

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Marcela Vedralová, Bc.

Analýza genetických markerů ledvinových komplikací diabetes mellitus
Determination of genetic markers for kidney complications of diabetes mellitus

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Anna Kotrbova - Kozak, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28. 8. 2011

.....

Marcela Vedralová

Poděkování

Děkuji své školitelce Ing. Anně Kotrbové – Kozak, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které dovedly moji práci do zdárného cíle. Velmi ráda bych poděkovala Doc. MUDr. Marii Černé, CSc. za podporu, vstřícnost a ochotu vždy poradit. Děkuji RNDr. Bohumíru Procházkovi, CSs. za pomoc při statistickém zpracování výsledků. Také děkuji pracovníkům laboratoře za vytvoření přátelského kolektivu a v neposlední řadě bych tímto chtěla poděkovat rodičům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

Abstrakt

Do předkládané studie byly vybrány geny, jejichž proteinové produkty významně ovlivňují kalciofosfátový metabolismus v ledvinách, a u nichž se předpokládá vliv na patogenezi jak samotného diabetu, tak ledvinného poškození. Receptor vitamínu D (VDR) patří do velké rodiny nukleárních receptorů a transkripčních faktorů. VDR je exprimován ve velkém množství buněk různých tkání a jeho aktivace ligandem 1, 25 – dihydroxyvitamínem D₃, ovlivňuje expresi mnoha genů. V genu pro VDR byly pomocí restričních endonukleáz *Bsm I*, *Fok I*, *Taq I* a *Apa I* nalezeny polymorfizmy, u kterých byla prokázána asociace s některými chronickými onemocněními, jako je diabetes 1. a 2. typu nebo karcinom plic. Tyto studie umožnily identifikovat polymorfizmy délky restričních fragmentů pomocí restričních endonukleáz *Bsm I*, *Fok I*, *Taq I* a *Apa I*. Mezi nejvýznamnější regulátory kalciového a fosfátového metabolismu patří též parathyroidní hormon. Alelový polymorfismus genu *PTH* zahrnuje alely B/b a D/d, které se rovněž mohou spolupodílet na patogenezi ledvinných komplikací.

Cíle: Naším cílem bylo zjistit, zda se určité kombinace VDR a PTH genotypů nevyskytují s vyšší frekvencí mezi skupinou diabetiků s ledvinnými komplikacemi než u diabetiků bez ledvinných komplikací. U VDR byla rovněž provedena expresní analýza na úrovni mRNA. Byl sledován vliv kombinace jednonukleotidových polymorfizmů na expresi VDR na úrovni RNA.

Metody: DNA byla izolována vysolovací metodou a pomocí PCR byly amplifikovány specifické fragmenty genů pro VDR a PTH. Amplifikovaný produkt byl poté štěpen restriktázou specifickou pro každou alelu. Pro gen VDR byly použity restriktázy: *Bsm I*, *Apa I*, *Taq I* a *Fok I*, pro parathyroidní hormon restriktázy *Bst BI* a *Dra II*. Poté byl hodnocen polymorfismus délky restričních fragmentů.

Určení hladiny exprese VDR v plné krvi na úrovni mRNA bylo provedeno pomocí metody Real – Time PCR.

Výsledky: Kombinace alel BBDD se zdá být predispozičním genotypem pro rozvoj diabetu 2. typu, ale nikoliv diabetické nefropatie. Genotyp bbDd má protektivní roli v rozvoji diabetu a jeho komplikací.

Klíčová slova: diabetes, nefropatie, parathyroidní hormon, receptor pro vitamín D, polymorfismus.

Abstract

In this work we chose to study genes whose protein products significantly affect calcium-phosphate metabolism in kidneys and are hypothesized to be involved in the pathogenesis of diabetes as well as kidney damage.

Vitamin D receptor (*VDR*) belongs to a large family of nuclear receptors and transcription factors. *VDR* is expressed in many cells in different tissues and activation of this receptor by its ligand 1,25 - dihydroxyvitamin D₃ affects expression of many genes. Using restriction endonucleases *Bsm I*, *Fok I*, *Taq I* and *Apa I*, there were identified polymorphic sites in *VDR* gene that were found to be associated with certain chronic diseases, like type 1 and type 2 diabetes and lung carcinoma.

Parathyroid hormone is one of the most important regulators of calcium and phosphate metabolism. Allelic polymorphism of *PTH* gene involves B/b and D/d alleles that can participate in pathogenesis of kidney complications as well.

Aims: We aimed to determine whether there is a difference in frequency of certain combinations of *VDR* and *PTH* genotypes between group of diabetic patients with kidney complications and diabetic patients without kidney complications. We also assessed influence of single-nucleotide polymorphisms at *VDR* gene mRNA expression.

Methods: DNA was isolated by salt-extraction method and specific fragments of *VDR* and *PTH* genes were amplified using PCR. Amplified products were digested by allele-specific restrictases *Bsm I*, *Apa I*, *Taq I*, *Fok I* (*VDR* gene) and *Bst BI* and *Dra II* (*PTH*). The genotype of individual was determined on the basis of length of restriction fragments. Assessment of *VDR* RNA levels in full blood was performed using Real-Time PCR.

Results: The BBDD genotype seems to be predisposing factor for development of type 1 diabetes, but not for development of diabetic nephropathy. The bbDd genotype seems to have protective role in development of diabetes and its complications.

Keywords: diabetes, nephropathy, parathyroid hormone, vitamin D receptor, polymorphism.

Obsah:

1. Úvod	14
1.1. Cíle	15
2. Literární přehled	16
2.1. Definice diabetes mellitus	16
2.2. Klasifikace diabetes mellitus	16
2.2.1. Diabetes mellitus 1. typu	16
2.2.2. Diabetes mellitus 2. typu	17
2.2.3. Ostatní specifické typy diabetu	18
2.2.4. Gestační diabetes	18
2.3. Komplikace diabetes mellitus	18
2.3.1. Základní rozdělení onemocnění ledvin u diabetiků	19
2.3.2. Fáze diabetické nefropatie	19
2.4. Patofyziologie diabetické nefropatie	19
2.4.1. Hemodynamické faktory	19
2.4.2. Metabolické faktory	21
2.4.2.1. Glykační produkty	21
2.4.2.2. Polyolová cesta	22
2.4.2.3. Hexozaminová cesta	22
2.4.2.4. Oxidační stres a volné radikály	23
2.4.3. Hyperglykémie a stresem aktivované patologické dráhy	23
2.4.3.1. Aktivace protein kinázy C	23
2.4.3.2. Signalizace MAPK v ledvinách	24
2.4.3.3. Signalizace zprostředkovaná NFκB	24
2.5. Genetické studie a markery diabetické nefropatie	24
2.5.1. Metody a úskalí zkoumání genetické komponenty diabetu	25
2.5.2. Asociační studie u diabetu a jeho komplikací	25
2.6. Vitamín D a jeho význam	27
2.6.1. Imunomodulační efekt vitamínu D	28
2.6.2. Vitamín D a diabetes 1. typu	29
2.6.3. Vitamín D a diabetes 2. typu	30
2.6.4. Vitamín D a nefropatie	30
2.6.5. Jaderný receptor vitamínu D	30
2.6.6. Studované polymorfizmy genu pro receptor vitamínu D	31

2.6.7. Polymorfizmy genu pro receptor vitamínu D ve vztahu k diabetu a diabetické nefropatii	32
2.7. Parathyreoidní (parathormon) hormon a jeho funkce	33
2.7.1. Chronické selhání ledvin ve vztahu k parathormonu	33
2.7.2. Struktura genu pro parathormon	33
2.7.3. Polymorfizmy ve vztahu k ledvinnému poškození	35
3. Materiál a metody	36
3.1. Používaný materiál	36
3.1.1. Pufry a roztoky	36
3.1.2. Enzymy	36
3.1.3. Komerční soupravy a standardy	36
3.1.4. Chemikálie	37
3.1.5. Používané oligonukleotidy a sondy	38
3.1.6. Používané přístrojové vybavení	39
3.1.7. Používané počítačové programy	39
3.1.8. Vyšetřované skupiny pacientů	40
3.2. Metodika práce a postupy	41
3.2.1. Izolace DNA z periferní krve	41
3.2.2. Stanovení koncentrace a čistoty DNA	42
3.2.3. Izolace mononukleárních buněk z periferní krve	42
3.2.4. Genotypizace polymorfizmů genů pro receptor vitamínu D (<i>VDR</i>) a parathyreoidní hormon (<i>PTH</i>)	43
3.2.4.1. Polymerázová řetězcová reakce	43
3.2.4.2. Polymorfizmus délky restrikčních fragmentů	46
3.2.4.3. Elektroforetické separace	50
3.2.5. Studium exprese <i>VDR</i> na úrovni mRNA	51
3.2.5.1. Izolace RNA	51
3.2.5.2. Reverzní transkripce	52
3.2.5.3. Real – Time PCR	53
3.2.6. Statistická analýza	54
4. Výsledky	55
4.1. Genotypizace genu pro receptor vitamínu D	55
4.1.1. <i>Fok I</i> polymorfizmus	55
4.1.2. <i>Bsm I</i> polymorfizmus	57

4.1.3. <i>Taq I</i> polymorfizmus	59
4.1.4. <i>Apa I</i> polymorfizmus	61
4.2. Genotypizace genu pro parathyreoidní hormon	63
4.2.1. <i>Bst BI</i> polymorfizmus	63
4.2.2. <i>Dra II</i> polymorfizmus	65
4.3. Porovnání kombinací genotypů <i>VDR</i>	67
4.4. Porovnání kombinací genotypů <i>PTH</i>	68
4.5. Hladina exprese <i>VDR</i> na úrovni mRNA	70
5. Diskuze	72
6. Souhrn	77
7. Seznam literatury	78

Seznam zkratek

A	adenin
ADA	Americká diabetická asociace
AGE	pozdní glykační produkty
ANP	atriální natriuretický peptid
ApoE	apolipoprotein E
ATPasa	adenosin trifosfatáza
C	cytosin
Ca ²⁺	vápenatý kationt
CD	diferenciační antigen
CDK	chronické selhání ledvin
cDNA	komplementární DNA
CI	interval spolehlivosti
CML	karboxymetyl lysin
CYP3A	cytochrom P450 3A
D/ I polymorfizmus	deleční / inserční polymorfizmus
DAG	diacylglycerol
dATP	2' - deoxyadenosin- 5' - trifosfát
db SNP	The Single Nucleotide Polymorphism database
DBP	bílkovinný nosič vitamínu D
DC	dendritická buňka
dCTP	2' - deoxycytidin- 5' - trifosfát
dGTP	2' - deoxyguanosin- 5' - trifosfát
dH ₂ O	destilovaná voda
DM 1	diabetes mellitus prvního typu
DM 2	diabetes mellitus druhého typu
DM	diabetes mellitus

DN	diabetická nefropatie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
dTTP	2' - deoxythymidin- 5' - trifosfát
ECT	extracelulární tekutina
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
eNOS	endoteliální forma syntetázy oxidu dusnatého
F- 6-P	fruktóza- 6 -fosfát
FNKV	Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
G	guanin
G-6-P	glukóza - 6 - fosfát
GAD 65	dekarboxyláza kyseliny glutamové, izoforma 65
GLUT 1	glukózový transportér 1
HCl	kyselina chlorovodíková
HLA	hlavní histokompatibilní systém člověka
HSPG	heparansulfát proteoglykan
huTBP	lidský gen jehož produkt se váže se na specifickou nukleotidovou sekvenci zvanou TATA box
hVDR	lidský gen pro receptor vitamínu D
HWE	Hardy – Weinbergův zákon
IFN γ	interferon gama
IgG	imunoglobulin izotypu G
IgM	imunoglobulin izotypu M
IL	interleukin
iNOS	indukovatelná forma syntetázy oxidu dusnatého
K ⁺	draselný kationt
kb	kilobáze
kol.	kolektiv

LADA	latentní autoimunitní diabetes dospělých
M	žebříček, marker
MAPK	mitogeny aktivované protein kinázy
MgCl ₂ · 6H ₂ O	hexahydrát chloridu hořečnatého
MHC	hlavní histokompatibilní systém
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
Na ⁺	sodný kationt
NaCl	chlorid sodný
NAD ⁺	nikotin amid adenin dinukleotid - oxidovaný
NADP	nikotin amid adenin dinukleotid
NADPH	nikotin amid adenin dinukleotid fosfát - redukovaný
NDRD	nediabetická nefropatie
NFAT	nukleární faktor aktivovaných T - lymfocytů
NFκB	nukleární faktor kappa B
nNOS	neurální forma syntetázy oxidu dusnatého
NO	oxid dusnatý
NOS	oxid dusnatý syntetáza
Obr.	obrázek
OR	odds ratio (statistický ukazatel)
PBMC	mononukleární buňky, bílé krvinky bez trombocytů
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PKC β	protein kináza C, izoforma β
PKC	protein kináza C
PPIA	peptidylprolyl isomeráza A (cyklofilin A)
PTH	parathyreoidní hormon, parathormon
PTHR	receptor pro parathyreoidní hormon
RAS	renin angiotenzinový systém

RCLB	Red cell lysis buffer
RE	restrikční endonukleáza
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
rs SNP	referenční číslo SNP
RT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
SDS	dodecylsulfát sodný
SNP	jednonukleotidová záměna
STZ	streptozotocin
T	thymín
Tab.	tabulka
TATA box	sedminukleotidová sekvence DNA nacházející se v promotorové oblasti mnoha genů
TEDDY	Environmental Determinant of Diabetes in the Young
TGF β	transformující růstový faktor beta
Th	pomocný T lymfocyt
Tris	2-amino-2-hydroxymetyl-propan-1,3-diol
UTR	nepřekládaná oblast
UV	ultrafialové záření
ÚZIS ČR	Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky
VDR	receptor pro vitamín D
<i>VDR – F</i>	alela genu <i>VDR</i> kódující krátkou verzi proteinu VDR
<i>VDR – f</i>	alela genu <i>VDR</i> kódující dlouhou verzi proteinu VDR
WCLB	White cell lysis buffer
WHO	Světová zdravotnická organizace
ZnT8	zinkový transportér

1. ÚVOD

Diabetes mellitus je onemocnění, jehož prevalence a incidence neustále stoupá nejen v České republice, ale i celosvětově.

Za posledních 20 let došlo v České republice k výraznému nárůstu onemocnění. Zatímco v roce 1975 bylo v České republice hlášeno přibližně 234 tisíc diabetiků, v roce 2009 to bylo již 783 tisíc pacientů s diabetem (ÚZIS ČR 2010).

S výskytem onemocnění narůstá i počet pacientů, u nichž se rozvinuly chronické komplikace diabetu. Jedná se především o cévní onemocnění, diabetickou retinopatii a nefropatii (DN), které se věnuji ve své diplomové práci. Tyto komplikace vedou nejenom ke zhoršení kvality života postižených diabetiků, ale i k zvyšujícím se ekonomickým nárokům na péči o tuto skupinu obyvatelstva.

Diabetes je onemocnění typicky multifaktoriálním a mohli bychom říci i „civilizačním“. Nemůžeme označit přesnou příčinu rozvoje onemocnění, ale lze jmenovat několik hlavních rizikových faktorů, které se mohou na patogenezi diabetu 2. typu podílet (nadváha, fyzická aktivita, klima, metabolická kontrola). Mezi rizikové faktory diabetu 1. typu patří virové infekce prodělané v dětství nebo pití kravského mléka v prvních měsících života dítěte.

Vedle genetické predispozice k diabetu je rovněž předpokladem genetická vnímavost k samotnému glomerulárnímu poškození. Ke studiu genů zodpovědných za vznik diabetické nefropatie se používají zejména asociační studie, srovnávající výskyt polymorfismů potencionálně rizikových genů mezi skupinou kontrolní (zdraví jedinci) a nepříbuznou skupinou postižených jedinců. Sledují se statisticky významné rozdíly mezi těmito skupinami. V předkládané studii byly vybrány geny, jejichž proteinové produkty významně ovlivňují kalciofosfátový metabolismus v ledvinách, a u nichž se předpokládá vliv na patogenezi jak samotného diabetu, tak ledvinného poškození. Receptor vitamínu D (VDR) a parathyreoidní hormon (PTH) patří mezi hlavní regulátory hladiny vápníku a fosfátu v krvi. Mnohé studie odhalily spojitost mezi polymorfismy genů *VDR* a *PTH* ve vztahu k diabetu a nefropatii. Avšak význam některých pozorování není zcela jasný. Proto je důležité, aby se tyto výsledky ověřily na větším vzorku populace a mohly se stát přínosem v prediktivní diagnostice tohoto onemocnění.

1.1. Cíle

- 1) Vyšetření genotypu pro alelové polymorfizmy genu pro receptor vitamínu D (*VDR*) a genu pro parathyreoidní hormon (*PTH*).
- 2) Porovnání genotypů a posouzení kombinací alel na rozvoj diabetické nefropatie.
- 3) Určení hladiny genové exprese *VDR* v plné krvi u vybrané skupiny pacientů na úrovni mRNA pomocí kvantitativní RT - PCR.
- 4) Zpracování získaných dat a posouzení možnosti zapojení genů *VDR* a *PTH* do prediktivní diagnostiky.

2. Literární přehled

2.1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus je souhrnným názvem pro skupinu klinicky a etiologicky heterogenních chronických onemocnění, které vznikají v důsledku absolutního nebo relativního nedostatku inzulínu vedoucího k poruše metabolismu. Hlavním projevem je hyperglykémie (PELIKÁNOVÁ 2003).

2.2. Klasifikace diabetes mellitus

Klasifikace diabetického syndromu vychází z průběhu hyperglykémie a klinických příznaků. Díky novým poznatkům v etiopatogenezi onemocnění zahrnuje současná klasifikace 4 základní skupiny. V roce 1999 ho přijala Světová zdravotní organizace WHO (WHO 1999):

1. diabetes mellitus 1. typu
 - imunitně podmíněný
 - idiopatický
2. diabetes mellitus 2. typu
3. ostatní specifické typy diabetu
4. gestační diabetes mellitus

2.2.1. Diabetes mellitus 1. typu

Diabetes mellitus 1. typu (DM 1) je autoimunitní onemocnění, které vzniká u geneticky predisponovaných osob. Autoimunitní proces postihuje selektivně β buňky Langerhansových ostrůvku pankreatu. Beta buňky, které představují až 70% z celkového množství buněk v Langerhansových ostrůvcích pankreatu, postupně zanikají, až v konečné fázi dochází k absolutnímu nedostatku inzulínu. Je zajímavé, že funkce zbylých endokrinních buněk pankreatu, jsou zachovány. Autoimunitní diabetes se projevuje zejména v dětství a v rané dospělosti, kdy dochází k velmi rychlému zániku β buněk. Pokud dochází k manifestaci DM typu 1. v dospělosti, bývá destrukce β buněk pomalá a diabetes je označován termínem LADA (latentní autoimunitní diabetes dospělých) (PELIKÁNOVÁ 2003).

V rozpoznání autoantigenů pankreatických β buněk hrají kritickou roli T lymfocyty, zejména pomocné CD4 a cytotoxické CD8 lymfocyty (SANTAMARIA 2010).

V oběhu pacienta se nachází cirkulující autoprotilátky, které svědčí o autoimunitním původu choroby. Tyto autoprotilátky jsou v klinické praxi využívány k predikci onemocnění. Autoprotilátky se navazují na dobře známé antigeny: inzulín, dekarboxylasa kyseliny glutamové (izofорма GAD 65), inzulínový antigen-2 a nedávno objevený zinkový transportér (ZnT8), který má vysokou prediktivní hodnotu (WENZLAU *et al.* 2007).

Impuls, který vede k iniciaci autoimunitní odpovědi, je dosud neznámý.

Těsná asociace byla prokázána s hlavním histokompatibilním komplexem *MHC II*. třídy, a to s antigeny *HLA-DR/DQ* (NOBLE *et al.*, 1996). Podle nedávných studií byla prokázána i slabá asociace s molekulami *MHC I*. třídy, *HLA-B* a *HLA-A* (NEJENTSEV *et al.* 2007).

Kromě genetických faktorů se na patogenezi onemocnění podílí i řada faktorů zevního prostředí. Mezinárodní konsorcium, Environmental Determinant of Diabetes in the Young (TEDDY), bylo založeno, aby pomohlo objasnit tyto složité interakce.

Na rozvoji prediabetu se mohou například podílet virová infekční onemocnění prodělaná v dětství nebo pití kravského mléka v prvních několika měsících života dítěte. Hygienická hypotéza vychází z pozorování, že děti, které jsou v raném věku nedostatečně vystavovány infekčním onemocněním, trpí častěji diabetem (<http://teddy.epi.usf.edu/>).

2.2.2. Diabetes mellitus 2. typu

Diabetes mellitus 2. typu (DM 2) je způsoben inzulínovou rezistencí spolu s poruchou sekrece inzulínu, která je způsobena jiným mechanismem než autoimunitou. Diabetici mohou mít jak nadbytek inzulínu, tak nedostatek inzulínu. Jeden z hlavních důvodů inzulínové rezistence je nadváha, proto je základním léčebným postupem snížení hmotnosti a správná dieta. Na vzniku onemocnění se podílí i řada exogenních faktorů (stres, kouření, nedostatek pohybu). Onemocnění se projevuje nejčastěji v dospělosti, po dosažení 40. roku života. Pro tento typ diabetu je charakteristický familiární výskyt onemocnění. Začátek choroby bývá pozvolný a diagnostikována bývá spíše náhodně nebo až při svých komplikacích (PELIKÁNOVÁ 2003).

2.2.3. Ostatní specifické typy diabetu

Do této skupiny patří DM podmíněný genetickým defektem funkce β buněk.

DM typu MODY (maturity-onset type diabetes of the young) je cukrovka s dominantní autozomální dědičností, která se manifestuje ve věku do 25 let a je více než 5 let kontrolovatelná bez podávání inzulínu. Dosud bylo definováno 6 podskupin MODY, které jsou spojeny s mutací genu pro glukokinázu (MODY 2) či s mutacemi genů transkripčních faktorů (MODY 1, 3, 4, 5, 6), které hrají důležitou roli během fetálního vývoje pankreatických ostrůvků. Genetický defekt účinku inzulínu zahrnuje například defekt inzulínových receptorů. Součástí této různorodé skupiny je dále diabetes vyvolaný onemocněním exokrinního pankreatu, endokrinopatií, chemikáliemi, léky, infekcemi a imunologickými patologiemi. Rovněž genetické syndromy (Downův, Turnerův a další) jsou občas provázené diabetem (PELIKÁNOVÁ 2003).

2.2.4. Gestační diabetes

Je charakteristický vznikem v průběhu těhotenství, nejčastěji po 20. týdnu. Souvisí se sekrecí antiinzulárně působících placentárních hormonů, z nichž má největší úlohu kortizol a humánní placentární laktogen. Po porodu dítěte obvykle gestační diabetes mizí. Je však známo, že u 40 % žen, které měly v těhotenství gestační diabetes, se po 15-20 letech vyvine DM 2 (ANDĚLOVÁ 2003).

