohnovou nemocí [49].

Velmi zajímavým zjištěním při určování nepříznivých faktorů u ISZ bylo kouření cigaret. Kouření je známým nepříznivým faktorem u nemocných s CD a naopak ochranným faktorem u nemocných trpících UC. Jakým mechanismem tento faktor působí a proč je u jedné nemoci nepříznivý a u druhé ochranný není známo [50].

Crohnova nemoc je zánětlivé onemocnění nejčastěji tenkého střeva, méně často tlustého střeva, ale může se vyskytnout i v jiných částech trávicí trubice. Crohnova nemoc většinou propuká v mládí, poslední dobou se zvýšil počet nově onemocnělých i v pozdějším věku. Projevuje se průjmy, bolestmi břicha, poruchou trávení a vstřebávání, zvýšenou teplotou a také příznaky mimostřevními (bolestmi a záněty kloubů, kožními obtížemi, tvorbou žlučových a ledvinových kamenů, apod.) [51]. Projevy Crohnovy nemoci jsou velmi rozmanité – často se střídají období zhoršení a zklidnění zánětu, zatímco u ulcerózní kolitidy se projevy onemocnění příliš nestřídají.

Ulcerózní kolitida je zánět tlustého střeva kdy dochází k poškození tkáně a je doprovázena tvorbou vředů. Projevy choroby jsou ze začátku nenápadné – nízká tělesná teplota, nechutenství, bolesti břicha a úbytek na váze, později se choroba projevuje výskytem hlenu a krve ve stolici. Až

u 10% jedinců, kteří trpěli 10 a více let kolitidou, se rozvine rakovina tlustého střeva nebo konečníku [52].

Diagnostika idiopatických střevních zánětů je prováděna po laboratorním nálezů zánětu v těle a zahrnuje rentgenové vyšetření využívající kontrastní látku, koloskopii s následnou biopsií nebo i sonografií. ISZ jsou léčeny protizánětlivými léky, kortikoidy nebo - u těžkých průběhů nemoci - imunosupresivy. V některých případech je nevyhnutelné chirurgické odstranění postižené části střeva a bohužel ani přesto nelze vyloučit propuknutí nemoci na jiné části střeva [53].

2.4.1 LÉČBA IDIOPATICKÝCH STŘEVNÍCH ZÁNĚTŮ

Idiopatické střevní záněty jsou léčeny aminosalicyláty, probiotiky, kortikosteroidy nebo imunosupresivy.

Aminosalicyláty jsou nasazovány při léčbě středně těžkých forem CD i UC. Aminosalicyláty (ASA) působí místně – ve střevní sliznici – a inhibují všechny dosud známé zprostředkovatele zánětů ISZ.

Výsledkem účinné léčby je zmírnění a u některých jedinců dokonce i vymizení příznaků nemoci. Před začátkem léčby je nutné zjistit rozsah postižení dané části střeva, protože absorpce léčiv je závislá na stavu sliznice, délce styku léčiva se sliznicí a pH prostředí [54]. Tyto údaje jsou nezbytné pro výběr formy léčiva.

Přípravky s léčivou látkou mesazalin se vyrábí v perorální lékové formě nebo ve formě čípků a klysmat. Léčba lehkých a středně těžkých forem ISZ je účinná u 40 až 80 % nemocných [54]. ASA nejsou nyní doporučovány k léčbě mírné formy Crohnovy nemoci, neboť metaanalýzy ukázaly jen malou účinnost proti placebo [55]. Kvůli nežádoucím účinkům se nyní ustupuje od podávání antibiotik (metronidazol, ciprofloxacín) v kombinaci s ASA nebo bez nich. Při léčbě těžké formy UC jsou současně s aminosalicyláty podávány i kortikosteroidy.

Nežádoucí účinky záleží na délce léčby a dávkování a patří mezi ně bolest hlavy, nevolnost a průjem. Nežádoucí účinky sulfasazalinu se vyskytují u 10 - 45 % pacientů a k akutní intoleranci dochází pouze u 3 % a je doprovázena krvavými průjmy [54].

Další skupinou využívanou k léčbě ISZ jsou probiotika. Probiotiky jsou nazývány živé fyziologické mikroorganismy vyskytující se v trávicím traktu a jsou prospěšné pro zdraví svého hostitelského makroorganismu. Pro léčebné využití se používají purifikované mikroorganismy, které nesmí tvořit žádné toxiny. Jako mikrobiologická terapie jsou používána probiotika (fyziologické organismy), nefyziologické organismy, usmrcené/poškozené organismy, produkty mikroorganismů nebo směsi probiotik a usmrcených či poškozených mikroorganismů.

Střevní mikroflóra zdravých jedinců a nemocných s ISZ je výrazně odlišná. Toho využil ve svých studiích McCann, kdy léčbou antibiotiky zničil původní střevní mikroflóru a poté nasadil 9denní terapii přípravkem Mutaflowem (obsahuje nepatogenní *E. coli*). Vymizení příznaků ISZ bylo úspěšné u 80 % jedinců a nepatogenní kmeny z přípravku ve střevě zůstaly natrvalo [56]. Cílem Rembackenovy studie bylo zjistit, zda má podání nepatogenní *E. coli* stejnou účinnost jako podání mesazalinu v prevenci před opětovným vzplanutím ulcerózní kolitidy. Studie ukázala, že *E. coli* je v udržení remise (vymizení příznaků a projevů nemoci) ulcerózní kolitidy stejně účinná jako mesazalin nejen v podílu pacientů u kterých nastala, ale i v délce jejího trvání [57]. Stejně srovnání provedl i Kruis, který ve své studii nezjistil žádný rozdíl mezi léčbou podáním mesazalinu a nepatogenní *E. coli* [58]. Využití probiotik je velmi účinné při léčbě nemocných s UC a s intolerancí aminosalicylátů [49].

Manorezistentní *E. coli* s enteroadhezivními vlastnostmi byla nalezena u 80 % nemocných s idiopatickými střevními záněty, u 27 %

nemocných s infekčními průjmy a v 0 % u zdravých kontrol [49]. U 88 % nemocných s UC a u 94 % nemocných s CD byla zjištěna přítomnost bakteriálních jedů, kterou bylo možno snížit až o 75 % během několika dnů po laváži (výplachem antibiotiky) střeva [49].

Probiotika jsou využívána při léčbě infekcí zažívacího traktu a dysmikrobiích, při ISZ, při jaterní encefalopatii (jaterní encefalopatie = projevy poruch mozku následkem těžšího jaterního selhání) a také při nádorových onemocněních [49].

K nejstarším probiotikům patří přípravek Mutaflor, který byl původně používán při léčbě infekčních průjmů a funkčních poruch, později se jím začaly léčit ISZ a nyní je využíván jako nádorová profylaxe [49]. Mutaflor obsahuje lyofylizované životaschopné *E. coli*. Mezi jeho vedlejší účinky patří chronické zácpy, nadýmání a mimostřevní onemocnění.

Nepatogenní *E. coli* obsahuje také přípravek nazvaný „Colifant New Born“, který je určen kojencům do jednoho roku jako ochrana před nákazami, které se mohou vyskytnout v nemocničním prostředí [49]. V České republice je často využíván přípravek BION3, který obsahuje směs tří probiotických kultur, vitaminy a minerály. Dalšími přípravky jsou například Lacidofil a Paidoflor, které jsou využívány ke zlepšení laktóзовé intolerance. Mezi vedlejší účinky jmenovaných přípravků patří přechodné průjmy a nadýmání, které lze omezit nebo i eliminovat snížením dávek nebo využitím méně koncentrovaných přípravků.

Kortikosteroidy jsou hlavním typem léčby u aktivních forem idiopatických střevních zánětů již více než padesát let. Účinnost léčby nastává během několika dní a je rychle dosaženo remise nemoci. Struktura léčiv je velmi podobná hormonu kortisolu, který je produkován v nadledvinách a proto u pacientů užívajících kortikosteroidy dochází ke snižování produkce kortisolu až k úplnému zastavení.

Kortikosteroidy působí rovněž jako imunosupresiva, tzn. snižují aktivitu imunitního systému a pacienti jsou pak náchylní k infekcím.

Dlouhodobá léčba se z důvodů nežádoucích účinků nedoporučuje, nevyžívají se ani k prevenci a k udržení remise. Kvůli těmto vedlejším účinkům jsou k počáteční terapii využívány aminosalicyláty a antibiotika, teprve poté jsou nasazeny kortikosteroidy v nejnižším možném dávkování. Při ukončování léčby musí být dávky kortikosteroidů snižovány pozvolna, aby byla postupně obnovena tvorba kortisolu v nadledvinách.

Kortikosteroidy bývají nejčastěji podávány perorálně. Patří mezi ně hydrocortison, prednisolon, prednison a budesonid. Budesonid patří mezi nesystémové kortikoidy a je aplikován u pacientů se středně těžkou formou CD. 90 % léčiva je inaktivováno dříve než dosáhne cíle a způsobuje tak méně nežádoucích účinků než ostatní kortikosteroidy. Nejčastějšími vedlejšími účinky jsou vysoký krevní tlak, měsíčkovitý obličej, zvýšené riziko infekce, přírůstky váhy, dochází k častým změnám nálady a k psychiatrickým symptomům. Někdy se může vyskytnout i zvýšená hladina cukru v krvi, šedý zákal nebo nespavost.

Někteří pacienti nereagují na perorální formy léčiv a proto byly zavedeny alternativní cesty aplikace. Léčiva jsou zaváděna buď rektálně (ve formě klysmatu, pěn a čípků) nebo intravenózně.

U některých nemocných s neuspokojivým výsledkem léčby na ostatní léčiva je podáván infliximab, monoklonální protilátka proti TNF- α , jehož aplikace umožňuje snížit dávkování kortikosteroidů a omezit tak výskyt jejich nežádoucích účinků [55].

V léčbě kortikosteroidům odolné CD je nasazen azathioprin nebo merkaptopurin, v případě jejich intolerance nebo neefektivity jsou nahrazeny methotrexátem.

U pacientů, kteří jsou rezistentní na ostatní typy léčby ISZ je většinou nasazená imunosupresivní léčba. Imunosupresivní látky dělíme podle mechanismu účinku do tří skupin: v první skupině jsou azathioprin a 6-merkaptopurin, druhou skupinu zastupuje methotrexát a třetí ciclosporin A [59].

Nejvíce používaným imunosupresivem je azathioprin, který je v organismu metabolizován na antimetabolit purinu (6-merkaptopurin), který po inkorporaci do nukleových kyselin brání proliferaci rychle se dělících buněk [60]. Účinnost léčby je až 80 %, ale nevýhodou je pomalý nástup účinku a doba jeho podávání - 1 až 6 let [60]. Kvůli dlouhé prodlevě nástupu účinku jsou tato léčiva nasazována v terapii pacientů s lehčím průběhem nemoci.

Výskyt nežádoucích efektů léčby azathioprinem je do 15 %, nejčastějšími komplikacemi jsou myelosuprese (5 %), zvracení, pankreatitida, hepatotoxicita a další [60].

Methotrexát je využíván pouze k léčbě pacientů s velmi rychlou progresí Crohnovy nemoci. Jeho nežádoucí účinky jsou velice časté (proto je podáván jen u nejtěžších případů) a patří mezi ně hepatotoxicita, teratogenita a také pneumonitida [59].

Ciclosporin A (CsA) je využíván především při transplantacích orgánů. Nedávno začal být využíván i u pacientů s těžkým průběhem ulcerózní kolitidy a toxicko-septickými komplikacemi. Léčba pomocí CsA má 70% úspěšnost, ale má také závažné nežádoucí účinky [59]. Mezi ně patří např. nefrotoxicita, hypertenze, neurotoxicita, oportunní infekce, zvracení a hepatotoxicita [59, 60].