2.3. Komplikace diabetes mellitus

Před objevem inzulínu byla hlavní příčinou smrti diabetiků dekompenzace diabetu. Po objevu inzulínu Fredericem Bantingem v roce 1923 dochází k revoluci v léčbě diabetu a prodlužuje se významně život pacientů. Na druhou stranu, dlouhodobá diagnóza diabetu a jeho špatná kompenzace s sebou nese riziko rozvoje komplikací, které vedou k nevratnému poškození tkání v organismu. Mezi tyto komplikace patří především diabetická retinopatie, neuropatie a nefropatie (BROWNLEE 2005).

2.3.1. Základní rozdělení onemocnění ledvin u diabetiků

V zásadě lze rozdělit poškození ledvin do 3 hlavních skupin:

A. Nefropatie vzniklá v souvislosti s diabetem, tedy diabetická glomeruloskleróza

B. Nediabetická nefropatie, kterou lze rozdělit na glomerulární (primární glomerulonefritidy) a neglomerulární (renovaskulární onemocnění ledvin, infekce močových cest, nekróza papily, polycystická choroba ledvin, refluxní nefropatie)

C. Iantrogenní poškození ledvin, jako projev nefrotoxického efektu léků, kontrastní látky atd. (RYCHLÍK A TESAŘ 2005).

2.3.2. Fáze diabetické nefropatie

U DM 1. typu rozlišujeme 5 poměrně dobře definovaných stádií nefropatie, hůře jsou definována stádia u diabetu 2. typu.

Stádium 1, nazývané hyperfiltračně hypertrofické, je pozorováno u pacientů, kteří mají nově diagnostikovaný diabetes. Je doprovázeno albuminurií, proteinurií a hyperfiltrací. Dochází k zvýšení propustnosti glomerulární membrány pro makromolekuly.

Stádium 2, latentní, je klinicky bezpříznakové. Dochází k rozvoji morfologických a typických histologických změn v ledvinách.

Stádium 3, incidentní diabetická nefropatie, se vyvíjí po 6 – 15 letech trvání diabetu a je provázeno mikroalbuminurií.

Stádium 4, manifestní diabetická nefropatie, se projevuje růstem proteinurie o 10-40 % za rok a poklesem glomerulární filtrace.

V 5. posledním stádiu, které nastupuje po 7 letech trvání proteinurie je pacient odkázán na dialyzační zařízení (RYCHLÍK 2005).

2.4. Patofyziologie diabetické nefropatie

2.4.1. Hemodynamické faktory, diabetická hyperfiltrace

V časných fázích diabetu dochází ke zvýšení glomerulární filtrace. Tento jev, označován jako diabetická hyperfiltrace, byl popsán u DM 1. typu (DIETZEL *et al.* 1972).

U DM 2. typu byl tento jev také pozorován (NELSON *et al.* 1999). Ke zvýšení glomerulární filtrace dochází také u osob trpících obezitou, která je přítomná velice často právě u diabetiků 2. typu (HALL *et al.* 1998).

Patogeneze hemodynamických změn u nefropatie je multifaktoriální. Bylo označeno mnoho potenciálních mediátorů, z nichž nejvýznamnější jsou zmíněny níže.

Atrialní natriuretický peptid (ANP) je peptid s natriuretickou a vazodilatační aktivitou, který je syntetizován ve svalových buňkách srdečních předsíní. Podnětem jeho tvorby je zvýšený příjem NaCl a expanze ECT. Výsledkem jeho působení je úprava objemu extracelulární tekutiny (ECT) zvýšenou diurézou, zvýšené vylučování sodných kationtů a pokles systolického a diastolického tlaku (SEDLÁČEK 2003).

Bylo dokázáno, že plazmatická hladina ANP je zvýšená u experimentálního modelu diabetu. Jako model byl použit potkan, u něhož byl diabetes vyvolán účinkem streptozotocinu (STZ), který ničí β buňky pankreatu (ORTOLA *et al.* 1987).

Výrazný podíl na řízení renální filtrace a hemodynamiky má oxid dusnatý (NO), který vzniká z aminokyseliny L- argininu pomocí enzymu NO syntetázy (NOS). Je produkován vaskulárním endotelem a buňkami macula densa. Působí na aferentní arterioly a buňky macula densa. Zprostředkuje interakci mezi vazodilatačním efektem a vazokonstrikčním efektem angiotensinu II. Působí přímo na glomerulární intersticiu a inhibuje tubulární transport v macula densa (SEDLÁČEK 2003).

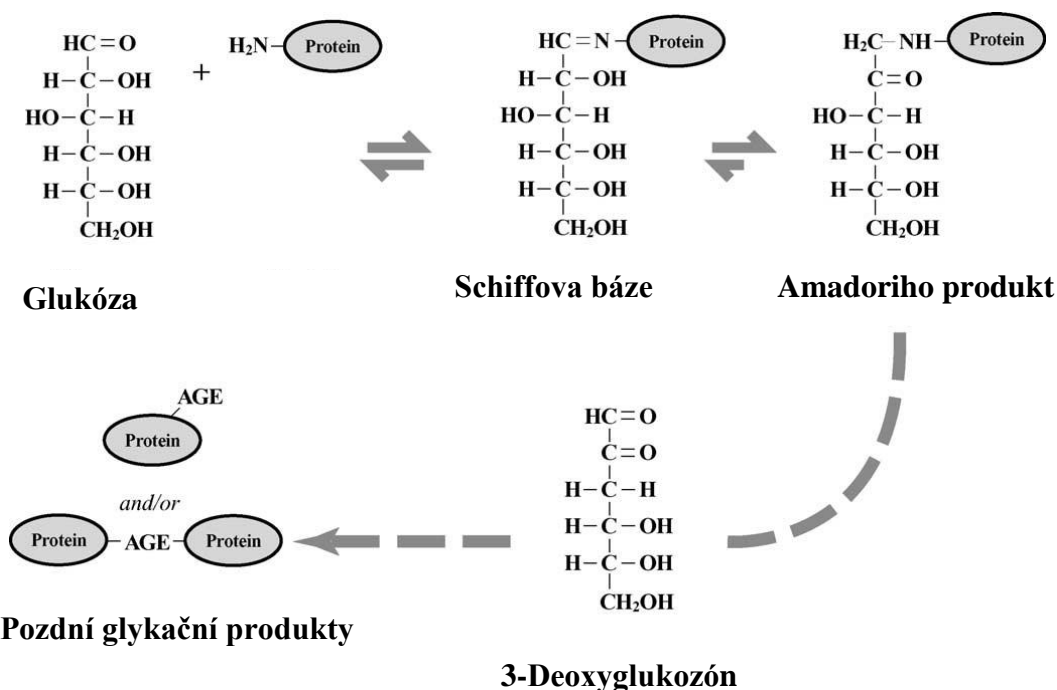
NOS se vyskytuje ve 3 formách: neurální nNOS, indukovatelná iNOS a endoteliální eNOS (KONE *et al.* 1997). Byl objeven polymorfismus eNOS v intronu 4 asociovaný s rozvojem diabetické nefropatie (NEUGEBAUER *et al.* 2000). Tato skutečnost byla intenzivně zkoumána, avšak některé studie asociaci polymorfizmu eNOS s diabetickou nefropatií nepotvrzují (WANG *et al.* 1999). U potkanů trpících chronickým selháním ledvin byla nalezena nízká produkce NO a jeho snížená exkrece. Suplementace L-argininu inhibovala u potkanů rozvoj chronického renálního selhání (BLUM *et al.* 1998).

2.4.2. Metabolické faktory

2.4.2.1. Glykační produkty

Významnou roli v patogenezi diabetické nefropatie hrají pozdní glykační produkty (AGE). Glykace proteinů je iniciována nukleofilní reakcí mezi volnou aminoskupinou proteinů a karbonylovou skupinou glukosy, kdy nejprve vzniká labilní, snadno disociovatelná Schiffova báze, která se přesmykuje na stabilní ketoamin (Amadoriho produkt). Glykace probíhá i u zdravých lidí. Podíl glykovaného hemoglobinu je úměrný koncentraci volné glukózy. Příмым důsledkem zvýšené hladiny glukózy v krvi je tedy i zvýšená tvorba glykačních produktů (NESSAR 2005).

Neenzymová glykace při dlouhodobé hyperglykémii vede k poškození tkání některých orgánů. Stanovení glykace erytrocytárních proteinů je ukazatelem hladiny glukózy v krvi v časovém období, které odpovídá biologickému poločasů života erytrocytů (120 dní). Běžně se stanovuje hladina glykovaného hemoglobinu, který umožňuje zhodnotit riziko rozvoje diabetických komplikací.



Obr. č. 1: Schéma tvorby pozdních glykačních produktů (NESSAR 2005)

Při počáteční reakci mezi aminovou skupinou proteinu a glukózou vzniká reverzibilní Schiffova báze, která se přesmykuje na ketoamin nebo Amadoriho produkt. Postupem času vytváří tyto Amadoriho produkty pozdní glykační produkty cestou dikarbonylových intermediátů.

Některé aminokyseliny proteinů jsou více reaktivní než jiné. Tato náchylnost ke glykaci souvisí s jejich hodnotou disociační konstanty. Ke glykaci jsou náchylnější proteiny s delší životností, které se během života téměř vůbec neobměňují, zejména proteiny oční čočky zvané krystaliny (OBŠIL A PAVLÍČEK 1997).

Jiným typem těchto proteinů jsou kolageny. Zkoumána byla glykace bazální glomerulární membrány, která byla u myši trpících diabetem mnohem vyšší než u myši bez diabetu (COHEN *et al.* 1980).

AGE mohou vytvářet můstky mezi proteiny. Pentosidin vzniká jako produkt přemostění lysinových a argininových zbytků. Dalšími takovými produkty jsou glyoxal-lysinový dimer a metylglyoxal-lysinový dimer (FRYE *et al.* 1998).

Jedním z nejvýznamnějších AGE je karboxymetyl lysin (CML). Hladina CML je dvojnásobná v kolagenu kůže u diabetických pacientů. Je zajímavé, že hladina CML v séru stoupá u diabetické retinopatie, nikoliv u nefropatie. Hladina pentosidinu stoupá jak u retinopatie, tak nefropatie (MIURA *et al.* 2003).

2.4.2.2. Polyová cesta

V tkáních nezávislých na inzulínu, jako jsou ledviny, sítnice, nervy a cévy, dochází vlivem hyperglykémie k aktivaci polyolové neboli sorbitolové cesty. Limitujícím enzymem je aldózo-reduktáza, která redukuje glukózu na sorbitol pomocí NADPH. Sorbitol je poté metabolizován sorbitol-dehydrogenázou na fruktózu, jako kofaktor slouží NAD⁺. Sorbitol je alkohol vysoce hydrofilní, proto nemůže difundovat buněčnou membránou ven z buňky a dochází k jeho intracelulární akumulaci s osmoticky aktivním účinkem (GABBAY 1973).

Využití NAD⁺ sorbitol-dehydrogenázou vede k zvýšení poměru NADH / NAD⁺, které je označováno jako pseudohypoxie a vede k aktivaci patologických metabolických a signalizačních drah (WILLIAMSON *et al.* 1993).

2.4.2.3. Hexozaminová cesta

Aktivace hexaminázové cesty patří mezi další patologické mechanismy, které se uplatňují při rozvoji inzulínové rezistence a diabetických vaskulárních komplikací. Hyperglykémie indukuje tvorbu transformujícího růstového faktoru β (TGFB) mezangiálními a tubulárními buňkami ledvin (ZIYADEH *et al.* 1994).

Metabolická dráha zahrnuje konverzi glukózy na glukózo - 6 - fosfát (G - 6 - P) pomocí enzymu hexokinázy, který je následně v procesu glykolýzy konvertován na fruktózo-6-fosfát (F - 6 - P). F - 6 - P je enzymaticky konvertován na glukozamin-6-fosfát, který slouží jako substrát pro syntézu mnoha látek. Jejich akumulace vede k aktivaci protein kinázy C (PKC) a TGFβ (MARSHALL *et al.* 1991).

2.4.2.4. Oxidační stres a volné radikály

Oxidační stres a následné oxidační poškození tkání je konečnou fází chronických onemocnění, jako je ateroskleróza, diabetes a revmatoidní artritida (BAYNES a THORPE 1999).

Reaktivní kyslíkové radikály vznikají při metabolických procesech v mitochondriích, peroxizómech a v mnoha cytozolických enzymatických systémech. Tvorbu ROS může vyvolat rovněž řada exogenních činitelů (UV záření, ionizující záření, chemoterapeutika, zánětlivé cytokiny, toxické látky). Organismus si proti vznikajícím oxidantům vytvořil antioxidační obranný systém, který představují enzymy jako kataláza, superoxid dismutáza a redukovaný glutation. Tyto enzymy regulují množství radikálů a udržují tak homeostázu. Snížení hladiny ROS může narušit fyziologickou roli oxidantů při buněčné proliferaci nebo při obraně vlastního organismu. Podobně zvýšená hladina oxidantů má škodlivé účinky. Může vést až k buněčné smrti a urychlit proces stárnutí. Pokud volné radikály nejsou odstraňovány, atakují a poškozují proteiny, lipidy a nukleové kyseliny. Zvýšená hladina volných radikálů může vytvářet stresové signály, které aktivují specifické dráhy (FINKEL a HOLBROOK 2000).

2.4.3. Hyperglykémie a stresem aktivované patologické dráhy uplatňující se u renálního poškození

2.4.3.1. Aktivace protein kinázy C

Nedávné studie ukázaly význam aktivace protein kinázy C (PKC) a zvýšené hladiny diacylglycerolu (DAG) na rozvoj komplikací sdružených s hyperglykemií. Aktivovaná PKC moduluje enzymatickou aktivitu fosfolipázy A a Na⁺/K⁺ ATPázy a genovou expresi komponent extracelulární matrix a kontraktilních proteinů. Z toho vyplývají patologické změny, které souvisí se zvýšenou hladinou glukózy. Patologické změny se dotýkají krevního tlaku v cévách, kontraktility, permeability a proliferace bazální membrány. Diabetes nebo hyperglykémie je asociována se zvýšenou aktivací různých

izoform PKC, zejména izoformou β . Izoforma PKC- β je predominantně aktivovaná ve všech vaskulárních tkáních a je zodpovědná za poškození cév (ISCHII *et al.* 1997).

2.4.3.2. Signalizace MAPK v ledvinách

V časném stádiu ledvinných komplikací se v patogenezi uplatňuje množství růstových faktorů a vasoaktivních látek. Mitogeny aktivované protein kinázy (MAPK) představují uspořádaný systém signálních drah, které zprostředkovávají buněčnou odpověď na široké spektrum podnětů. Na stimulaci MAPK se podílí i výše zmíněný enzym - PKC.

Aktivita MAPK byla měřena v glomerulech ledvin u potkanů trpících diabetem, který byl vyvolán účinkem streptozocinu. Bylo dokázáno, že aktivita MAPK v glomerulech izolovaných z těchto potkanů byla zvýšená (AWAZU *et al.* 1999).

2.4.3.3. Signalizace zprostředkovaná NF κ B

Transkripční faktor NF κ B reguluje expresi řady genů. Hraje kritickou roli ve zprostředkování zánětlivé odpovědi a apoptózy. K aktivaci NF κ B rovněž dochází při chronických onemocnění, jako je diabetes a jeho komplikace (BIERHAUS *et al.* 2001). Bylo zjištěno, že pro- a anti- apoptotické účinky NF κ B jsou odlišné u různých typů buněk a také záleží na způsobu jeho aktivace. Inhibice cytokinů, které vyvolávají aktivaci NF κ B, chrání β buňky pankreatu *in vitro* (HEIMBERG *et al.* 2001) a *in vivo* před apopózou (ELDOR *et al.* 2006).

2.5. Genetické studie a markery diabetické nefropatie

Diabetická nefropatie se vyskytuje u obou typů diabetu, ale trpí jí častěji diabetici 2. typu, než pacienti s diabetem 1. typu (LOCATELLI *et al.* 2003).

Příčinou prudkého nárůstu prevalence diabetu 2. typu není změna genetického fondu lidstva. Příčinou je spíše změna životního stylu. Tento stav vyplývá z interaktivního působení životního prostředí na citlivý genotyp.

Při globálním pohledu je možné zjistit rozdílnou frekvenci diabetu mezi různými etniky. Některé etnické skupiny vykazují velmi vysokou prevalenci (ŠEDA 2005).

Nejvyšší prevalence diabetu a diabetické nefropatie je popisována mezi severoamerickými indiány. Diabetes postihuje severoamerické indiány ve srovnání s jinými etniky neúměrně častěji. Téměř výlučně se jedná o diabetes 2. typu. Je

zajímavé, že k rozvoji diabetu 2. typu dochází již v mladším věku. S brzkým nástupem onemocnění souvisí i časný rozvoj komplikací. Nejvíce informací o dopadu diabetu na americkou komunitu indiánů pochází z dlouhodobých studií a pozorování indiánů kmene Pima žijících v Arizoně. Systematické zkoumání této homogenní etnické skupiny trvajících více než 40 let poskytlo cenné informace o příčinách rozvoje diabetické nefropatie (PAVKOV *et al.* 2008).

Analýzy genomu postižených sourozenských párů indiánů Pima umožnily identifikovat čtyři vazebné oblasti na DNA. Oblasti na chromozomech 3, 9, 20 jsou spojeny s nefropatií. Oblasti na 3. a 9. chromozomu jsou ve vazbě s retinopatií. Oblasti na chromozomech 7 a pravděpodobně na chromozomu 20 jsou spojeny s vnímavostí k nefropatii, nikoliv k retinopatii (IMPERATORE *et al.* 1998).

2.5.1. Metody a úskalí zkoumání genetické komponenty diabetu

Je zřejmé, že se prakticky na všech formách diabetu podílí genetické komponenty. Jejich identifikace je poměrně komplikovaná. Ke genetickému studiu se v současné době používají asociační a vazebné studie. Pro vazebnou analýzu komplexních znaků se používají tzv. neparametrické metody, tedy takové, kde se nepředpokládá žádný konkrétní způsob dědičnosti. Sledované rodiny s častým výskytem onemocnění jsou podrobeny analýze, zda postižení jedinci nesdílejí některé alely častěji.

Asociační studie testují vztah mezi konkrétní alelou, genotypem, haplotypem a chorobou. Spočívají ve srovnání výskytu polymorfismu kandidátních genů mezi skupinou nepříbuzných postižených jedinců a kontrolní skupinou, kterou představují zdraví jedinci. Kandidátní geny představují takové geny, u kterých se předpokládá, že mají vliv na patogenezi diabetu, respektive diabetickou nefropatii. Sledují se statisticky významné rozdíly mezi těmito skupinami (ŠEDA 2005).

2.5.2. Asociační studie u diabetu a jeho komplikací

Mezi zkoumané geny, jejichž produkty jsou zapojené do metabolismu glukózy, patří aldózoreduktáza. Byly odhaleny 2 polymorfizmy v tomto genu: tranzice C/T na pozici -106 a mikrosatelitní marker (CA)_n vzdálený 2,1 kb downstream od začátku transkripce. Alela T je významně asociována s diabetickou nefropatií, avšak asociace (CA)_n mikrosatelitu s diabetickou nefropatií prokázána nebyla (NEAMAT-ALLAH *et al.* 2001).

S diabetickou nefropatií je dále asociován polymorfismus v 2. exonu glukózového transportéru (GLUT1) zahrnující transverzi G/T (HODGINSON *et al.* 2001).

Apolipoprotein E (Apo E) se podílí na transportu lipidů v krvi. Polymorfismus *ApoE* je spojený s patogenezí aterosklerózy, neurodegenerativním onemocněním a rovněž s renálním onemocněním. Je známo 6 polymorfizmů genů pro *ApoE* (LIBEROPOULOS *et al.* 2004).

Pozornost se zaměřila také na geny, které mají vztah k hypertenzi, zejména na studium genu angiotenzin konvertujícího enzymu. Inzerční (I)/deleční (D) polymorfismus tohoto genu se nachází v 16. intronu. Přítomnost nebo delece fragmentu dlouhého 250 bp definuje 3 genotypy: II, ID, DD (RIGAT *et al.* 1990). Alela D nebo genotyp DD je spojen s rizikem rozvoje kardiovaskulárních onemocnění (SCHUNKERT *et al.* 1994, RAYNOLDS 1993), Ig A nefropatií (HARDEN *et al.* 2003) a diabetickou nefropatií (HA *et al.* 2003)

Dále byly zkoumány polymorfizmy genů spojené s metabolismem oxidu dusnatého. Byl objeven polymorfismus eNOS v intronu 4 asociovaný s rozvojem diabetické nefropatie (NEUGEBAUER *et al.* 2000). Tato skutečnost byla intenzivně zkoumána, avšak některé studie asociaci polymorfizmu eNOS s diabetickou nefropatií nepotvrzují (WANG *et al.* 1999).

Heparan sulfát proteoglykan (HSPG) je složkou bazální membrány glomerulů a slouží jako selektivní bariéra pro negativně nabitě molekuly. Byl odhalen polymorfismus v 6. intronu HSPG genu, který zahrnuje transverzi G/T. Alela T je spojena s vyšším rizikem rozvoje nefropatie na podkladě diabetu 2. typu (LIU *et al.* 2003).

2.6. Vitamín D3 a jeho význam

V 17. století popsali Whistler (v r. 1645) a Glisson (v r. 1650) křivici jako onemocnění kostí, které se vyskytující se u dětí (RAJAKUMAR 2003). Samotný vitamín D a jeho účinky byly popsány mnohem později. Vitamín D není vitamínem v pravém slova smyslu, je řazen mezi hormony. Toto zařazení nevychází pouze z jeho struktury, ale i účinků.

Syntéza vitamínu probíhá v několika postupných reakcích. Provitamín D3 je syntetizován v kůži ze 7 - dehydrocholesterolu. Tento proces je závislý na slunečním záření, konkrétně jeho ultrafialové oblasti (270 - 300 nm). Energie UV záření je absorbována dvojitými vazbami B kruhu cholesterolu a dochází k štěpení rigidního kruhu za vzniku provitamínu D3. Provitamín D3 je v buňkách epidermis a dermis transformován na cholekalciferol. Tato forma vitamínu může být získána také z potravy. Z rostlinných zdrojů je přijímán jako vitamín D2 - ergosterol. Vitamín D3 i D2 je hydroxylován 25- hydroxylázou v játrech na 25 - hydroxyvitamín D3, který představuje hlavní cirkulující formu D3. V ledvinách je 25 - hydroxyvitamín D3 konvertován 1- α - hydroxylázou na svoji fyziologicky nejvíce aktivní formu 1,25 - dihydroxyvitamín D3. Syntéza aktivního metabolitu je regulována parathormonem (PTH), hladinou vápníku a fosfátů v krvi. Esenciální role D3 spočívá v regulaci mineralizace nebo remodelace kostní hmoty přes metabolismus vápníku a fosforu. D3 stimuluje absorpci vápníku a fosforu ze střeva, resorpci z kostí a zpětné vstřebávání z ledvi (HOLICK 1996, HOLICK 2004).