Dalšími vedlejšími účinky u některých imunosupresiv je vznik protilátek a rozvoj anafylaktického šoku.

3 HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE

3.1 HYPOTÉZA

Aktivací *PXR* některým z léčiv, které vyvolávají lékové interakce (např. rifampicin, dexamethason, atp.) jsou zvýšeny hladiny CYP3A, MDR1 a jiných genových produktů. Metabolismus jiných léčiv bývá zrychlený, což může vést buď k projevům vedlejších účinků léčiv nebo k selhání terapie s následným zhoršováním klinického stavu pacientů [13].

Studie Panwaly *et al.* dokázala, že *mdr1a* P-gp „knockoutované“ myši mají zvýšené riziko vzniku spontánních střevních zánětů pokud jsou chovány za specifických podmínek vylučujících výskyt patogenů [43]. Podávání antibiotik P-gp „knockoutovaným“ myším zabránilo rozvoji nemoci a příznaky aktivního střevního zánětu ustoupily.

Exprese a funkce P-gp není ovlivněna pouze výskytem polymorfismu v genu *MDR1*, ale také jinými faktory (např. vystavením xenobiotikům nebo změnou aktivity regulačních systémů). Exprese P-gp je také regulována komplexem *PXR/SXR* a proto existuje teoretický předpoklad, že funkční polymorfismy genu *PXR* ovlivňující expresi cílového genu *MDR1* mohou být dalším genetickým faktorem ovlivňujícím riziko vzniku a progresi onemocnění.

3.2 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem bylo zjistit zda jsou sledované polymorfismy rizikovým faktorem pro vznik idiopatických střevních zánětů.

Vedlejším cílem této studie bylo popsat frekvenci výskytu variantních alel genu *PXR* v české populaci a porovnat ji s dostupnými literárními údaji z ostatních populací.

4 METODY

4.1 POUŽITÉ REAGENCIE A PŘÍSTROJE

Veškeré použité reagensy byly získány od těchto firem:
jednotlivé složky reakční směsi pro PCR – Fermentas, Litva
Top Vision LE CQ Agarose – Fermentas, Litva
QIAmp Blood Mini Kit – QIAGEN, Německo
Agarosa Serva – Serva, Německo
jednotlivé složky pro izolaci DNA vysolovací metodou – Sigma, USA
primery - VBC Genomics, Rakousko

Použité přístroje:

Analytické předvážky – CHIRANA P3/200, Chirana, ČR
Analytické váhy – LB-1050/1, MIM, Maďarsko
Centrifuga – MPW 360, Mechanika Precyzyjna, Polsko
Elektroforetická vana – Sub-cell Model 192, BIO-RAD, USA
Elektroforetický zdroj – PowerPac HC, BIO-RAD, USA
Inkubátor – EN025, Nüve, Turecko
Lázeň – Isotemp 202, Fisher Scientific, USA
Lednice – ERB 4052, Electrolux, Švédsko
Magnetická míchačka – T1A, Lavat, ČR
Mikrovlákná trouba – LCE-2034M, Čína
Minicentrifuga – MiniSpin plus, Eppendorf, Německo
Mrazák - ERB 4052, Electrolux, Švédsko
pH metr – MS 22, Laboratorní přístroje Praha, ČR
Tavička folií – Typ 0762, ETA, ČR
Termocycler - MyCycler gradient thermal cycler, BIO-RAD, USA.
Transiluminátor – EFX 20MX, Vilber Lourmat, Francie
Vortex – Ika works, USA

4.2 STUDOVANÉ SKUPINY POPULACE

4.2.1 PACIENTI

Do studie bylo zařazeno 118 pacientů (65 žen a 53 mužů), kteří trpí některým z idiopatických střevních zánětů. Vzorky krve byly získány ze 4. interní kliniky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze od pacientů ambulantně léčených, kteří podepsali informovaný souhlas s genetickým vyšetřením genu *PXR*. U pacientů jsem hodnotila následující údaje o jejich pohlaví, věku, diagnóze a průběhu léčby onemocnění.

4.2.2 KONTROLNÍ SKUPINA

Kontrolní skupina byla sestavena ze zdravých dobrovolníků - studentů vysokých škol – a pacientů z ortopedické ordinace po úraze kolenního kloubu. Skupinu zdravých dobrovolníků z řad studentů tvořilo 172 jedinců (111 žen a 61 mužů), skupina pacientů z ortopedické ordinace léčených i neléčených měla 221 jedinců (90 žen a 131 mužů). Vzorky krve byly použity v souladu s podepsaným informovaným souhlasem všech jedinců.

4.3 IZOLACE DNA Z KRVE

Vzorky krve byly odebrány do jednorázových evakuovaných odběrných zkumavek s přídavkem K_2EDTA (protisrážlivé agens). Některé ze vzorků byly ihned zpracovány, jiné byly zmraženy (-18 °C) a zpracovány později. Izolace DNA probíhala buď typickou vysolovací metodou nebo za použití kitu na izolaci DNA – QIAmp Blood Mini Kitu.

4.3.1 IZOLACE DNA VYSOLOVACÍ METODOU

Materiál potřebný pro izolaci DNA

- RBC pufr – 10mM Na_3PO_4 , 150mM NaCl, 1mM $MgCl_2$, pH 7,4

- Bristol
 - Proteináza K (20 mg/ml)
 - 10% SDS
 - 5M NaCl
 - 96% ethanol
 - TE pufr - 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
-
- Centrifuga
 - Inkubátor

Do velké kónické zkumavky (50 ml) jsem přenesla 5 ml krve a 20 ml RBC pufru, který je lyzačním roztokem pro erytrocyty. Směs jsem promíchala na vortexu a ponechala 30 minut ve vodní lázni s ledem. Po vyndání z vodní lázně jsem směs centrifugovala 10 minut při 3000 ot./min (805x g). Supernatant se zlyzovanými erytrocyty jsem odstranila. Ke zbylým leukocytům jsem přidala RBC pufr (25 ml). Směs jsem promíchala na vortexu a opět na 30 minut ponechala ve vodní lázni s ledem. Směs jsem centrifugovala 10 minut při 3000 ot./min (805x g). Pokud po slití pufru se zbytky erytrocytů vznikla bílá sedlina (peleta) pokračovala jsem dále, jinak jsem opakovala přidání pufru, lýzi a centrifugaci do úplného vyčištění. Ke vzniklé peletě jsem přidala 3 ml Bristolu a míchala cca 30 s na vortexu. Přidala jsem 300 μ l proteinázy K a 300 μ l 10% SDS. Vzniklou reakční směs jsem nechala inkubovat ve vodní lázni při 55 °C čtyři hodiny, nebo při 37 °C přes noc. Po inkubaci jsem do zkumavky přidala 900 μ l NaCl a cca 2 minuty jsem směs míchala na vortexu. Po centrifugaci 30 minut při 5000 ot./min (2236x g) jsem opatrně přenesla supernatant do zkumavky s 8 ml vychlazeného 96% ethanolu. Směs jsem mírně promíchala a DNA, která po sražení vyplavala na hladinu, jsem namotala na sterilní skleněnou tyčinku a nechala ji oschnout za laboratorní teploty. Oschlou tyčinku

s namotanou DNA jsem opláchla v eppendorfci se 150 μ l TE pufru. Finální DNA jsem uložila do lednice.

Izolaci DNA lze přerušit po lýzi erytrocytů a přidání Bristolu. Směs protřepeme a uložíme v hlubokomrazícím mrazáku (cca -84 °C).

4.3.2 IZOLACE DNA POMOCÍ „QIAmp BLOOD MINI KITu“

Materiál potřebný k izolaci DNA

- QIAGEN proteáza
- Pufr AL
- 96% ethanol
- Pufr AW1
- Pufr AW2
- Pufr AE

- Vortex
- Inkubátor
- Centrifuga

Do řádně popsaných eppendorfek jsem postupně nanesla 20 μ l QIAGEN proteázy, 200 μ l krve a 200 μ l pufru AL. Když je objem krve menší než 200 μ l, je třeba jej doplnit sterilním fyziologickým roztokem. Obsah eppendorfek jsem důkladně promíchala na vortexu a nechala inkubovat 10 minut ve vodní lázni při 56 °C. Po vyndání z lázně a lehkém klepnutí (kvůli odstranění kapky z víčka) jsem přidala 200 μ l 96% vychlazeného ethanolu a míchala po dobu 15 s na vortexu. Celý objem jsem přelila do plastové soupravy QIAmp Mini Column s filtrem a centrifugovala 1 minutu při 8000x g. Po přefiltrování celého objemu jsem vložila filtr do nové spodní nádoby – „Collection Tube“ a filtrát jsem vyhodila. Na filtr jsem nanesla 500 μ l pufru AW1 a centrifugovala jsem

celou sestavu 1 minutu při 8000x g. Opět jsem filtr vložila do nové „Collection Tube“ a filtrát také vyhodila. Na filtr jsem nanesla 500 µl pufru AW2 a centrifugovala jsem vše po dobu šesti minut při 14100x g. Do nové popsané eppendorfky jsem vložila filtr, nanesla na něj 200 µl pufru AE a nechala inkubovat při pokojové teplotě. Eppendorfku s filtrem jsem centrifugovala 1 minutu při 8000x g. Filtr jsem vyhodila. Finální DNA je obsažena ve filtrátu v eppendorfce, kterou jsem uložila k ostatním vzorkům do lednice.

4.3.3 PŘÍPRAVA GELŮ

K přípravě gelů na horizontální elektroforézu jsem použila dva typy agaros. Agarosu od firmy Serva jsem použila na přípravu 2% gelu pro kontrolu vzniku PCR produktu. Agarosu od firmy Fermentas jsem použila při přípravě 3% a 3,5% gelu pro odečítání délky vzniklých fragmentů DNA po restrikci.

Gely jsem připravovala ve skleněné kádince smícháním naváženého množství agarosy a 1x TBE pufru dle schématu:

2,0% gel	3,50 g agarosy do 175 ml 1x TBE pufru
3,0% gel	5,25 g agarosy do 175 ml 1x TBE pufru
3,5% gel	6,13 g agarosy do 175 ml 1x TBE pufru nebo 9,28 g agarosy do 265 ml 1x TBE pufru

K agarose a TBE pufru jsem přidala 10 ml destilované vody aby se neměnila potřebná koncentrace gelu, protože při vaření i následném míchání dochází k odpařování vody. Směs jsem nechala cca 3 minuty míchat na magnetické míchačce. Poté jsem na kádinku přiložila porcelánovou pokličku a dala jsem směs do mikrovlnné trouby na 6 – 8 minut při 450 W. Směs na přípravu 3,5% gelu o objemu 265 ml jsem v mikrovlnné troubě nechala cca 15 minut. Po úspěšném uvaření agarosového gelu (z mléčně zbarvené suspenze se stane čirý gel bez

bublinek) jsem kádinku s gelem nechala cca 7 – 10 minut na magnetické míchačce a nechala jsem gel za stálého míchání vychladnout. Poté jsem nalila gel do připravené formy s potřebným typem a množstvím hřebenů a nechala jej vychladnout. Nově připravený gel jsem buď hned použila nebo jej zatavila do sterilní folie a uskladnila v ledničce.

Formu na přípravu 2% gelu tvořila 10 cm dlouhá a 24,5 cm široká vanička se dvěma hřebeny, které dohromady vytvořily 104 jamek. Formu na přípravu 3% a 3,5% gelu tvořila 10 cm dlouhá a 24,5 cm široká vanička se dvěma hřebeny, které dohromady vytvořily 52 jamek. Při přípravě 3,5% gelu vytvořeného použitím 265 ml TBE jsem použila 15 cm dlouhou a 24,5 cm širokou vaničku se dvěma hřebeny, které dohromady vytvořily 52 jamek.

4.4 GENOTYPOVÁNÍ

4.4.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA GENOTYPOVÁNÍ

Genotypování je jedním z procesů, kterým lze stanovit výskyt poškozených míst v DNA. Pokud jsou tato místa – genetické změny – přítomna u více než 1 % zkoumané populace, můžeme tento jev nazvat genetickým polymorfismem. Genetické změny velmi často ovlivňují expresi genu, zvyšují nebo snižují aktivitu genového produktu nebo mohou poškodit sestřih mRNA a poškodit tak její stabilitu.

Polymorfismy v některých genech mohou mít za následek velké individuální rozdíly v rychlosti odbourávání substrátů metabolické cesty.

K určení genotypu jsem použila nejčastěji používanou metodu PCR-RFLP – polymerázovou řetězovou reakci s následnou analýzou délky restričních fragmentů.

4.4.1.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerázová řetězová reakce slouží k amplifikaci (zmnožení počtu vláken) části DNA o které víme, že obsahuje místo výskytu zkoumaného polymorfismu. Při provedení PCR je nutná přítomnost termostabilní DNA Taq polymerázy, která vyžaduje stálé složení reakční směsi během celého procesu. To je dosaženo přítomností pufru pro DNA Taq polymerázu. V reakční směsi jsou také zapotřebí hořčnaté ionty v podobě $MgCl_2$, dNTP (deoxyribonukleotidtrifosfáty), sterilní PCR voda a primery, které jednoznačně označují daný úsek DNA určený k amplifikaci.

DNA Taq polymeráza je schopná syntetizovat komplementární vlákno k vláknu původnímu tak, že k existujícímu úseku komplementárního vlákna přidává nové nukleotidy ve směru 5'>3' nového vlákna. Tímto existujícím úsekem je v našem případě primer, který je syntetizován uměle nejčastěji jako 17 - 22 bazí dlouhý oligonukleotid. Pro vytvoření primerů je potřeba znát přesnou sekvenci DNA, kterou zjistíme v internetové databázi GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Za vhodných teplotních podmínek (94 °C) dojde v reakční směsi k denaturaci původního (templátového) vlákna DNA a při snížení teploty na teplotu tání primerů dojde k vytvoření vodíkových můstků primerů s komplementární sekvencí v jednom z původních vláken. Po nasednutí primeru je přesně určené místo odkud bude DNA amplifikována a také jakým směrem (od 3' konce primeru). V další fázi - po zvýšení teploty na 72 °C – dochází k prodloužení primeru přidáváním dalších deoxynukleotidů na jeho 3' konec. Při jednom cyklu vznikne z jednoho vlákna jen jedna kopie. Po každém cyklu denaturace, nasednutí primerů a jejich následném prodloužení vznikají produkty, které jsou v dalších cyklech použity jako nové templáty pro další reakci. Produkt se tedy tvoří geometrickou řadou – z x vláken získáme po n cyklech x^n kopií, což je pro dvě původní vlákna po 35 cyklech cca $3,44 * 10^{10}$ kopií.

Výslednou kvalitu PCR produktu ovlivňuje kvalita izolované DNA, počet cyklů a délka jejich jednotlivých intervalů, složení reakční směsi, kvalita použité polymerázy a také typ termocycleru. U některých termocyclerů může docházet k delším prodlevám při změnách teplot nebo teplota nemusí být homogenní a mohou tak vznikat nespecifické produkty.

Obecné podmínky PCR reakce jsou:

- 5 minut denaturace DNA při 94 °C
- 35 cyklů : denaturace DNA při 94 °C
 nasednutí primerů při teplotě tání
 prodlužování primerů při 72 °C
- 5 minut při 72 °C – terminální elongace
- uchovávání při 10 °C

Obecné složení reakční směsi pro PCR

- celkový objem 25 µl
- sterilní PCR voda
- pufr pro DNA Taq polymerázu
- DNA Taq polymeráza
- deoxyribonukleotidy
- primery
- MgCl₂
- DNA

Reakční směs jsem připravovala za chlazení na ledovém bločku. Nejprve jsem do eppendorfky napipetovala kromě DNA výše popsané složky reakční směsi a vše pořádně promíchala. Tuto směs jsem rozpipetovala do jednotlivých PCR zkumavek a nakonec jsem za chlazení

přidala DNA. PCR reakce probíhala v termocycleru „MyCycler gradient thermal cycler“ od firmy BIO-RAD, USA.

Konečný produkt amplifikace byl detekován elektroforézou na 2% agarosovém gelu. Pokud reakce proběhla úspěšně, byla v gelu (po obarvení např. ethidium bromidem a následné vizualizaci na transiluminátoru) vidět jen jedna řada bandů - pruhů - stejně vzdálených od místa nanesení do gelu. Vzdálenost bandu od startu je závislá na velikosti výsledného produktu a můžeme si ji kontrolovat pomocí markeru, který tvoří několik různých bandů o známých délkách fragmentů DNA. Pokud v gelu není viditelný žádný band, tak PCR neproběhla, pokud je vidět více bandů, tak PCR proběhla, ale s nescifickým nasednutím primerů a vznikly i nechtěné produkty. Zabránit nechtěným produktům reakce lze pouze optimalizací podmínek za kterých probíhá.

Na 2% agarosový gel jsem nanesla 7 μ l PCR produktu s 10 μ l nanášecího pufru 1x Loading Dye Solution (Fermentas) a do poslední jamky 6 μ l markeru GeneRuler 50bp DNA Ladder (o koncentraci 0,1 μ g/ μ l; Fermentas). Elektroforézu jsem nechala probíhat 30 minut při 100V v prostředí 1x TBE pufru. Gel jsem potom cca 25 minut barvila v ethidium bromidu, které jsem ze zásobního roztoku (10 mg/ml) naředila 1x TBE puftrem na konečnou koncentraci 5 μ g/ml. Obarvené gely jsem vizualizovala na transiluminátoru.

U vzorků, u kterých jsem potvrdila vznik PCR produktu, jsem provedla restrikci specifickými restrikčními enzymy.

Složení 10x TBE pufru:

- 109 g TRIS báze (ne TRIS HCl)
- 55,6 g kyseliny borité
- 9,3 g EDTA

- přidat injekční vodu do 1 litru, upravit na pH = 8 pomocí HCl konc. a nechat vysterylizovat v mikrovlnce 3 x 5 minut
- před použitím naředit inj. vodou nebo dH₂O na požadovanou koncentraci
- skladovat v ledničce

Složení markeru:

- 110 µl alikvotu GeneRuler 50bp DNA Ladder
- 110 µl nanášejícího pufru 6x Loading Dye Solution
- 440 µl čerstvě otevřené sterilní PCR vody

4.4.1.2 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP je metodou, při které analyzujeme délky vzniklých restrikčních fragmentů. K PCR produktu nanese specifické restrikční enzymy – endonukleázy – které rozeznávají určitou sekvenci bazí (většinou do osmi deoxyribonukleotidů). Endonukleázy bývají voleny tak, aby štěpily produkt pouze v místě kde by mohlo dojít k jednonukleotidové záměně bazí (tzv. polymorfismu). A tak je štěpen buď produkt, kde k záměně bazí došlo, anebo produkt, kde se záměna bazí nevyskytuje. Správnost výskytu polymorfismu lze ověřit sekvenováním DNA.

Po úspěšném průběhu restrikce vznikne naštěpený nebo nenaštěpený PCR produkt. Velikost DNA fragmentů zjišťujeme horizontální elektroforézou v agarosovém gelu o různých koncentracích. Gel po elektroforéze barvíme cca 25 minut v ethidium bromidu a poté vizualizujeme na transiluminátoru. Délku vzniklých fragmentů zjistíme porovnáním s délkou fragmentů markeru GeneRuler 50bp DNA Ladder, jejichž velikost je přesně určena.

Gely, kterými jsem potvrdila vznik PCR produktu i délku vzniklých fragmentů, jsem vyfotila digitálním fotoaparátem Sony, uložila na médium a vytiskla do laboratorního deníku.

4.4.2 POLYMORFISMUS V POZICI -25 385

Mutace v genu PXR – sekvence aggtt(C/T)tcttt – byla zjišťována modifikovanou metodou podle práce [38].

Primery použité pro PCR:

- MuF : 5' -TTT TTG GCA ATC CCA GAT T – 3'
- R : 3' - TAA AAG GCA AAC AAG TAC AAG C – 5'

Složení reakční směsi pro PCR (vztaženo na jeden vzorek):

- 2,50 μ l 10x pufru pro DNA Taq polymerázu
- 2,50 μ l dNTP
- 0,32 μ l primeru Ups MuF
- 0,32 μ l primeru Ups R
- 4,00 μ l MgCl₂ (25mM)
- 0,15 μ l polymerázy Taq DNA pol
- 15,30 μ l sterilní PCR vody
- 1 μ l DNA

Podmínky PCR reakce:

- 2 minuty při 94 °C
- 35 cyklů – 30 s při 94 °C, 60 s při 53,5 °C a 40 s při 72 °C
- 7 minut při 72 °C
- ∞ při 10 °C

Produkt PCR reakce měl velikost 124 bp. Restrikce probíhala enzymem Smul 18 hodin při 37 °C. Velikost restrikčních fragmentů byla

- 107 bp a 17 bp pro homozygota (wt/wt)
- 124 bp, 107 bp a 17 bp pro heterozygota (v/wt)
- 124 bp pro variantního homozygota (v/v)

Složení restrikční směsi (pro jeden vzorek):

- 0,15 µl enzymu Hinfl
- 2 µl pufru 10x Buffer R
- 7,5 µl sterilní PCR vody

Enzym Hinfl štěpí vzniklý produkt v místech, kde se vyskytuje tato sekvence 5'... G↓ A N T C ...3'

3'... C T N A↑ G ...5'

Velikost restrikčních fragmentů jsem ověřovala elektroforézou na 3,5% agarosovém gelu. Elektroforéza probíhala při 100 V po dobu 120 minut. V 15 cm dlouhém gelu byly dva hřebeny. Při této elektroforéze bylo nutno dbát na velmi dobré chlazení.

4.4.3 POLYMORFISMUS V POZICI - 24 113

Mutace v genu PXR v místě intronu 1 – sekvence gggtg(G/A)aaaaa – byla zjišťována modifikovanou metodou podle práce [38].

Primery použité pro PCR:

- F : 5' - CGG AGC AAA GAA CTT ACC ACC – 3'
- R: 5' - GGA GCT GGT TGT ATG TGT GAC T – 3'

Složení reakční směsi pro PCR (vztaženo na jeden vzorek):

- 2,50 μ l 10x pufru pro DNA Taq polymerázu
- 2,50 μ l dNTP
- 0,32 μ l primeru int1 F
- 0,32 μ l primeru int1 R
- 1,88 μ l MgCl₂ (25mM)
- 0,10 μ l polymerázy Taq DNA pol
- 17,38 μ l sterilní PCR vody
- 1 μ l DNA

Podmínky PCR reakce:

- 2 minuty při 94 °C
- 35 cyklů – 30 s při 94 °C, 45 s při 65 °C a 40 s při 72 °C
- 7 minut při 72 °C
- ∞ při 10 °C

Produkt PCR reakce měl velikost 311 bp. Restrikce probíhala enzymem HphI 18 hodin při 37 °C. Velikost restrikčních fragmentů byla

- 311 bp pro homozygota (wt/wt)
- 311 bp, 194 bp a 117 bp pro heterozygota (v/wt)
- 194 bp a 117 bp pro variantního homozygota (v/v)

Složení restrikční směsi (pro jeden vzorek):

- 0,15 μ l enzymu HphI
- 2 μ l pufru 10x Buffer B
- 7,85 μ l sterilní PCR vody

Enzym HphI štěpí vzniklý produkt v místech, kde se vyskytuje tato sekvence

$$\begin{array}{c} 5' \dots \text{G G T G A (N)}_8 \downarrow \dots 3' \\ 3' \dots \text{C C A C T (N)}_7 \uparrow \dots 5' \end{array}$$

Velikost restričních fragmentů jsem ověřovala elektroforézou na 3% agarosovém gelu. Elektroforéza probíhala při 100 V po dobu 65 minut. V 10 cm dlouhém gelu byly dva hřebeny.