V krevním oběhu jsou všechny metabolity D3 navázané na bílkovinný nosič, známý jako vitamín D binding protein (DBP) (HADDAD *et al.* 1993). Na odbourání 25 - dihydroxyvitamínu D3 a 1, 25- dihydroxyvitamínu D3 se podílí 24 - hydroxyláza, která iniciuje kaskádovitou katabolickou reakci (TANAKA *et al.* 1997).

2.6.1. Imunomodulační efekt vitamínu D

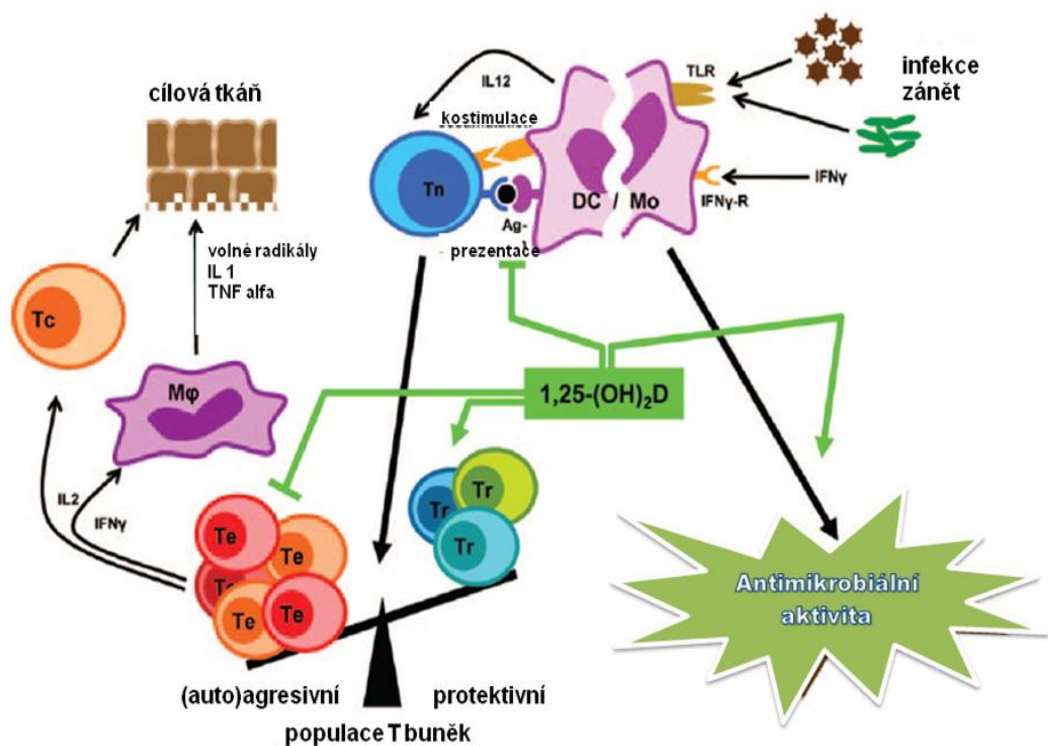
Vliv vitamínu D3 na imunitní systém je znám více než 20 let (LEMIRE *et al.* 1984, RIGBY 1984). V posledních letech se ukazuje, že D3 má mnohem rozsáhlejší oblast imunomodulačních účinků. Uplatňuje se v regulaci buněčné diferenciaci, proliferaci a apoptóze. Má úlohu v usídlování (homingu) T lymfocytů v tkáních a v produkci specifických izotypů protilátek (MORA *et al.* 2008). Vitamín D3 snižuje proliferaci B buněk, diferenciaci plazmatických buněk a sekreci imunoglobulinu izotypu IgG mononukleárními buňkami (PBMC) (LEMIRE *et al.* 1984, CHEN *et al.* 2007).

Lokálně produkovaný D3 působí autokrinně nebo parakrinně. Receptor pro vitamín D byl nalezen na většině buněk imunitního systému, nejvíce na antigen prezentujících, zejména na makrofázích a DC a také na aktivovaných T lymfocytech (MATHIEU *et al.* 2004).

Aktivované makrofágy a dendritické buňky (DC) obsahují enzym 1- α -hydroxylázu, který je nezbytný pro konečný aktivační krok vitamínu D3. 1- α -hydroxyláza přítomná v imunocytech je identická s renální hydroxylázou, ale regulace jejího genu je odlišná. Gen pro renální hydroxylázu je pod kontrolou parathyreoidního hormonu, kdežto v imunocytech je regulován imunitními signály a to zejména interferonem γ (IFN γ) a Toll-like receptory (OVERBERGH *et al.* 2000).

In vitro vitamín D3 podporuje fagocytózu a zabíjení bakterií makrofágy, ale suprimuje antigen prezentující kapacitu makrofágů a DC. Vazbou hormonu na VDR receptor je potlačena exprese MHC molekul II. třídy. Snižená je také produkce adhezivních molekul nezbytných pro aktivaci T lymfocytů, např. B7.2 (VAN ETTEN *et al.* 2004).

Díky snížené produkci kostimulačních molekul a snížené schopnosti prezentace antigenu MHC II. třídy, zejména na DC, je nepřímě suprimována aktivace Th1 lymfocytů. Naopak je podporována indukce Th2 a regulačních lymfocytů. D3 a jeho analogy mají také přímý vliv na T lymfocyty. Je inhibována produkce IL-2 a IFN γ Th1 lymfocyty, zatímco produkce IL-4 Th2 lymfocyty je podporována (OVERBERGH *et al.* 2000, BOONSTRA *et al.* 2001).



Obr. č. 2: Vliv vitamínu D na imunitní systém (BOUILLON *et al.* 2008)

1,25 - dihydroxyvitamín D3 inhibuje povrchovou expresi molekul MHC II. třídy, kostimulačních molekul a produkci interleukinu 2 antigen prezentujícími buňkami (např. dendritickými buňkami). Dochází k posunu polarizace T buněk směrem k regulačním (protektivním) T lymfocytům. Tyto imunomodulační funkce vitamínu D3 zprostředkované buňkami adaptivního imunitního systému vedou k ochraně tkání před autoimunitními chorobami. Vitamín D 3 působí stejně tak na složky přirozeného imunitního systému. Zesiluje antimikrobiální funkce monocytů a makrofágů.

2.6.2. Vitamín D a diabetes I. typu

Přímé poškození β buněk cytokiny a jinými zánětlivými agens je jeden z hlavních patogenetických mechanismů diabetu I. typu. Inhibice funkce β buněk je způsobená IL-1 β nebo IFN γ . Vitamín D3 brání tomuto poškození tím, že blokuje indukci povrchových receptorů pro cytokiny. Stimulace exprese genů pro MHC II. třídy a adhezivních molekul byla pozorována po inkubaci s D3 nebo jeho analogy (RIACHY *et al.* 2001).

2.6.3. Vitamín D a diabetes II. typu

Efekt vitamínu D na syntézu a sekreci inzulínu

Nedostatek vitamínu D vede k poruše sekrece inzulínu jak u zvířecího modelu, tak u lidského. Poškození β buněk pankreatu je primárně způsobeno jeho přímým nedostatkem nebo hypokalcémií (ZEITS *et al.* 2003). Vyšší hladina vitamínu D je asociována s nižším rizikem rozvoje diabetu 2. typu. Nalezení optimální hladiny vitamínu D₃ se zdá být jako jedna z možných strategií prevence onemocnění (LIU *et al.* 2010).

2.6.4. Vitamín D a nefropatie

Protektivní role vitamínu D u diabetické nefropatie

Vitamín D₃ negativně reguluje renin - angiotensinový systém (RAS), který má kritickou roli v rozvoji diabetické nefropatie. Zhang *et al.* testovali na myších s inaktivovaným genem pro *VDR* citlivost k hyperglykémii. Takto znevýhodněná myš vyvinula těžkou albuminurii a glomerulosklerózu. Závažné poškození ledvin bylo způsobeno zúžením bazální glomerulární membrány a vyhlazením vrstvy podocytů. Myši s inaktivovaným genem pro *VDR* ve srovnání s divokým typem diabetické myši exprimovaly více fibronektinu, ale méně nefrinu. D₃ inhiboval vysokou hladinu glukózy a suprimoval aktivaci RAS a TGF β v mezangiálních a juxtaglomerulárních buňkách (ZHANG *et al.* 2008).

2.6.5. Jaderný receptor vitamínu D

Receptor pro vitamín D je exprimován ve většině tkání v těle. Je to fosfoprotein patřící do rodiny nukleárních receptorů, který váže hormon s vysokou afinitou. N - terminální oblast *VDR* obsahuje motivy zinkových prstů a je esenciální pro kontakt s transkripčním faktorem II B zodpovědným za rozpoznání a vazbu na DNA (JURUTKA *et al.* 2000).

Makishima *et al.* demonstrovali, že *VDR* také funguje jako receptor pro lithocholovou kyselinu, která je hepatotoxická a potencionální střevní karcinogen. *VDR* je mnohem citlivější na lithocholovou kyselinu a její metabolity než jiné nukleární receptory. Aktivace *VDR* lithocholovou kyselinou indukuje *in vivo* expresi CYP 3A, který ji detoxifikuje v játrech a střevě (MAKISHIMA *et al.* 2002).

Gen pro receptor vitamínu D leží na dlouhém raménku 12. chromozomu a je tvořen 11 exony a spolu s vmezeřenými introny je velký přibližně 75 kb. Exony 1A, 1B a 1C kódují 5' UTR, 8 zbývajících exonů kóduje strukturní část genu (MIYAMOTO *et al.* 1997).

2.6.6. Studované polymorfizmy genu pro receptor vitamínu D

Vzhledem k roli a funkci vitamínu D v lidském těle byla zpracována řada studií, které se zabývaly polymorfizmy tohoto genu zejména ve spojitosti s kostním metabolismem. Četné asociační studie byly věnovány problematice osteoporózy a sledování kostní denzity (HOUSTON *et al.* 1996, SAINZ *et al.* 1997, GARNERO *et al.* 2005), tělesného vzrůstu (SUAREZ *et al.* 1997), hypoparathyroidismu (CARLING *et al.* 1998) a umožnila identifikovat polymorfizmy délky restričních fragmentů pomocí restričních endonukleáz *Bsm I*, *Fok I*, *Taq I* a *Apa I*.

Gen receptoru pro vitamín D vykazuje četné polymorfizmy. Jedním z nich je jednonukleotidový repetitivní polymorfizmus (A)_n v 3' nepřekládané oblasti, dále *Fok I* polymorfizmus, který se vyskytuje uprostřed exonu 2, *Bsm I* a *Apa I*, které se nalézají v intronu 8 a *Taq I*, který leží v exonu 9 (HAUSSLER *et al.* 1998).

Fok I polymorfizmus odpovídá záměně T/C (ATG → ACG) v translačním počátku *VDR* a vede k syntéze 2 různě dlouhých proteinových produktů. Delší verze proteinu (247 aminokyselin) je označovaná jako T neboli f alela a též jako forma M1 (metionin na první pozici). Kratší verze proteinu dlouhá 424 aminokyselin je označována jako C neboli F alela a též jako M4 forma (metionin na 4. pozici). Rozdíl mezi těmito dvěma různě dlouhými proteiny spočívá v efektivitě interakce mRNA s transkripčním faktorem TFIIB. Kratší forma proteinu (M4) reaguje s tímto transkripčním faktorem efektivněji než forma delší (BAKER *et al.* 1988, MIYAMOTO *et al.* 1997).

Na rozdíl od *Fok I* polymorfizmu, není zcela známo, jaký vliv na *VDR* mají polymorfizmy *Bsm I*, *Apa I* a *Taq I*, které se nachází v blízkosti 3' nekódující oblasti (UTR). Je však známo, že 3' UTR má důležitou úlohu v regulaci exprese genů, zejména stability mRNA.

2.6.7. Polymorfizmy genu pro receptor vitamínu D ve vztahu k diabetu a ledvinnému poškození

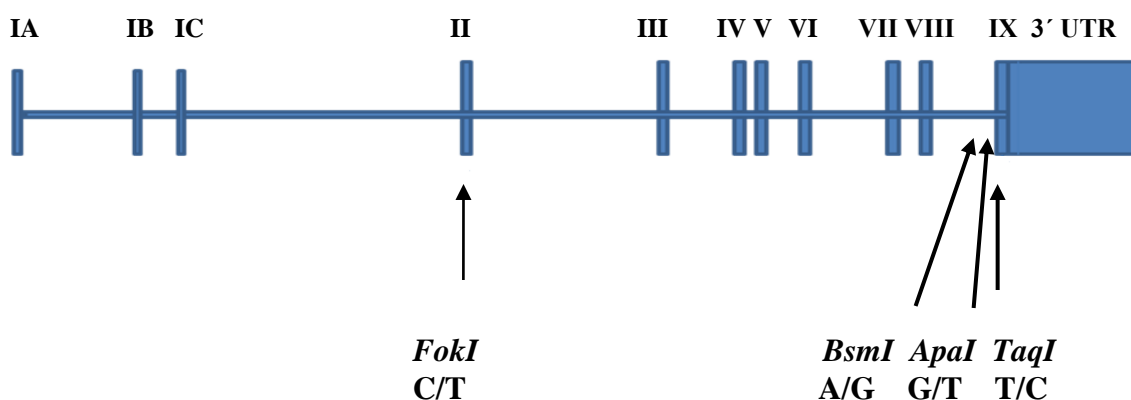
Škrabič *et al.* ve své studii popsali polymorfizmy *VDR* genu u řecké populace.

U pacientů trpících diabetem I. typu provedl genotypizaci pomocí výše zmíněných restrikčních endonukleáz: *Bsm I*, *Apa I* a *Taq I*. Nejvyšší vnímavost k diabetu I. typu našel u kombinace genotypu BBAAtt (ŠKRABIČ *et al.* 2002).

Pani *et al.* došli ve své studii ke stejnému závěru. BAAt haplotyp vykazoval nejvyšší vnímavost k diabetu I. typu (PANI *et al.* 2000).

Chang *et al.* provedli podobnou studii, ale na asijské populaci. Alely B a A se vyskytovala u diabetických pacientů s vyšší frekvencí. Na rozdíl od předchozích skupin, nebyl zaznamenán rozdíl ve výskytu polymorfizmu *Taq I* mezi kontrolami a nemocnými (CHANG *et al.* 2000).

U hemodialyzovaných pacientů byla provedena asociační studie pomocí polymorfizmu *Bsm I*. Nagaba *et al.* testovali výskyt B/b alely na skupině japonských pacientů. Autoři však nezaznamenali signifikantní rozdíl v distribuci alel mezi zdravými kontrolami a hemodialyzovanými pacienty (NAGABA *et al.* 1998).



Obr. č. 3: Zkoumané polymorfizmy a struktura genu pro VDR

Lidský *VDR* gen je tvořen celkem 11 exony, tři z nich (IA, IB a IC) se nacházejí v 5' UTR oblasti.

Zbývajících 8 exonů kóduje (exony 2-9) strukturní část genu. *Fok I* polymorfizmus odpovídá substituci T/C v translačním počátku *VDR*. *Bsm I* a *Apa I* se nalézají v intronu 8. *Taq I* polymorfizmus se nachází v exonu 9.

2.7. Parathyreoidní hormon (parathormon) a jeho funkce

Parathyreoidní hormon (PTH) má podstatnou úlohu v metabolismu vápníku a fosforu a pro své účinky se používá v léčbě osteoporózy. PTH aktivuje zpětnou resorpci Ca^{2+} v distálním tubulu a v sběrném kanálku. Zvyšuje hladinu vápníku v krvi odbouráním kostní hmoty osteoklasty (BINGHAM *et al.* 1969).

Současně způsobuje exkreci fosfátů (fosfaturii) prostřednictvím inhibice jejich vstřebávání v proximálním a distálním tubulu ledvin (GREENWALD *et al.* 1925). V neposlední řadě pak aktivuje v ledvinách syntézu vitamínu D3 (GARABEDIAN *et al.* 1972).

Účinek PTH je zprostředkován vazbou na receptor PTH1R, který je členem rodiny receptorů asociovaných s G proteiny (JUPPNER *et al.* 1991). Tato rodina zahrnuje receptor pro glukagon, kalcitonin a další terapeuticky významné hormony (HOARE 2005).

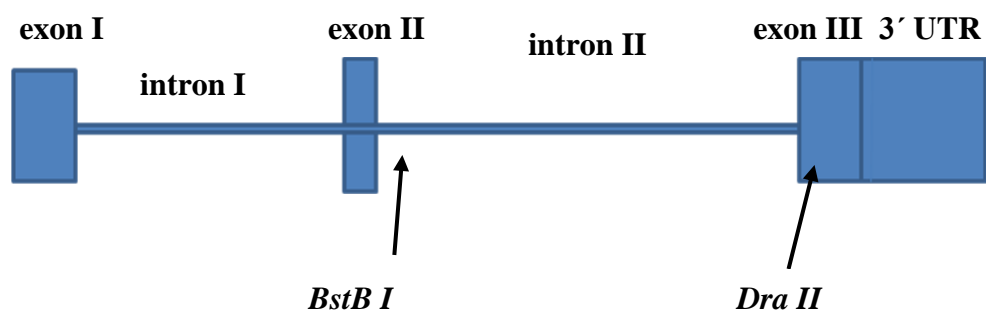
2.7.1. Chronické renální selhání ve vztahu k parathormonu

Chronické renální selhání vede k sekundárnímu hyperparathyreoidismu téměř u všech pacientů. Podnícení funkce příštítných tělísek je způsobeno následujícími faktory: nedostatečnou produkcí kalcitriolu ledvinami, nedostatkem vápníku a nadbytkem fosfátů. Patologické změny se odehrávají i na molekulární úrovni, kdy dochází k patologické stimulaci transkripce a translace prepro-parathyreoidního hormonu a následně k zvýšené proliferaci buněk příštítných tělísek (DRUEKE 2001).

Hemodialyzovaní pacienti s diabetem rozvíjí těžkou hyperparathyroiditu, která je léčena pulsní terapií vitamínem D. Incidence hyperparathyroidity u hemodialyzovaných pacientů bez diabetu mellitu je nižší (INABA *et al.* 2002).

2.7.2. Struktura genu *PTH*

Díky své stěžejní úloze v metabolismu a v patogenezi několika genetických onemocnění se lidský parathormon stal zájmem mnoha molekulárních biologů a genetiků. Vasicek *et al.* popsali strukturu odpovídajícího genu ležícího na krátkém raménku 11. chromozomu, který se skládá se z 3 exonů. Exon 1 je netranslatovaný, exon 2 koduje 25 aminokyselin dlouhý signální peptid a část prohormonu a exon 3 koduje zbytek prohormonu a celou PTH molekulu (VASICEK *et al.* 1983).



Obr. č. 4: Zkoumané polymorfizmy a struktura *PTH* genu

Schématické zobrazení intronů a exonů *PTH* genu, který kóduje prepro-*PTH* molekulu. Signální peptid je kódován 25 aminokyselinami. 3' UTR obsahuje konzervovanou sekvenci 26 nukleotidů, která je kritická pro stabilitu mRNA (GOSWAMI *et al.* 2004).

Velké úsilí bylo vynaloženo na identifikaci asociace mezi restričními polymorfizmy *PTH* a onemocněním příštítných tělísek, ať už ve smyslu snížené nebo zvýšené sekrece hormonu. V těchto studiích byla značná důvěra kladena na polymorfizmus *Pst I* a *Taq I* (SCHMIDKE *et al.* 1984).

Genotyp *PTH* je také charakterizován přítomností nebo absencí restričních míst pro *Dra II* (C → A substituce) nebo *Bst BI* (G → A substituce) restriční endonukleázy. Polymorfizmus *Dra II* je způsoben substitucí C → A v kodonu 52 v exonu 3.

Substituce G → A v intronu 2 se nalézá 54 nukleotidů downstream od 3' konce exonu 2 (respektive 50 nukleotidů upstream od 3'sestřihového akceptorového místa. V sestřihovém procesu se uplatňuje krátká konzervovaná sekvence zvaná větvicí místo, které funguje jako rozpoznávací signál pro spliceozom. Větvicí místo je charakteristické vysokým obsahem adenosinových zbytků, které slouží jako kotva pro sestavení spliceozomu a nachází se ve vzdálenosti 10 - 50 nukleotidů upstream od 3' sestřihového místa. Právě substituce G → A by mohla vést k tvorbě nového větvicího místa a k změně sestřihu mRNA *PTH*. Za účelem možnosti předpovědět tvorbu nového potenciálního větvicího místa byl vytvořen skórovací systém pro určitou nukleotidovou sekvenci. Podle této skórovací metody, sekvence se skórem vyšším než 96 %, může skutečně být větvicí místo. Záměna G → A vede k vzniku nové kombinace nukleotidové sekvence, ale podle tohoto skórovacího systému dostala tato sekvence pouze 61 % a tedy vznik nového větvicího místa je nepravděpodobný (GOSWAMI *et al.* 2004).

2.7.3. Polymorfizmy *PTH* ve vztahu k diabetu a ledvinnému poškození

Ve své studii Gohda *et al.* nezjistili signifikantní rozdíl v zastoupení genotypů BB/bb a DD/dd mezi kontrolní skupinou a hemodialyzovanými pacienty. Avšak u hemodialyzovaných pacientů s genotypem Dd/dd našli vyšší hladinu sérového parathormonu. Předpokládá se, že genotyp DD je asociován s nižšími plazmatickými hladinami parathormonu (GOHDA *et al.* 2002).

3. Materiál a metody

3.1. Používaný materiál

3.1.1 Pufry a roztoky

Vysolovací metoda izolace DNA

RCLB (Red Cell Lysis Buffer): 320 mM sacharóza
1% (v/v) Triton X100
12 mM TRIS HCl, 5 mM MgCl₂ · 6 H₂O)

WCLB (White Cell Lysis Buffer): 120 mM EDTA pH=8
375 mM NaCl

Agarózová gelová elektroforéza

TBE pufr: 890 mM TRIS báze
890 mM kys. boritá
20mM EDTA pH=8
Loading Dye 6×, Fermentas, Kanada 0,25 % bromfenolová modř
0,25 % xylencylonová modř, 30 % glycerol

3.1.2. Enzymy

Restrikční enzymy

Apa I TaKaRa (Japonsko)
Bsm I New England BioLabs (USA)
Bst BI New England BioLabs (USA)
Fok I TaKaRa (Japonsko)
Taq I TaKaRa (Japonsko)

Modifikační enzymy

Proteináza K 30 units/mg, Sigma Aldrich, USA
Taq DNA polymeráza Fermentas, Kanada

3.1.3. Komerční soupravy a standardy

PCR reakční kit, Fermentas, Kanada *Taq* DNA Polymeráza 500u / μl
10 × *Taq* Buffer with (NH₄)₂SO₄
10 × *Taq* Buffer with KCl
25 mM MgCl₂

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied BioSystems, USA

10 × RT Buffer

100 mM dNTP Mix

10 × RT RandomPrimer

MultiScribeReverse - Transcriptase

ZR Whole-Blood Total RNA Kit TM, ZYMO RESEARCH, USA

ZR RNA Buffer, RNA Prewash Buffer

RNA Wash Buffer

DNAase/RNAase - Free Water

Zymo-Spin IC Columns

Zymo-Spin IIC Columns

TaqMan Gene Expression Master Mix, Applied Biosystem, USA

Marker pUC19 DNA/MspI, Fermentas, Kanada

50 bp DNA Ladder, New England BioLabs

3.1.4. Chemikálie

Chemikálie

Agaróza	Serva, Německo
Deoxyadenosin- 5- trifosfát	Sigma Aldrich, USA
Deoxythimidin- 5- trifosfát	Sigma Aldrich, USA
Deoxycytidin- 5- trifosfát	Sigma Aldrich, USA
Deoxyguanosin- 5- trifosfát	Sigma Aldrich, USA
Dodecylsulfát sodný	Sigma Aldrich, USA
Etanol (96%, 70%)	FNKV, ČR
GelRed	Biotium, USA
Chlorid sodný	Serva, Německo
Kyselina boritá	Amresco, USA
Kyselina etylendiamintetraoctová	lékárna FNKV
Sacharóza	Sigma Aldrich, USA

Tris báze	Carl Roth, Německo
Triton X – 100	Sigma Aldrich, USA
Histopaque	Sigma Aldrich, USA
PBS	Invitrogen, USA
RNA later	Sigma Aldrich, USA

3.1.5. Použité oligonukleotidy a sondy

Taq Man Gene Expression Assay:

VDR: Hs 01045840_m1, Applied Biosystem, USA

hu TBP: Hs 00427620_m1, Applied Biosystem, USA

hu B-actin, Hs 99999903_m1, Applied Biosystem, UK

PPIA: Hs 99999904_m1, Applied Biosystem, USA

Tab. č. 2: Seznam použitých primerů pro amplifikaci genů *VDR* a *PTH*

Název	Sekvence	Gen
VDR0 F	CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA ^α	<i>VDR</i>
VDR0 R	AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG	
VDR2 F	CAGAGCATGGACAGGGAGCAA ^β	<i>VDR</i>
VDR2 R	GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC	
VDR3 F	AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTC ^γ	<i>VDR</i>
VDR3 R	ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC	
PTH3 F	CATTCTGTGTACTATAGTTTG ^δ	<i>PTH</i>
PTH3 R	GAGCTTTGAATTAGCAGCATG	

V PCR byly použity primery převzaté z literatury: α, β, γ (ISRANI *et al.* 2009), δ (KANZAWA *et al.* 1999, GOHDA *et al.* 2002).

dodavatel primerů – IDN (ČR)

3.1.6. Používané přístrojové vybavení

Autokláv Systec DE-23, Systec, Germany

Automatická pipeta jednonanálová Biopette A (1000 – 5000), Labnet , Polsko

Automatické pipety jednonanálové Discovery⁺ (0,1 - 2, 2 - 20, 20 - 200, 100 - 1000)
(PZ HTL), Lab Solution, Polsko

Automatická pipeta osmikanálová Discovery⁺ (1-10), PZ HTL, Polsko

Chlazená centrifuga Z300 K, Hermle, Německo

Kombinovaná lednička, Whirpool, USA

Laminární box Aura Mini, BioAir, Itálie

Laminární box CleanAir, Scholler, Německo

Minicentrifuga Z 100M, Hermle, Německo

Mrazicí box Premium U410, New Brunswick Scientific, Velká Británie

Nanophotometr, Implen, Německo

Systém pro elektroforézu Thermo Scientific OWL A1, Biotech, Praha

Zdroj napětí pro elektroforézu, Major Science, USA

Termostat BT 120 M, Laboratorní přístroje Praha, Česko

ThermoCycler C1000, Bio Rad, USA

Mikrovlnná trouba, Zanussi, Itálie

Stolový vortex, Scientific Industrie, USA

Digitální váhy 40 SM - 200 A, Precisa, Švýcarsko

LabCycler SensoQuest, Scholler, Německo

7000 SDS ABI Prism, Applied Biosystem, USA

3.1.7. Používané počítačové programy

GeneSnap, Syngene, Velká Británie

NanoPhotometrTM PVC Software 5.2.2.2, Implen, Německo

Kodak Molecular Imaging software, verze 5.0., Kodak, USA

7000 Sequence Detection Software 1.2.3., Applied Biosystem, USA

GraphPad Prism 5.04 (volně dostupná verze)

3.1.8. Skupiny pacientů

V období 2006 - 2011 byl vytvořen hodnotný soubor pacientů. Pacienti jsou evidováni ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady v Praze. Část souboru je tvořena německými pacienty, kteří jsou evidováni ve Fakultní nemocnici v Mannheimu. Kontrolní soubor, který postihuje průřez populace, představují zdraví dárci krve. Do studia byli zařazeni pacienti, kteří splňují určitá vstupní kritéria. Skupina DM 1 a DM 2 je tvořena diabetiky 1. a 2. typu, bez ledvinného poškození (CDK, chronic kidney disease). Skupina NDRD (diabetici s nediabetickou nefropatií) je tvořena pacienty s CDK 2. - 4. stupně na podkladu nediabetické nefropatie. Skupina DN (diabetická nefropatie) je představována pacienty s CDK 2. - 4. stupně na podkladu diabetické nefropatie. Kritéria pro stanovení typu nefropatie jsou klinicko – laboratorní. Projevy manifestní diabetické nefropatie (DN) jsou: proteinurie > 0,5 gramů proteinů v moči za 24 h s anamnézou předcházející mikroalbuminurie, doba trvání diabetu delší než 10 let, normální velikost ledvin na ultrasonografii, nejlépe i přítomnost diabetické retinopatie. Kritéria pro zařazení do skupiny NDRD typu renovaskulárního onemocnění ledvin (RVO) jsou: negativní proteinurie, negativní mikroalbuminurie, doba trvání diabetu delší než 10 let, zmenšená velikost ledvin na ultrasonografii, nepřítomnost diabetické retinopatie.

Tab č. 1: Rozdělení vyšetřovaného souboru pacientů

skupina	NDRD	DN	DM 1	DM 2	Kontroly
počet pacientů ve skupině	47	132	31	116	118
průměrný věk	79, 86	70	45, 15	64, 89	40
věkový rozptyl	51 – 89	41 – 80	24 - 68	45 – 88	24-72
pohlaví	19 žen 28 mužů	57 žen 75 mužů	13 žen 18 mužů	54 žen 92 mužů	67 žen 51 mužů

Vysvětlivky: NDRD skupina - pacienti s nediabetickou nefropatií, DN skupina - pacienti s diabetickou nefropatií, DM 1 - pacienti s diabetem 1. typu bez ledvinných komplikací, DM 2 - diabetici 2. typu bez ledvinných komplikací, kontrolní skupina je představována zdravými dárci krve.

3.2. Metodika práce a postupy

3.2.1. Izolace DNA z periferní krve

Na izolaci DNA byla použita plná nesrážlivá periferní krev s EDTA, buď čersvá nebo zmrazená na -20 °C. K samotné izolaci byla využita vysolovací metoda dle Millera (MILLER *et al.* 1988).

Princip

V prvním kroku byly dezintegrovány membrány erytrocytů. Následně byla získána směs proteinů a DNA dezintegrací leukocytární membrány proteinázou K za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) jako detergentu. Poté byla k roztoku DNA přidána vysoká koncentrace NaCl. Ionty NaCl vytvářejí hydratační obal, díky kterému je DNA tzv. vysolena z roztoku. V posledním kroku vedlo přidání 96 % etanolu k precipitaci DNA. Následovalo promytí DNA 70 % etanolem, které zvyšuje čistotu DNA.

Postup

- 1) K 500 μ l plné krve byl přidán 1 ml RCLB pufru a směs byla 30 s třepána lehce obrácením zkumavky. Poté byla zkumavka stočena 3 min při 16 000 g. Supernatant byl odebrán a pomocí gázy byla zkumavka zbavena zbytku supernatantu.
- 2) Sediment byl resuspendován v 1 ml destilované vody a stočen při 16 000 g. Promývání bylo opakováno, dokud nebyl sediment světlý, bez erytrocytů.
- 3) K sedimentu bylo přidáno 235 μ l dH₂O, 80 μ l WCLB a obsah byl resuspendován. Poté bylo přidáno 40 μ l 10 % SDS a 15 μ l proteinázy K a zkumavka byla inkubována na otáčecím rotátoru při 55 °C 60 min. Po inkubaci byl obsah zkumavky zchlazen na pokojovou teplotu.
- 4) Poté bylo přidáno 100 μ l 6M NaCl a následně bylo se zkumavkou silně třepáno 15 s. Obsah byl stočen 6 min při 16 000 g a supernatant byl přenesen do nové zkumavky.
- 5) Supernatant byl promíchán s 1 ml čistého etanolu vychlazeného na - 20 °C. DNA byla vysrážena lehkým obrácením zkumavky a poté inkubována 20 min na ledě. Po inkubaci byl obsah stočen 2 min při 16000 g a supernatant byl odebrán.
- 6) DNA byla promyta 1 ml 70 % etanol a stočena 2 min při 16 000 g. Gázou byly stěny zkumavky opatrně zbaveny zbytky etanolu. Poté byla DNA sušena a rozpuštěna ve 100 μ l dH₂O. Výtěžek DNA se pohyboval kolem 70 - 100 ng/ μ l. DNA byla uchovávána při 4 °C.

3.2.2. Stanovení koncentrace a čistoty DNA

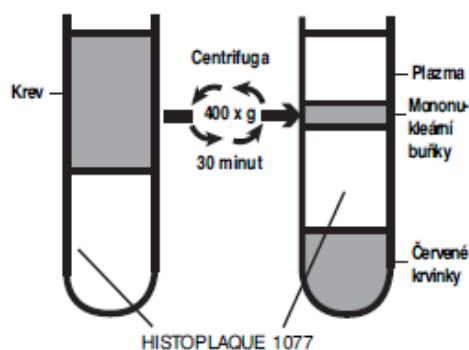
Kvalita a kvantita DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí nanofotometru v křemenných kyvetách při vlnové délce λ 260 a 280 nm.

Kontaminace DNA proteiny a RNA byla určena porovnáním podílu absorbancí A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{240} v doporučeném rozmezí pro čistotu DNA 1,8 – 2.

3.2.3. Izolace mononukleárních buněk z periferní krve

Za účelem budoucí kvantifikace proteinu VDR byly izolovány mononukleární buněky periferní krve (PBMC) metodou hustotní gradientové centrifugace za použití izolačního roztoku Histopaque.

- 1) Periferní heparinizovaná krev byla naředěna 1:1 sterilním roztokem PBS (1%) (10 ml PBS + 10 ml krve).
- 2) Do 50 ml zkumavky bylo nanášeno 8 ml Histopaque (méně než polovina objemu ředěné krve).
- 3) Pomocí 10 ml pipety byla naředěná krev navrstvena na hladinu Histopaque, tak aby nedošlo k promíchání obou vrstev. Zkumavka byla stočena na centrifuze se zaplými brzdami (program soft) při 400 g po dobu 35 min.
- 4) Pomocí pipety byla odebrána vrstva séra.
- 5) Pomocí pipety byl odebrán prstenec mononukleárních buněk, tak aby nedošlo k nasátí Histopaque.
- 6) PBMC byly přeneseny do nové zkumavky s 20 ml PBS (1%), která byla stočena při 250 g 10 min.
- 7) Poté byl odebrán supernatant a pelet byl resuspendován v 10 ml PBS (1%) a opět stočen při 250 g 10 min.
- 8) Supernatant byl odebrán a buněčná peleta byla nakonec resuspendována v 2 ml PBS (1%) a zamrazena na -80°C .



Obr. č. 5: Schématické zobrazení jednotlivých frakcí buněk během hustotní gradientové centrifugace na izolačním roztoku Histopaque.

Granulocyty a erytrocyty pronikají během centrifugace skrze separační médium na dno zkumavky, zatímco mononukleární buňky zůstávají ve formě interfáze mezi vrstvami plazmy a separačního média.

3.2.4. Genotypizace polymorfizmů genů pro receptor vitamínu D a parathyroidní hormon

Pro účel genotypizace byl nejprve amplifikován požadovaný úsek DNA pomocí PCR. Amplifikovaný produkt byl poté štěpen restriční endonukleázou specifickou pro každou alelu.

3.2.4.1. Polymerázová řetězcová reakce

Polymerázová řetězcová reakce (PCR) slouží k rychlé a selektivní amplifikaci požadovaného úseku DNA. Princip je založen na využití termostabilní polymerázy, která nepodléhá denaturaci při zvýšené teplotě. Každý cyklus se skládá z 3 po sobě jdoucích kroků: denaturace, nasednutí primerů a elongace. Během denaturace dojde vlivem vysoké teploty k oddělení obou řetězců templátové DNA. V druhé fázi dochází k ochlazení vzorku a hybridizaci primerů na komplementární sekvenci DNA. V třetím kroku probíhá syntéza příslušného úseku DNA (<http://www.gelifesciences.com>).

Obecné kroky amplifikace:

A) denaturace templátu při teplotě 94 ° (95) °C

B) krok připojení primerů – teplota připojení závisí na teplotě T_m obou primerů

C) krok prodloužení (elongace) připojených primerů *Taq* DNA polymerázou, reakce probíhá při teplotě 72 °C, doba závisí na délce amplifikovaného úseku DNA. Rychlost připojování jednotlivých bazí *Taq* DNA polymerázou činí 2 – 4 kb / min.

Optimalizace PCR:

Pro genotypizaci bylo nejprve nutné najít vhodné podmínky pro amplifikaci úseku DNA, tak aby byl získán produkt o dostatečné koncentraci a bez nespecifických produktů. Pro účel optimalizace byla měněna koncentrace $MgCl_2$, DNA a teplota hybridizace primerů. Pro optimalizaci byly vyzkoušeny 2 pufrů: $10 \times Taq$ Buffer with KCl a $10 \times Taq$ Buffer with $(NH_4)_2 SO_4$.

Po optimalizaci protokolu byl použit protokol v následující tabulce (Tab. č. 3):

Tab. č. 3: Obecné složení směsi pro jednu PCR

Složka	Množství (μ l)
Taq Buffer $(NH_4)_2 SO_4$ ($10 \times$)	5
dNTPs (2 mM)	5
MgCl (25mM)	3 - 6
Forward Primer (100)	0,25
Reverse Primer (100 μ M)	0,25
Taq polymerasa (5U/ μ l)	0,2
H ₂ O	30,3 – 33,3
celkový objem	47

Všechny reagenty kromě *Taq* DNA polymerázy byly rozmrazeny a reakční směs byla připravena v laminárním boxu na ledu. Reakční směsi byly připraveny podle tabulky (Tab. č. 3), jako poslední byla přidána *Taq* DNA polymeráza. Směs byla rozpipetována po 47 μ l k 3 μ l vzorku DNA.

Podmínky PCR pro polymorfismus *Bsm I* genu *VDR*:

- | | | |
|-------------------------|-----------------|------------|
| 1. počáteční denaturace | 60 s při 95 °C | } 35 cyklů |
| 2. denaturace | 60 s při 95 °C | |
| 3. hybridizace primerů | 60 s při 68 °C | |
| 4. elongace | 60 s při 72 °C | |
| 5. dokončení produktů | 5 min při 72 °C | |

Podmínky PCR pro polymorfizmy *Apa I* a *Taq I* genu *VDR*:

- | | | |
|-------------------------|-----------------|------------|
| 1. počáteční denaturace | 5 min při 95 °C | |
| 2. denaturace | 60 s při 95 °C | } 30 cyklů |
| 3. hybridizace primerů | 60 s při 66 °C | |
| 4. elongace | 60 s při 72 °C | |
| 5. dokončení produktů | 5 min při 72 °C | |

Podmínky PCR pro polymorfizmus *Fok I* genu *VDR*:

- | | | |
|-------------------------|------------------|------------|
| 1. počáteční denaturace | 1 min. při 95 °C | |
| 2. denaturace | 30 s při 95 °C | } 30 cyklů |
| 3. hybridizace primerů | 30 s při 66 °C | |
| 4. elongace | 30 s při 72 °C | |
| 5. dokončení produktů | 5 min při 72 °C | |

Podmínky PCR pro *Dra II* a *BstB I* polymorfizmus genu *PTH*:

- | | | |
|-------------------------|-----------------|------------|
| 1. počáteční denaturace | 5 min při 95 °C | |
| 2. denaturace | 30 s při 95 °C | } 35 cyklů |
| 3. hybridizace primerů | 30 s při 52 °C | |
| 4. elongace | 30 s při 72 °C | |
| 5. dokončení produktů | 5 min při 72 °C | |

Po PCR byla amplifikace příslušného produktu kontrolována pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

3.2.4.2. Polymerázová řetězcová reakce – polymorfismus délky restričních fragmentů

PCR-RFLP („polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism“), polymerázová řetězcová reakce – polymorfismus délky restričních fragmentů) je modifikace standardní PCR používaná pro typizaci cílové sekvence, obsahující sekvenční polymorfismus. Působením určité restriční endonukleázy na amplifikovanou sekvenci DNA dojde k jejímu rozštěpení na fragmenty rozdílné délky podle umístění cílových sekvencí štěpení pro použitou restriktázu. DNA od různých jedinců stejného druhu může mít délku fragmentu shodnou nebo rozdílnou. Příčinou vzniku polymorfismu délky restričních fragmentů může být mutace některého nukleotidu v cílové sekvenci štěpení. Restriční endonukleáza pak v takto pozměněné cílové sekvenci neštěpí a vzniká fragment, jehož délka je součtem délek dvou sousedních původních fragmentů. Naopak je možné, že mutací vznikne nová cílová sekvence, a tak dojde ke zkrácení délky restričního fragmentu.

RFLP pro geny *VDR* a *PTH*

V předkládané práci bylo analyzováno 6 polymorfizmů genů *VDR* a *PTH* pomocí příslušných restričních endonukleáz, viz přehledná tabulka (Tab. č. 4). Jednotlivé polymorfizmy byly sledovány ve všech zkoumaných skupinách pacientů.

Správnost PCR produktu byla ověřena nejen gelovou elektroforézou, ale také štěpením 2 nezávislými restričními endonukleázami.

Po ověření kvality PCR produktů byly vyhovující produkty podrobeny štěpení podle podmínek uvedených v tabulkách (Tab. č. 5, 6, 7, 8, 9, 10). Reagencie (mimo enzymu, který byl uchovávan na ledu) byly rozmrazeny a napipetovány podle výše uvedených tabulek. Naštěpená DNA byla uchovávána při 4°C.

Tab. č. 4: Sledované polymorfizmy genů *VDR* a *PTH*

SNP	Cílová sekvence RE	Genotyp	Gen	db SNP
<i>Bsm I</i>	5'..GAATGCN↓..3' 3'..CTTAC↑GN..5'	GG bb GA Bb AA BB	<i>VDR</i>	rs 1544410
<i>Apa I</i>	5'..GGGCC↓C..3' 3'..CCC↑GGG..5'	GG aa GT Aa TT AA	<i>VDR</i>	rs 7975232
<i>Taq I</i>	5'..T↓GAA..3' 3'..AGC↑T..5'	TT TT TC Tt CC tt	<i>VDR</i>	rs 731236
<i>Fok I</i>	5'..GGATG↓N ₉ ..3' 3'..CCTAC↑N ₁₃ ..5'	TT ff TC Ff CC FF	<i>VDR</i>	rs 2228570
<i>Dra II</i>	5'..RG↓GNCCY..3' 3'..YCCNG↑GR..5'	CC DD CA Dd AA dd	<i>PTH</i>	rs 6256
<i>BstB I</i>	5'..TT↓CGAA..3' 3'..AAGC↑TT..5'	GG BB GA Bb AA bb	<i>PTH</i>	rs 6254

SNP – jednonukleotidová záměna, RE – restriční endonukleáza, db SNP – The Single Nucleotide Polymorphism database, rs – referenční číslo SNP. Označení alel např. GG nebo GA vychází se záměny nukleotidu v cílové sekvenci. Název polymorfizmu (*Bsm I*, *Apa I* atd.) je odvozen od názvu restriční endonukleázy, která rozeznává cílovou sekvenci polymorfizmu. Označení alel velkým či malým písmenem nevyhází ze vztahu mezi alelami, ale z četnosti alel v populaci, tzn. majoritní alela, značena velkým písmenem se v populaci vyskytuje častěji než minoritní alela, která je v populaci zastoupena s nižší frekvencí. Obě tato značení jsou si rovnocenná.

***Fok I* polymorfismus**

Tab. č. 5: Složení reakční směsi pro jednu RFLP reakci

Komponenty	Objem (μl)
H ₂ O	10,45
Buffer 10 × M	2
BSA 0,1 %	0,25
<i>Fok I</i>	0,3
PCR produkt	7
celkový objem	20

Reakce probíhala 12 hod při 65°C.

Enzym byl poté inaktivován zahříváním směsi po dobu 20 min při 80 °C.

***Bsm I* polymorfismus**

Tab. č. 6: Složení reakční směsi pro jednu RFLP reakci

Komponenty	Objem (μl)
H ₂ O	12,2
Buffer 10 × M	2,5
<i>Bsm I</i>	0,3
PCR produkt	10
celkový objem	25

Reakce probíhala 10 hod při 65 °C.

Enzym byl poté inaktivován zahříváním směsi po dobu 20 min při 80 °C.

***Taq I* polymorfismus**

Tab. č. 7: Složení reakční směsi pro jednu RFLP reakci

Komponenty	Objem (μl)
H ₂ O	11,95
Buffer 10 × M	2,5
BSA 0,1 %	0,25
<i>Taq I</i>	0,3
PCR produkt	10
celkový objem	25

Reakce probíhala 12 hod při 65 °C.

Enzym byl poté inaktivován zahříváním směsi po dobu 20 min při 80 °C.

Apa I polymorfismus

Tab. č. 8: Složení reakční směsi pro jednu RFLP reakci

Komponenty	Objem (μl)
H ₂ O	12,2
Buffer 10 × M	2,5
<i>Apa I</i>	0,3
PCR produkt	10
celkový objem	25

Reakce probíhala 12 hod při 37 °C.