4.4.4. POLYMORFISMUS V POZICI 7 635

Mutace v genu PXR v místě intronu 5 – sekvence ctctc(A/G)cccc – byla zjišťována modifikovanou metodou podle práce [38].

Primery použité pro PCR:

- F : 5' - GGT TGT GAG GGG AGA GAT GA – 3'
- R: 5' - ACC TGC ATA TCC TGG CGT AG– 3'

Složení reakční směsi pro PCR (vztaženo na jeden vzorek):

- 2,50 μl 10x pufru pro DNA Taq polymerázu
- 2,50 μl dNTP
- 0,32 μl primeru int5 F
- 0,32 μl primeru int5 R
- 1,88 μl MgCl_2 (25mM)
- 0,10 μl polymerázy Taq DNA pol
- 17,38 μl sterilní PCR vody
- 1 μl DNA

Podmínky PCR reakce:

- 2 minuty při 94 °C
- 35 cyklů – 30 s při 94 °C, 45 s při 63 °C a 40 s při 72 °C
- 7 minut při 72 °C
- ∞ při 10 °C

Produkt PCR reakce měl velikost 404 bp. Restrikce probíhala enzymem HphI 18 hodin při 37 °C. Velikost restrikčních fragmentů byla

- 404 bp pro homozygota (wt/wt)
- 404 bp, 331 bp a 73 bp pro heterozygota (v/wt)
- 331 bp a 73 bp pro variantního homozygota (v/v)

Složení restrikční směsi (pro jeden vzorek):

- 0,15 µl enzymu HphI
- 2 µl pufru 10x Buffer B
- 7,85 µl sterilní PCR vody

Enzym HphI štěpí vzniklý produkt v místech, kde se vyskytuje tato sekvence



Velikost restrikčních fragmentů jsem ověřovala elektroforézou na 3% agarosovém gelu. Elektroforéza probíhala při 100 V po dobu 65 minut. V 10 cm dlouhém gelu byly dva hřebeny.

4.4.5 POLYMORFISMUS V POZICI 10 799

Mutace v genu PXR v místě jeho nepřekládaného regionu – sekvence atggc(G/A)ggcac – byla zjišťována modifikovanou metodou podle práce [38].

Primery použité pro PCR:

- TspF : 5' - TCT TCC GAG CTG CTT TGT – 3'
- TspR : 3' - GGG AAA TTC CTT GTG CTG – 5'

Složení reakční směsi pro PCR (vztaženo na jeden vzorek):

- 2,50 μ l 10x pufru pro DNA Taq polymerázu
- 2,50 μ l dNTP
- 0,32 μ l primeru 3'UTRdef TspF
- 0,32 μ l primeru 3'UTRdef TspR
- 2,88 μ l MgCl₂ (25mM)
- 0,10 μ l polymerázy Taq DNA pol
- 16,38 μ l sterilní PCR vody
- 1 μ l DNA

Podmínky PCR reakce:

- 2 minuty při 94 °C
- 35 cyklů – 30 s při 94 °C, 45 s při 61 °C a 40 s při 72 °C
- 7 minut při 72 °C
- ∞ při 10 °C

Produkt PCR reakce měl velikost 558 bp. Restrikce probíhala enzymem SmaI 18 hodin při 37 °C. Velikost restrikčních fragmentů byla

- 354 bp a 204 bp pro homozygota (wt/wt)
- 558 bp, 354 bp a 204 bp pro heterozygota (v/wt)
- 558 bp pro variantního homozygota (v/v)

Složení restrikční směsi (pro jeden vzorek):

- 0,5 μ l enzymu Smul
- 2 μ l pufru 10x Buffer B
- 7,5 μ l sterilní PCR vody

Enzym Smul štěpí vzniklý produkt v místech, kde se vyskytuje tato sekvence

$$\begin{array}{c} 5' \dots C C C G C (N)_4 \dots 3' \\ 3' \dots G G G C G (N)_6 \dots 5' \end{array}$$

Velikost restrikčních fragmentů jsem ověřovala elektroforézou na 3% agarosovém gelu. Elektroforéza probíhala při 100 V po dobu 60 minut. V 10 cm dlouhém gelu byly dva hřebeny.

4.5 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Předpokládané genotypové frekvence byly vypočítány podle Hardy-Weinbergova vztahu:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 \quad \text{kde platí } p + q = 1$$

p = frekvence výskytu „wild-type“ alely vypočítaná z pozorovaných genotypových frekvencí – počet homozygotů pro „wild-type“ alelu + polovina počtu heterozygotů

q = frekvence výskytu variantní alely vypočítaná z pozorovaných genotypových frekvencí – počet homozygotů pro variantní alelu + polovina počtu heterozygotů

p^2 = frekvence výskytu homozygotů pro „wild-type“ alely (bez výskytu SNP)

q^2 = frekvence výskytu homozygotů pro variantní alely (výskyt SNP v obou alelách)

$2pq$ = frekvence výskytu heterozygotů (výskyt SNP pouze v jedné alele)

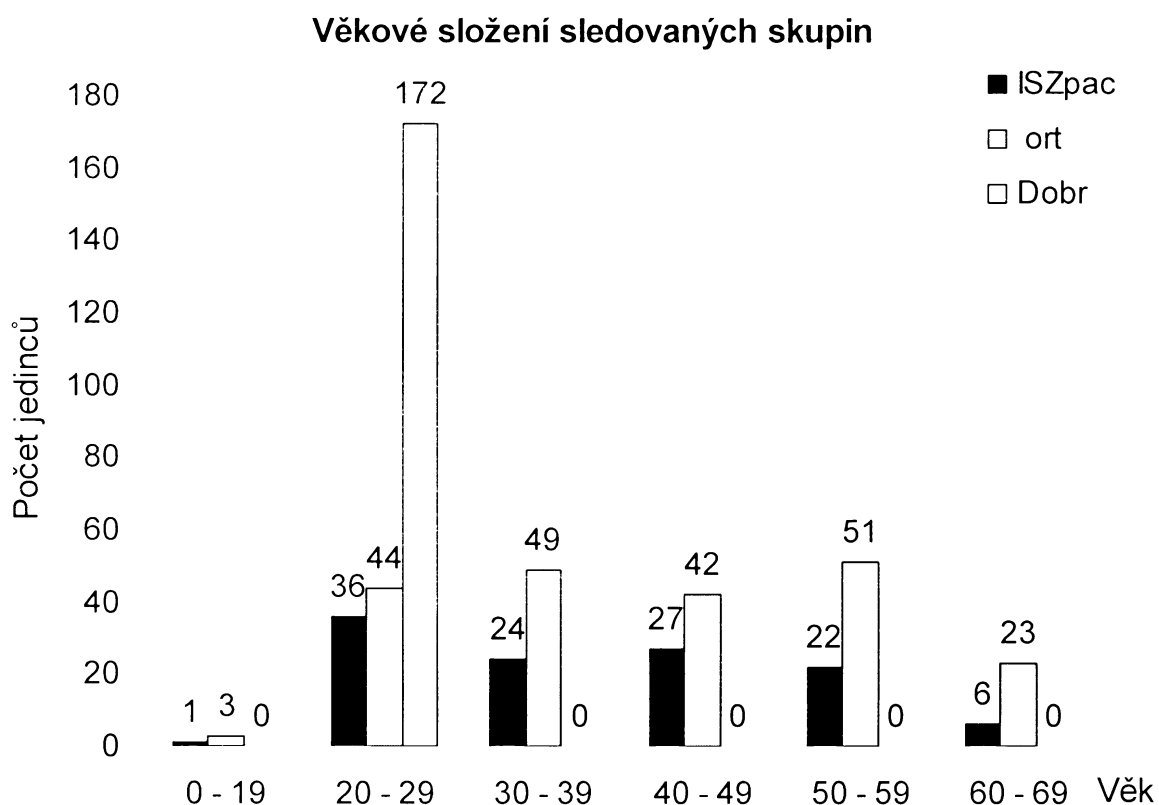
Konfidenční interval byl vypočítán ze vztahu :

$$CI = p \pm 1,96 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

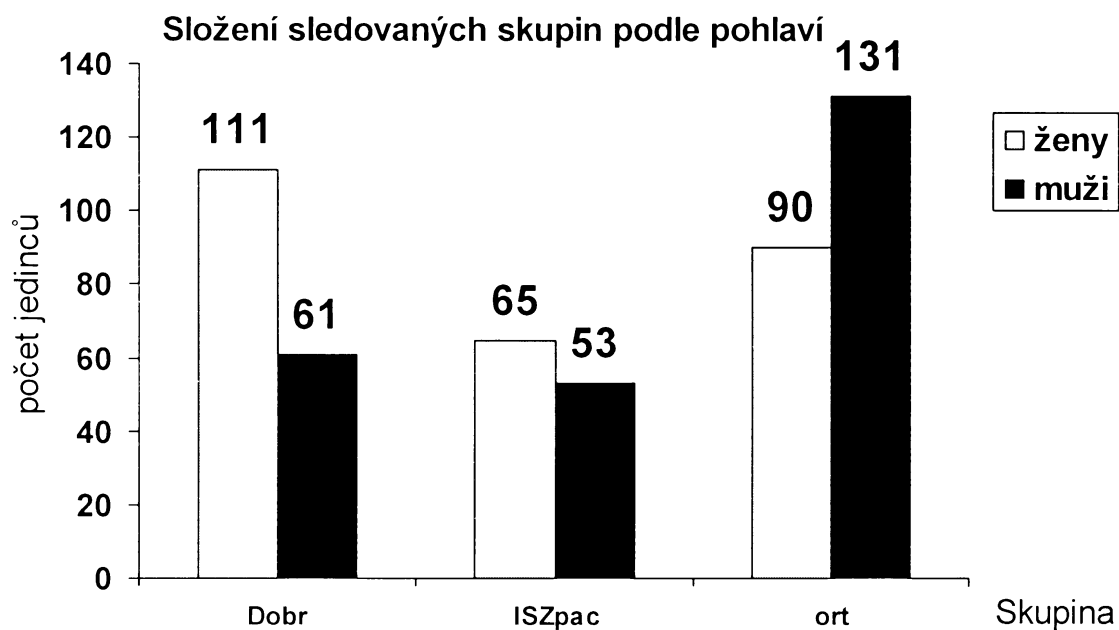
kde p značí pozorovanou genotypovou frekvenci a n je počet všech alel (tedy dvojnásobný počet jedinců)

V programu STATGRAPHICS Plus byl proveden χ^2 test a byla jím určena hladina spolehlivosti, na které platí nulová hypotéza, že mezi pozorovanými genotypovými frekvencemi u jednotlivých sledovaných souborů neexistuje rozdíl.