Enzym byl poté inaktivován zahříváním směsi po dobu 20 min při 80 °C.

Bst BI polymorfismus

Tab. č. 9: Složení reakční směsi pro jednu RFLP reakci

Komponenty	Objem (μl)
H ₂ O	15,2
Buffer 10 × M	2,5
<i>Bst BI</i>	0,3
PCR produkt	7
celkový objem	25

Reakce probíhala 12 hod. při 65°C.

Reakční směs byla po proběhnutí štěpení uskladněna do -20 °C.

Dra II polymorfismus

Tab. č. 10: Složení reakční směsi pro jednu RFLP reakci

Komponenty	Objem (μl)
H ₂ O	15,2
Buffer 10 × M	2,5
<i>Dra II</i>	0,3
PCR produkt	7
celkový objem	25

Reakce probíhala 12 hod. při 37 °C.

Enzym byl poté inaktivován zahříváním směsi po dobu 20 min při 80 °C.

3.2.4.3. Elektroforetická separace

Pro identifikaci a separaci jednotlivých fragmentů DNA byla použita horizontální gelová elektroforéza. Pro požadované rozdělení fragmentů DNA byl zvolen gel vhodné koncentrace (2 – 3 %). Za účelem vizualizace produktů bylo přidáno 5 μ l interkalačního barviva GelRed na 100 ml připravovaného gelu (GelRed - netoxická náhrada za etidium bromid). Pro posouzení velikosti vzniklých fragmentů byl současně se vzorky nanesen na gel marker velikosti DNA. Agrózový gel byl připraven z příslušného množství agarózy a rozpuštěn v 1% TBE pufru. Separované PCR vzorky (respektive produkty restrikčního štěpení) byly nanесeny spolu s 6 \times koncentrovaným vzorkovým pufrem. Elektroforetická separace probíhala při konstantním napětí 5 V/cm. Jednotlivé fragmenty byly rozděleny podle velikosti a komplexy fragmentů DNA s GelRed vizualizovány pod UV světlem.

3.2.5. Studium exprese *VDR* na úrovni mRNA

Míra exprese genu *VDR* na úrovni mRNA byla měřena pomocí Real – Time PCR. Pro pilotní studii byla vybrána skupina 13 pacientů trpících diabetickou nefropatií (DN). Jako kontrolní skupina bylo použito 6 zdravých dárců krve.

3.2.5.1. Izolace RNA

RNA byla izolována z plné nesrážlivé krve pomocí soupravy ZR Whole-Blood Total RNA dle postupu doporučeného výrobcem.

- 1) K 200 μ l plné krve bylo přidáno 600 μ l ZR RNA pufru a vše bylo mixováno.
- 2) Směs byla přenesena do ZIMO SPIN III C kolonky ve sběrné tubě a centrifugována při 18 000 g 60 s, sběrná tuba byla vyhozena.
- 3) Bylo přidáno 400 μ l RNA PRE WASH pufru na kolonku a centrifugováno při 18 000 g 60 s, sběrná tuba byla vyhozena.
- 4) Bylo přidáno 250 μ l RNA WASH pufru na kolonku a stočeno při 18 000 g 60 s. Tuba byla vyhozena.
- 5) 80 μ l DNázy bylo pipetováno přímo na membránu a inkubováno 15 min při pokojové teplotě (příprava DNázy (80 μ l na jeden vzorek): 70 μ l RDD pufru bylo smícháno s 10 μ l DNázy).
- 6) Po inkubaci bylo přidáno 250 μ l RNA WASH pufru a stočeno při 18 000 g 60s a byla vyhozena sběrná tuba.
- 7) Bylo přidáno 50 μ l H₂O přímo na membránu. RNA byla eluována 2 min při pokojové teplotě, poté stočena při 18 000 g.

Pro získání vyšší koncentrace RNA následovaly tyto kroky:

- 8) Do eluované RNA bylo přidáno 400 μ l ZR RNA pufru a vše bylo zamícháno.
- 9) Směs byla přenesena do ZYMO SPIN I C kolonky ve sběrné tubě, poté byla stočena při 18 000 g 60s a sběrná tuba byla vyhozena.
- 10) Bylo přidáno 200 μ l RNA WASH pufru, stočeno při 18 000 g 60 s, sběrná tuba byla vyhozena.
- 11) Bylo přidáno 200 μ l RNA WASH pufru, stočeno při 18 000 g 60 s. Tuba byla vyhozena a byl zopakován 11. krok.
- 12) Na kolonku bylo přidáno 15 μ l H₂O. RNA byla eluována 2 min při pokojové teplotě a poté centrifugována při 18 000 g 1 min.

Podle uvedeného postupu byla získána purifikovaná RNA o koncentraci ± 30 ng/ μ l. RNA byla uchovávána při -80 °C. Přesná koncentrace RNA byla ověřena spektrofotometricky na Nanophotometru. Princip stanovení koncentrace RNA byl takřka shodný jako u stanovení koncentrace DNA.

3.2.5.2. Reverzní transkripce

Zá účelem získání cDNA byla provedena reverzní transkripce RNA pomocí soupravy High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit dle doporučení výrobce.

1) Všechny komponenty kitu byly rozmrazeny na ledu.

Podle počtu reakcí byla připravena reakční směs. V tabulce (Tab. č. 11) je uvedeno množství chemikálií na jednu reakci. Směs byla připravována dvakrát. Směs bez reverzní transkriptázy sloužila jako negativní kontrola v Real - Time PCR.

Tab. č. 11: Složení reakční směsi pro jednu reakci reverzní transkripce

Komponenty	Objem (μ l)	
	Směs s reverzní transkriptázou	Směs bez reverzní transkriptázy
10 \times RT Buffer	2	2
100mM dNTP Mix	0,8	0,8
10 \times RT Random Primers	2	2
MultiScribe Reverse Transkriptase	1	-
H ₂ O (DNasa/RNase free)	4,2	5,2
celkem	10	10

2) Reakční směs byla zvortexována a udržována na ledu.

3) Do každé zkumavky bylo napipetováno 10 μ l reakční směsi.

4) Do reakce bylo přidáno tolik RNA, aby její množství v reakci bylo 20 ng. Celkový objem reakce byl doplněn H₂O na 20 μ l.

5) V termocycleru byl nastaven program pro reverzní transkripci:

- | | |
|---------------------------------|-------------------|
| 1. krok (hybridizace s primery) | 10 min. při 25°C |
| 2. krok (extenze) | 120 min. při 37°C |
| 3. krok (denaturace enzymu) | 5 min. při 85°C |

6) Po skončení reakce byla směs uchovávána při -20 °C.

3.2.5.3. Real - Time PCR

V této reakci byla cDNA amplifikována a značena fluorescenčními TaqMan™ sondami. TaqMan™ sondy jsou oligonukleotidy značené na obou koncích. Na 5' konci je navázán flourofor (reportér) s krátkou vlnovou délkou emitovaného záření, na 3' konci se nalézá tlumič (quencher) s delší vlnovou délkou. Fluorofor s kratší vlnovou délkou předává energii tlumiči. Původní záření flouroforu je utlumeno.

Sonda nasedá současně s primery na komplementární sekvenci. Novotvořený řetězec je postupně prodlužován, až dosáhne místa, kde je navázána sonda. V této chvíli se uplatní 5' exonukleázová aktivita DNA polymerasy. DNA polymeráza hydrolyzuje TaqMan™ sondu. Dojde k uvolnění fluorescenční látky a k nárůstu fluorescence, neboť při rozpadu sondy se uvolněný fluorofor vymaní z vlivu tlumiče a začne emitovat záření o krátké vlnové délce. Fluorescence je detekována a zaznamenána v reálném čase. Na základě standardizačních křivek lze přesně kvantifikovat množství hledané cDNA sekvence (našeho markeru) ve vzorku.

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>

Kvantifikace exprese genu *VDR*

Za účelem zjištění genu vhodného pro použití jako endogenní kontrola byly testovány 3 kandidátní geny: *TBP*, *B-aktin*, *PPIA*. Poté byla testována exprese genu *VDR* u pacientů s DN a u zdravých kontrol. Byla použita souprava TaqMan Gene Expression Assays dle pokynů výrobce.

Pro každý gen byla připravena reakční směs podle hodnot uvedených v tabulce (Tab. č. 12). Množství připravené směsi bylo upraveno podle počtu měřených vzorků se započítanou negativní kontrolou a vše bylo vynásobeno 3, neboť reakce probíhala v tripletech.

Tab. č. 12: Složení směsi pro jednu Real - Time PCR reakci

Složka	Objem (μl)
TaqMan Gene Expression Master Mix	12,5
Assay-on-Demand Gene Expression Master Mix	1,25
H ₂ O	1,25
celkem	25

cDNA byla 10 × naředěna vodou a rozpipetována po 10 µl do 96 jamkové destičky a 2 min centrifugována při 500 g.

Absolutní kvantifikace byla měřena na přístroji 700 SDS ABI Prism a podmínky reakce byly následující:

- | | | |
|--------------------------------|-----------------|------------|
| 1. krok (zničení případné RNA) | 2 min při 50°C | |
| 2. krok (hot start) | 10 min při 95°C | |
| 3. krok (denaturace) | 15 s při 95°C | } 50 cyklů |
| 4. krok (hybridizace, extenze) | 1 min při 60°C | |

3.2.6. Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena v programu GraphPad Prism verze 5.04., využitím Fisherova dvoustranného testu, chí kvadrát testu a neparametrického Mann – Whitney testu s hladinou významnosti 0, 05.

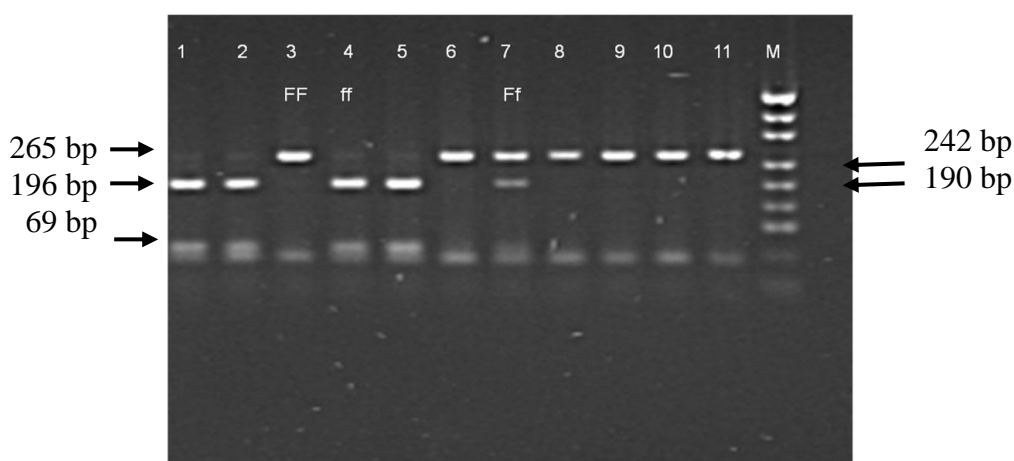
4. Výsledky

4.1. Genotypizace genu pro receptor vitamínu D

Byla provedena genotypizace 4 polymorfizmů: rs 1544410, rs 7975232, rs 731236, rs 2228570 v genu pro receptor vitamínu D metodou PCR – RFLP.

4.1.1. *Fok I* (rs 1544410) polymorfizmus v genu pro receptor vitamínu D

Za účelem genotypizace *Fok I* polymorfizmu byla použita sada primerů VDR3 R a VDR3 F, která tvořila očekávaný produkt o délce 265 bp. Pokud byla přítomna substituce T → C, restriktáza *Fok I* tento produkt štěpila na dva fragmenty o délce 196 bp a 69 bp. Homozygot FF (CC) byl detekován přítomností neštěpeného fragmentu o délce 265 bp. V případě heterozygota Ff (CT) byly detekovány 3 fragmenty o délce 265 bp, 196 bp a 69 bp. V případě ff (TT) homozygota byly detekovány 2 fragmenty o délce 196 bp a 69 bp.



Obr. č. 6: Genotypizace polymorfizmu *Fok I* v genu pro VDR

Výsledek restriktčního štěpení náhodně vybraných vzorků pacientů s DN očíslované 1 – 9. Homozygot FF je detekován přítomností fragmentů o délce 265 bp - vzorky v dráze 3, 6, 8, 9, 10, 11. Heterozygot Ff je detekován přítomností fragmentů o délce 265 bp, 196 bp a 69 bp – vzorek v dráze 7. Homozygot ff je detekován přítomností fragmentů o délce 196 bp a 69 bp – vzorky v dráze 1, 2, 4, 5. Zkratkou M byl označen žebříček.

Z celkového počtu 47 pacientů ve skupině NDRD byla genotypizace polymorfizmu *Fok I* úspěšná u všech 47 pacientů. U všech 132 pacientů ve skupině DN, 31 pacientů ve skupině DM 1, 116 pacientů ve skupině DM 2 a 118 pacientů ve skupině kontrolní byla genotypizace polymorfizmu *Fok I* úspěšná. Úspěšnost genotypizace *Fok I* byla 100%. Mezi skupinami pacientů bylo nalezeno následující zastoupení genotypů *Fok I* polymorfizmu - viz tabulka (Tab. č. 13).

Tab. č. 13: Alelická a genotypová frekvence *Fok I* polymorfizmu

VDR genotyp / alely	NDRD N (frekvence)	DM 1 N (frekvence)	DM 2 N (frekvence)	DN N (frekvence)	KONTROLNÍ SKUPINA N (frekvence)
<i>Fok I</i> ff	3 (0,064)	6 (0,194)	18 (0,155)	11 (0,083)	12 (0,106)
Ff	28 (0,596)	13 (0,419)	60 (0,517)	58 (0,439)	76 (0,673)
FF	16 (0,34)	12 (0,387)	38 (0,328)	63 (0,477)	25 (0,221)
p	0,25	0,035	0,0571	0,0002	
HWE P	0,047	0,474	0,476	0,644	0,000
f	34 (0,362)	25 (0,403)	96 (0,438)	80 (0,303)	100 (0,442)
F	60 (0,638)	37 (0,597)	136 (0,586)	184 (0,697)	126 (0,558)
p	0,214	0,665	0,571	0,002	
OR	1,401	1,175	1,124	1,825	
95 % CI	0,958 – 1,267	0,663 – 2,08	0,776 – 1,628	1,259 – 2,646	

Zkratky použité v tabulce: DM 1 – pacienti s diabetem 1. typu, DM 2 – pacienti s diabetem 2. typu, DN – pacienti s diabetickou nefropatií. NDRD – pacienti s nediabetickou nefropatií, N - počet vyšetřených pacientů v dané skupině s výsledným genotypem. Podle Hardy – Weinbergova zákon (HWE): $P < 0,05$ populace není v souladu HWE. Hodnota **p** udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %.

4.1.2. *Bsm I* (rs 7975232) polymorfismus v genu pro receptor vitamínu D

Za účelem genotypizace *Bsm I* polymorfizmu byla použita sada primerů VDR0 F a VDR0 R, která tvořila očekávaný produkt o délce 825 bp. Pokud je přítomna substituce A → G, restriktáza *Bsm I* štěpila tento produkt na dva fragmenty o délce 650 bp a 175 bp. Homozygot BB (AA) byl detekován přítomností fragmentu o délce 825 bp. V případě heterozygota Bb (AG) byly detekovány 3 fragmenty o délce 825 bp, 650 bp a 175 bp. V případě bb (GG) homozygota byly detekovány 2 fragmenty o délce 650 bp a 179 bp.



Obr. č. 7: Genotypizace polymorfizmu *Bsm I* v genu pro VDR

Výsledek restriktčního štěpení náhodně vybraných vzorků pacientů s DN očíslované 1 – 8. Homozygot BB je detekován přítomností fragmentu o délce 825 bp - vzorky v dráze 5 a 6. Heterozygot Bb je detekován přítomností fragmentů o délce 825 bp, 650 bp a 75 bp – vzorky v dráze 1, 3, 4, 7, 8. Homozygot bb je detekován přítomností fragmentů o délce 650 bp a 75 bp – vzorek v dráze 2. Zkratkou M byl označen žebříček.

Z celkového počtu 47 pacientů ve skupině NDRD byla genotypizace polymorfizmu *Bsm I* úspěšná u 46 pacientů. Z celkového počtu 132 pacientů ve skupině DN byla genotypizace úspěšná u 116 pacientů. Z celkového počtu 31 pacientů ve skupině DM 1 byla genotypizace úspěšná u 26 pacientů. Z celkového počtu 116 pacientů ve skupině DM 2 byla genotypizace úspěšná u 113 pacientů. Z celkového počtu 118 pacientů v kontrolní skupině byla genotypizace úspěšná u 73 pacientů. I přes opakovanou optimalizaci protokolu štěpení, se nám nepodařilo získat výsledky genotypizace u všech pacientů. V souboru pacientů bylo nalezeno následující zastoupení genotypů *Bsm I* polymorfismus –viz tabulka(Tab. č. 14).

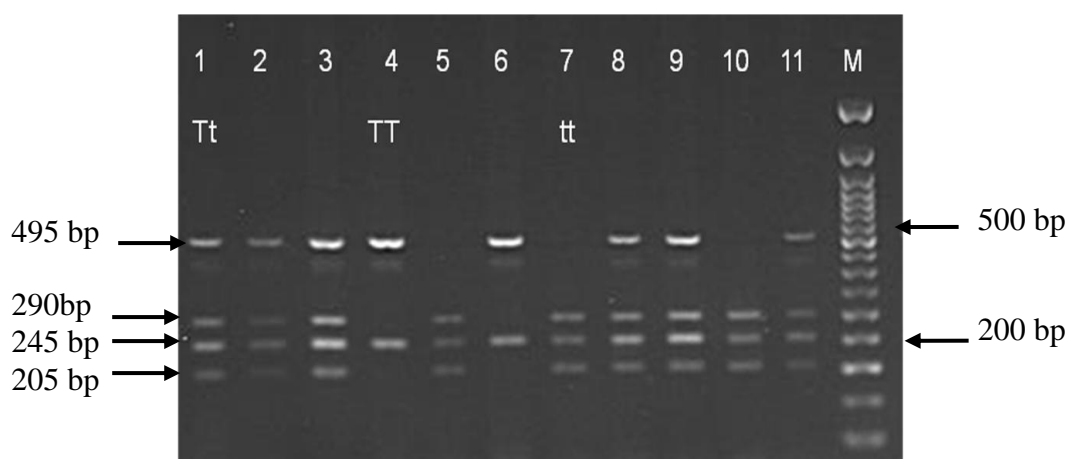
Tab. č. 14: Alelická a genotypová frekvence *Bsm I* polymorfizmu

VDR genotyp / alely	NDRD N (frekvence)	DM 1 N (frekvence)	DM 2 N (frekvence)	DN N (frekvence)	KONTROLNÍ SKUPINA N (frekvence)
<i>Bsm I</i> bb	12 (0,261)	14 (0,538)	41(0,363)	34 (0,293)	27 (0,370)
Bb	24 (0,522)	7 (0,269)	46 (0,407)	63 (0,543)	36 (0,493)
BB	10 (0,217)	5 (0,192)	26 (0,230)	19 (0,164)	10 (0,137)
p	0,341	0,141	0,254	0,538	
HWE P	0,758	0,048	0,069	0,259	0,714
b	48 (0,521)	35(0,673)	128 (0,566)	131 (0,564)	90 (0,616)
B	44 (0,479)	17 (0,327)	98 (0,434)	101 (0,436)	56 (0,384)
p	0,150	0,507	0,387	0,336	
OR	1,473	0,781	1,230	1,239	
95 % CI	0,869 – 2,498	0,4 – 1,524	0,874 – 1,476	0,812 – 1,891	

Zkratky použité v tabulce: DM 1 – pacienti s diabetem 1. typu, DM 2 – pacienti s diabetem 2. typu, DN – pacienti s diabetickou nefropatií. NDRD – pacienti s nediabetickou nefropatií, N - počet vyšetřených pacientů v dané skupině s výsledným genotypem. Podle Hardy – Weinbergova zákon (HWE): $P < 0,05$ populace není v souladu HWE. Hodnota **p** udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %.

4.1.3. *Taq I* (rs 2228570) polymorfismus v genu pro receptor vitamínu D

Za účelem genotypizace *Taq I* polymorfismu byla použita sada primerů VDR2 F a VDR2 R, která tvořila očekávaný produkt o délce 740 bp. PCR produkt byl restrikázou *Taq I* štěpen na dva fragmenty o délce 495 bp a 245 bp. Homozygot TT (TT) byl detekován přítomností 2 fragmentů o délce 495 bp a 245 bp. V případě heterozygota Tt (TC) byly detekovány 4 fragmenty o délce 495 bp, 290 bp, 245 bp a 205, protože v případě substituce T→C se objeví nové restrikční místo. V případě tt (CC) homozygota byly detekovány 3 fragmenty o délce 290 bp, 245bp a 205bp.



Obr. č. 8: Genotypizace polymorfismu *TaqI* v genu pro VDR

Výsledek restrikčního štěpení náhodně vybraných vzorků pacientů s DN očíslované 1 – 11. Homozygot TT je detekován přítomností fragmentů o délce 495 bp a 245 bp - vzorky v dráze 4 a 6. Heterozygot Tt je detekován přítomností 4 fragmentů o délce 825 bp, 650 bp a 175 bp – vzorky v dráze 1,2, 3, 8, 9,11. Homozygot ff je detekován přítomnost fragmentů o délce 650 bp a 175 bp – vzorky v dráze 5, 7, 10. Zkratkou M byl označen žebříček.

Z celkového počtu 47 pacientů ve skupině NDRD byla genotypizace polymorfismu *Taq I* úspěšná u 45 pacientů. Z celkového počtu 132 pacientů ve skupině DN byla genotypizace úspěšná u 126 pacientů. Z celkového počtu 31 pacientů ve skupině DM 1 byla genotypizace úspěšná u 29 pacientů. Z celkového počtu 116 pacientů ve skupině DM 2 byla genotypizace úspěšná u 111 pacientů. Z celkového počtu 118 pacientů v kontrolní skupině byla genotypizace úspěšná u 92 pacientů. V souboru pacientů bylo nalezeno následující zastoupení genotypů *Taq I* polymorfismu - viz tabulka (Tab. č. 15).

Tab. č. 15: Alelická a genotypová frekvence *Taq I* polymorfizmu

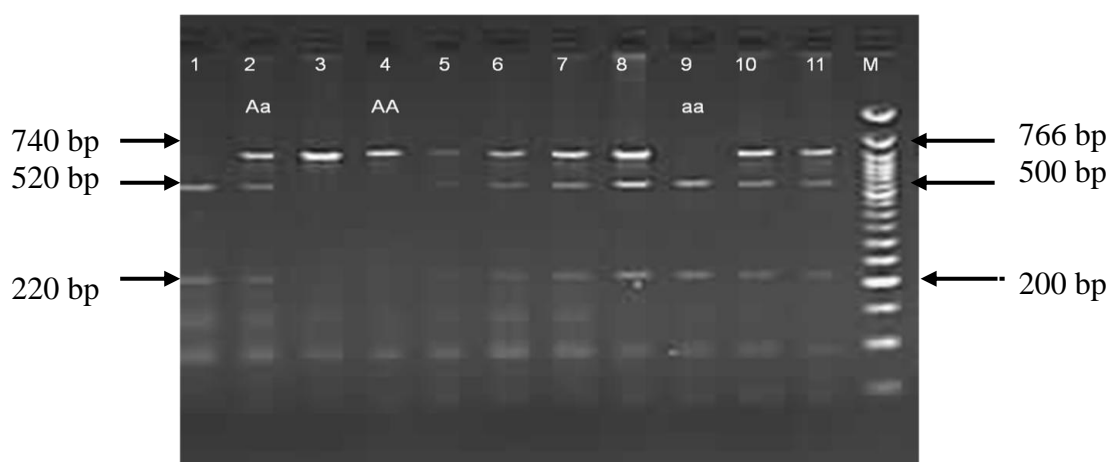
VDR genotyp / alely	NDRD N (frekvence)	DM 1 N (frekvence)	DM 2 N (frekvence)	DN N (frekvence)	KONTROLNÍ SKUPINA N (frekvence)
<i>Taq I</i> tt	8 (0,178)	6 (0,207)	17 (0,153)	12 (0,095)	14 (0,13)
Tt	22 (0,489)	11 (0,379)	52 (0,468)	80 (0,635)	46 (0,482)
TT	15 (0,333)	12 (0,414)	42 (0,378)	34 (0,27)	32 (0,308)
p	0,928	0,51	0,89	0,123	
HWE P	0,989	0,264	0,891	0,001	0,703
t	38 (0,422)	23 (0,396)	86 (0,387)	104 (0,412)	106 (0,402)
T	52 (0,578)	35 (0,604)	136 (0,613)	148 (0,558)	110 (0,598)
p	0,315	0,237	0,0341	0,094	
OR	1,319	1,466	1,524	1,371	
95 % CI	0,803 – 2,166	0,813 – 2, 645	1,042 – 2,228	0,951 – 1,978	

Zkratky použité v tabulce: DM 1 – pacienti s diabetem 1. typu, DM 2 – pacienti s diabetem 2. typu, DN – pacienti s diabetickou nefropatií. NDRD – pacienti s nediabetickou nefropatií, N - počet vyšetřených pacientů v dané skupině s výsledným genotypem. Podle Hardy – Weinbergova zákon (HWE): $P < 0,05$ populace není v souladu HWE.

Hodnota **p** udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %.

4.1.4. *Apa I* (rs 731236) polymorfismus v genu pro receptor vitamínu D

Za účelem genotypizace *Apa I* polymorfizmu byla rovněž použita sada primerů VDR2F a VDR2R, která tvořila očekávaný produkt o délce 740 bp. Pokud byla přítomna substituce T → G, restriktáza *Apa I* štěpila tento produkt na dva fragmenty o délce 520 bp a 220 bp. Homozygot AA (TT) byl detekován přítomností fragmentu o délce 740 bp. V případě heterozygota Aa (TG) byly detekovány 3 fragmenty o délce 740 bp, 520 bp a 220 bp. V případě aa (GG) homozygota byly detekovány 2 fragmenty o délce 520 bp a 220 bp.



Obr. č. 9: Genotypizace polymorfizmu *Apa I* v genu pro VDR

Výsledek restriktčního štěpení náhodně vybraných vzorků pacientů s DN očíslované 1 – 11. Homozygot AA je detekován přítomností fragmentu o délce 740 bp - vzorky v dráze 3 a 4. Heterozygot Aa je detekován přítomností fragmentů o délce 740 bp, 520 bp a 220 bp – vzorky v dráze 2, 5, 6, 7, 8, 10, 11. Homozygot aa je detekován přítomností fragmentů o délce 520 bp a 220 bp – vzorky v dráze 1 a 9. Zkratkou M byl označen žebříček.

Z celkového počtu 47 pacientů ve skupině NDRD byla genotypizace polymorfizmu *Apa I* úspěšná u 46 pacientů. Z celkového počtu 132 pacientů ve skupině DN byla genotypizace úspěšná u 124 pacientů. Z celkového počtu 31 pacientů ve skupině DM 1 byla genotypizace úspěšná u 21 pacientů. Z celkového počtu 116 pacientů ve skupině DM 2 byla genotypizace úspěšná u 108 pacientů. Z celkového počtu 118 pacientů v kontrolní skupině byla genotypizace úspěšná u 105 pacientů.

Mezi skupinami pacientů bylo nalezeno následující zastoupení genotypů *Apa I* polymorfizmu - viz tabulka (Tab. č. 16).

Tab. č. 16: Alelická a genotypová frekvence *Apa I* polymorfizmu

VDR genotyp	NDRD	DM 1	DM 2	DN	KONTROLNÍ SKUPINA
	N (frekvence)	N (frekvence)	N (frekvence)	N (frekvence)	N (frekvence)
<i>Apa I</i> aa	10 (0,217)	9 (0,310)	27 (0,25)	20 (0,161)	17 (0,163)
Aa	24 (0,522)	12 (0,414)	50 (0,463)	74 (0,597)	63 (0,606)
AA	12 (0,261)	8 (0,276)	31 (0,287)	30 (0,242)	24 (0,231)
p	0,959	0,128	0,113	0,981	
HWE P	0,758	0,356	0,449	0,025	0,034
a	44 (0,478)	30 (0,517)	104 (0,481)	114 (0,45)	97 (0,4704)
A	48 (0,522)	28 (0,483)	112 (0,519)	134 (0,55)	113 (0,5296)
p	0,803	0,462	0,7	1,0	
OR	0,936	0,801	0,924	1,009	
95 % CI	0,573 – 1,53	0,448 – 1,434	0,632 – 1,353	0,698 – 1,459	

Zkratky použité v tabulce: DM 1 – pacienti s diabetem 1. typu, DM 2 – pacienti s diabetem 2. typu, DN – pacienti s diabetickou nefropatií. NDRD – pacienti s nediabetickou nefropatií, N - počet vyšetřených pacientů v dané skupině s výsledným genotypem. Podle Hardy – Weinbergova zákon (HWE): $P < 0,05$ populace není v souladu HWE.

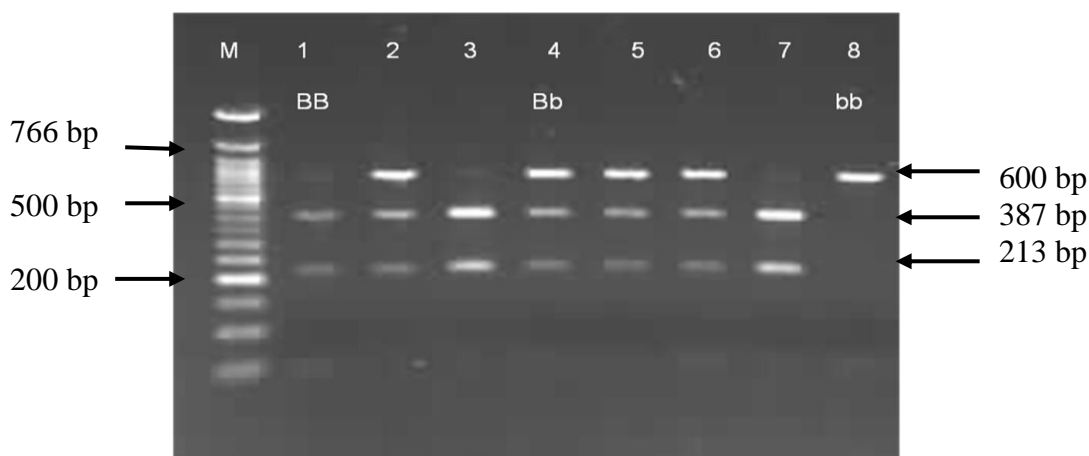
Hodnota **p** udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %.

4.2. Genotypizace genu pro parathyreoidní hormon

Byla provedena genotypizace 2 polymorfizmů: rs 6254, rs 6256.

4.2.1. *Bst BI* (rs 6254) polymorfizmus

Za účelem genotypizace polymorfizmu *Bst BI* byla použita sada primerů PTH3 F a PTH3 R, která tvořila očekávaný produkt o délce 600 bp. Pokud byla přítomna substituce A → G, restriktáza *Bst BI* štěpí tento produkt na dva fragmenty o délce 387 bp a 213 bp. Homozygot BB (GG) byla detekován přítomností fragmentu o délce 381 bp a 213 bp. V případě heterozygota Bb (AG) byly detekovány 3 fragmenty o délce 600 bp, 387 bp a 213 bp. V případě bb (AA) homozygota byl detekován 1 fragment o délce 600 bp.



Obr. č. 10: Genotypizace polymorfizmu *Bst BI* v genu pro parathyreoidní hormon

Výsledek restriktčního štěpení náhodně vybraných vzorků pacientů s DN očíslované 1 – 8. Homozygot BB je detekován přítomností fragmentů o délce 387 bp a 213 bp - vzorky v dráze 1, 3, 7. Heterozygot Bb je detekován přítomností fragmentů o délce 600 bp, 387 bp a 213 bp – vzorky v dráze 2, 4, 5, 6. Homozygot bb je detekován přítomností fragmentu délce 600 bp - vzorek v dráze 8. Zkratkou M byl označen žebříček.

Z celkového počtu 47 pacientů ve skupině NDRD byla genotypizace polymorfizmu *Bst BI* úspěšná u 45 pacientů. Z celkového počtu 132 pacientů ve skupině DN byla genotypizace úspěšná u 113 pacientů. Z celkového počtu 31 pacientů ve skupině DM 1 byla genotypizace úspěšná u 30 pacientů. Z celkového počtu 116 pacientů ve skupině DM 2 byla genotypizace úspěšná u 104 pacientů. Z celkového počtu 118 pacientů v kontrolní skupině byla genotypizace úspěšná u 83 pacientů. V souboru pacientů bylo nalezeno následující zastoupení genotypů *BstBI* polymorfizmu - viz tabulka (Tab. č. 17).

Tab. č. 17: Alelická a genotypová frekvence *Bst BI* polymorfizmu

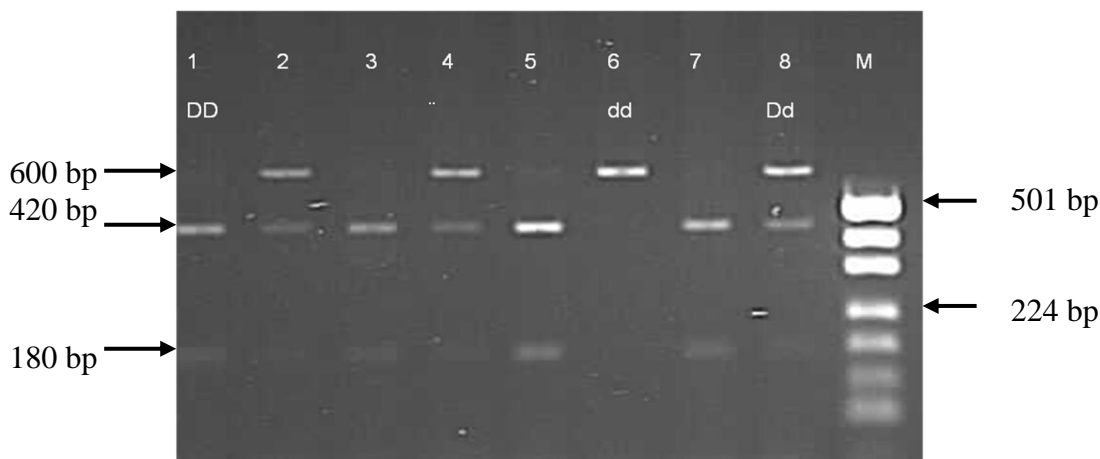
<i>PTH</i> genotyp/ alely	NDRD N (frekvence)	DM 1 N (frekvence)	DM 2 N (frekvence)	DN N (frekvence)	KONTROLNÍ SKUPINA N (frekvence)
<i>Bst BI</i> bb	5 (0,111)	2 (0,067)	14 (0,135)	12 (0,106)	20 (0,241)
Bb	25 (0,556)	14 (0,467)	47 (0,452)	46 (0,407)	33 (0,398)
BB	15 (0,333)	14 (0,467)	43 (0,413)	55 (0,487)	30 (0,361)
HWE P	0,257	0,543	0,000	0,029	0,079
p	0,123	0,116	0,173	0,023	
b	35 (0,338)	18 (0,3)	75 (0,360)	70 (0,309)	73 (0,439)
B	55 (0,662)	42 (0,7)	133 (0,640)	156 (0,691)	93 (0,561)
p	0,508	0,066	0,136	0,011	
OR	1,233	1,832	1,392	1,749	
95 % CI	0,731 – 2,081	0,974 – 3,445	0,917 – 2,113	1,153 – 2,653	

Zkratky použité v tabulce: DM 1 – pacienti s diabetem 1. typu, DM 2 – pacienti s diabetem 2. typu, DN – pacienti s diabetickou nefropatií. NDRD – pacienti s nediabetickou nefropatií, N - počet vyšetřených pacientů v dané skupině s výsledným genotypem. Podle Hardy – Weinbergova zákon (HWE): $P < 0,05$ populace není v souladu HWE.

Hodnota p udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %.

4.2.2. *Dra II* (rs 6256) polymorfizmus

Za účelem genotypizace polymorfizmu *Dra II* byla použita sada primerů PTH3 F a PTH3 R, která tvořila očekávaný produkt o délce 600 bp. Pokud je přítomna substituce C→A, restriktáza *Dra II* štěpí tento produkt na dva fragmenty o délce 420 bp a 180 bp. Homozygot DD (AA) je detekován přítomností fragmentu o délce 420 bp a 180 bp. V případě heterozygota Dd (CA) byly detekovány 3 fragmenty o délce 600 bp, 420 bp a 180 bp. V případě dd (CC) homozygota byly detekovány 1 fragment o délce 600 bp.



Obr. č. 11: Genotypizace polymorfizmu *Dra II* v genu pro parathyreoidní hormon

Výsledek restriktčního štěpení náhodně vybraných vzorků pacientů s DN očíslované 1 – 8. Homozygot DD je detekován přítomností fragmentů o délce 420 bp a 180 bp – vzorky v dráze 1, 3, 5, 7. Heterozygot Dd je detekován přítomností fragmentů o délce 600 bp, 420 bp a 180 bp – vzorky v dráze 2, 4, 8. Homozygot dd je detekován přítomností fragmentu o délce 600 bp – vzorek v dráze 6. Zkratkou M byl označen žebříček.

Z celkového počtu 47 pacientů ve skupině NDRD byla genotypizace polymorfizmu *Dra II* úspěšná u 46 pacientů. Z celkového počtu 132 pacientů ve skupině DN byla genotypizace úspěšná u 103 pacientů. Z celkového počtu 31 pacientů ve skupině DM 1 byla genotypizace úspěšná u 30 pacientů. Z celkového počtu 116 pacientů ve skupině DM 2 byla genotypizace úspěšná u 103 pacientů. Z celkového počtu 118 pacientů v kontrolní skupině byla genotypizace úspěšná u 88 pacientů.

Mezi skupinami pacientů bylo nalezeno následující zastoupení genotypů *Dra II* polymorfizmu - viz tabulka (Tab. č. 18).

Tab. č. 18: Alelická a genotypová frekvence *Dra II* polymorfizmu pro gen *PHT*

<i>PTH</i> genotyp/ alely	NDRD N (frekvence)	DM 1 N (frekvence)	DM 2 N (frekvence)	DN N (frekvence)	KONTROLNÍ SKUPINA N (frekvence)
<i>Dra II</i> dd	1 (0,022)	2 (0,067)	5 (0,049)	1 (0,009)	1 (0,0011)
Dd	15 (0,326)	10 (0,333)	32 (0,311)	42 (0,375)	56 (0,636)
DD	30 (0,652)	18 (0,60)	66 (0,641)	69 (0,616)	31(0,352)
HWE P	0,576	0,708	0,663	0,047	0,000
p	0,003	0,008	0,000	0,001	
d	17 (0,185)	14 (0,233)	42 (0,204)	44 (0,196)	58 (0,329)
D	75 (0,815)	46 (0,767)	164 (0,796)	180 (0,804)	118 (0,671)
p	0,015	0,195	0,007	0,003	
OR	2,168	1,615	1,919	2,011	
95 % CI	1,174 – 4,004	0,822 – 3,175	1,209 – 3,047	1,275 – 3,171	

Zkratky použité v tabulce: DM 1 – pacienti s diabetem 1. typu, DM 2 – pacienti s diabetem 2. typu, DN – pacienti s diabetickou nefropatií. NDRD – pacienti s nediabetickou nefropatií, N - počet vyšetřených pacientů v dané skupině s výsledným genotypem. Podle Hardy – Weinbergova zákon (HWE): $P < 0,05$ populace není v souladu HWE.

Hodnota **p** udává statistickou významnost na hladině 0,05 pro Fisherův dvoustranný test, OR míru relativního rizika s intervalem spolehlivosti CI 95 %.

4.3. Porovnání kombinací genotypů VDR mezi zkoumanými skupinami

Pro další statistické zpracování byly porovnávány pouze 2 skupiny pacientů - DN, DM 2 vs. kontrolní skupina. Vzhledem k nízkému počtu pacientů byly skupiny NDRD a DM 1 vyřazeny z dalšího statistického hodnocení. Skupiny s nízkým počtem pacientů hodláme rozšířit. Pro statistickou analýzu byl využit Fischerův dvoustranný test s hladinou významnosti 0,05, tzn., byla požadována maximální hodnota $P = 0,05$. Byla počítána hodnota OR a interval spolehlivosti CI (95 %), který vyjadřuje hodnověrnost tohoto odhadu.

Porovnání distribuce genotypu VDR mezi skupinou DN a kontrolami

Při porovnání všech možných kombinací genotypů VDR mezi DN a kontrolní skupinou byl nalezen pouze jeden statisticky významný genotyp, který splňuje podmínku $P < 0,05$.

Tab. č. 19: Statisticky významný genotyp VDR mezi DN a kontrolní skupinou

Genotyp	DN N (frekvence)	KONTROLNÍ SKUPINA N (frekvence)	p	OR (95 % CI)
BBFFAATt	7 (0,065)	0 (0)	0,046	0,935 (0,890 – 0,983)

Počet pacientů ve skupině DN: $N = 108$, počet pacientů ve skupině kontrolní: $N = 58$.

Do tabulky byla uvedena pouze kombinace genotypu, která má $P < 0,05$ (5%). Zbylé kombinace genotypů nebyly statisticky významné, a proto z důvodů přehlednosti uváděny nebyly.

Porovnání distribuce VDR genotypů mezi skupinou DM 2 a kontrolami

Mezi skupinou DM 2 ($N = 105$ pacientů) a kontrolami ($N = 81$ pacientů) nebyla nalezena žádná kombinace genotypů, která by splňovala podmínku $P < 0,05$. Rozdíl mezi těmito skupinami nebyl signifikantní.

Porovnání distribuce genotypů *VDR* mezi skupinou DN a DM2

Při porovnání všech možných kombinací genotypů *VDR* mezi skupinou DN a DM 2 byl nalezen pouze jeden statisticky významný genotyp, který splňuje podmínku $P < 0,05$.

Tab. č. 20: Statisticky významný genotyp *VDR* mezi skupinou DN vs. DM 2

Genotyp	DN N (frekvence)	DM 2 N (frekvence)	P	OR (95 % CI)
BbFFAaTt	21 (0,194)	9 (0,086)	0,018	2,575 (1,119 – 5,923)

Počet pacientů ve skupině DN: **N = 108**, počet pacientů ve skupině DM 2: **N = 105**.

Do tabulky byla uvedena pouze kombinace genotypu, která má $P < 0,05$ (5%). Zbylé kombinace genotypů nebyly statisticky významné, a proto z důvodů přehlednosti uváděny nebyly.

4.4. Porovnání kombinací genotypů *PTH* mezi studovanými skupinami

Porovnání distribuce *PTH* genotypů mezi skupinou DN a kontrolami.

Při porovnání všech možných kombinací genotypů *PTH* mezi skupinou DN a kontrolami byly nalezeny 2 genotypy, které splňují podmínku $P < 0,05$ (5%).

Tab. č. 21: Distribuce kombinací genotypů *PTH* mezi DN a kontrolní skupinou

Genotyp	DN N (frekvence)	KONTROLNÍ SKUPINA N (frekvence)	P – hodnota	OR (95 % CI)
bbDd	1 (0,009)	16 (0,198)	0,000	0,037 (0,005 – 0,285)
BBDD	30 (0,27)	8 (0,099)	0,002	3,380 (1,457 – 7,841)

Počet pacientů ve skupině DN: **N = 111**, počet pacientů v kontrolní skupině: **N = 81**.

Do tabulky byla uvedena pouze kombinace genotypu, která má $P < 0,05$ (5%). Zbylé kombinace genotypů nebyly statisticky významné, a proto z důvodů přehlednosti uváděny nebyly.

Porovnání distribuce *PTH* genotypů mezi skupinou DM 2 a kontrolami.

Při porovnání všech možných kombinací genotypů *PTH* mezi skupinami DM 2 a kontrolami byly nalezeny 2 genotypy, které splňují podmínku $P < 0,05$.

Tab. č. 22: Distribuce kombinací genotypů *PTH* mezi DM 2 a kontrolní skupinou

Genotyp	DM 2 N (frekvence)	KONTROLNÍ SKUPINA N (frekvence)	P – hodnota	OR (95 % CI)
bbDd	2 (0,019)	16 (0,198)	0,000	0,080 (0,018 – 0,361)
BBDD	23 (0,223)	8 (0,099)	0,019	2,623 (1,105 - 6,229)

Počet pacientů ve skupině DM 2: **N = 103**, počet pacientů v kontrolní skupině: **N = 81**.

Do tabulky byly uvedeny pouze kombinace genotypů, která má $P < 0,05$ (5%). Zbylé kombinace genotypů nebyly statisticky významné, a proto z důvodů přehlednosti uváděny nebyly.

Porovnání distribuce *PTH* genotypů mezi skupinou DN a DM 2

Mezi skupinou DN (N = 111 pacientů) a DM 2 (N = 103 pacientů) nebyla nalezena žádná kombinace genotypů, která by splňovala podmínku $P < 0,05$ (5%). Rozdíl mezi těmito skupinami nebyl signifikantní.