5 VÝSLEDKY



Graf 5.1: Věkové složení skupiny dobrovolníků, pacientů z ortopedie (ort) a skupiny pacientů s ISZ (ISZpac)

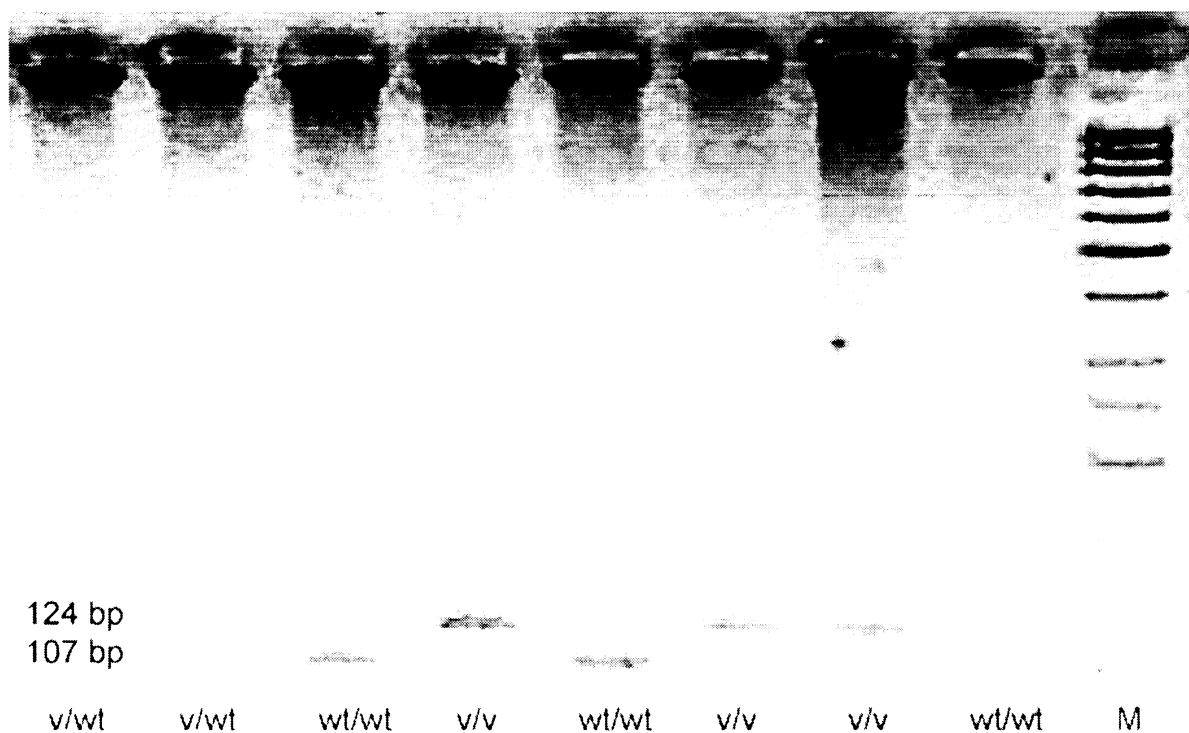


Graf 5.2: Složení sledovaných skupin podle pohlaví

5.1 FREKVENCE VÝSKYTU POLYMORFISMŮ GENU *PXR* V ČESKÉ POPULACI A U SOUBORU NEMOCNÝCH A KONTROL

Na základě předběžných výsledků jsem kontroly získané z ortopedické ordinace rozdělila na skupinu bez farmakologické léčby (ort neléčená) a skupinu s farmakoterapií (ort léčená).

5.1.1 POLYMORFISMUS V POZICI -25 385



Obrázek 5.1.1.1: Velikost restrikčních fragmentů u polymorfismu genu *PXR* v pozici -25 385, kde M značí marker (GeneRuler 50bp DNA Ladder), wt „wild-type“ alelu a v variantní alelu

Tabulka 5.1.1.1: Srovnání pozorovaných genotypových frekvencí s předpokládanými genotypovými frekvencemi

Sledovaný soubor	Genotyp. skupina	Počet jedinců	Pozorovaná genotyp. frekvence	Alelická frekvence	Předpokl. genotyp. frekvence	CI
Dobr n = 172	wt	69	0,4012	0,6192	0,3834	0,3486 - 0,4538
	ht	75	0,4360		0,4716	0,3828 - 0,4892
	v	28	0,1628	0,3808	0,1450	0,1232 - 0,2024
ort neléčená n = 147	wt	63	0,4286	0,6531	0,4265	0,3720 - 0,4851
	ht	66	0,4490		0,4531	0,3921 - 0,5058
	v	18	0,1224	0,3469	0,1204	0,0850 - 0,1599
ort léčená n = 74	wt	27	0,3649	0,5743	0,3298	0,2873 - 0,4424
	ht	31	0,4189		0,4890	0,3394 - 0,4984
	v	16	0,2162	0,4257	0,1812	0,1499 - 0,2825

Výsledky χ^2 testu:

Dobr vs ort neléčená $\chi^2 = 1,07$ P = 0,586

Dobr vs ort léčená $\chi^2 = 1,04$ P = 0,596

ort léčená vs ort neléčená $\chi^2 = 3,40$ P = 0,182

Tabulka 5.1.1.2: Porovnání genotypových frekvencí v závislosti na pohlaví

Genotyp. skupina	Dobr		ort neléčená		ort léčená		ISZpac	
	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy
wt	25 40,98%	44 39,64%	38 39,58%	25 49,02%	13 37,14%	14 35,90%	18 33,96%	28 43,08%
ht	24 39,35%	51 45,95%	47 48,96%	19 37,25%	14 40,00%	17 43,59%	25 47,17%	27 41,54%
v	12 19,67%	16 14,41%	11 11,46%	7 13,73%	8 22,86%	8 20,51%	10 18,87%	10 15,38%
Σ	61	111	96	51	35	39	53	65

Výsledky χ^2 testu: muži vs ženy

Dobr	$\chi^2 = 1,08$	P= 0,583
ort neléčená	$\chi^2 = 1,85$	P= 0,397
ort léčená	$\chi^2 = 0,11$	P= 0,946
ISZpac	$\chi^2 = 1,04$	P= 0,594

Tabulka 5.1.1.3: Porovnání genotypových frekvencí mezi kontrolním souborem a pacienty trpícími idiopatickými střevními záněty

Sledovaný soubor	Genotyp. skupina	Počet jedinců	Pozorovaná genotyp. frekvence	Alelická frekvence	Předpokl. genotyp. frekvence	CI
kontrolní skupina n = 319	wt	132	0,4138	0,6348	0,4030	0,3575 - 0,4701
	ht	141	0,4420		0,4636	0,3852 - 0,4988
	v	46	0,1442	0,3652	0,1334	0,1040 - 0,1844
ISZpac n = 118	wt	46	0,3898	0,6102	0,3723	0,3276 - 0,4520
	ht	52	0,4407		0,4757	0,3774 - 0,5040
	v	20	0,1695	0,3898	0,1520	0,1170 - 0,2220

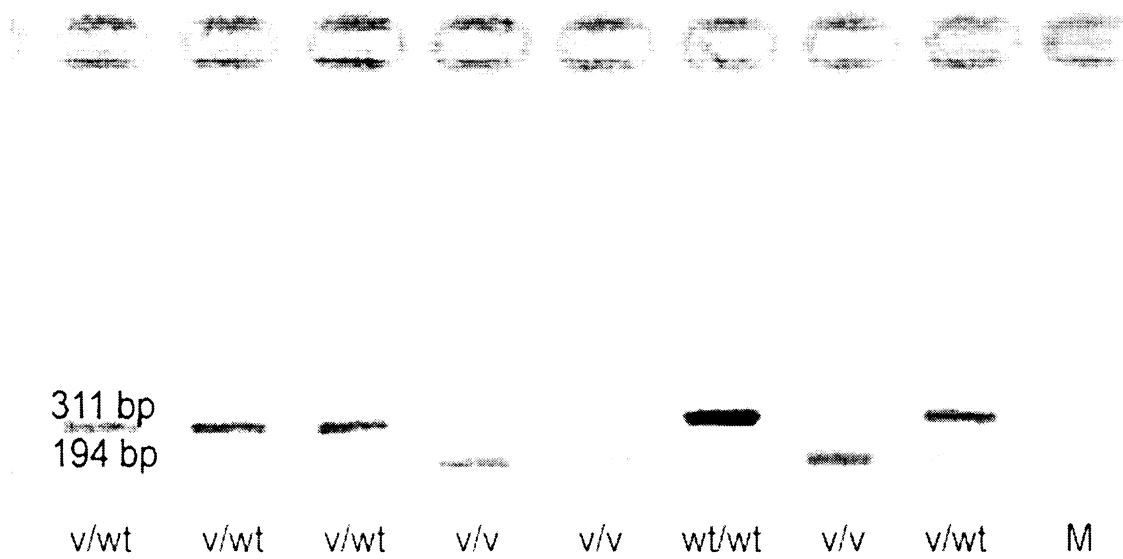
Výsledky χ^2 testu:

Kontrolní skupina vs ISZpac

$\chi^2 = 0,49$

P = 0,784

5.1.2 POLYMORFISMUS V POZICI -24 113



Obrázek 5.1.2.1: Velikost restrikčních fragmentů u polymorfismu genu *PXR* v pozici -24 113, kde M značí marker (GeneRuler 50bp DNA Ladder), wt „wild-type“ alelu a v variantní alelu

Tabulka 5.1.2.1: Srovnání pozorovaných genotypových frekvencí s předpokládanými genotypovými frekvencemi

Sledovaný soubor	Genotyp. skupina	Počet jedinců	Pozorovaná genotyp. frekvence	Alelická frekvence	Předpokl. genotyp. frekvence	CI
Dobr n = 172	wt	71	0,4128	0,6308	0,3979	0,3600 - 0,4656
	ht	75	0,4360		0,4658	0,3828 - 0,4892
	v	26	0,1512	0,3692	0,1363	0,1128 - 0,1896
ort neléčená n = 147	wt	60	0,4082	0,6565	0,4309	0,3520 - 0,4643
	ht	73	0,4966		0,4510	0,4394 - 0,5538
	v	14	0,0952	0,3435	0,1180	0,0617 - 0,1288
ort léčená n = 74	wt	21	0,2838	0,5135	0,2637	0,2111 - 0,3564
	ht	34	0,4595		0,4996	0,3792 - 0,5397
	v	19	0,2567	0,4865	0,2367	0,1864 - 0,3271

Výsledky χ^2 testu dobré shody:

Dobr vs ort neléčená $\chi^2 = 2,61$ P = 0,272

Dobr vs ort léčená $\chi^2 = 5,52$ P = 0,063

ort léčená vs ort neléčená $\chi^2 = 10,82$ P = 0,005

Vzhledem ke statisticky signifikantnímu rozdílu alelické frekvence pacientů na dlouhodobé medikamentosní terapii ve srovnání s pacienty neléčenými a hraniční signifikance se zdravými dobrovolníky není možné tuto skupinu zařadit do kontrolního souboru. Proto v dalších výpočtech zahrnují do kontrolní skupiny pouze skupinu dobrovolníků a skupinu pacientů ortopedie, kteří nejsou dlouhodobě léčeni farmaky.