4. 5. Hladina exprese VDR na úrovni mRNA

Pro porovnání exprese genu *VDR* u 12 pacientů s DN a u 6 zdravých kontrol byla provedena kvantitativní Real – Time PCR. Bylo porovnáváno, zda některé kombinace alel mohou mít vliv na expresi mRNA *VDR*.

Za účelem výběru genu pro použití jako endogenní kontrola byly testovány 3 geny: β – *aktin*, *hu TBP* a *cyklofilin A (PPIA)*. Porovnáním exprese všech tří kontrolních genů mezi skupinou DN a kontrolami, bylo ověřeno, že exprese β – *aktinu* je u obou skupin nejjednodušší. Jako kontrolní gen byl použit β – *aktinu*.

Pro každý vzorek byly získány 3 hodnoty Ct. Ct je hodnota cyklu, při kterém fluorescence vzorku přesáhne prahovou hodnotu. Z těchto hodnot byly počítány další parametry a byla provedena statistická analýza.

Tab č. 23: Výsledná hodnota $2^{-\Delta Ct}$ pro každý genotyp *VDR* ve skupině DN

skupina DN číslo vzorku	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	genotyp <i>VDR</i>
1	4,846667	0,034754	FfBbAaTt
2	5,166667	0,027841	FfBbAaTt
3	5,585000	0,020833	FfAaTt
4	4,996666	0,031322	FfAaTt
5	5,156667	0,028034	FfAaTt
6	4,373333	0,04825	FFAaTt
7	5,406667	0,023574	FFBBAaTt
8	3,003333	0,124712	FfBbAaTt
9	2,143333	0,226357	FFAaTt
10	4,433334	0,046284	FfAaTt
11	5,540000	0,021493	FfAaTt
12	5,981667	0,015825	FFAaTt
13	6,086667	0,014714	FFAaTt

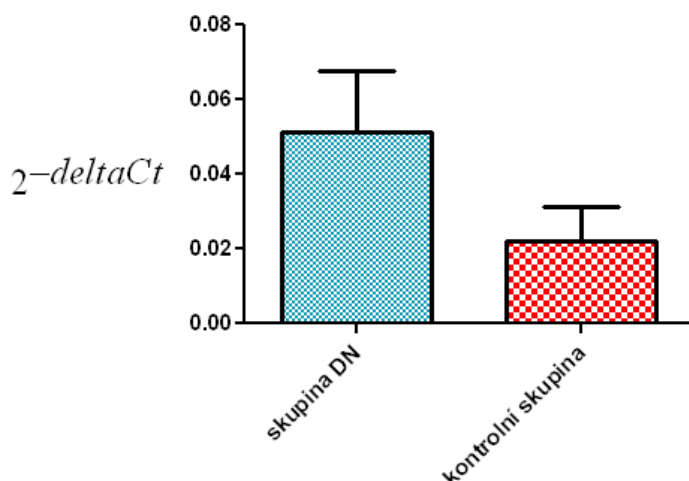
ΔCt je rozdíl průměru Ct *VDR* (zkoumaného genu) a Ct β – *aktinu* (endogenní kontroly). $2^{-\Delta Ct}$ vyjadřuje poměr exprese genu *VDR* vůči expresi endogenní kontroly.

Tab č. 24: Výsledná hodnota $2^{-\Delta C_t}$ pro každý vzorek v kontrolní skupině

Kontroly číslo vzorku	ΔC_t	$2^{-\Delta C_t}$	genotyp <i>VDR</i>
14	3,90333	0,066831	Ff
15	6,91000	0,008315	FfBBaa
16	5,96833	0,015972	Ff
17	6,26667	0,012988	Ff
18	6,00333	0,015589	Ffbb
19	6,20800	0,012869	ffbbAATt

C_t je rozdíl průměru C_t *VDR* (zkoumaného genu) a C_t β – *aktinu* (endogenní kontroly). $2^{-\Delta C_t}$ vyjadřuje poměr exprese genu *VDR* vůči expresi endogenní kontroly.

Vzhledem k malému počtu pacientů byl pro analýzu rozdílu exprese *VDR* mezi oběma zkoumanými skupinami použit neparametrický Mann – Whitney test s hladinou významnosti 0,05.



P = 0,0317

Graf č. 1: Porovnání exprese *VDR* mezi pacienty diabetickou nefropatií a kontrolní skupinou. Z grafu je patrné, že pacienti s diabetickou nefropatií mají vyšší hladinu exprese *VDR*.

5. Diskuze

Do studie jsme zahrnuli 5 souborů pacientů. Jako kontrolní soubor jsme použili zdravé dárce krve. Další soubor tvořili diabetici bez komplikací, které jsme dále rozdělili na diabetiky 1. (DM 1) a 2. typu. (DM 2). Pacienty s postižením ledvin jsme rozřadili do 2 souborů, a to podle původu poškození ledvin. Pacienti s diabetickou nefropatií (DN) trpí onemocněním ledvin na podkladě diabetického syndromu, zatímco pacienti s nediabetickou nefropatií (NDRD), trpí selháním ledvin nediabetického původu.

Zaměřili jsme se na studium polymorfizmů genů, jejichž proteinové produkty hrají významnou roli v kalciofosfátovém metabolismu v ledvinách, a u nichž se předpokládá vliv na patogenezi jak samotného diabetu, tak ledvinného poškození. Mezi nejvýznamnější regulátory hladiny vápníku a fosfátu v krvi patří vitamín D a parathyroidní hormon.

Analyzovali jsme 4 polymorfizmy v genu pro receptor vitamínu D (*VDR*) a 2 polymorfizmy v genu pro parathyroidní hormon (*PTH*). Alelové polymorfizmy pro *VDR* zahrnovaly polymorfizmy *Fok I*, *Bsm I*, *Apa I* a *Taq I*. Alelové polymorfizmy *PTH* zahrnovaly polymorfizmy *Bst BI* a *Dra II*.

Jsou známé účinky vitamínu D na imunitní systém (D'AMBROSIO *et al.* 1998, BOONSTRA *et al.* 2001). Byla prokázána asociace vitamínu D s řadou autoimunitních chorob: diabetes 1. typu (ISRANI *et al.* 2009, ŠKRABIC *et al.* 2003), revmatoidní artritida (GARCIA – LOZANO *et al.* 2001) a lupénka (RUCEVIC *et al.* 2009).

Nejvýznamnější vliv z výše uvedených polymorfizmů genu *VDR* na imunitní systém byl popsán u polymorfizmu *Fok I*. Záměna T → C vede k vzniku alternativního iniciačního kodonu (BAKER *et al.* 1988, MIYAMOTO *et al.* 1997). Tato substituce vede k syntéze 2 různě dlouhých proteinů, krátkého *VDR – F* a dlouhého *VDR – f* proteinu.

Van Etten *et al.* ukázali, že alela *F* a predispoziční alely *MHC* vykazují významné intergenové interakce. Tyto výsledky poukazují na možnou integrovanou roli alel *MHC* v prezentaci antigenu a alely *VDR – F* při zvýšené autoimunitní odpovědi. Tuto hypotézu podporuje poznatek o tom, že zkrácená varianta *VDR – F* zvyšuje transkripci genů, jejichž promotory jsou konrolovány NF-κ B, NFAT a IL-12 p 40 (VAN ETTEN *et al.* 2007).

V naší studii jsme zjistili následné zastoupení genotypů polymorfizmu *Fok I*: kontrolní skupina (ff – 10,6 %, Ff – 67,3 %, FF – 22,1 %), skupina NDRD (ff - 6,4 %,

Ff – 59 %, FF – 34 %), skupina DN (ff – 8,3%, Ff - 43,9 %, FF - 47, 7 %), skupina DM 1 (ff - 19,4 %, Ff - 41,9 %, FF - 38,7 %), DM 2 (ff - 15,5 %, Ff – 51%, FF – 32,8).

Ukázali jsme, že alela F je signifikantně zvýšená u pacientů s DN a DM 1. Toto je v souladu se studií Ponsonby *et al.*, kteří shledali alelu F jako predispoziční pro diabetes 1. typu (PONSONBY *et al.* 2008).

Zjistili jsme následující zastoupení genotypů polymorfizmu *Bsm I* mezi vyšetřovanými skupinami: kontrolní skupina (bb – 37, Bb – 49,3 %, BB 13,7 %), skupina NDRD (bb - 26,1, Bb - 52,2 %, BB - 21,7 %), skupina DN (bb - 29,3 %, Bb – 54, 3, BB – 16,4), skupina DM 1 (bb - 53,8 %, Bb – 26,9 %, BB - 19,2 %), skupina DM 2 (bb - 36,3 %, Bb - 40,7, BB – 23 %). Nebyly nalezeny statisticky významné genotypy, a proto není možné předpovědět vliv ale B/b na rozvoj onemocnění.

McDermott *et al.* ve své studii zjistili, že alela b je signifikantně zvýšená u pacientů s diabetem 1. typu (MCDERMOTT *et al.* 2007). S těmito výsledky se rozcházejí studie podle Van Etten *et al.* (VAN ETTEN *et al.* 2007). Tyto protichůdné výsledky mohou být ovlivněny tím, že studie byly prováděny na různých populacích, které jsou vystaveny rozdílné expozici UV záření, neboť je známo, že proces syntézy vitamínu D je závislý na slunečním záření.

Zjistili jsme následující zastoupení genotypů polymorfizmu *Apa I*: kontrolní skupina (aa – 16,3 %, Aa – 60,6 %, AA – 23,2 %), skupina NDRD (aa – 21,7, Aa – 52,2 %, AA – 26,1), skupina DN (aa – 16,1 %, Aa – 59,7, AA – 24,2 %), skupina DM 1 (aa – 31 %, Aa – 41,4 %, AA - 27,6 %). Nebyly nalezeny statisticky významné genotypy.

Chang *et al.* ve své studii shledali genotyp AA jako vysoce rizikový pro rozvoj diabetu 1. typu (CHANG *et al.* 2002). Rozpor mezi našimi výsledky může být způsoben nízkým počtem pacientů ve skupině DM 1, což může způsobit zkreslení výsledků, a proto bude nutné skupinu DM 1 (stejně tak NDRD) rozšířit.

Podíl výsledných genotypů polymorfizmu *Taq I VDR* byl následující: Kontrolní skupina (tt - 13 %, Tt – 48,2 %, TT – 30,8 %), skupina NDRD (tt = 17,3 %, Tt = 48,9 %, TT- 33,3 %), skupina DN (tt – 9,5%, Tt – 63,5 %, TT - 42,2 %), DM 1(tt – 20,7 %, Tt – 37,9 %, TT – 41,4), DM 2 (tt – 15,3 %, Tt – 46,8 %, TT – 37,8 %). Ze statistického vyhodnocení frekvence alely T lze usuzovat, že alela T je predispoziční pro DM 2.

Nebyla prokázána statistická významnost polymorfizmu *Taq I* pro DM 1 a nefropatie (statistická významnost pro DM 1 nebyla prokázána ani v asijské populaci) (CHANG *et al.* 2002).

Zjistili jsme následující zastoupení genotypů polymorfizmu *Bst BI* v genu *PTH*: kontrolní skupina (bb - 24,1 %, Bb - 39,8 %, BB - 36,1 %), skupina NDRD (bb - 11,1 %, Bb - 55,6 %, BB - 33,3 %), skupina DN (bb - 10,6 %, Bb - 40,7 %, BB - 48,7 %), skupina DM 1 (bb - 6,7 %, Bb - 46,7 %, BB - 46,7 %), DM 2 (bb - 13,5 %, Bb - 45,2 %, BB - 41,3 %). Statistickou analýzou byla prokázána významnost alely B pro rozvoj diabetické nefropatie. Blízko této statistické významnosti se nachází skupina DM 1.

Podíl výsledných genotypů polymorfizmu *Dra II* byl následující: kontrolní skupina (dd - 1,1 %, Dd - 63,6 %, DD - 35,2 %), skupina NDRD (dd - 2,2 %, Dd - 32,6 %, DD - 65 %), skupina DN (dd - 0,9 %, Dd - 37,5 %, DD - 61,6 %), skupina DM 1 (dd - 6,7 %, Dd - 33,3 %, DD - 60 %), skupina DM 2 (dd - 4,9 %, Dd - 31,3 %, DD - 64,1 %). Genotyp DD je statisticky významný pro skupinu DM 1, DM 2, DN i NDRD.

Více než hledání asociace mezi studovanými skupinami a frekvencí jednotlivých polymorfizmů, nás zajímalo, zda některé kombinace genotypů *VDR* či *PTH* nemají vliv na rozvoj diabetických komplikací. V dalším statistickém vyhodnocení jsme analyzovali pouze 3 skupiny pacientů - DN, DM 2 vs. kontroly. Vzhledem k nízkému počtu pacientů skupiny NDRD a DM 1 nebyly tyto skupiny zahrnuty do dalšího statistického zpracování.

Porovnáním všech možných kombinací genotypů *VDR* mezi skupinou DN a kontrolami jsme našli pouze jeden statisticky významný genotyp, který splňuje podmínku $P < 0,05$ (5%). Genotyp BBFFAATt (OR = 0,935, 95 % CI = 0,890 - 0,983) byl v kontrolní skupině zastoupen s nulovou frekvencí, zato ve skupině DN jsme našli tuto kombinaci u 7 nositelů (6,5 %).

Mezi skupinou DM 2 a kontrolami nebyla nalezena žádná kombinace genotypů, která by splňovala podmínku $P < 0,05$ (5%). Rozdíl mezi těmito skupinami nebyl signifikantní.

Porovnáním všech možných kombinací genotypů *VDR* mezi skupinou DN a DM 2 byl nalezen pouze jeden statisticky významný genotyp, který splňuje podmínku $P < 0,05$. Genotyp BbFFAaTt (OR = 2,575, 95 % CI = 1,119 - 5,593) byl ve skupině DN zastoupen u 21 jedinců (19,4 %), zatímco ve skupině DM 2 u 9 jedinců (8,6 %). Hodnota OR > 1 svědčí pro pozitivní asociaci genotypu k diabetické nefropatii.

Studie, které se zabývaly hledáním asociace mezi kombinacemi genotypů výše zmíněných polymorfizmů, porovnávaly frekvence genotypů především ve spojitosti s diabetem 1. typu. S tímto onemocněním jsou výrazně asociované haplotypy BFAt a

BfAT (ISRAMI *et al.* 2009). Stejně tak kombinace genotypů BBAAtt byla označena jako riziková pro rozvoj diabetu 1. typu v chorvatské populaci (ŠKRABIČ *et al.* 2003). Stejný haplotyp (BA_t) byl nalezen i v populaci německé (PANI *et al.* 2000). Dogan *et al.* označili haplotyp baT jako rizikový pro rozvoj rakoviny plic (DOGAN *et al.* 2009). Gunes *et al.* našli rizikový haplotyp bAT, který je asociovaný s periodontitidou (zánětlivé postižení ozubice) (GUNES *et al.* 2008). V naší studii jsme našli genotyp BBFFAAT_t, který je rizikový pro rozvoj diabetických komplikací, respektive nefropatie.

Podobné srovnání frekvence kombinací genotypů jsme provedli pro alely B/b a D/d genu *PTH*. Mezi skupinou DN (N = 111) a kontrolami (N = 81) jsme našli 2 statisticky významné kombinace genotypů, které splňují podmínku $P < 0,05$ (5%): bbDd (OR = 0,037, 95 % CI = 0,005 – 0,0285) a BBDD (OR = 3,380, 95 % CI = 1,457 – 7,841). Genotyp bbDd byl ve skupině DN zastoupen pouze u jednoho nositele (0,9 %), zato u kontrol u 16 jedinců (19,8 %). Hodnota OR < 1 svědčí pro negativní asociaci. Zdá se, genotyp bbDd má projektivní účinek před rozvojem diabetických komplikací. BBDD byl ve skupině DN zastoupen u 30 jedinců (27 %), zato u kontrol pouze u 8 jedinců (9,9 %). Hodnota OR > 1 svědčí pro pozitivní asociaci s DN.

Mezi skupinou DM 2 (N = 103) a kontrolami (N = 81) byly nalezeny stejné statisticky významné kombinace genotypů: bbDd (OR = 0,080, 95 % CI = 0,018 – 0,361) a BBDD (OR = 2,623, 95 % CI = 1,105 - 6,229). Genotyp bbDd byl ve skupině DM 2 nalezen u 2 jedinců (1,9%), zatímco u kontrol u 16 jedinců (19,8%). Hodnota OR < 0 svědčí pro negativní asociaci s DM 2. Genotyp BBDD byl nalezen ve skupině DM 2 u 23 jedinců (22,3 %) a ve skupině kontrolní u 8 jedinců (9,9 %). Hodnota OR > 1 svědčí pro pozitivní asociaci s DM 2.

Mezi skupinou DN (N = 111 pacientů) a DM 2 (N = 103 pacientů) nebyla nalezena žádná kombinace genotypů, která by splňovala podmínku $P < 0,05$ (5%). Rozdíl mezi těmito skupinami nebyl signifikantní.

Můžeme tedy konstatovat, že genotyp BBDD je asociován s diabetem 2. typu, ale nemá prediktivní hodnotu, podle které bychom mohly předpovědět, zda se u diabetika rozvinou ledvinové komplikace. Naopak alely *b* a *d* mají protektivní roli před rozvojem diabetu 2. typu. Kanzawa *et al.* ve své práci porovnávali vztah mezi výše zmíněnými polymorfizmy a rozvojem primární hyperparathyreózy, nezaznamenali však rozdíl ve frekvenci *PTH* genotypů mezi zdravými kontrolami a pacienty s primární

hyperparathyreózou (KANZAWA *et al.* 1999). Rovněž Gohda *et al.* nezaznamenali ve své studii rozdíl ve frekvenci *PTH* genotypů mezi hemodialyzovanými pacienty se sekundární hyperparathyreózou a zdravými kontrolami (GOHDA *et al.* 2002).

V dalším experimentu jsme chtěli ověřit, zda exprese mRNA koreluje s určitou kombinací genotypu *VDR*. V rámci pilotní studie jsme vybrali 13 pacientů s diabetickou nefropatií a 6 zdravých jedinců, kteří sloužili jako kontrolní skupina. Vzhledem k nedostupnosti bioptických vzorků tkáně ledvin, byly pro izolaci mRNA zvoleny mononukleární buňky z periferní krve PBMC.

Expresa mRNA *VDR* u pacientů s diabetickou nefropatií byla prokazatelně zvýšená oproti kontrolní skupině. To potvrzuje naše domněnky, neboť porušený kalciofosfátový metabolismus v ledvinách, organizmus kompenzuje tím, že dochází ke zvýšené expresi receptoru pro vitamín D. Korelaci mezi hladinou mRNA a kombinací genotypů *VDR* se nám potvrdit nepodařilo. Ve skupině 13 pacientů s DN jsme diagnostikovali téměř samé heterozygoty. Hodnota exprese mRNA byla odlišná pouze u 2 pacientů s DN, ale ani u nich nebyla nalezena odlišná kombinace genotypu *VDR*.

Pro tento experiment by bylo přínosné, kdybychom expresi mRNA *VDR* stanovovali z biopsií ledvin. Tento materiál je jen těžko dostupný, neboť není etické získávat bioptický materiál pouze pro vědecké účely. Od těchto 13 pacientů s diabetickou nefropatií jsem zároveň izolovala mononukleární buňky periferní krve. Tuto studii plánujeme rozšířit o kvantitativní stanovení hladiny proteinu *VDR* v periferní krvi pomocí metody ELISA.

6. Souhrn

V rámci diplomové práce jsem vyšetřila 4 alelové polymorfizmy genu *VDR* a 2 alelové polymorfizmy genu *PTH*. V genu *VDR* jsem analyzovala polymorfizmy: *Bsm I*, *Fok I*, *Apa I*, *Taq I*, v genu *PTH* *Bst BI* a *Dra II*.

- Ukázala jsem, že alela F je signifikantně zvýšená u pacientů s DN a DM 1.
- Ze statistického vyhodnocení frekvence alely T lze usuzovat, že alela T je predispoziční pro DM 2.
- Prokázala jsem významnost alely B pro rozvoj diabetické nefropatie.
- Genotyp DD je statisticky významný pro skupinu DM 1, DM 2, DN i NDRD.

Porovnála jsem kombinace genotypů v rámci genů *VDR* a *PTH* mezi vybranými skupinami pacientů a kontrolní skupinou, dále jsem porovnála skupiny pacientů s diabetickou nefropatií a diabetem 2. typu.

- Nalezla jsem statisticky významný genotyp, který splňuje podmínku $P < 0,05$. Genotyp BBFFAATt je predispoziční pro diabetickou nefropatii.
- Genotyp BbFFAaTt svědčí pro rozvoj diabetické nefropatie u pacientů s DM 2.
- Genotyp BBDD je asociován s DM 2 a DN, ale nelze ho využít v prediktivní diagnostice rozvoje diabetických komplikací.
- Zdá se že, že genotyp bbDd má protektivní roli před rozvojem diabetu 2. typu a jeho komplikacemi.

Určila jsem hladinu genové exprese *VDR* pomocí kvantitativní RT – PCR v plné krvi u skupiny pacientů s diabetickou nefropatií a kontrolní skupinou.

- Exprese mRNA *VDR* u pacientů s diabetickou nefropatií je prokazatelně zvýšená oproti kontrolní skupině.
- Nepodařilo se nám potvrdit korelaci mezi genotypem a hladinou exprese mRNA *VDR*.

7. Seznam literatury

1. Andělová K. (2003): Diabetes a těhotenství. In: Bartoš V., Pelikánová T. (eds): Praktická diabetologie. 3. vydání, Maxdorf, Praha, 358 – 361.
2. Awazu M., Ishikura K., Hida M., Hoshiya M. (1999): Mechanisms of Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Experimental Diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology* 10: 738-745.
3. Baker A.R., McDonnell D.P., Hughes M., Crisp T., Mangelsdorf D.J., Haussler M.R., Pike J.W., Shine J., O'Malley B.W. (1988): Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Biochemistry* 85: 3294 – 3298.
4. Baynes J.W., Thorpe S.R. (1999): Perspectives in diabetes. Role of Oxidative Stress in Diabetic complications. A New Perspective on an Old Paradigm. *Diabetes* 48: 1 - 9.
5. Bierhaus A., Schiekofer S., Schwaninger M., Andrassy M., Humpert P.M., Chen J., Hong M., Luther T., Henle T, Klötting I., Morcos M., Hofmann M., Tritschler H., Weigle B., Kasper M., Smith M., Perry G., Marie Schmid A.-M., Stern D.M., Häring H.-L., Schleicher E., Nawroth P.P. (2001): Diabetes-Associated Sustained Activation of the Transcription Factor Nuclear Factor- κ B. *Diabetes* 50: 2792 - 2808.
6. Bingham P., Brazell I.A., Owen M. (1969): The effect of parathyroid extract on cellular activity and plasma calcium levels in vivo. *Journal of Endocrinology* 45: 387 - 400.
7. Blum M., Yachnin T., Wollman Y., Chernihovsky T., Peer G., Grosskopf I., Kaplan E., Silverberg D., Cabili S., Iaina A. (1998): Low Nitric Oxide Production in Patients with Chronic Renal Failure. *Nephron* 79: 265 - 268.
8. Boonstra A., Barrat F.J., Crain C., Heath V.L., Savelkoul H.F., O'Garra A. (2001): 1 alpha, 25-Dihydroxyvitamin D₃ has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *The Journal of Immunology* 167: 4874 - 4980.
9. Bouillon R., Carmeliet G., Verlinden L., van Etten E., Verstuyf A., Luderer H.F., Lieben L., Mathieu Ch., Demay M. (2008): Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. *Endocrine Reviews* 29: 726 – 776. 10.
10. Brownlee M. (2005): The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism. *Diabetes* 54: 1615 - 1625.
11. Carling T., Rastad J., Åkerström G., Westin G. (1998): Vitamin D Receptor (VDR) and Parathyroid Hormone Messenger Ribonucleic Acid Levels Correspond to Polymorphic VDR Alleles in Human Parathyroid Tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83: 2255 - 2259.