Tabulka 5.1.2.2: Porovnání genotypových frekvencí v závislosti na pohlaví

Genotyp. skupina	Dobr		ort neléčená		ort léčená		ISZpac	
	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy
wt	25 40,98%	46 41,44%	37 38,54%	23 45,10%	8 22,86%	13 33,33%	22 41,51%	30 46,15%
ht	26 42,62%	49 44,14%	47 48,96%	26 50,98%	15 42,86%	19 48,72%	23 43,40%	26 40,00%
v	10 16,40%	16 14,42%	12 12,50%	2 3,92%	12 34,28%	7 17,95%	8 15,09%	9 13,85%
Σ	61	111	96	51	35	39	53	65

Výsledky χ^2 testu: muži vs ženy

Dobr	$\chi^2 = 0,12$	P= 0,940
ort neléčená	$\chi^2 = 2,95$	P= 0,229
ort léčená	$\chi^2 = 2,77$	P= 0,251
ISZpac	$\chi^2 = 0,26$	P= 0,880

Tabulka 5.1.2.3: Porovnání genotypových frekvencí mezi kontrolním souborem a pacienty trpícími idiopatickými střevními záněty

Sledovaný soubor	Genotyp. skupina	Počet jedinců	Pozorovaná genotyp. frekvence	Alelická frekvence	Předpokl. genotyp. frekvence	CI
kontrolní skupina n = 319	wt	131	0,4107	0,6426	0,4130	0,3544 - 0,4669
	ht	148	0,4639		0,4593	0,4069 - 0,5210
	v	40	0,1254	0,3574	0,1277	0,0875 - 0,1632
ISZpac n = 118	wt	52	0,4407	0,6484	0,4204	0,3774 - 0,5040
	ht	49	0,4153		0,4560	0,3524 - 0,4782
	v	17	0,1440	0,3516	0,1237	0,0992 - 0,1888

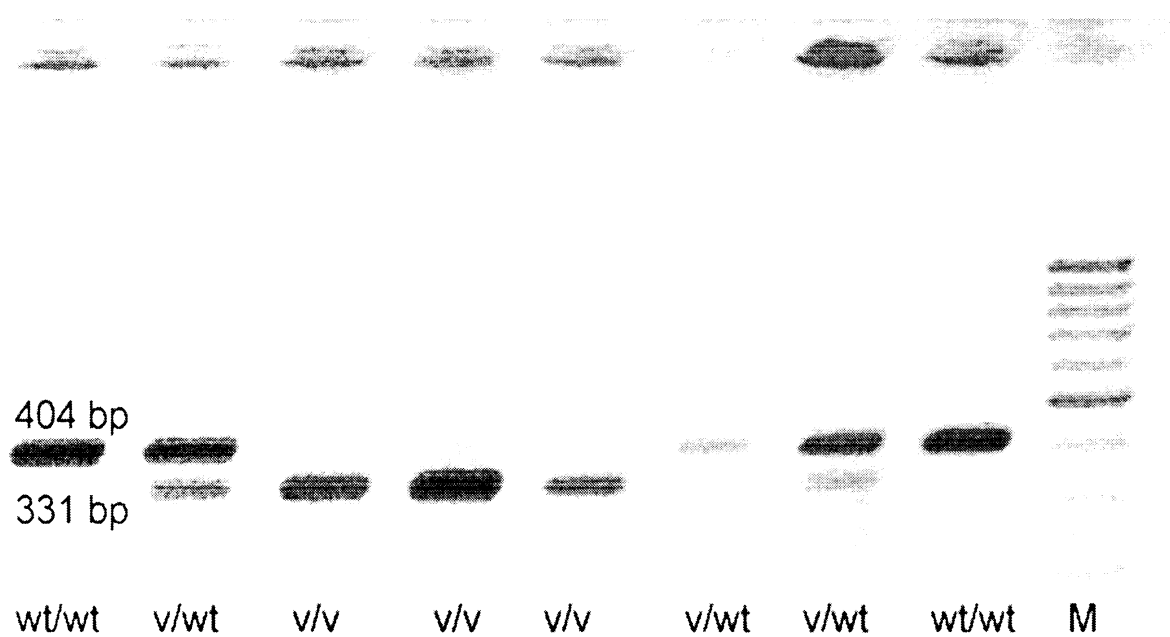
Výsledky χ^2 testu:

Kontrolní skupina vs ISZpac

$\chi^2 = 0,87$

P = 0,647

5.1.3 POLYMORFISMUS V POZICI 7 635



Obrázek 5.1.3.1: Velikost restrikčních fragmentů u polymorfismu genu *PXR* v pozici 7 635, kde M značí marker (GeneRuler 50bp DNA Ladder), wt „wild-type“ alelu a v variantní alelu

Tabulka 5.1.3.1: Srovnání pozorovaných genotypových frekvencí s předpokládanými genotypovými frekvencemi

Sledovaný soubor	Genotyp. skupina	Počet jedinců	Pozorovaná genotyp. frekvence	Alelická frekvence	Předpokl. genotyp. frekvence	CI
Dobr n = 172	wt	20	0,1163	0,3605	0,1300	0,0819 - 0,1507
	ht	84	0,4884		0,4611	0,4348 - 0,5420
	v	68	0,3953	0,6395	0,4090	0,3429 - 0,4477
ort neléčená n = 147	wt	30	0,2041	0,4388	0,1925	0,1580 - 0,2502
	ht	69	0,4694		0,4925	0,4123 - 0,5264
	v	48	0,3265	0,5612	0,3150	0,2729 - 0,3801
ort léčená n = 74	wt	14	0,1892	0,4324	0,1870	0,1261 - 0,2523
	ht	36	0,4865		0,4909	0,4060 - 0,5670
	v	24	0,3243	0,5676	0,3221	0,2489 - 0,3997

Výsledky χ^2 testu:

Dobr vs ort neléčená $\chi^2 = 4,99$ P = 0,083

Dobr vs ort léčená $\chi^2 = 2,69$ P = 0,261

ort léčená vs ort neléčená $\chi^2 = 0,09$ P = 0,958

Tabulka 5.1.3.2: Porovnání genotypových frekvencí v závislosti na pohlaví

Genotyp. skupina	Dobr		ort neléčená		ort léčená		ISZpac	
	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy
wt	9 14,75%	11 9,91%	22 22,92%	8 15,69%	5 14,29%	9 23,08%	11 20,75%	11 16,92%
ht	32 52,46%	52 46,85%	36 37,50%	33 64,71%	19 54,28%	17 43,59%	23 43,40%	29 44,62%
v	20 32,79%	48 43,24%	38 39,58	10 19,60%	11 31,43%	13 33,33%	19 35,85%	25 38,46%
Σ	61	111	96	51	35	39	53	65

Výsledky χ^2 testu: muži vs ženy

Dobr	$\chi^2 = 2,14$	P= 0,344
ort neléčená	$\chi^2 = 10,18$	P= 0,006
ort léčená	$\chi^2 = 1,21$	P= 0,547
ISZpac	$\chi^2 = 0,29$	P= 0,864

Tabulka 5.1.3.3: Porovnání genotypových frekvencí mezi kontrolním souborem a pacienty trpícími idiopatickými střevními záněty

Sledovaný soubor	Genotyp. skupina	Počet jedinců	Pozorovaná genotyp. frekvence	Alelická frekvence	Předpokl. genotyp. frekvence	CI
kontrolní skupina n = 319	wt	50	0,1567	0,3966	0,1573	0,1152 - 0,1983
	ht	153	0,4796		0,4786	0,4225 - 0,5367
	v	116	0,3637	0,6034	0,3641	0,3086 - 0,4186
ISZpac n = 118	wt	22	0,1864	0,4068	0,1654	0,1367 - 0,2361
	ht	52	0,4407		0,4826	0,3774 - 0,5040
	v	44	0,3729	0,5932	0,3519	0,3112 - 0,4346

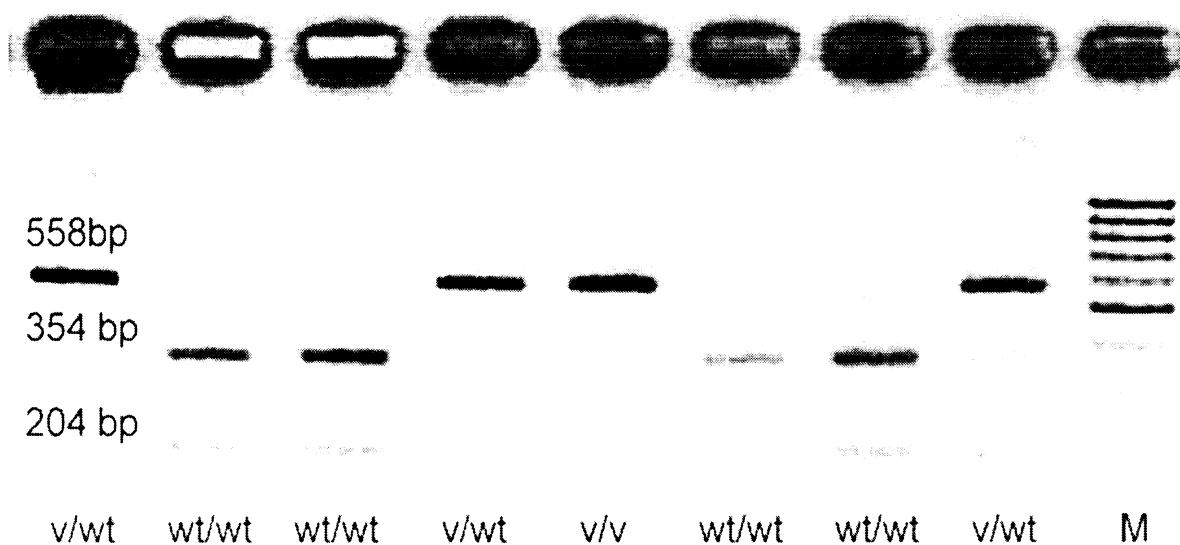
Výsledky χ^2 testu:

Kontrolní skupina vs ISZpac

$\chi^2 = 0,76$

P = 0,684

5.1.4 POLYMORFISMUS V POZICI 10 799



Obrázek 5.1.4.1: Velikost restrikčních fragmentů u polymorfismu genu *PXR* v pozici 10 799, kde M značí marker (GeneRuler 50bp DNA Ladder), wt „wild-type“ alelu a v variantní alelu

Tabulka 5.1.4.1: Srovnání pozorovaných genotypových frekvencí s předpokládanými genotypovými frekvencemi

Sledovaný soubor	Genotyp. skupina	Počet jedinců	Pozorovaná genotyp. frekvence	Alelická frekvence	Předpokl. genotyp. frekvence	CI
Dobr n = 172	wt	140	0,8140	0,8925	0,7966	0,7723 - 0,8557
	ht	27	0,1570		0,1919	0,1180 - 0,1960
	v	5	0,0290	0,1075	0,0116	0,0110 - 0,0470
ort neléčená n = 147	wt	115	0,7823	0,8776	0,7701	0,7351 - 0,8295
	ht	28	0,1905		0,2149	0,1456 - 0,2354
	v	4	0,0272	0,1224	0,0150	0,0086 - 0,0458
ort léčená n = 74	wt	56	0,7568	0,8649	0,7480	0,6876 - 0,8259
	ht	16	0,2162		0,2337	0,1499 - 0,2825
	vt	2	0,0270	0,1351	0,0183	0,0009 - 0,0532

Výsledky χ^2 testu:

Dobr vs ort neléčená

$$\chi^2 = 0,62$$

$$P = 0,732$$

Dobr vs ort léčená

$$\chi^2 = 1,26$$

$$P = 0,533$$

ort léčená vs ort neléčená

$$\chi^2 = 0,21$$

$$P = 0,902$$

Tabulka 5.1.4.2: Porovnání genotypových frekvencí v závislosti na pohlaví

Genotyp. skupina	Dobr		ort neléčená		ort léčená		ISZpac	
	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy
wt	50 81,97%	90 81,08%	75 78,13%	40 78,43%	26 74,29%	30 76,92%	41 77,36%	48 73,85%
ht	9 14,75%	18 16,22%	18 18,75%	10 19,61%	8 22,86%	8 20,51%	12 22,64%	15 23,08%
v	2 3,28%	3 2,70%	3 3,12%	1 1,96%	1 2,85%	1 2,57%	0 0,00%	2 3,07%
Σ	61	111	96	51	35	39	53	65