12. Cohen M.P., Urdanivia E., Surma M., Wu V.Y. (1980): Increased glycosylation of glomerular basement membrane collagen in diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 95: 765 - 769.
13. D'Ambrosio D., Cippitelli M., Cocciolo M.G., Di Lucia P., Lang R., Sinigaglia F., Panina – Bordignon P. (1998): Inhibition of IL- 12 production by 1, 25 – dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF – kappa B downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *Journal of clinical investigation* 101: 252 – 262.
14. Ditzel J., Junker K. (1972): Abnormal Glomerular Filtration Rate, Renal Plasma Flow, and Renal Protein Excretion in Recent and Short-term Diabetics. *British Medical Journal* 2: 13 - 19.
15. Dogan I., Onen H.I., Yurdakul A.S., Konac E., Ozturk C., Varol A., Ekmekci A. (2009): Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and risk of lung cancer. *Medical Science Monitor* 15: 232 – 242.
16. Drueke T.B. (2001): Genetic Aspect of Secondary Hyperparathyroidism in Uremia. *American Journal of Kidney Disease* 38: 143 - 146.
17. Eldor R., Yeffet A., Baum K., Doviner V., Amar D., Ben-Neriah Y., Christofori G., Peled A., Carel J.C., Boitard C., Klein T., Serup P., Eizirik D.L., Melloul D. (2006): Conditional and specific NF- κ B blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents. *PNAS* 103: 5072 - 5077.
18. Finkel T., Holbrook N.J. (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239 - 247.
19. Frye E.B., Degenhardt T.P., Thorpe S.R., Baynes J.W. (1998): Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product – dependent increase in imidazolium cross- links in human lens proteins. *Journal of Biological Chemistry* 273: 18714 – 18719.
20. Gabbay K.H. (1973): The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *New England Journal of Medicine* 288: 831 - 836.
21. Garabedian M., Holick M.F., Deluca H.F., Boyle I.T. (1972): Control of 25 hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands. *Cell Biology* 69: 1673 – 1676.
22. Garcia – Lozano J.R., Gonzales – Escribano F., Valenzuela A., Garcia A., Nunez – Roldán A. (2001): Association of vitamin D receptor genotypes with early onset rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunogenetics* 28: 89 – 93.

23. Garnero P., Munoz F., Borel O., Sornay-Rendu E., Delmas P.D. (2005): Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with the Risk of Fractures in Postmenopausal Women, Independently of Bone Mineral Density. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90: 4829 - 4835.
24. Giannini S., D'Angelo A., Nobile M., Carraro G., Rigotti P., Silva-Netto F., Pavan S., Marchini F., Zaninatto M., Carbonare L.D., Sartori L., Crepaldi G. (2002): The Effects of Vitamin D Receptor Polymorphism on Secondary Hyperparathyroidism and Bone Density After Renal Transplantation. *Journal Of Bone and Mineral Research* 17: 1768 - 1773.
25. Gohda T., Shou I., Fukui M., Funabiki K., Horikoshi S., Shirato S., Tomino Y. (2002): Parathyroid Hormone, Gene Polymorphism and Secondary Hyperparathyroidism in Hemodialysis Patients. *American Journal of Kidney Disease* 39: 1255 - 1260.
26. Goswami R., Mohapatra T., Gupta N., Rani R., Tomar N., Dikshit A., Sharma R.K.(2004): Parathyroid Hormone Gene Polymorphism and Sporadic Idiopathic Hypoparathyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89: 4840 -4845.
27. Greenwald I., Gross J. (1925): The effect of the administration of a potent parathyroid extract upon the excretion of nitrogen, phosphorus, calcium and magnesium, with some remarks on the solubility of calcium phosphate in serum and on the pathogenesis of tetany. *Journal of Biological Chemistry* 66: 217 – 227.
28. Gunes S., Sumer A.P., Keles G.C., Kara N., Koprulu H., Bagci H., Bek Y. (2008): Analysis of vitamin D receptor polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *Indian Journal of Medical Research* 127: 58 – 64.
29. Ha S.K., Park H.Ch., Park H.S., Kang B.S., Lee T.H., Hwang H.J., Kim S.J., Kim D.H., Kang S.W., Choi K.H., Lee H.Y., Han D.S. (2003): ACE Gene Polymorphism and Progression of Diabetic Nephropathy in Korean Type 2 Diabetic Patients: Effect of ACE Gene DD on the Progression of Diabetic Nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases* 41: 943 - 949.
30. Haddad J.G., Matsuoka L.Y., Hollis B.W., Hu Y.Z., Wortsman J. (1993): Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *Journal of Clinical Investigation* 91: 2552 – 2555.
31. Hall J.E., Brands M.W., Henegar J.R., Shek E.W. (1998): Abnormal kidney function as a cause and a consequence of obesity hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 25: 58 - 64.
32. Harden P.H., Geddes C., Rowe P.A., McIlroy J.H., Boulton-Jones M., Rodger R.S.C., Junor B.J.R., Briggs J.D., Connell J.M.C., Jardine A.G. (1995): Polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene and progression of IgA nephropathy. *The Lancet* 345: 1540 - 1542.

33. Haussler M.R., Whitfield G.K., Haussler C.A., Hsieh J.C., Thompson P.D., Selznick S.H., Dominguez C.E., Jurutka P.W. (1998): The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *Journal of Bone Mineral Research* 13: 325 - 49.
34. Heimberg H., Heremans Y., Jobin Ch., Leemans R., Cardozo A.K., Darville M., Eizirik D.L. (2001): Inhibition of Cytokine-Induced NF- κ B Activation by Adenovirus Mediated Expression of a NF- κ B Super-Repressor Prevents β -Cell Apoptosis. *Diabetes* 50: 2219 - 2224.
35. Hoare S.R.J. (2005): Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug Discovery Today* 10: 417 - 427.
36. Hodginson A.D., Millward B.A., Demaine A.G. (2001): Polymorphism of the glucose transporter (GLUT 1) gene are associated with diabetic nephropathy. *Kidney International* 59: 985 - 989.
37. Holick M.F. (1996): Vitamin D and Bone Health. *Journal of Nutrition* 126: 1159 - 1164.
38. Holick M.F. (2004): Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 80: 1678 - 1688.
39. Houston L.A., Grant S.F.A., Reid D.M., Ralston S.H. (1996): Vitamin D receptor polymorphism, bone mineral density, and osteoporotic vertebral fracture: Studies in a UK population. *Bone* 18: 249 - 252.
40. Chang T.J., Lei H.H., Yeh J.I., Chiu K.C., Lee K.Ch., Chen M.Ch., Tai T.Y., Chuang L.M. (2000): Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clinical Endocrinology* 52: 575 - 580.
41. Chen S., Sims G.P., Chen X.X., Gu Y.Y., Chen S., Lipsky P.E. (2007): Modulator Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ on Human B Cell Differentiation. *The Journal of Immunology* 179: 1634 - 1647.
42. Choi M.J., Jun J.K., Choe J., Hwang D., Park S.H., Ku S.Y., Kang D., Kim J.G., Moon S.Y., Lee J.Y. (2000): Association of the vitamin D receptor start codon polymorphism (*Fok* I) with bone mineral density in postmenopausal Korean women. *Journal Of Human Genetics* 45: 280 - 283.
43. Imperatore G., Hanson R.L., Pettitt D.J., Kobes S., Bennett P.H., Knowler W.C. (1998): Sib-pair linkage analysis for susceptibility genes for microvascular complications among Pima Indians with type 2 diabetes. *Pima Diabetes Genes Group. Diabetes* 47: 821 - 830.
44. Inaba M., Nagasue K., Okuno S., Ueda M., Kumeda Y., Imanishi Y., Shoji T., Ishimura E., Ohta T., Nakatani T., Kim M., Nishizawa Y. (2002): Impaired Secretion of Parathyroid hormone, But Not Refractoriness of Osteoblast, Is a

Major Mechanism of Low Bone Turnover in Hemodialyzed Patients With Diabetes Mellitus. *American Journal of Kidney Diseases* 39: 1261 – 1269.

45. Ishii H., Koya D., King G.L. (1998): Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Journal of Molecular Medicine* 76: 21 - 31.
46. Israni N., Goswami R., Kumar A., Rani R. (2009): Interaction of Vitamin D Receptor with HLA DRB1 0301 in Type 1 Diabetes Patients from North India. *PLoS ONE* 4: 8023.
47. Juppner H., Abou-Samra A.B., Freeman M., Kong X.F., Schipani E., Richards J., L.F.Kolakowski, Hock J., Potts J.T., Kronenberg H.M. (1991): A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 254: 1024 - 1026.
48. Jurutka P.W., Remus L.S., Whitfield K.G., Thompson P.D., Hsieh J.C., Zitzer H., Tavakkoli P., Galligan M.A., Dang H.T., Haussler C.A., Haussler M.R. (2000): The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Molecular Endocrinology* 14: 401 - 420.
49. Kanzawa M., Sugimoto T., Kobayashi A., Chihara K. (1999): Parathyroid hormone gene polymorphisms in primary hyperparathyroidism. *Clinical Endocrinology* 50: 583 - 588.
50. Kone B.C., Baylis C. (1997): Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *American Journal of Physiology* 41: 561– 578.
51. Lemire J. M., Adams J. S., Saka R., Jordan S. C. (1984): 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Clinical Investigation* 74: 657 – 661.
52. Liberopoulos E., Siamopoulos K., Elisaf M. (2004): Apolipoprotein E and Renal Disease. *American Journal of Kidney Diseases* 43: 223 - 233.
53. Liu E., Meigs J.B., Pittas A.G, Economos Ch.D., McKeown N.M., Booth S.L., Jacques P.F. (2010): Predicted 25 – hydroxyvitamin score and incident type 2 diabetes in the Framingham Offspring Study. *American Journal of Clinical Nutrition* 91: 1627 – 1633.
54. Liu L., Xiang K., Zheng T., Zhang T., Li M., Wang Y., Lu H., Li J. (2003): The heparan sulfate proteoglycan gene polymorphism: Association with type 2 diabetic nephropathy in Chinese. *Molecular and Cellular Biochemistry* 245: 121 - 126.
55. Locatelli E., Canaud B., Eckardt K.U., Stenvinkel P., Wanner CH., Zoccali C. (2003): The importance of diabetic nephropathy in current nephrological practice. *Nephrology Dialysis Transplantation* 18: 1716 – 1725.

56. Makishima M., Lu T.T., Xie W., Whitfield G.K., Domoto H., Evans R.M., Haussler M.R., Mangelsdor D.J. (2002): Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 296: 1313 - 1316.
57. Marshall S., Bacote V., Traxinger R.R. (1991): Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry* 266: 4706 - 4712.
58. Mathieu Ch., van Ettena E., Decallonnea B., Guiliettia A., Gysemansa C., Bouillona R., Overbergh L. (2004): Vitamin D and 1,25 - dihydroxyvitamin D₃ as modulators in the immune system. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 89-90: 449 - 452.
59. McDermott M.F., Ramachandran A., Ogunkolade B.W., Aganna E., Curtis D., Boucher B.J., Snehaltha C., Hitman G.A. (1997): Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia* 40: 971 – 975.
60. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988): A simple salting out procedure extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215 - 1215.
61. Miura J., Yamagishi S., Uchigata Y., Takeuchi M., Yamamoto H., Makita Z., Iwamoto Y. (2003): Serum levels of non-carboxymethyllysine advanced glycation endproducts are correlated to severity of microvascular complications in patients with Type 1 diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications* 17: 16 – 21.
62. Miyamoto K., Kesterson R.A., Yamamoto H., Taketani Y., Nishiwaki E., Tatsumi S., Inoue Y., Morita K., Takeda E., Pike J.W. (1997): Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Molecular Endocrinology* 11: 1165 - 1179.
63. Mora J.R., Iwata M., von Andrian U.H. (2008): Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature Review Immunology* 8: 685 – 698.
64. Nagaba Y., Heishi M., Tazawa H., Tsukamoto Y., Kobayashi Y. (1998): Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Affect Secondary Hyperparathyroidism in Hemodialyzed Patients. *American Journal of Kidney Diseases* 32: 464 – 496.
65. Neamat- Allah M., Freeney S.A., Savaget D.A., Maxwell A.P., Hanson R.L., Knowler W.C., El Nahas A.M., Plater M.E., Shaw J., Boulton A.J.M., Duff G.W., Cox A. (2001): Analysis of the association between diabetic nephropathy and polymorphisms in the aldose reductase gene in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 18: 906 - 914.

66. Nejentsev S., Howson J.M.M, Walker N.M., Szeszko J., Field S.F., Stevens H.E., Reynolds P., Hardy M., King E., Masters J., Hulme J., Maier L.M., Smyth D., Bailey R., Cooper J.D., Ribas G., Campbell R.D., The Wellcome Trust Case Control Consortium, Clayton D.G., Todd J.A. (2007): Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes *HLA-B* and *HLA-A*. *Nature* 450: 887 - 892.
67. Nelson R.G., Tan M, Beck G.J., Bennet P.H., Knowler W.C., Mitch W.E., Blouch K., B.D. Myers B.D. (1999): Changing glomerular filtration with progression from impaired glucose tolerance to Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 42: 90 - 93.
68. Nessar Ahmed (2005): Advanced glycation endproducts- role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practise* 67: 3 – 21.
69. Neugebauer S., Baba T., Watanabe T. (2000): Association of the nitric oxide synthase gene polymorphism with an increased risk for progression to diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 49: 500 - 503.
70. Noble J.A., Valdez A.E., Cook M., Klitz W., Thomson G., Erlich H.A. (1996): The Role of HLA Class II Genes in Insulin-Dependent Diabetes. *American Journal of Human Genetics* 59: 1134 - 1148.
71. Obšil T., Pavlíček Z. (1997): Glykace proteinů a fosfolipidů: Maillardova reakce in vivo. *Chemické Listy* 91, 558 - 569 .
72. Ortola F.V., Ballermann B.J., Anderson S., Mendez A.S., Brenner B.M. (1987): Elevated Plasma Atrial Natriuretic Peptide Levels in Diabetic Rats. *American Society for Clinical Investigation* 80: 670 - 674.
73. Overbergh L., Decallonne B., Valckx D., Verstuyf A., Depovere J., Laureys J., Rutgeerts O., Saint-Arnaud R., Bouillon R., Mathieu C. (2000): Identification and immune regulation of 25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase in murine macrophages. *Clinical and Experimental Immunology* 120(1): 139 - 46.
74. Overbergh L., Decallonne B., Waer M., Rutgeerts O., Valckx D., Casteels K.M., Laureys J., Bouillon R., Mathieu C. (2000): 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543). *Diabetes* 49(8): 1301 - 1307.
75. Pani M.A., Knapp M., Donner H., Braun J., Baur M.P., Usade H.K., Badenhoop K. (2000): Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes* 49: 504 - 507.
76. Pavkov M.E., Knowler W.C., Hanson R.L., Nelson R.G. (2008): Diabetic nephropathy in American Indians, with a special emphasis on the pima Indians. *Current Diabetes Reports* 8: 486 - 493.
77. Pelikánová T. (2003): Klasifikace a patogeneze diabetu. In: Bartoš V., Pelikánová T. (eds.): *Praktická diabetologie*. 3. vydání, Maxdorf, Praha, 47 – 53.

78. Ponsonby A.L., Pezis A., Ellis J., Morley R., Cameron F., Carlin J., Dwyer T. (2008): Variation in association between allelic variation of the vitamin D receptor gene and onset of type 1 diabetes mellitus by ambient winter ultraviolet radiation levels: a meta-regression analysis. *American Journal of epidemiology* 168: 358 - 365.
79. Rajakumar K. (2003): Vitamin D, Cod-Liver Oil, Sunlight, and Rickets: A Historical Perspective. *Pediatrics* 112: 132 - 135.
80. Raynolds M.V., Briston M.R., Bush E.V., Abraham W.T., Lowes B.D., Zisman L.S., Taft C.S., Perryman M.B. (1993): Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 342: 1073 - 1075.
81. Riachy R., Vandewalle B., Belaich S., Kerr-Conte J., Gmyr V., Zerimech F., d'Herbomez M., Lefebvre J., Pattou F. (2001): Beneficial effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on cytokine-treated human pancreatic islets. *Journal of Endocrinology* 169: 161 - 168.
82. Rigat B., Hubert Ch., Alhens-Gelas F., Cambien F., Corvol P., Soubrier F. (1990): An Insertion/ Deletion Polymorphism In the Angiotensin I-converting Enzyme Gene Accounting for Half the Variance of Serum Enzyme Gene. *Journal of Clinical Investigation* 86: 1343 - 1346.
83. Rigby W.F., Stacy T., Fanger M.V. (1984): Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25 - dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). *Journal of Clinical Investigation* 74(4):1451–1455.
84. Rucevic I., Barisic – DruscoV., Glavas – Obrovac L., Stefanic M. (2009): Vitamin D endocrine system and psoriasis vulgaris - review of the literature. *Acta Dermatovenerologica Croatica* 17: 187 - 192.
85. Rychlík I. (2005): Klinický obraz a fáze diabetické nefropatie. In: Rychlík I., Tesař V. a kol. (eds.): *Onemocnění ledvin u diabetes mellitus*. Horizonty diabetologie, díl 2,1. vydání. TIGIS, spol. s.r.o., Praha, 139 – 141.
86. Rychlík I., Tesař V. (2005): Základní rozdělení onemocnění ledvin u diabetiků. In: Rychlík I., Tesař V. a kol. (eds.): *Onemocnění ledvin u diabetes mellitus*. Horizonty diabetologie, díl 2.,1. vydání. TIGIS, spol. s.r.o., Praha, 21 - 22.
87. Sainz J., Van Tornout J.M., Loro M.L., Sayre J., Roe T.F., Gilsanz V. (1997): Vitamin D-receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal American girls of Mexican descent. *The New England Journal of Medicine* 337: 77 - 82.
88. Santamaria P. (2010): The long and winding road to understanding and conquering type 1 diabetes. *Immunity* 32: 437 - 45.

89. Sedláček J. (2003): Fyziologie vylučování. In: Trojan S. a kol. (eds.): Lékařská fyziologie. 4. vydání, Graga Publishing, Praha 2004, 451 – 454.
90. Schunkert H., Hense H.V., Holmer S.R., Stender M., Perz S., Keil U., Lorell B.H., Riegger G.A.J. (1994): Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *New England Journal of Medicine* 330: 1634 - 1638.
91. Smidtke J., Pape B., Kregel U., Lagenberg U., Cooper D.N., Breyel E., Mayer H. (1984): Restriction fragment length polymorphisms at the human parathyroid hormone gene locus. *Human genetics* 67: 428 - 431.
92. Suarez F., Zeghoud F., Rossignol C., Walrant O., Garabédian M. (1997): Association between vitamin D receptor gene polymorphism and sex-dependent growth during the first two years of life. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82: 2966 - 2970.
93. Šeda O. (2005): Genetika diabetu. In: Perušičová J. (ed): *Diabetologie 2005*. 1. vydání, Triton s.r.o., Praha, 91 – 95.
94. Škrabič V., Zemunik T., Šitum M., Terzič J. (2003): Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in the Dalmatian population. *Diabetes Research and Clinical Practice* 59: 31 - 35.
95. Tanaka Y., Castillo L., Deluca H.F. (1977): The 24 - hydroxylation of 1,25 dihydroxyvitamin D₃. *Journal of Biological Chemistry* 252: 1421 – 1424.
96. ÚZIS ČR (2010): Aktuální informace Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky 23: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/cinnost-oboru-diabetologie-pece-diabetiky-roce-2010>.
97. Van Etten E., Decallonnea B., Bouillona R., Mathieu Ch. (2004): NOD bone marrow-derived dendritic cells are modulated by analogs of 1,25 - dihydroxyvitamin D₃, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 89-90: 457 – 459.
98. van Etten E., Verlinden L., Giulietti A., Ramos-Lopez E., Branisteanu D.D., Ferreira G.B., Overbergh L., Verstuyf A., Bouillon R., Roep B.O., Badenhoop K., Mathieu C (2007) The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *European journal of immunology* 37: 395 - 405.
99. Vasicek T.J., McDevitt B.E., Freeman M.W., Fennick B.J, Hendy G.N., Potts J.T., Rich A., Kronenberg H.M.(1983): Nucleotide sequence of the human parathyroid hormone gene. *Biochemistry* 80: 2127 - 2131.
100. Wang Y., Kikuchi S., Suzuki H., Nagase S., Koyama A. (1999): Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in intron 4 affects the progression of renal failure in non-diabetic renal diseases. *Nephrology Dialysis Transplantation* 14: 2898 - 2902.

101. Wenzlau J.M., Juhl K., Yu L., Moua O., Sarkar S.A., Gottlieb P., Rewers M., Eisenbarth G.S., Jensen J., Davidson H.W., Hutton J. (2007): The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *PNAs* 104: 1704 - 17045.
102. Williamson J. R., Chang K., Frangos M , Hasan K.S., Ido Y., Kawamura T., Nyengaard J.R., van den Enden M., Kilo C., Tilton R.G.(1993): Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42: 801 - 813.
103. World Health Organisation (1999): Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complication. Report of a WHO Consultation, Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva: World Health Organisation.
104. Zeitz U., Weber K., Soegiarto D.W., Wolf E., Balling R., Erben R.G. (2003): Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB Journal* 17: 509 - 11.
105. Zhang Z., Sun L., Wang Y., Ning G., Minto A.W., Kong J., Quigg R.J. and Li Y.C. (2007): Renoprotective role of the vitamin D receptor in diabetic nephropathy. *Kidney International* 73, 163 – 171.
106. Ziyadeh F.N., Sharma K., Ericksen M., Wolf G. (1994): Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth faktor-beta. *Journal of Clinical Investigation* 9: 536 - 542.