Výsledky χ^2 testu: muži vs ženy

Dobr	$\chi^2 = 0,10$	P= 0,950
ort neléčená	$\chi^2 = 0,18$	P= 0,914
ort léčená	$\chi^2 = 0,07$	P= 0,966
ISZpac	$\chi^2 = 1,68$	P= 0,432

Tabulka 5.1.4.3: Porovnání genotypových frekvencí mezi kontrolním souborem a pacienty trpícími idiopatickými střevními záněty

Sledovaný soubor	Genotyp. skupina	Počet jedinců	Pozorovaná genotyp. frekvence	Alelická frekvence	Předpokl. genotyp. frekvence	CI
kontrolní skupina n = 319	wt	255	0,7994	0,8856	0,7842	0,7536 - 0,8452
	ht	55	0,1724		0,2027	0,1292 - 0,2156
	v	9	0,0282	0,1144	0,0131	0,0093 - 0,0471
ISZpac n = 118	wt	89	0,7542	0,8686	0,7544	0,6993 - 0,8091
	ht	27	0,2288		0,2283	0,1752 - 0,2824
	v	2	0,0170	0,1314	0,0173	0,0005 - 0,0335

Výsledky χ^2 testu:

Kontrolní skupina vs ISZpac

$\chi^2 = 2,12$

P = 0,347

5.2 FREKVENCE VÝSKYTU VARIANTNÍCH ALEL

Tabulka 5.2.1: Srovnání frekvence výskytu variantních alel genu *PXR* kontrolní skupiny a publikovaných frekvencí u bělošské a afroamerické populace podle [38]

	Polymorfismus v pozici -25 385	Polymorfismus v pozici -24 113	Polymorfismus v pozici 7 635	Polymorfismus v pozici 10 799
Kontrolní skupina	0,37	0,36	0,60	0,11
Bělošská populace	0,39	0,39	0,65	0,13
Afroamer. populace	0,32	0,32	0,23	0,14

6 DISKUSE

Cílem této studie bylo ověřit hypotézu zda jsou polymorfismy genu *PXR* rizikovým faktorem pro vznik idiopatických střevních zánětů a popsat frekvenci výskytu variantních alel u zdravé populace.

Sledovala jsem jednonukleotidové polymorfismy (SNP) genu *PXR* ve čtyřech pozicích označených jako -25 385, -24 113, 7 635 a 10 799 . Tato čísla znamenají pozici SNP v genu vůči začátku transkripce – tedy první a druhá pozice SNP jsou v místech nepřekládaných oblastí genů.

Jednotlivé naměřené genotypové frekvence ve všech pozicích jsem porovnávala s genotypovými frekvencemi vypočítanými podle rovnice Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Z měření jsem určila frekvenci výskytu variantní alely a tu jsem srovnávala s alelickými frekvencemi u bělošské populace v práci Zhanga *et al.* [38].

Vzorky DNA, které jsem měla k dispozici, jsem rozdělila na několik skupin – Dobr, ort léčená, ort neléčená a ISZpac. Do skupiny označené jako Dobr patřili studenti vysokých škol, kteří netrpěli žádnou nemocí a nebyli na dlouhodobé medikamentosní terapii. Ve skupině ort léčená byli zařazeni pacienti ortopedické ordinace, kteří prodělali úraz kolenního kloubu a byli dlouhodobě léčeni farmaky většinou ze skupiny antihypertenziv. Skupinu ort neléčená také tvořili pacienti ortopedické ordinace po úrazu kolenního kloubu, ale bez systémového onemocnění a dlouhodobé medikamentosní terapie. Skupinou ISZpac byli nazváni pacienti 4. interní kliniky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, kteří trpí některým z idiopatických střevních zánětů. Složení sledovaných skupin podle věku a pohlaví je uvedeno v grafech 5.1 a 5.2 na straně 53.

Při zpracování výsledků jsem mezi sebou porovnávala jednotlivé skupiny. Také jsem zjišťovala jestli je rozdílná genotypová frekvence mezi pohlavími.

U polymorfismu v pozici -25 385 (obrázek 5.1.1.1) se variantní alela vyskytuje v 38,08 % ve skupině Dobr; 34,69 % ve skupině ort neléčená a ve 42,57 % u skupiny ort léčená. Podle χ^2 testu není mezi frekvencemi výskytu variantní alely statisticky signifikantní rozdíl – tabulky 5.1.1.1 a 5.1.1.2. Při porovnávání alelických frekvencí mezi muži a ženami rovněž nebyl zjištěn žádný významný rozdíl.

Variantní alela se vyskytuje v 38,98 % u pacientů s ISZ (tabulka 5.1.1.3), což se shoduje s publikovanými daty (39 % výskyt var. alely v bělošské populaci) a blíží se i výsledkům u kontrolního souboru (36,52 %). Proto lze předpokládat, že výskyt tohoto polymorfismu není rizikovým faktorem pro vznik idiopatických střevních zánětů.

U polymorfismu v pozici -24 113 (obrázek 5.1.2.1) jsem naměřila následující frekvenci výskytu variantní alely: u skupiny Dobr se tato alela vyskytuje v 36,92 % ; ve skupině ort neléčená v 34,35 % a ve skupině ort léčená v 48,65 %. Porovnáním těchto výsledků χ^2 testem byl zjištěn signifikantní rozdíl alelické frekvence mezi skupinami ort léčená a ort neléčená – tabulky 5.1.2.1 a 5.1.2.2. Tento statisticky významný rozdíl ($p = 0,005$) by mohl být způsoben asociací některých systémových onemocnění s výskytem polymorfismu *PXR*. Z těchto důvodů jsem do kontrolního souboru zahrnula pouze skupiny Dobr a ort neléčená, ve kterých žádný z jedinců netrpí systémovým onemocněním a nebyl dlouhodobě léčen farmaky.

Variantní alela v pozici -24 113 se u pacientů s ISZ (tabulka 5.1.2.3) vyskytuje v 35,16 %, v kontrolním souboru v 35,74 %. χ^2 testem bylo prokázáno, že ve frekvenci není mezi skupinami statisticky významný rozdíl. V alelických frekvencích v této pozici také nebyl zjištěn rozdíl mezi pohlavími. Zjištěná frekvence výskytu variantní alely se významně neliší od

dostupných literárních údajů v bělošské populaci. Polymorfismus v pozici - 24 113 také není rizikovým faktorem vzniku idiopatických střevních zánětů.

U polymorfismu v pozici 7 635 (obrázek 5.1.3.1) jsem naměřila následující výskyt variantní alely – 63,95 % u skupiny Dobr; 56,12 % u skupiny ort neléčená a 56,76 % u skupiny ort léčená. Po porovnání skupin χ^2 testem byla zjištěna hraniční signifikance mezi skupinami Dobr a ort neléčená – tabulky 5.1.3.1 a 5.1.3.2. Při porovnávání alelických frekvencí mezi muži a ženami byl pouze ve skupině ort neléčená nalezen statisticky významný rozdíl ($p = 0,006$). Tento rozdíl lze nejspíše vysvětlit relativně malým počtem žen ve skupině ort neléčená a tudíž relativně malým počtem jedinců v porovnávaných souborech.

Výskyt variantní alely u pacientů s ISZ (tabulka 5.1.3.3) je 59,32 %, v kontrolním souboru 60,34 %. Podle literárních údajů je variantní alelická frekvence v pozici 7 635 je 65 % v bělošské populaci (tabulka 5.2.1), což není významně odlišné od naměřených hodnot kontrolního souboru. Mohu se tedy domnívat, že ani výskyt polymorfismu v pozici 7 365 není rizikovým faktorem pro vznik ISZ.

U polymorfismu v pozici 10 799 (obrázek 5.1.4.1) jsem naměřila 10,75% výskyt variantní alely ve skupině Dobr; 12,24% výskyt variantní alely ve skupině ort neléčená a 13,51% výskyt var. alely ve skupině ort léčená. Výsledky χ^2 testu prokázaly, že mezi skupinami není žádný statisticky významný rozdíl – tabulky 5.1.4.1 a 5.1.4.2. Při porovnání alelických frekvencí mezi oběma pohlavími také nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl.

Variantní alela v pozici 10 799 se u pacientů s ISZ (tabulka 5.1.4.3) vyskytuje v 13,14 %; což je srovnatelné s výskytem v bělošské populaci

(13 %). Výskyt variantní alely v této pozici také není rizikovým faktorem pro vznik idiopatických střevních zánětů.

Pozorované genotypové frekvence mají normální distribuci ve všech souborech a jsou ve shodě s literárními údaji o výskytu variantních alel v bělošské populaci. Nepozorovala jsem významný rozdíl v alelické frekvenci všech sledovaných polymorfismů *PXR* mezi kontrolním souborem a souborem pacientů s ISZ a proto není pravděpodobné, že by sledované polymorfismy byly rizikovým faktorem pro vznik tohoto onemocnění.

7 SOUHRN

Idiopatické střevní záněty patří k onemocněním u kterých neznáme původ jejich vzniku. Mezi potenciální rizikové faktory vzniku ISZ patří výskyt polymorfismu v genu *MDR1*, který snižuje míru exprese P-glykoproteinu. Exprese P-gp je také regulována komplexem *PXR/SXR* a proto existuje teoretický předpoklad, že funkční polymorfismy genu *PXR* ovlivňující expresi cílového genu *MDR1* mohou být dalším genetickým faktorem zvyšujícím riziko vzniku a progresu onemocnění.

Cílem studie bylo tuto hypotézu ověřit a zjistit zda jsou polymorfismy genu *PXR* rizikovým faktorem pro vznik idiopatických střevních zánětů a popsat frekvenci výskytu variantních alel u zdravé populace a u populace pacientů trpících některým z ISZ.

Výskyt jednonukleotidových polymorfismů genu *PXR* jsem zjišťovala z krve zdravých dobrovolníků i nemocných s ISZ. Ze získané krve jsem izolovala DNA. Metodou stanovení SNP byla polymerázová řetězová reakce s následným štěpením vzniklých PCR produktů specifickými endonukleázami. Vznik PCR produktů i délku vzniklých restričních fragmentů jsem odečítala z agarosových gelů obarvených ethidium bromidem na transiluminátoru. Jednotlivé genotypy jsem určovala podle

délky vzniklých restričních fragmentů (velikosti těchto fragmentů již byly popsány v různých publikacích) porovnáním s markerem o přesně definovaných velikostech fragmentů.

Analyzovala jsem tři soubory – studenty vysokých škol (označení jako Dobr), kontrolní pacienty z ortopedie (ort.) a pacienty s idiopatickými střevními záněty. Kontrolní pacienty z ortopedie jsem rozdělila na dvě podskupiny označené jako ort. léčená a ort. neléčená, mezi kterými jsem pozorovala statisticky významný rozdíl ve výskytu polymorfismu v pozici -24 113. Toto naznačuje možnost asociace systémových onemocnění s výskytem polymorfismů genu *PXR*. Z tohoto důvodu nebyla do kontrolního souboru určenému pro srovnání s pacienty s ISZ zahrnuta skupina ort léčená.

Pozorované genotypové frekvence se ve všech sledovaných skupinách shodují s předpokládanými genotypovými frekvencemi podle rovnice Hardy-Weinbergovy rovnováhy, což ilustruje jejich normální distribuci vzhledem ke zjištěným alelickým frekvencím.

Alelické frekvence všech sledovaných polymorfismů genu *PXR* v kontrolním souboru se shodují s literárními údaji o výskytu variantních alel v bělošské populaci. Alelické frekvence všech sledovaných polymorfismů *PXR* v kontrolním souboru se také shodují s frekvencí variantních alel ve sledovaném souboru pacientů s ISZ.

Vzhledem ke shodě výskytu polymorfismů v genu *PXR* mezi kontrolní skupinou a skupinou pacientů s ISZ jsem neprokázala, že by sledované polymorfismy mohly být rizikovým faktorem pro vznik tohoto onemocnění.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J: **Nuclear receptors and the control of metabolism.** *Annu Rev Physiol* 2003, **65**:261-311.
2. Okey AB, Boutros PC, Harper PA: **Polymorphisms of human nuclear receptors that control expression of drug-metabolizing enzymes.** *Pharmacogenet Genomics* 2005, **15**(6):371-379.
3. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Maurel P, Vilarem MJ: **The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1619**(3):243-253.
4. Goodwin B, Hodgson E, Liddle C: **The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module.** *Mol Pharmacol* 1999, **56**(6):1329-1339.
5. Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterstrom RH *et al*: **An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway.** *Cell* 1998, **92**(1):73-82.
6. Willson TM, Jones SA, Moore JT, Kliewer SA: **Chemical genomics: functional analysis of orphan nuclear receptors in the regulation of bile acid metabolism.** *Med Res Rev* 2001, **21**(6):513-522.
7. Willson TM, Kliewer SA: **PXR, CAR and drug metabolism.** *Nat Rev Drug Discov* 2002, **1**(4):259-266.
8. Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM: **The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism.** *Endocr Rev* 2002, **23**(5):687-702.

9. Watkins RE, Wisely GB, Moore LB, Collins JL, Lambert MH, Williams SP, Willson TM, Kliewer SA, Redinbo MR: **The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity.** *Science* 2001, **292**(5525):2329-2333.
10. Moore LB, Maglich JM, McKee DD, Wisely B, Willson TM, Kliewer SA, Lambert MH, Moore JT: **Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors.** *Mol Endocrinol* 2002, **16**(5):977-986.
11. Jones SA, Moore LB, Shenk JL, Wisely GB, Hamilton GA, McKee DD, Tomkinson NC, LeCluyse EL, Lambert MH, Willson TM *et al*: **The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution.** *Mol Endocrinol* 2000, **14**(1):27-39.
12. Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA: **The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions.** *J Clin Invest* 1998, **102**(5):1016-1023.
13. Kliewer SA, Willson TM: **Regulation of xenobiotic and bile acid metabolism by the nuclear pregnane X receptor.** *J Lipid Res* 2002, **43**(3):359-364.
14. Ostberg T, Bertilsson G, Jendeberg L, Berkenstam A, Uppenberg J: **Identification of residues in the PXR ligand binding domain critical for species specific and constitutive activation.** *Eur J Biochem* 2002, **269**(19):4896-4904.
15. Johnson DR, Li CW, Chen LY, Ghosh JC, Chen JD: **Regulation and binding of pregnane X receptor by nuclear receptor corepressor**

- silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors (SMRT).** *Mol Pharmacol* 2006, **69**(1):99-108.
16. Koyano S, Kurose K, Saito Y, Ozawa S, Hasegawa R, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Nakajima T *et al*: **Functional characterization of four naturally occurring variants of human pregnane X receptor (PXR): one variant causes dramatic loss of both DNA binding activity and the transactivation of the CYP3A4 promoter/enhancer region.** *Drug Metab Dispos* 2004, **32**(1):149-154.
 17. Moore JT, Kliewer SA: **Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions.** *Toxicology* 2000, **153**(1-3):1-10.
 18. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE: **Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism.** *Adv Drug Deliv Rev* 2002, **54**(10):1271-1294.
 19. Schuetz EG, Strom S, Yasuda K, Lecureur V, Assem M, Brimer C, Lamba J, Kim RB, Ramachandran V, Komoroski BJ *et al*: **Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450.** *J Biol Chem* 2001, **276**(42):39411-39418.
 20. El-Sankary W, Bombail V, Gibson GG, Plant N: **Glucocorticoid-mediated induction of CYP3A4 is decreased by disruption of a protein: DNA interaction distinct from the pregnane X receptor response element.** *Drug Metab Dispos* 2002, **30**(9):1029-1034.
 21. Tirona RG, Lee W, Leake BF, Lan LB, Cline CB, Lamba V, Parviz F, Duncan SA, Inoue Y, Gonzalez FJ *et al*: **The orphan nuclear receptor HNF4alpha determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4.** *Nat Med* 2003, **9**(2):220-224.
 22. Hustert E, Zibat A, Presecan-Siedel E, Eiselt R, Mueller R, Fuss C, Brehm I, Brinkmann U, Eichelbaum M, Wojnowski L *et al*: **Natural**

- protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4.** *Drug Metab Dispos* 2001, **29**(11):1454-1459.
23. Tirona RG, Kim RB: **Nuclear receptors and drug disposition gene regulation.** *J Pharm Sci* 2005, **94**(6):1169-1186.
24. Quattrochi LC, Guzelian PS: **Cyp3A regulation: from pharmacology to nuclear receptors.** *Drug Metab Dispos* 2001, **29**(5):615-622.
25. Goodwin B, Redinbo MR, Kliewer SA: **Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002, **42**:1-23.
26. LeCluyse EL: **Pregnane X receptor: molecular basis for species differences in CYP3A induction by xenobiotics.** *Chem Biol Interact* 2001, **134**(3):283-289.
27. Xie W, Evans RM: **Pharmaceutical use of mouse models humanized for the xenobiotic receptor.** *Drug Discov Today* 2002, **7**(9):509-515.
28. Xie W, Radominska-Pandya A, Shi Y, Simon CM, Nelson MC, Ong ES, Waxman DJ, Evans RM: **An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(6):3375-3380.
29. Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, Liu Y, Klaassen CD, Brown KK, Reinhard J *et al*: **The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(6):3369-3374.
30. Kliewer SA: **The nuclear pregnane X receptor regulates xenobiotic detoxification.** *J Nutr* 2003, **133**(7 Suppl):2444S-2447S.

31. Moore LB, Goodwin B, Jones SA, Wisely GB, Serabjit-Singh CJ, M. WT, Collins JL, Kliewer SA: **St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:7500-7502.
32. Coumoul X, Diry M, Barouki R: **PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides.** *Biochem Pharmacol* 2002, **64**(10):1513-1519.
33. Sueyoshi T, Negishi M: **Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001, **41**:123-143.
34. Wang H, Faucette S, Sueyoshi T, Moore R, Ferguson S, Negishi M, LeCluyse EL: **A novel distal enhancer module regulated by pregnane X receptor/constitutive androstane receptor is essential for the maximal induction of CYP2B6 gene expression.** *J Biol Chem* 2003, **278**(16):14146-14152.
35. Goodwin B, Moore LB, Stoltz CM, McKee DD, Kliewer SA: **Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor.** *Mol Pharmacol* 2001, **60**(3):427-431.
36. Cai Y, Konishi T, Han G, Campwala KH, French SW, Wan YJ: **The role of hepatocyte RXR alpha in xenobiotic-sensing nuclear receptor-mediated pathways.** *Eur J Pharm Sci* 2002, **15**(1):89-96.
37. Gerbal-Chaloin S, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Daujat M, Waechter F, Fabre JM, Carrere N, Maurel P: **Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture.** *Drug Metab Dispos* 2001, **29**(3):242-251.
38. Zhang J, Kuehl P, Green ED, Touchman JW, Watkins PB, Daly A, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C *et al*: **The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional**

- characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics* 2001, **11**(7):555-572.
39. Chang TK, Bandiera SM, Chen J: **Constitutive androstane receptor and pregnane X receptor gene expression in human liver: interindividual variability and correlation with CYP2B6 mRNA levels.** *Drug Metab Dispos* 2003, **31**(1):7-10.
40. Staudinger J, Liu Y, Madan A, Habeebu S, Klaassen CD: **Coordinate regulation of xenobiotic and bile acid homeostasis by pregnane X receptor.** *Drug Metab Dispos* 2001, **29**(11):1467-1472.
41. Kauffmann HM, Pfannschmidt S, Zoller H, Benz A, Vorderstemann B, Webster JI, Schrenk D: **Influence of redox-active compounds and PXR-activators on human MRP1 and MRP2 gene expression.** *Toxicology* 2002, **171**(2-3):137-146.
42. Dostálek M.: **Transportní proteiny rodiny ABC (ATP binding cassette).** *Farmakoterapie.*
43. Fromm MF: **The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans.** *Adv Drug Deliv Rev* 2002, **54**(10):1295-1310.
44. Buchman AL, Paine MF, Wallin A, Ludington SS: **A higher dose requirement of tacrolimus in active Crohn's disease may be related to a high intestinal P-glycoprotein content.** *Dig Dis Sci* 2005, **50**(12):2312-2315.
45. Wang H, LeCluyse EL: **Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes.** *Clin Pharmacokinet* 2003, **42**(15):1331-1357.
46. Farrell RJ, Kelleher D: **Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease.** *J Endocrinol* 2003, **178**(3):339-346.

47. Geick A, Eichelbaum M, Burk O: **Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin.** *J Biol Chem* 2001, **276**(18):14581-14587.
48. Kim RB: **Pharmacogenetics of CYP enzymes and drug transporters: remarkable recent advances.** *Adv Drug Deliv Rev* 2002, **54**(10):1241-1242.
49. Zbořil V: **Probiotika v léčbě idiopatických střevních zánětů .** Dostupné na WWW <<http://www.tigis.cz/alergie/aler304/06.htm>>
50. Lukáš M, Chalupná P, Bortlík M: **Imunosupresivní a biologická terapie ulcerózní kolitidy a Crohnovy nemoci.** *Remedia* 2003:75-86.
51. Vokurka M, Hugo J: **Velký lékařský slovník On-line.** In.; Maxdorf, 2002, dostupný na WWW < <http://www.maxdorf.cz/maxdorf/lis.html>>.
52. Šácha P: **Ulcerózní kolitida - zánět tlustého střeva.** ZPRAVODAJ Centra celostní medicíny říjen 2003. Dostupné na WWW <<http://www.celostnimediceina.cz/ulcerozni-kolitida-zanet-tlusteho-streva.htm>>
53. Caprilli R, Gassull MA, Escher JC, Moser G, Munkholm P, Forbes A, Hommes DW, Lochs H, Angelucci E, Cocco A *et al*: **European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations.** *Gut* 2006, **55 Suppl 1**:i36-58.
54. Lukáš K: **Aminosalicyláty v léčbě idiopatických střevních zánětů.** VI. Vzdělávací a diskusní gastroenterologické dny 1998. Dostupné na WWW <<http://www.riebel.cz/chirurgie/aa.asp?id=106>>
55. Travis SP, Stange EF, Lemann M, Oresland T, Chowers Y, Forbes A, D'Haens G, Kitis G, Cortot A, Prantera C *et al*: **European evidence based consensus on the diagnosis and management**

- of Crohn's disease: current management. *Gut* 2006, **55** Suppl 1:i16-35.
56. McCann ML, Abrams RS, Nelson RP, Jr.: **Recolonization therapy with nonadhesive Escherichia coli for treatment of inflammatory bowel disease.** *Ann N Y Acad Sci* 1994, **730**:243-245.
57. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT: **Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial.** *Lancet* 1999, **354**(9179):635-639.
58. Kruis W, Schutz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M: **Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis.** *Aliment Pharmacol Ther* 1997, **11**(5):853-858.
59. Lukáš M: **Vzrůstající význam imunosupresiv u idiopatických střevních zánětů (ISZ).** VI. Vzdělávací a diskusní gastroenterologické dny 1998. Dostupné na WWW <<http://www.riebel.cz/chirurgie/aa.asp?id=108>>
60. Bartůněk: **Imunosupresivní léčba idiopatických střevních zánětů (ISZ).** In: *Konference*Semináře: 28.6.1999 1999; 1999: 16-17.*

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka