



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

## Molekulárně genetická vyšetření predispozic Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

**Autor:** Natálie Roubíková

**Vedoucí práce:** Ing. Aneta Zlámalová

České Budějovice 2023

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Molekulárně genetická vyšetření predispozic Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2. 5. 2023

.....

Podpis

## **Poděkování**

Tímto bych velice ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce paní Ing. Anetě Zlámalové za její veškerou pomoc, odborné vedení a cenné rady v průběhu psaní a také za veškerou trpělivost a čas, který se mnou strávila v laboratoři při plnění mé metodiky. Dále bych ráda poděkovala všem probandům, kteří byli ochotni poskytnout mi své vzorky, a v neposlední řadě moc děkuji své úžasné rodině a přátelům za pevné nervy a veškerou podporu po celou dobu mého studia.

# Molekulárně genetická vyšetření predispozic Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy

## Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na idiopatické střevní záněty, do kterých řadíme Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu. Jedná se o chronická zánětlivá onemocnění střev, u kterých je zaznamenáno několik příčin. Dle studií lze říci, že nejčastěji k rozvoji dochází díky genetické predispozici, vnějším vlivům jako je například stres a kouření, také díky infekci a v některých případech i díky odchýlné reaktivitě imunitního systému vůči součástí vlastnímu střevnímu mikrobiomu.

Genetika těchto nemocí není dodnes přesně objasněna, ale je jisté, že genetické faktory jsou více patrné u Crohnovy choroby než u ulcerózní kolitidy. Nejčastějšími geny, které jsou spojovány s rozvojem idiopatických střevních zánětů jsou geny *NOD2/CARD15*, *NOD1/CARD4* a *ICAM-1*. Je známo, že z těchto genů se gen *NOD2/CARD15* podílí spíše na rozvoji Crohnovy choroby a gen *ICAM-1* na rozvoji ulcerózní kolitidy.

V metodické části se má bakalářská práce zabývat prokázáním alespoň jedné příslušné mutace genu u 12 probandů, z nichž šest trpělo Crohnovou chorobou, tři ulcerózní kolitidou a u tří se jednalo o zdravé jedince, kteří byli v příbuzenském vztahu s nemocnými. U příslušného rozboru vzorků došlo k vyzolování čisté genomové DNA, která byla využita k metodě PCR, díky které došlo k amplifikaci specifického úseku genu. PCR produkty byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy, následně enzymaticky přečištěny a osekvenovány firmou GenSeq.

Nakonec došlo k ověření a vyhodnocení příslušných sekvencí pomocí internetového nástroje BLAST, internetové databáze GenBank a programu Geneious Prime. Díky tomu byla prokázána mutace genu ve dvou případech – *NOD1/CARD4 (D372N)* a *ICAM-1 (K469E)*.

## Klíčová slova

Idiopatické střevní záněty; Crohnova choroba; ulcerózní kolitida; genetické predispozice; izolace DNA; PCR; elektroforéza; sekvenace DNA

# **Molecular analysis of genetic predispositions to Crohn's disease and ulcerative colitis**

## **Abstract**

This bachelor thesis focuses on idiopathic inflammatory bowel diseases, which include Crohn's disease and ulcerative colitis. These are chronic inflammatory diseases of the intestines caused by several causes. Studies have shown that the development of these diseases is most commonly due to genetic predisposition, external factors such as stress and smoking, infection, and in some cases, an abnormal immune system reactivity to components of the gut microbiome.

The genetics of these diseases have not yet been fully elucidated, but it is clear that genetic factors are more apparent in Crohn's disease than in ulcerative colitis. The most common genes associated with the development of idiopathic inflammatory bowel diseases are NOD2/CARD15, NOD1/CARD4, and ICAM-1. It is known that the NOD2/CARD15 gene is more involved in the development of Crohn's disease, while the ICAM-1 gene is more involved in the development of ulcerative colitis.

In the methodological part, this thesis aims to demonstrate at least one relevant gene mutation in 12 probands, of whom six suffered from Crohn's disease, three from ulcerative colitis, and three were healthy individuals who were related to the affected individuals. The relevant genomic DNA was isolated from the samples and used in the PCR method to amplify a specific gene segment. The PCR products were visualized using gel electrophoresis, then enzymatically purified and sequenced by the GenSeq company.

Finally, the relevant sequences were verified and evaluated using the BLAST internet tool, the GenBank internet database, and the Geneious Prime program. As a result, a gene mutation was demonstrated in two cases - NOD1/CARD4 (D372N) and ICAM-1 (K469E).

## **Key words**

Idiopathic inflammatory bowel diseases; Crohn's disease; ulcerative colitis; genetic predisposition; DNA isolation; PCR; electrophoresis; DNA sequencing

## Obsah

1	Úvod.....	8
2	Anatomie tenkého a tlustého střeva .....	9
2.1	Tenké střevo.....	9
2.1.1	Dvanáctník (duodenum) .....	9
2.1.2	Lačník (jejunum).....	9
2.1.3	Kyčelník (ileum).....	9
2.2	Tlusté střevo.....	10
2.2.1	Slepé střevo (caecum).....	11
2.2.2	Tračník (colon) .....	11
2.2.3	Konečník (rectum) .....	12
3	Střevní mikrobiom .....	13
4	Idiopatické střevní záněty .....	15
5	Crohnova choroba.....	16
5.1	Symptomy .....	16
5.2	Průběh onemocnění.....	17
6	Ulcerózní kolitida .....	18
6.1	Symptomy .....	18
6.2	Průběh onemocnění.....	19
7	Etiologické faktory vzniku idiopatických střevních zánětů.....	20
7.1	Genetické faktory.....	20
7.2	Geny pro Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu .....	20
7.3	Faktory vnějšího prostředí .....	23
7.4	Infekce .....	23
8	Komplikace idiopatických střevních zánětů .....	24
8.1	Střevní komplikace .....	24
8.2	Mimostřevní komplikace .....	26
9	Diagnostika a léčba idiopatických střevních zánětů .....	30
9.1	Diagnostika IBD .....	30
9.2	Léčba IBD.....	31
10	Cíle práce .....	33
11	Metodika .....	34
11.1	Izolace DNA .....	34
11.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	36

11.3	Elektroforéza.....	39
11.4	Enzymatické přečištění PCR produktu .....	40
11.5	Sekvence DNA.....	40
12	Výsledky .....	41
12.1	NOD2/CARD15.....	41
12.1.1	R702W .....	41
12.1.2	G908R.....	43
12.1.3	1007fs.....	44
12.2	ICAM-1.....	45
12.2.1	K469E .....	45
12.2.2	G241R.....	47
12.3	NOD1/CARD4.....	48
12.3.1	D372N.....	48
12.3.2	E266K .....	50
13	Diskuze .....	52
14	Závěr .....	55
15	Seznam literatury .....	56
16	Seznam obrázků.....	65
17	Seznam tabulek .....	67
18	Seznam použitých zkratk .....	68

# 1 Úvod

Crohnova choroba a ulcerózní kolitida jsou chronické autoimunitní záněty trávicího traktu, které se dohromady nazývají jako idiopatické střevní záněty. Jejich průběh je charakterizován remisemi a recidivami po celou dobu trvání nemoci. Mezi těmito chorobami je hlavní rozdíl v rozsahu postižení trávicího traktu. U Crohnovy choroby dochází k postižení kterékoliv části trávicí trubice a u ulcerózní kolitidy je postižena pouze poslední část tlustého střeva a konečník. Jedná se o onemocnění, u kterých není zcela jasná příčina. Dle studií lze potvrdit, že nejčastěji hraje roli genetická predispozice, vnější vlivy jako například stres a kouření, dále je možný vliv infekce a v některých případech mohou tato onemocnění vzniknout díky odchylné reaktivitě imunitního systému vůči součástem vlastního střevního mikrobiomu.

Z genetického hlediska se jedná o onemocnění, která se mohou rozvíjet díky genům *NOD2/CARD15*, *NOD1/CARD4* a *ICAM-1*. Gen *NOD2/CARD15* má více jak 60 sekvenčních variant, ale pouze 3 hlavní jsou spojovány s rozvojem onemocnění – *R702W*, *G908R* a *I007fs*. Tyto varianty jsou spojovány s Crohnovou chorobou, nikoliv s ulcerózní kolitidou. U ulcerózní kolitidy je spojován s rozvojem spíše gen *ICAM-1*, respektive jeho varianty *G241R* a *K469E*. U genu *NOD1/CARD4* se s rozvojem spojují varianty *D372N* a *E266K*. Existuje ale také možnost, že se u pacienta trpícího jedním z idiopatických střevních zánětů nemusí ani jedna z mutací genů objevit.

Cílem této práce je na vybraném vzorku pacientů s již propuknutou Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou a několika jejich zdravých rodinných příslušnících ověřit, zda je možné zmíněnou mutaci genů pozorovat, případně zda zdraví rodinní příslušníci pacientů danou mutaci nesou také.



## 2 Anatomie tenkého a tlustého střeva

### 2.1 Tenké střevo

Tenké střevo (*intestinum tenue*) je nejdelší část trávicí trubice, která navazuje na žaludek (Obrázek 1). Jeho délka je přibližně 3–5 m a jeho šířka 3–4 cm (Lukáš et al., 2005). Dělí se na tři části – dvanáctník (*duodenum*), lačník (*jejunum*), kyčelník (*ileum*) (Křivánková a Hradová, 2009).

#### 2.1.1 Dvanáctník (*duodenum*)

Jedná se o první a zároveň nejkratší část tenkého střeva, jeho délka je asi 25–30 cm nebo také 12 palců – odtud jeho název (Lukáš et al., 2005). Narozdíl od jejuna a ilea jde o nepohyblivou část tenkého střeva (Hůna, 2013). Má velmi variabilní tvar, může vypadat jako nepravidelná podkova, v jehož vyklenutí je uložena hlava slinivky břišní, nebo jako písmeno U, V nebo L (Dylevský, 2009; Křivánková a Hradová, 2009) (Obrázek 1). Sliznice duodena je pokryta jednovrstevným cylindrickým epitelem, který má resorpční schopnost. Představuje četné a vysoké cirkulární řasy, které jsou pokryty klky (Lukáš a Hoch, 2018). Hlavní funkcí duodena je řízení trávicích dějů pomocí tvorby a vylučování místních hormonů. Tyto hormony ovlivňují pohyblivost stěn a vyměšování žlázek žaludku a střev, funkci vrátníkové pumpy, která umožňuje přesun tráveniny ze žaludku do dvanáctníku a vyměšování slinivkové šťávy a žluči z jater (Kachlík, 2018).

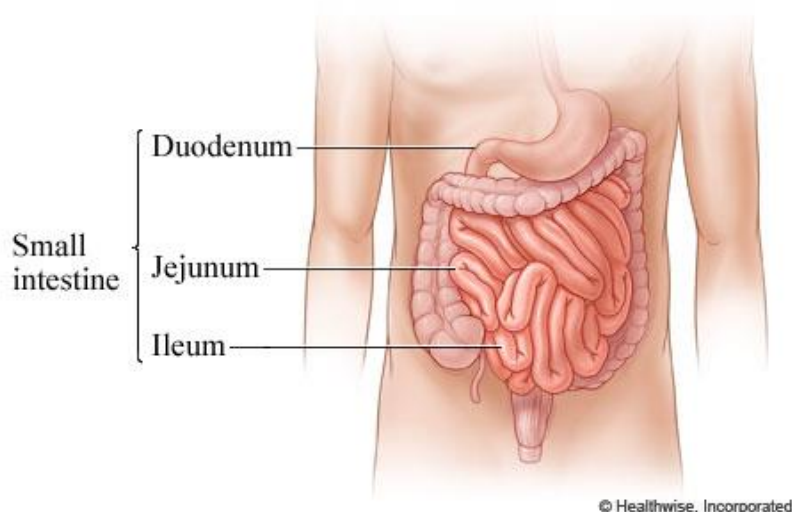
#### 2.1.2 Lačník (*jejunum*)

Lačník navazuje na dvanáctník, vytváří kličky a jeho délka je přibližně 2 m, což jsou asi 2/3 tenkého střeva (Křivánková a Hradová, 2009; Fiala et al., 2015). Nachází se v dutině břišní vlevo nahoře (Obrázek 1). Dochází zde k intenzivnímu trávení a ke vstřebávání živin (Křivánková a Hradová, 2009). Jeho sliznice je složena v četné příčné řasy a z těch vybíhají drobné klky (Fiala et al., 2015). Díky takovému uspořádání se výrazně zvětšuje vnitřní výstelka střeva a dochází ke vzniku rozsáhlé vstřebávací neboli resorpční plochy (Čeledová et al., 2017). Jedná se o pohyblivou část tenkého střeva a jeho název je odvozen od poznatku, že při pitvě bývá obvykle prázdný (Hůna, 2013).

#### 2.1.3 Kyčelník (*ileum*)

Kyčelník je navázán na lačník, nachází se v dutině břišní vpravo dole a tvoří 1/3 tenkého střeva (Křivánková a Hradová, 2009) (Obrázek 1). Kyčelník je kratší a užší

než lačník a jeho kličky se nacházejí v pravé jámě kyčelní (Lukáš et al., 2005). Jeho název je tedy odvozen od jeho polohy (Hůna, 2013). Kyčelník z jámy kyčelní ústí do první části tlustého střeva, kterou je slepé střevo (Lukáš et al., 2005). Před ústím do tlustého střeva se nachází chlopeň, která odděluje a uzavírá průchod tenkého střeva do tlustého. Chlopeň se otevírá jen tehdy, kdy dojde k dokonalému natrávení střevního obsahu a dále také zabraňuje návratu střevního obsahu po průchodu z ilea do slepého střeva (Křivánková a Hradová, 2009). Lačník i kyčelník jsou zavěšeny na okruží, tzv. mezenteriu v němž probíhají krevní a mízní cévy (Fiala et al., 2015; Čeledová et al., 2017).



Obrázek 1: Popis tenkého střeva (zdroj: [www.myhealth.alberta.ca](http://www.myhealth.alberta.ca))

## 2.2 **Tlusté střevo**

Tlusté střevo (*intestinum crasum*) nebo také nazývané jako tračník (*colon*) je poslední částí trávicí trubice (Křivánková a Hradová, 2009; Falt et al., 2015) (Obrázek 2). Jeho délka je přibližně 1,5 m a má průsvit 5–8 cm (Lukáš et al., 2005; Dylevský, 2009). Od tenkého střeva se tlusté střevo liší hlavně stavbou, po krátkých úsecích se objevuje pravidelné zúžení střídající se s výdutěmi, tzv. haustry (Křivánková a Hradová, 2009). Na rozdíl od lačníku a tračníku je jeho sliznice bez klků a je pokryta jednovrstevným cylindrickým epitelem (Orel, 2019). Stěna tlustého střeva je složena z několika vrstev, které jsou charakteristické pro trávicí trubici – slizniční vrstva, podslizniční vrstva a svalová vrstva (Čihák, 2013).

Sliznice tlustého střeva je bledá, pokryta jednovrstevným cylindrickým epitelem a je bez klků (Lukáš a Hoch, 2018). Tvoří ji ploché výběžky, které obsahují četné sekreční žlázy produkující slizniční substance (Vigué, 2015).

Podslizniční vrstva je řídká a obsahuje cévní a nervovou pletěň. Zasahují do ní shluky lymfocytů ze sliznice (Čihák, 2013).

Svalová vrstva (*tunica muscularis*) tlustého střeva má dvě vrstvy – vnitřní cirkulární a vnější podélnou (Lukáš a Hoch, 2018). Cirkulární svalovina je mimořádně tenká a podélná svalovina je naopak zahuštěná do tří pruhů (tění), mezi kterými je svalová vrstva opět tenká (Dylevský, 2009).

Tlusté střevo je složeno z několika částí – slepé střevo, vzestupný tračník, příčný tračník, sestupný tračník, esovitý tračník a konečník (Kachlík, 2018).

### **2.2.1 Slepé střevo (*caecum*)**

Jedná se o vakovitou rozšířenou část tlustého střeva, do níž ústí kyčelník (Dylevský, 2009). Nachází se v pravé jámě kyčelní a na své spodině přechází v červovitý přívěsek neboli appendix (Lukáš et al., 2005; Křivánková a Hradová, 2009) (Obrázek 2). Délka appendixu se pohybuje v rozmezí 5–10 cm. Nachází se v něm lymfatická tkáň, a tudíž bývá příčinou častých zánětů (Křivánková a Hradová, 2009).

### **2.2.2 Tračník (*colon*)**

Na slepé střevo se napojuje vzestupný tračník (*colon ascendens*), který směřuje od slepého střeva nahoru ke spodní části spodního jaterního laloku (Lukáš et al., 2005; Dylevský, 2009) (Obrázek 2). Je přisedlý zadní plochou k zadní břišní stěně, tudíž je nepohyblivý (Kachlík, 2018). Pod játry dochází k pohybu doleva a přechází v příčný tračník (Fiala et al., 2015).

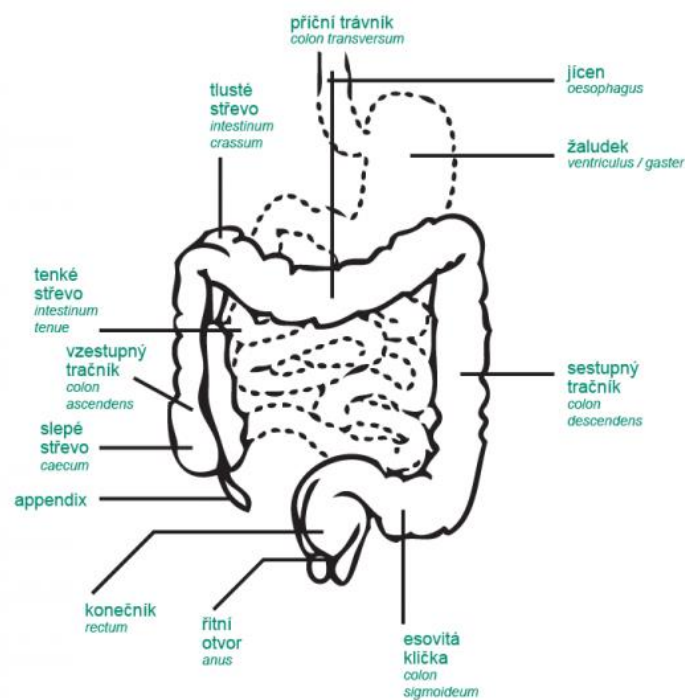
Příčný tračník (*colon transversum*) je přibližně 50 cm dlouhá část tlustého střeva, která je rozepjatá v prověšeném oblouku mezi pravým (jaterním) a levým (slezinným) ohbím (Dylevský, 2009) (Obrázek 2). Na rozdíl od vzestupného tračníku je tento pohyblivý a má tvar písmene U nebo V. U sleziny přechází levým tračnickovým ohbím do sestupného tračníku (Kachlík, 2018).

Sestupný tračník (*colon descendens*) má délku přibližně 25–30 cm a jedná se o nejužší část celého tračníku (Dylevský, 2009). Je přisedlý zadní plochou na zadní břišní stěnu, tudíž je stejně jako příčný tračník nepohyblivý. V levé kyčelní jámě pak přechází v esovitý tračník (Kachlík, 2018) (Obrázek 2).

Esovitý tračník (*colon sigmoideum*) nazývaný také jako esovitá klička je různě dlouhý úsek tlustého střeva, který se nachází v levé kyčelní jámě a může být rozšířený až k pupku (Fiala et al., 2015) (Obrázek 2). Jeho tvar připomíná přibližně písmeno N, kdy nejprve míří nahoru a pak se ohýbá dolů k malé pánvi, kde vstupuje do poslední části tlustého střeva konečníku (Lukáš a Hoch, 2018).

### 2.2.3 Konečník (*rectum*)

Konečník je přibližně 12–15 cm dlouhý a nachází se těsně před křížovou kostí. (Lukáš et al., 2005) (Obrázek 2). Je rozdělen na dvě části, na větší část pánevní a menší část řitní a ta je zakončena řitním otvorem (*anus*), kterým konečník ústí ven (Lukáš et al., 2005; Orel, 2019). Mezi těmito částmi se nachází přechod epitelové výstelky, kdy jednovrstevný dlaždicový epitel konečníku přechází v mnohovrstevný dlaždicový epitel řitního otvoru (Orel, 2019). Konečník už opouští břišní stěnu a z většiny se nachází pod úrovní pobřišnice (Čeledová et al., 2017).



Obrázek 2: Popis tlustého střeva (zdroj: [www.lepsipecz.cz](http://www.lepsipecz.cz))

### 3 Střevní mikrobiom

Střevní mikrobiom, který je také označován jako střevní mikrobiota je souhrnný název pro velké množství mikrobů, které osidlují střevo. Patří k nim bakterie, viry, plísňe, parazité a prvoci (Říhová a Šťastný, 2021).

Odhaduje se, že kolektivní genom střevních mikrobů obsahuje přibližně stokrát více genů než lidský genom. Během celogenomových asociačních studií bylo identifikováno více jak 200 genů, které jsou asociovány s idiopatickými střevními záněty (dále jako IBD). Některé z nich se podílejí na zprostředkování reakcí hostitele na střevní mikroflóru (Nishida et al., 2018). Fyziologické funkce těchto genů jsou kategorizovány do několika skupin týkajících se:

- Získané imunity (*IL23R, IL12B, JAK2, STAT3*)
- Rozpoznání a zpracování bakterií (*NOD2/CARD15*)
- Autofagie (*ATG16L, IRGM, ATG5*)
- Slizniční bariéry (*ECM1, CDH1, LAMB1*)

Mnoho predispozičních genů na Crohnovu chorobu (dále jako CD) je spojeno s rozpoznáváním a zpracováním bakterií a mnoho predispozičních genů na ulcerózní kolitidu (dále jako UC) souvisí s funkcí slizniční bariéry. To naznačuje, že zhoršené zacházení s bakteriemi nebo narušení slizniční bariérové funkce vede k porušení tolerance proti komenzálním bakteriím ve střevě u CD a UC (Matsuoka a Kanai, 2015).

Střevní mikrobiom plní velmi podstatné funkce, které jsou důležité pro zdraví lidského těla. Tyto funkce zahrnují syntézu vitaminů, rozklad chemických látek a živin, podporu metabolismu tuků, boj s patogeny a rovnováhu a rozvoj imunitního systému (Simpson, 2022). Za určitých okolností mohou střevní bakterie způsobovat různé střevní i celkové choroby (Nečas et al., 2021). Střevní mikrobiom je z jedné třetiny u všech lidí stejný, ze dvou třetin je pak striktně individuální (Říhová a Šťastný, 2021).

Složení střevního mikrobiomu se během života každého člověka velmi výrazně mění. Jeho vývoj probíhá přibližně do třetí dekády lidského života, kdy postupně dochází k ustanovení jeho složení (Lukáš a Hoch, 2018). U pacientů s IBD složení střevní mikroflóry kolísá výrazně více než u zdravých jedinců (Qui et al., 2022). Složení závisí na fyzickém stavu jedince, na jeho genotypu, imunitním fenotypu i na faktorech zevního

prostředí jako je například výživa, životní styl a eventuelně podávání antibiotik (dále jako ATB) (Frühau, 2017). Více než 90 % přirozené lidské střevní mikroflóry se skládá ze čtyř hlavních kmenů. Dominují kmene *Firmicutes* (49–76 %) a *Bacteroidetes* (16–23 %), v mnohem menší míře jsou pak přítomny kmene *Proteobacteria* a *Actinobacteria* (Matsuoka a Kanai, 2015). Naopak u pacientů s IBD se méně objevují bakterie kmene *Firmicutes* a *Bacteroidetes* a značně zvýšené jsou kmene *Proteobacteria* a *Actinobacteria* (Becker et al., 2015).

Lidské střevo patří mezi jedno z nejhustěji osídlených míst bakteriemi na zemi. Žije v něm přibližně 10 bilionů bakterií, které dohromady váží přibližně 2 kg, a to je více než lidský mozek (Lukáš a Hoch, 2018). Nízký počet a málo druhů obývá žaludek a horní část tenkého střeva a jejich počet se postupně zvyšuje od jejunu po tlusté střevo (Nishida et al., 2018). Jedná se o komenzální neškodné, ale i škodlivé mikroby, které jsou nazývané jako patobionty (Říhová a Šťastný, 2021). V případě zvýšené střevní propustnosti se znečišťující, škodlivé látky a bakterie dostávají do krevního oběhu. Poté dochází k ovlivňování buněk škodlivými bakteriemi a tato reakce v těle způsobuje zánět (Simpson, 2022).

CD a UC jsou způsobeny odchýlnou reaktivitou imunitního systému vůči součástem vlastní střevní mikrobioty (Špičák et al., 2017). U pacientů s IBD je ve srovnání se zdravými jedinci pozorován pokles bakterií s protizánětlivými schopnostmi a nárůst bakterií se zánětlivými schopnostmi (Nishida et al., 2018). Z kmene *Firmicutes* je to zejména druh *Faecalibacterium prausnitzii*, který je snížen v úměrném množství ve stolici u pacientů s CD. Členové kmene *Proteobacteria*, jako jsou *Enterobacteriaceae*, do kterého zahrnujeme bakterii *Escherichia coli* jsou u pacientů s IBD běžně zvýšené (Ni et al., 2017).

## 4 Idiopatické střevní záněty

Za IBD považujeme chronické záněty tenkého a tlustého střeva. Řadí se mezi ně CD a UC (Červenková, 2009). Jejich průběh je protrahovaný a charakterizovaný remisemi a recidivami v průběhu jejich přirozené historie (Ananthkrishnan et al., 2017). V některých případech jsou také označovány jako nespecifické střevní záněty (Vránová, 2013). Souček et al. (2011) naopak uvádí, že tento název je ze staršího českého názvosloví a přestal se používat kvůli skutečnosti, že tyto záněty neznamenaají protiklad k zánětům specifickým. Mohou se objevit v jakémkoliv věku, CD má nejvyšší výskyt ve věku 20 až 30 let, zatímco UC postihuje lidi mezi 30 až 40 lety. Co se týče pohlaví, UC je o něco častější u mužů, kdežto CD je naopak častější u žen (Zonetti de Arruda Leite a Andrade, 2016).

Etiologie obou onemocnění je velmi podobná, ale také nejasná. Proto se tato onemocnění označují jako idiopatická. (Mačák a Mačáková, 2004). Charakteristicky se od sebe odlišují klinicky a morfologicky a také se liší léčbou (Stříteský, 2001). Přesněji se tato onemocnění liší lokalizací a postižením vrstev střeva, ale také ne dosud zcela objasněnou patogenezi (Zonetti de Arruda Leite a Andrade, 2016). Přesto je ale možné říci, že mezi nejčastější příčiny se řadí genetické vlivy. Dále jsou to vlivy vnějšího prostředí a zvažovány jsou i imunologické a infekční vlivy. Z tohoto důvodu je příčina vzniku a rozvoje IBD označována jako multifaktoriální (Vránová, 2013).

Jedná se o relabující onemocnění, což znamená, že dochází k opakujícím se fázím klidového a akutního stádia po celou dobu trvání nemoci (Vránová, 2013; Lukáš a Hoch, 2018). Projevují se hlavně chronickým průjmem, který bývá s příměsí krve nebo je vodnatý (Lukáš a Hoch, 2018). Intenzita projevujících se problémů záleží hlavně na formě zánětu a s růstem rozsahu postiženého střeva stoupá tíže onemocnění (Bortlík, 2014).

## 5 Crohnova choroba

U CD se jedná o chronický idiopatický zánět, který může postihnout kteroukoliv část trávicího trubic od jícnu po řiť (Zvoníková et al., 2010; Rimola, 2019) (Obrázek 3). Onemocnění probíhá s obdobími relapsů a remisí a není možné to medikamentózně ani chirurgicky definitivně vyléčit (Pavelka et al., 2014). Nejčastěji bývá zánětem postižena oblast tenkého a tlustého střeva. Dochází k poškození celé střevní stěny a může nastat i tvorba píštělí a abscesů. (Vránová, 2013). Jako typický projev se vyskytuje aftózní vřed s bělavým středem a zarudlým lemem (Šafránková a Nejedlá, 2006). Na rozdíl od UC není postižení střeva souvislé, ale segmentální. To znamená že úseky postižené sliznice střídají úseky zdravé sliznice (Navrátil et al., 2017).



Crohnova choroba

*Obrázek 3: Postižení střev u CD (zdroj: wikiskripta.cz)*

Etiologie je dodnes ještě z velké části neznámá, ale pravděpodobně může být CD důsledkem složité souhry mezi genetickou náchylností, enviromentálními faktory a změněnou střevní mikroflórou, což vede k dysregulovaným vrozeným a adaptivním imunitním reakcím (Rajesh a Sinha, 2014; Torres et al., 2017). Identifikace expozičních faktorů, které ovlivňují riziko vzniku této choroby, je důležitá zejména kvůli prevenci tohoto onemocnění. Důsledky CD jsou například celoživotní morbidita, zhoršená kvalita života pacienta a zvýšené riziko kolorektálního karcinomu (dále jako KR-CA) (Rajesh a Sinha, 2014).

### 5.1 Symptomy

Symptomy jsou u CD velmi rozdílné a liší se podle toho, jaká část trávicího ústrojí a v jaké míře je postižena (Červenková, 2009). Na začátku se nemoc projeví velmi



výrazně a může napodobit i náhlou příhodu břišní (Vodička, 2014). V případě terminálního ilea, což je nejtypičtější výskyt postižení, se onemocnění projevuje podobně jako akutní nebo chronická apendicitida. Bolesti břicha jsou křečovitě a objevují se hlavně po jídle, přibližně do 30 až 60 minut (Navrátil et al., 2008; Červenková, 2009). Dále jsou hlavními symptomy průjmy, které se objevují zejména po jídle a tím je způsobený úbytek na váze (Pavelka et al., 2014). Pacienti, kteří mají převážně postižené tlusté střevo, mohou vykazovat příznaky, které jsou totožné s UC, tj. průjmy s příměsí krve a hlenu, často jsou přítomny píštěle a abscesy nebo postižení řitního kanálu v podobě nehojící se anální fisury nebo vředu (Pavelka et al., 2014; Rimola, 2019).

Existují ještě mimostřevní symptomy, které se objevují pouze u 30–40 % pacientů, a to zvláště u těch, kteří trpí postižením tlustého střeva. Jde zejména o kožní projevy, kloubní změny nebo recidivující oční záněty (Pavelka et al., 2014). Rozlišují se dvě skupiny mimostřevních projevů, kdy buď nejsou vázány na aktivitu a tíží onemocnění anebo s aktivitou střevního zánětu úzce souvisí (Vránová, 2013).

## **5.2 Průběh onemocnění**

U onemocnění rozlišujeme: první ataku, remisi, relaps, recidivu a reaktivaci (Souček et al., 2005). Jako první ataku označujeme úplný počátek onemocnění, jakmile dojde k nastolení klidové fáze, hovoříme o remisi, a naopak jakmile dojde k opakovanému vzplanutí onemocnění, nazýváme to jako relaps. Pojem recidiva se užívá při projevu onemocnění na dosud nepostiženém úseku střeva a pokud dojde ke vzplanutí na místě, které bylo předtím zcela zdravé je to označováno jako reaktivace (Souček et al., 2011). Na začátku má většina nemocných pouze zánětlivé změny na střevní sliznici, ale v dalších letech jsou změny takové, které vedou ke vzniku zúženin a píštělí (Červenková, 2009). Jako píštěl se rozumí kanálek komunikující mezi dutinou a jejím povrchem, vzniká jako následek zánětu, nádoru nebo úrazu. Odchází jím hnis nebo jiný obsah dutiny (Slezáková et al., 2012).

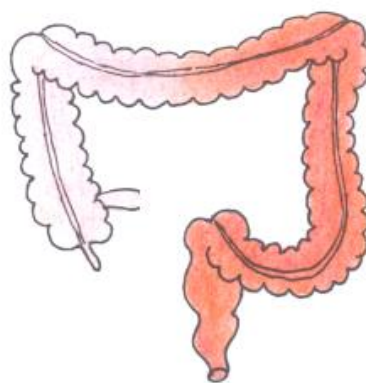
Podle Greensteinovy klasifikace se pacienti s CD rozdělují podle průběhu onemocnění do dvou typů – typ agresivní a typ indolentní. Typ agresivní, nebo také nazýván jako perforující, probíhá agresivním způsobem. Dochází při něm ke tvorbě píštělí a abscesů, a nakonec je charakterizován nutností častých chirurgických intervencí. U typu indolentního dochází k atakám velmi zřídka, objevuje se tvorba stenóz a nutnost chirurgické léčby je malá (Souček et al., 2019).

## 6 Ulcerózní kolitida

Colitis znamená zánět tračníku a slovo „ulcerózní“ značí tendenci k rozvoji vředů, a to zejména na místech postižených zánětem (Nair a Peate, 2015). Zánětu podléhá různě dlouhá část tlustého střeva a šíření postupuje většinou od konečníku výše (Vránová, 2013) (Obrázek 4).

Na rozdíl od CD se jedná o zánět sliznice tlustého střeva, který se objevuje v rektu a šíří se kontinuálně na proximální část střeva nebo celé tlusté střevo. (Pavelka et al., 2014). Onemocnění může být ohraničeno pouze na rektum, pokud tomu tak je, označuje se to jako ulcerózní proktitida (Kasper, 2015). Ačkoliv existuje několik vrstev, které tvoří tlusté střevo, zánět postihuje pouze nejvnitřnější výstelku zvanou sliznice (Farraye, 2017). Mohou být postiženy i hlubší vrstvy tračníku, ale pouze při komplikacích typu fulminantní kolitidy a toxického megakolon (dále jako TM) (Souček et al., 2019).

Etiologie dodnes objasněná není, ale dominující postavení v otázkách etiopatogeneze UC mají teorie imunologické a genetické (Navrátil et al., 2008).



Ulcerózní kolitida

Obrázek 4: Postižení tlustého střeva u UC (zdroj: [www.wikiskripta.cz](http://www.wikiskripta.cz))

### 6.1 Symptomy

U více než 90 % všech pacientů s aktivní UC se objevuje rektální krvácení (Sturm a White, 2019). Mezi další symptomy patří také bolesti břicha, průjem s příměsí krve a/nebo hleny a anémie (Nair a Peate, 2015). Jak se onemocnění zhoršuje, může

se u pacienta objevit únava, horečka, zimnice, ztráta chuti k jídlu a ztráta hmotnosti. Pomocí těchto příznaků lékaři mohou posoudit, zda se jedná o kolitidu lehkou, střední nebo těžkou (Farraye, 2017).

Podle montrealské klasifikace tíže UC se v případě lehké UC objevují méně než 4 stolice za den a pacient nevykazuje systémové příznaky. V případě střední UC se vyskytují více než 4 stolice za den s minimálními systémovými příznaky a u těžké UC už je více než 6 stolic za den, puls pacienta je vyšší než 90/minutu, pacient má zvýšenou teplotu a hemoglobin je nižší než 105 g/l (Vránová, 2013).

Extraintestinální příznaky se vyskytují často a zahrnují projevy kožní, ústní, kloubní, oční a jaterní (Gabalec, 2009a). Mezi nejčastější mimostřevní projevy se řadí například polyartritida, vaskulitida nebo spondylitida (Šrámková, 2013). Zdá se, že vývoj jednoho extraintestinálního příznaku zvyšuje náchylnost k vývoji dalších takovýchto příznaků (Rothfuss et al., 2006).

## **6.2 Průběh onemocnění**

Počátek onemocnění nazýváme jako první ataku nemoci. Nastolení klidové fáze pak nazýváme remisí a další vzplanutí označujeme jako relaps (Souček et al., 2019). Podle zkušeností lékařů se říká, že první tři roky od stanovení diagnózy jsou pro chování a vývoj nemoci zásadní. Pokud se příznaky od počátku vracejí několikrát do roka navzdory udržovací léčbě, tak se takto onemocnění bude chovat nadále a naopak dojde-li po úvodní atace ke dlouhodobému zklidnění, nebudou relapsy ani v budoucnu častější (Červenková, 2009).

Průběh UC může být chronický, kontinuální nebo chronicky intermitentní, což znamená s remisemi a relapsy nebo může být také fulminantní, který může skončit až fatálně (Šváb et al., 2008). Lukáš a Hoch (2018) uvádí, že UC může proběhnout asi v 1 % jen jako jedna ataka akutní kolitidy s okamžitým přechodem do remise, ale u tohoto případu je otázkou, zda se jedná o UC nebo pouze o infekci, alergii či lékové poškození s vředy v trávicím traktu, které organismus zvládne „vlastními silami“.

Po 15 letech trvání nemoci se zvyšuje riziko vzniku KR-CA a po 20 letech je incidence 5-10 %, po 30 letech 12-20 %. Tím pádem je nutné koukat na UC jako na rizikové onemocnění z hlediska možné karcinogeneze (Souček et al., 2011).

## 7 Etiologické faktory vzniku idiopatických střevních zánětů

### 7.1 Genetické faktory

Genetické faktory jsou u těchto nemocí patrné, ale dodnes nejsou přesně definovány (Souček et al., 2011). Jsou více patrné spíše u CD než u UC, ale i přesto znamenají nezbytný předpoklad vzniku a rozvoje klinických příznaků IBD u obou nemocí (Vránová, 2013).

Rodinná anamnéza je nejdůležitějším rizikovým faktorem pro rozvoj onemocnění, což naznačuje genetickou predispozici k IBD (Hugot et al., 1999). Děti, které mají oba rodiče trpící IBD mají 33% riziko rozvoje onemocnění do 30 let věku (Stěpanov a Studnička, 2021). Relativní možnost získat onemocnění od příbuzných prvního stupně je 8–10krát větší než v celkové populaci. Velikou roli hraje i etnický původ, kdy například Židé z východu Evropy mají riziko rozvoje IBD 2–4krát vyšší než ostatní (Lukáš a Hoch, 2018).

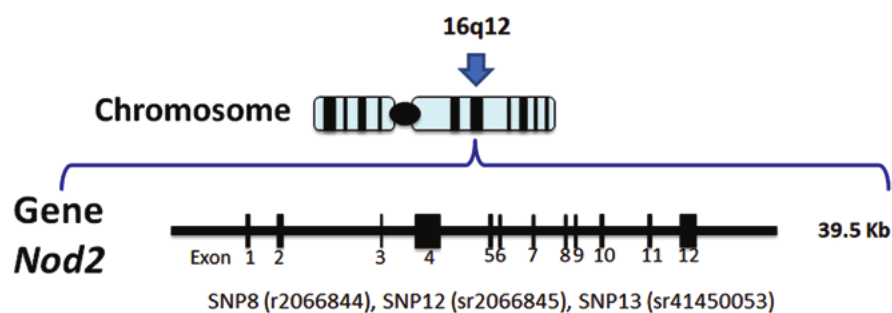
### 7.2 Geny pro Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu

Podle studií je známo, že příbuzní prvního stupně (děti, rodiče, sourozenci) pacientů trpících CD mají přibližně 10-20 % celoživotní riziko rozvoje onemocnění ve srovnání s obecnou populací. Pomocí celogenomových studií bylo rozpoznáno nejméně 70 chromozomálních lokusů, které mají spojitost s rozvojem CD (Kupka et al., 2014; Hosák et al. 2015). Tyto lokusy jsou součástí genů, které řídí některé z homeostatických mechanismů:

- Vrozené receptory rozpoznávání vzorů (*NOD2/CARD15*, *TLR4*, *CARD9*),
- Diferenciace Th17-lymfocytů (*IL-23R*, *JAK2*, *STAT3*, *CCR6*, *ICOSLG*),
- Autofagie neboli „pojídání sebe sama“ (*ATG16L1*, *IRGM*, *LRRK2*),
- Udržování integrity epiteliální bariéry (*IBD5*, *DLG5*, *PTGER4*, *ITLN1*, *DMBT1*, *XBPI*),
- Řízení sekundární imunitní odpovědi (*HLA-region*, *TNFSF15/TL1A*, *IRF5*, *PTPN2*, *PTPN22*, *NKX2-3*, *IL-12B*, *IL-18RAP*, *MST1*) (Van Limbergen et al., 2009; Balvan et al., 2021).

Nejčastějším genem, který se vyskytuje v souvislosti s IBD je gen *NOD2* (nucleotide-binding oligomerization domain 2) označován také jako *CARD15* (caspase

recruit-ment domain 15) (Kupka et al., 2014; Lukáš a Hoch, 2018). Jedná se o gen, který se nachází na chromozomu 16 (16q12) (Obrázek 5) a kóduje protein účastnící se bakteriálního rozpoznávání buňkami zapojenými do přirozené imunity (Hugot, 2006; Kupka et al. 2014). Oblast na chromozomu 16 poprvé identifikoval Jean-Pierre Hugot, francouzský dětský gastroenterolog, v roce 1996. Zmapování tohoto lokusu vedlo k identifikaci genu *NOD2/CARD15* (Van Limbergen et al., 2007). Protein, který je kódován tímto genem, slouží jako intracelulární receptor a je prezentován hlavně v monocytech, makrofázích, dendritických buňkách, Panethových buňkách a intestinálních epitelálních buňkách. Hraje důležitou roli v imunitní odpovědi na bakteriální infekci (Kupka et al., 2014). Dle Heliö et al. (2003) bylo v tomto genu identifikováno více než 60 sekvenčních variant, přičemž tvrdí, že tři hlavní varianty (*R702W*, *G908R* a *1007fs*) jsou spojeny s náchylností k infekci. U variant *R702W* a *G908R* dochází vlivem mutace k záměně aminokyselin a u varianty *1007fs* dochází k posunu čtecího rámce a pak k předčasnému ukončení translace a tvorbě zkráceného proteinu. Všechny tyto varianty jsou spojovány pouze s CD, nikoliv s UC (Lukáš a Hoch, 2018).

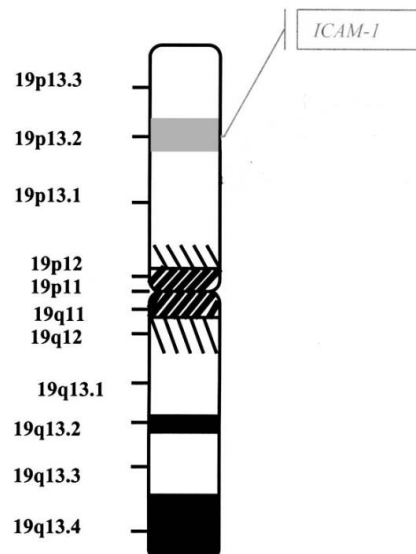


Obrázek 5: Lokace genu *NOD2/CARD15* na chromozomu 16 (zdroj: [www.medigraphic.com](http://www.medigraphic.com))

Téměř po 20 letech od objevení *NOD2* se stále nepodařilo plně objasnit přesné mechanismy, kterými tento gen přispívá k patogenezi onemocnění (Geremia a Satsangi, 2018). Dalšími variantami genů, které se podílejí na rozvoji IBD jsou *NOD1/CARD4* a *ICAM1*. V genu *NOD1/CARD15* se na rozvoji podílejí hlavně polymorfismy *E266K* a *D372N*, u genu *ICAM-1* se jedná o polymorfismy *G241R* a *K469E* (Özen et al., 2006)

Mezibuněčná adhezní molekula *ICAM-1* je klíčová pro příliv neutrofilních granulocytů do sliznice tlustého střeva. Genové analýzy našly polymorfismy v genu kódujícím *ICAM-1*, což naznačuje, že změny ve funkci této molekuly se mohou podílet

na patogenezi UC (Vainer, 2005). *ICAM-1* je glykoprotein, který se nachází na chromozomu 19p13 (Cheng a Liang, 2015) (Obrázek 6).



Obrázek 6: Umístění *ICAM-1* na chromozomu 19 (zdroj: Low et al., 2006)

*ICAM-1* má dvě různé formy, které jsou syntetizovány endoteliálními buňkami. Jedná se o membránově vázanou formu a rozpustnou formu. Rozpustná forma je výsledkem jednonukleotidového polymorfismu v *ICAM-1* a je vytvořen alternativním sestřihem na úrovni mRNA. Tím vzniká protein, který postrádá membránové a intracelulární domény. S oběma formami se setkáváme u UC (Vainer, 2015).

U UC vykazuje migrace neutrofilů epiteliotropismus, což znamená, že neutrofilů mají tendenci specificky migrovat směrem k epitelu. Důvod zůstává nejasný, ale testy poskytly důkaz, že samotná epiteliální buňka může hrát roli v regulaci pohybu neutrofilů do subepiteliálního prostoru a napříč epitelem. Po dosažení epitelu překračují neutrofilů epiteliální bariéru uvolněním proteolytických enzymů. Tento proces vede k destrukci mikroprostředí, a nakonec způsobuje charakteristické změny pozorované histologicky v tlustém střevě během těžké UC, jako jsou abscesy, šíření neutrofilů ve sliznici a ulcerace (Vainer, 2015).

Dle studií lze říct, že je zde přítomna i možnost, která nasvědčuje, že mezi IBD a *NOD2/CARD15*, *NOD1/CARD4* nebo *ICAM-1* nemusí být žádná souvislost. Genetické predispoziční faktory u IBD se mohou u různých populací lišit, protože je známo, že IBD je onemocnění s mnoha příčinami, včetně velkého počtu různých genetických abnormalit (Özen et al., 2006).

### 7.3 Faktory vnějšího prostředí

Faktory vnějšího prostředí mají na vznik a průběh IBD významný vliv. Nejčastěji se jedná o bakteriální složení gastrointestinálního traktu (dále jako GIT), psychický stres, kouření a také užívání některých léčiv (Lukáš, 2014).

Na prvním místě faktorů vnějšího prostředí je obviňováno kouření, aktuální kuřáci mají 2x vyšší riziko vzniku Crohnovy choroby než kuřáci bývalí. Naopak lidé, kteří kouřili v minulosti, mají vyšší riziko vzniku UC na rozdíl od lidí, kteří kouří stále (Lukáš a Hoch, 2018). Nikotin totiž může přímo ovlivňovat slizniční imunitní odpověď, střevní propustnost a mikrocirkulaci (Stěpanov a Studnička, 2021).

Dalším vnějším faktorem je psychická zátěž, zejména dlouhodobá, ta může být startovacím faktorem pro vzplanutí nebo pro relaps onemocnění (Vránová, 2013). UC byla dokonce od 30. let minulého století brána jako tzv. psychosomatické onemocnění. Pacienti s UC, kteří mají onemocnění v remisi, mají výrazně vyšší riziko zhoršení nemoci, pokud jsou vystaveni psychickému stresu nebo pokud trpí depresivní poruchou. Je dokázáno, že nepříjemné životní události, kterými jsou například ztráta blízkého člověka nebo ztráta zaměstnání mohou vyvolat IBD (Lukáš, 2014).

### 7.4 Infekce

Přesto, že žádné mikroby onemocnění nevyvolávají, jsou vedeny jako příčina vzniku onemocnění, a to z důvodu, že slouží jako spouštěcí mechanismus (Mačák a Mačáková, 2004). Konkrétní bakterie nebyla nikdy nalezena, ale i přesto může být mikrobiální osídlení střeva podmínkou chronického zánětu. Za vznik Crohnovy choroby odpovídají především anaerobní bakterie a některé kmeny *Escherichia Coli*, produkující cytokiny, které poškozují střevní buňky. Naopak u UC se uplatňují bakterie aerobní (Šafránková a Nejedlá, 2006).

IBD vznikají v důsledku nesprávné reakce imunitního systému, který špatně rozeznává fyziologické mikroby v tlustém a tenkém střevě a chybně je interpretuje jako patogeny (Pavelka et al., 2014).

## 8 Komplikace idiopatických střevních zánětů

Jako téměř u každého onemocnění jsou i IBD doprovázeny různými komplikacemi, mezi které patří píštěle, stenózy a abscesy, ale mohou být i život ohrožující, jako například megakolon (Lukáš a Hoch, 2018). Jsou způsobeny zejména těžkým zánětem ve střevě, imunitní reakcí anebo narušením vstřebávání některých živin a žlučových kyselin (Červenková, 2009).

### 8.1 Střevní komplikace

Mezi nejčastější střevní komplikace se řadí stenóza, perforace, abscesy, píštěle, septický průběh střevního zánětu a masivní krvácení. Mezi ty horší komplikace se pak řadí TM a KR-CA (Červenková, 2009).

Stenóza střeva vzniká zjizvením střeva, tím dochází k jeho zúžení a poté je nutné chirurgické řešení (Šrámková, 2013). Perforace značí proděravění střeva, které ve vzácném případě pokračuje až do dutiny břišní a způsobuje peritonitidu. Velmi často končí slepě ve tkáních, kde tvoří abscesy, což je dutina naplněná hnisem (Burda a Šolcová, 2016; Navrátil et al., 2017). Jak již bylo zmíněno, IBD jsou komplikovány píštělemi, zejména rektovaginálními píštělemi, což je patologická komunikace mezi GIT a poševní dutinou. U UC se tyto píštěle nacházejí ve 22 %, ale bývají úspěšně залéčeny pomocí análního pouchu. U CD tento píštěl bývá často prvním příznakem nemoci. (Horák et al., 2013). Pokud dochází ke komplikaci, která má septický průběh, potom se jedná o pacienta s oslabenou imunitou, protože takový průběh se nachází pouze u těchto pacientů (Kasper, 2015).

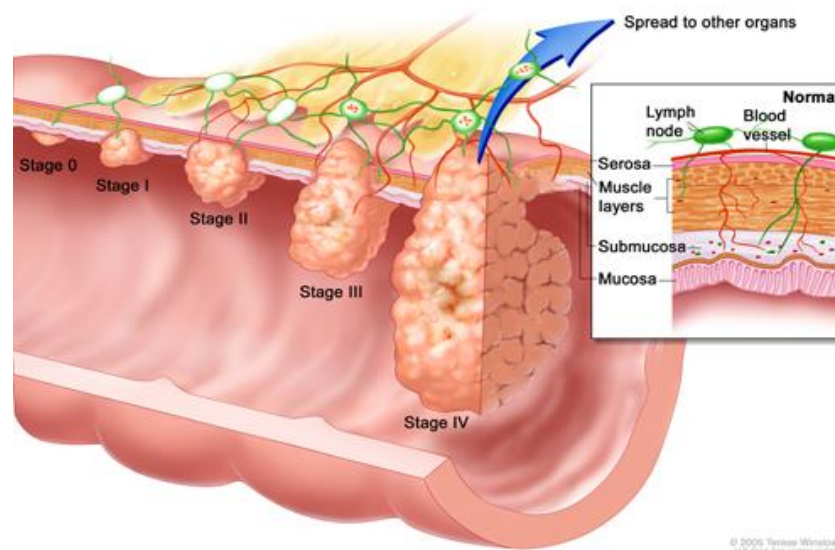
TM představuje obávanou komplikaci především zánětlivých či infekčních stavů tlustého střeva (Autenrieth a Baumgart, 2012). Tato komplikace se rozvíjí spíše u UC než u CD a vyskytuje se kolem 3–5 % (Souček et al., 2005). Dříve se vyskytoval pouze u UC, ale CD byla poté rozpoznána též jako příčina a postupně se ukázalo, že téměř jakýkoli zánětlivý stav tlustého střeva může pacienty predisponovat k TM (Gan a Beck, 2003). TM je charakterizován celkovou nebo částečnou neobstrukční dilatací tlustého střeva a systémovou toxicitou. Je spojován s vysokou morbiditou a mortalitou a ve většině případů je nutná léčba (Desai et al., 2022). Několik autorů zaznamenalo neoficiální zprávy o kolonoskopii jako spouštěči TM a navzdory ojedinělým zprávám o její bezpečnosti jako diagnostické a prognostické techniky je u UC obecně odsuzována.



Existují kazuistiky chemoterapie jako možného indikujícího faktoru TM (Gan a Beck, 2003). Není dáno, v jakém věku ani u jakého pohlaví se tato komplikace rozvine. U pacientů s IBD je nejvyšší riziko rozvoje TM v časném stádiu onemocnění, až u 30 % případů dojde k rozvoji do 3 měsíců od diagnózy. Dle studií je TM prvním klinickým projevem dříve nediodagnostikované UC u 13 % pacientů (Autenrieth a Baumgart, 2012).

KR-CA je závažnou komplikací IBD a představuje přibližně 15 % všech úmrtí souvisejících s IBD. Pravděpodobnost rozvoje KR-CA u pacientů trpícími CD nebo UC je vyšší než, kdyby došlo k rozvoji tohoto karcinomu bez jakýchkoliv příčin (Averboukh et al., 2011). KR-CA je třetí nejčastější maligní onemocnění a čtvrtá hlavní příčina úmrtnosti související s rakovinou na celém světě (Hnatyszyn et al., 2019). U každého pacienta s UC se riziko rozvoje karcinomu odhaduje na 2 % po 10 letech, 8 % po 20 letech a 18 % po 30 letech od diagnózy (Eaden, 2004). U pacientů s CD je riziko rozvoje 4–20x vyšší než u běžné populace (Averboukh et al., 2011). Délka onemocnění není jediným rizikovým faktorem pro KR-CA. Dalšími faktory jsou rozsah a závažnost onemocnění, přítomnost zánětlivých pseudopolypů a rodinná anamnéza (Stidham a Higgins, 2018).

KR-CA se rozděluje na stádia 0–IV. Ve stádiu 0 nenalezneme žádný primární tumor, ve stádiu I tumor prochází submukózou, ve stádiu II tumor prochází muscularis propria, ve stádiu III tumor prochází skrz muscularis propria do subserózy a ve stádiu IV tumor proniká přímo do okolních orgánů a struktur (Holubec et al., 2004) (Obrázek 7).



Obrázek 7: Klasifikace kolorektálního karcinomu (zdroj: <https://www.priznaky-projevy.cz>)

## 8.2 *Mimostřevní komplikace*

Vzhledem k imunitnímu mechanismu a komplexnímu působení IBD na celý organismus mohou být různě postiženy i jiné systémové orgány než jen GIT. Tato postižení nazýváme jako mimostřevní nebo také extraintestinální komplikace. Mohou závažně ovlivňovat prognózu pacienta a snižovat kvalitu jeho života (Navrátil et al., 2021). IBD mohou být komplikovány extraintestinálními projevy až u 40 % pacientů. Jsou významnou příčinou morbiditu a mohou být pro pacienta zvláště stresující (Williams et al., 2008). Projevy, které vznikají jiným mechanismem se nazývají extraintestinální komplikace, které se objevují jako důsledek nějakých metabolických, anatomických nebo jiných změn v rámci IBD. Mohou se objevit např. jako nežádoucí účinek léčby (Navrátil et al., 2021).

Extraintestinální komplikace jsou způsobeny hlavně nemocí samotnou a zahrnují například stavy jako je malabsorpce s následným nedostatkem mikroživin, osteoporóza, periferní neuropatie, ledvinové kameny, žlučové kameny a vedlejší účinky IBD související s léky (Vavricka et al., 2015).

Nejčastější komplikací jsou kloubní projevy jako periferní artritida. Tato artritida postihuje 5–20 % pacientů s IBD a je klasifikována do dvou typů, kdy typ 1 postihuje více jak 5 velkých kloubů a typ 2 postihuje především malé klouby (Williams et al., 2008). Periferní artritida na rozdíl od revmatoidní artritidy vykazuje malou nebo žádnou destrukci (Vavricka et al., 2015). Léčba periferní artritidy je zaměřená na léčbu základního onemocnění střev a také na dosažení úlev od symptomů (Levine a Burakoff, 2011).

Mezi metabolické komplikace se řadí osteoporóza. IBD jsou spojovány se zvýšeným rizikem rozvoje osteoporózy. Míra prevalence se pohybuje od 2 % do 30 % a u osteopenie od 40 % do 50 % (Larsen et al., 2009). Rozvoj osteoporózy u pacientů s IBD má mnoho rizikových faktorů, které souvisí s věkem, se sníženou aktivitou a také zahrnují léčbu kortikosteroidy (Levine a Burakoff, 2011). Williams et al. (2008) uvádí, že existuje domněnka, že úbytek kostní hmoty u IBD souvisí spíše se základním onemocněním než s kortikosteroidy.

Dalšími komplikacemi jsou dermatologické projevy. Závažné dermatologické projevy byly hlášeny u 2–34 % pacientů s IBD. Objevuje se široké spektrum kožních

onemocnění a během přirozeného onemocnění se může projevit více kožních komplikací současně (Levine a Burakoff, 2011). Mezi nejčastěji vyskytující se kožní komplikace IBD se řadí erythema nodosum (dále jako EN) a pyoderma gangrenosum (dále jako PG). EN se projevuje jako jeden nebo více citlivých červených uzlíků objevujících se typicky na povrchu extensoru dolních končetin (Obrázek 8). Je častější u CD než u UC (Jose a Heyman, 2008). PG je mnohem vzácnější než EN. Na počátku se objevují pustuly, které se vyvinou do ulcerujících lézí s podkopenými, fialovými okraji a okolním erytémem (Obrázek 9). Běžně se vyskytují na holeních nebo v blízkosti stomií, ale mohou se objevit kdekoliv na těle (Williams et al., 2008).

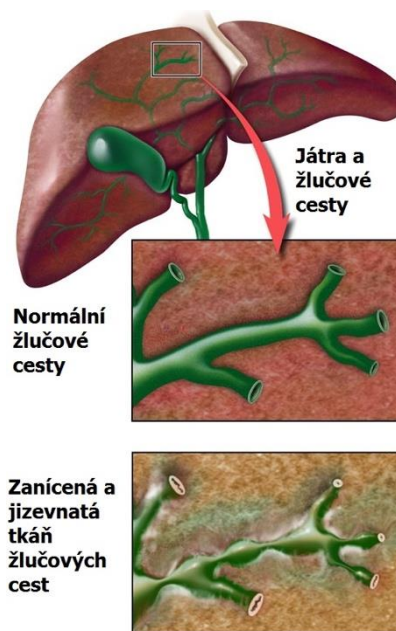


Obrázek 8: Erythema nodosum (zdroj: Vavricka et al., 2015)



Obrázek 9: Pyoderma gangrenosum (zdroj: Vavricka et al., 2015)

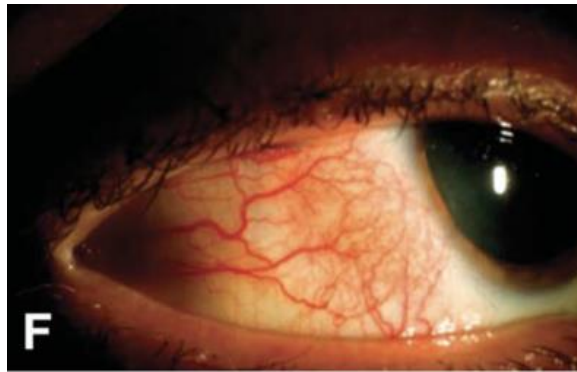
Jednou z nejzávažnějších komplikací IBD je primární sklerozující cholangitida (dále jako **PSC**). Jedná se o chronické, progresivní onemocnění neznámé etiologie, které se projevuje zánětem a fibrózou středních a velkých intra- a extrahepatálních žlučovýchodů (Levine a Burakoff, 2011) (Obrázek 10). **PSC** může být život ohrožující komplikace a častěji se vyskytuje u mužů a také u pacientů trpících **UC** než u těch, kteří trpí **CD** (Vavricka et al., 2015; Harbord et al., 2016). **PSC** významně zvyšuje kumulativní riziko **KR-CA** (Larsen et al., 2009). Je to nejčastější onemocnění jater specifické pro **IBD** a v některých zeměpisných oblastech může postihnout až 4–5 pacientů. V populacích severoevropského původu má dokonce 70–80 % pacientů s **IBD** současně i **PSC** (Harbord et al., 2016). Vavricka et al. (2015) uvádí, že je možné, že diagnóza **PSC** ovlivňuje průběh **IBD**, protože u pacientů s **PSC** i **UC** se předpokládá mírnější průběh kolitidy s menším histologickým zánětem tlustého střeva než u pacientů bez **PSC**.



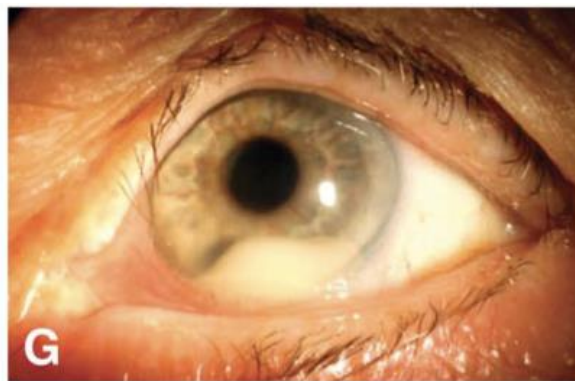
Obrázek 10: Primární sklerozující cholangitida (zdroj: <https://www.priznaky-projevy.cz>)

Mezi oční komplikace se řadí hlavně episkleritida a uveitida (Jose a Heyman, 2008). Prevalence očního zánětu u **IBD** je méně než 10 %, ale jeho rychlé rozpoznání je životně důležité. Může vést k významné morbiditě a akutní ztrátě zraku (Williams et al., 2008). Episkleritida je charakterizována jako nebolestivá hyperémie spojivky a skléry, je přítomno podráždění, pálení, začervenání a citlivost (Obrázek 11). Je častější u **CD** než u **UC** a nevyžaduje jinou specifickou léčbu než léčbu základního onemocnění (Vavricka et al., 2015). Uveitida se projevuje jako akutní nebo subakutní bolest očí s rozmazaným viděním, fotofobií a bolestí hlavy (Jose a Heyman, 2008) (Obrázek 12). Na rozdíl

od episkleritidy je časová korelace uveitidy s IBD méně předvídatelná a její výskyt může předcházet diagnóze IBD (Vavricka et al., 2015).



Obrázek 11: Episkleritida (zdroj: Vavricka et al., 2015)



Obrázek 12: Uveitida (zdroj: Vavricka et al., 2015)

Poslední z nejčastějších extraintestinálních komplikací IBD je anémie, přesněji anémie z nedostatku železa – sideropenická anémie. Jedná se o běžnou komplikaci u pacientů s IBD a je často jako komplikace přehlížena (Kaitha et al., 2015). Mezi primární projevy anémie se řadí únava, nevykonnost, slabost, dušnost nebo pocit palpitace. Intenzita těchto projevů závisí na poklesu hemoglobinu, který je u CD a UC pozvolný a tím pádem je řada pacientů na tento stav připravena a klinické projevy jsou u nich postrádány (Navrátil et al., 2021). Z tohoto důvodu musí být u pacientů s IBD pravidelně sledována hladina hemoglobinu, aby bylo možné anémii detekovat včas. Železo je součástí hemoglobinu, myoglobinu, cytochromů a mnoha dalších enzymů, anémie tedy negativně ovlivňuje téměř každý aspekt každodenního života pacientů s IBD (Kaitha et al., 2015). Léčba zahrnuje hlavně útlum vyvolávající příčiny, tedy léčbu IBD a sideropenie se léčí pomocí preparátů železa nebo pomocí vitamínu B12 (Navrátil et al., 2021).

## 9 Diagnostika a léčba idiopatických střevních zánětů

### 9.1 Diagnostika IBD

Diagnostika IBD nemá dodnes přesně stanovené vyšetřovací postupy, které by měly být nutně dodrženy (Vránová, 2013). Diagnózy CD a UC jsou stanoveny na klinických podkladech doplněných objektivními nálezy radiologického, endoskopického a histologického vyšetření. V některých případech musí být diagnostické hodnocení po uplynutí určité doby opakováno (Baumgart, 2009). Červenková (2009) navíc uvádí, že je důležité ještě též laboratorní vyšetření.

Laboratorní vyšetření má několik účelů, včetně diagnostiky, sledování aktivity onemocnění a sledování nežádoucích účinků a účinnosti léků (Veauthier a Hornecker, 2018). Laboratorní abnormality jsou pozorovány častěji s delším trváním a závažnějším onemocněním (Feuerstein a Cheifetz, 2017). U krevních testů se pozoruje přítomnost imunoglobulinů – ASCA, pANCA. ASCA protilátky jsou namířené vůči běžným kvasinkám pekařských kvasnic, nacházejí se přibližně u 60 % pacientů s CD. Mohou se nacházet i u 2 % zdravých jedinců, proto platí, že pozitivní výsledek značí s velkou pravděpodobností CD, ale nemusí tomu tak být. ANCA protilátky jsou namířené vůči bílým krvinkám a vyskytují se u 60–70 % pacientů s UC (Červenková, 2009). Dalším rozumným testem je vyšetření stolice, kdy se pozoruje koncentrace fekálního kalprotektinu. Když je jeho koncentrace zvýšená potvrzuje se tím, že se jedná o střevní infekci nebo zánětlivý stav, ale opět to nepotvrzuje, že se přímo jedná o IBD (Feuerstein a Cheifetz, 2017).

Endoskopie a zobrazovací metody jsou základními nástroji pro diagnostiku a sledování IBD. Endoskopické postupy umožňují přímou vizualizaci a přístup do lumen střeva. Přímá vizualizace umožňuje identifikaci charakteristických lézí, sledování úspěchu či selhání terapie a screening KR-CA (Veauthier a Hornecker, 2018). Pokud endoskopie není snadno dostupná nebo když struktury tlustého střeva brání důkladnému vyhodnocení může baryový klystýr s dvojitým kontrastem a baryová kontrola tenkého střeva prokázat jemné detaily sliznice. Souvislý, povrchový, zánětlivý proces naznačuje UC, zatímco nesouvislý zánět postihující tenké střevo naznačuje CD (Langan et al., 2007). Někteří odborníci obhajují použití chromoendoskopie, která zahrnuje postřík sliznice tlustého střeva indigokarmínem nebo methylenovou modří. V mnoha studiích bylo

popsáno, že chromoendoskopie je při detekci dysplazie účinnější než kolonoskopie bílým světlem s náhodnými biopsiemi (Feuerstein a Cheifetz, 2014).

Odlišení CD od UC může být náročné, zvláště v raném stádiu onemocnění, ale je to důležitý krok, protože léčba se u těchto onemocnění liší. Pro stanovení konečné diagnózy je rozhodující kontrola biopsií zkušeným patologem (Langan et al. 2007).

## **9.2 Léčba IBD**

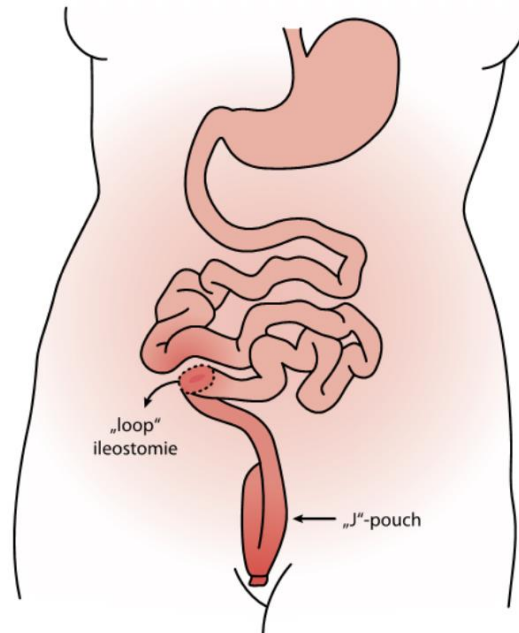
Rozhodnutí o léčbě se řídí věkem, symptomy, stavem zánětu, lokalizací a rozsahem onemocnění a celkovým rizikem závažnějších a komplikovanějších onemocnění (Veauthier a Hornecker, 2018). Cílem léčby obou typů chronického zánětlivého onemocnění střev je rychlé navození bezsteroidní remise a prevence komplikací samotného onemocnění (Baumgart, 2009).

Prvním krokem v léčbě IBD je farmaceutická léčba. Lékaři obvykle předepisují léky postupně. Prvně se předepisují méně škodlivé léky, a pokud tyto léky neposkytnou požadovanou úlevu, jsou předepsány některé jiné léky (Seyedian et al., 2019). Mezi tyto léky se řadí hlavně kortikosteroidy, aminosalicyláty imunosupresiva, biologická léčiva a perorální malé molekuly (Cai et al., 2021). V některých případech pomáhají i další léky jako je metronidazol a širokospektrá ATB (Pithadia a Jain, 2011). Mezi aminosalicyláty se řadí kyselina 5-aminosalicylová (dále jako 5-ASA) (Cai et al., 2021). 5-ASA jsou základem léčby mírného až středně těžkého onemocnění. U pacientů, u kterých selhala léčba těmito aminosalicyláty, nebo kteří mají závažný průběh onemocnění, je typicky volena léčba kortikosteroidy (Feuerstein a Cheifetz, 2014). Kortikosteroidy jsou lékem volby při středně těžkých až těžkých vzplanutích, ale pro dlouhodobé užívání jsou nevhodné kvůli svým vedlejším účinkům a neschopnosti udržet remisi. Preferovaným steroidem je prednisolon, který je podáváný perorálně, rektálně nebo parenterálně v naléhavých situacích (Pithadia a Jain, 2011).

I když je cílem léčby dostat pod kontrolu zánět a navodit klinickou remisi farmakologickou terapií, u většiny pacientů bude nakonec vyžadován chirurgický zákrok. Bohužel operace není kurativní a pacienti stále vyžadují pokračující terapii i po operaci pro recidivu onemocnění (Feuerstein a Cheifetz, 2017). Chirurgická léčba je indikována u pacientů s TM, perforací, masivním krvácením, neúspěšnou léčbou, dysplazií tlustého střeva nebo rakovinou (Feuerstein a Cheifetz, 2014). U UC je úplným řešením kolektomie



s pouchem, ale i tato metoda vystavuje pacienta riziku, jelikož může dojít k zánětu tzv. pouchitidě, která následně představuje specifický léčebný problém (Souček et al., 2019) (Obrázek 13).



Obrázek 13: Kolektomie s pouchem (zdroj:Lukáš a Hoch, 2018)

Chirurgická léčba CD zahrnuje bypass, resekci a strikturoplastiku. Cíl chirurgie CD se posunul od radikální operace k minimální operaci, která má odstranit jen silně zanícenou tkáň nebo provést strikturoplastiku. Chirurg musí posoudit, který postup je v každé oblasti onemocnění nejvhodnější (Yamamoto a Watanabe, 2014). Pomocí resekce se odstraňuje postižený úsek střeva, kterému se říká primární postižení. Strikturoplastika je neresekční výkon, při kterém se odstraňuje přepážka průchodnosti a musí se zachovat délka střeva. Pokud mají pacienti s CD postižení, které je neřešitelné resekci ani strikturoplastikou dochází k výkonu zvanému bypass. (Lukáš a Hoch, 2018).



## 10 Cíle práce

1. Vyšetření části genů *NOD2/CARD15*, *NOD1/CARD4* a *ICAM-1* u souboru pacientů s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou, vyšetření souboru jedinců bez těchto diagnóz
2. Klasifikace nalezených SNP

## 11 Metodika

Metodika mé bakalářské práce probíhala pod vedením Ing. Anety Zlámalové v laboratoři na Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Prováděla jsem zde izolaci DNA z bukálního stěru, amplifikaci specifického úseku genu pomocí PCR, dále bylo potřeba vizualizovat PCR produkty pomocí gelové elektroforézy, a nakonec jsem tyto PCR produkty enzymaticky přečistila a poslala na sekvenaci DNA. Toto všechno jsem prováděla u vzorků od 12 probandů (Tabulka 1), které jsem si sama odebrala. Jednalo se o probandy trpící CD, UC nebo o ty, kteří jsou zdraví a jsou s nemocnými v příbuzenském vztahu.

Tabulka 1: Přehled probandů

Číslo	Pohlaví	Nemoc
Vzorek č.1	Žena	CD
Vzorek č.2	Muž	UC
Vzorek č.3	Žena	Zdráva – matka (muže vz.č.2)
Vzorek č.4	Muž	CD
Vzorek č.5	Muž	CD
Vzorek č.6	Žena	CD
Vzorek č.7	Žena	CD
Vzorek č.8	Žena	CD
Vzorek č.9	Muž	Zdráv – syn nemocného otce
Vzorek č.10	Muž	UC
Vzorek č.11	Muž	UC
Vzorek č.12	Žena	Zdráva – dcera (muže vz.č.11)

(Zdroj: Vlastní)

### 11.1 Izolace DNA

Izolace DNA se provádí před některými genetickými metodami. Nejčastěji je prováděna z bukálního stěru nebo z periferní krve.

V mém případě jsem izolovala DNA z bukálních stěrů od 12 probandů. Tato část práce je velmi důležitá, díky izolaci se snažíme získat čistou a nepoškozenou DNA probanda bez příměsí nečistot.

Před samotným začátkem práce jsem si připravila pomůcky, které jsem k izolaci potřebovala. Jednalo se o kit pro izolaci DNA od firmy Generi biotech, který obsahoval pytlík se sběrnými zkumavkami, pytlík s kolonkami a reagentie – Buffer BL1, Buffer BL2, Wash Buffer BL3, Elution Buffer BL4, Proteinase K a Proteinase K Buffer (dále

PKB). Jednalo se o ještě nerozbalený kit, který tedy obsahoval nepřípravené reagenty Wash Buffer BL3 a Proteinase K, a které jsem si musela podle návodu připravit.

Do lahvičky Wash Buffer BL3 jsem přidala 48 ml ethanolu (96%), promíchala a označila víčko lahvičky křížkem, aby bylo jasné, že už je připravený k použití. Takto připravený roztok je stabilní minimálně 1 rok při laboratorní teplotě.

Lahvička Proteinase K obsahovala tabletu, kterou bylo nutné rozpustit, aby vznikl roztok vhodný k použití. Pro její rozpuštění jsem do lahvičky přidala 1,35 ml pufru PKB a řádně jsem promíchala. Opět bylo nutné označit na lahvičce, že byl přidán PKB. Takto vzniklý roztok je stabilní minimálně 6 měsíců při -20 °C.

Dále jsem si připravila stojan na zkumavky a pro každý vzorek jsem si připravila 3 mikrozkušavky (které nebyly součástí kitu), 2 sběrné zkumavky a 1 kolonku. Lihovým fixem jsem je všechny řádně označila čísly 1-12. Zapnula jsem si termostat a nastavila jeho teplotu na 70 °C. Vložila jsem do něj Elution Buffer BL4, protože je nutné, aby jeho teplota při použití měla 70 °C.

Nejprve jsem prováděla lýzu vzorku. Materiál se vzorkem stěru z bukální sliznice (1-12) jsem pomocí nůžek odstříhla a umístila do mikrozkušavek. Dále jsem do stejných mikrozkušavek přidala 200 µl deionizované vody, 200 µl Buffer BL1 a 25 µl Proteinasy K. Řádně jsem vzorky promíchala na vortexu (cca 20 s) a dala inkubovat do blokového termostatu na 15 minut při 70 °C. Po inkubaci jsem vzorky ještě před otevřením krátce stočila na centrifuze a poté jsem jejich obsah přenesla pomocí mikropipety do nové mikrozkušavky. Mikrozkušavku se stěrovým materiálem jsem vyhodila.

Dále jsem přidala 96% ethanol. Do každého vzorku jsem napipetovala 210 µl, promíchala na vortexu a dala do centrifugy krátce stočit.

V dalším kroku probíhalo navázání DNA. Na každou kolonku umístěnou ve sběrných zkumavkách jsem z mikrozkušavek přepipetovala 600 µl vzorku. Dále jsem vzorky centrifugovala jednu minutu při 11 000 rpm/min. Po centrifugaci jsem sběrnou zkumavku s filtrátem vyhodila a kolonku jsem vložila do druhé připravené sběrné zkumavky.

Následoval promývací krok. Na kolonky jsem napipetovala 500 µl Buffer BL2 a centrifugovala jsem vzorky po dobu jedné minuty při 11 000 rpm/min. Tekutinu ze sběrných zkumavek jsem vylila a kolonky jsem vložila zpět do těch samých sběrných zkumavek. Dále jsem na kolonky napipetovala 600 µl Wash Buffer BL3 a centrifugovala jsem vzorky dvě minuty při 11 000 rpm/min. Po centrifugaci jsem sběrné zkumavky s filtrátem odstranila a kolonky vložila do mých připravených třetích mikrozkušavek.

Poslední krok byl krok eluční, kdy jsem na střed všech kolonek napipetovala 100 µl Buffer BL4 předehřátého na 70 °C. Následovala inkubace vzorků po dobu jedné minuty při laboratorní teplotě. Poté jsem vložila kolonky i s mikrozkušavkami do centrifugy a centrifugovala 1 minutu při 11 000 rpm/min. Nakonec jsem odstranila kolonku a v mikrozkušavce byla čistá genomová DNA připravená pro další použití.

Takto připravené vzorky s čistou genomovou DNA jsem dále měřila na spektrofotometru značky Colibri a tím zjišťovala koncentraci vyizolované DNA (Tabulka 2).

*Tabulka 2: Výsledky koncentrací vyizolované DNA*

Číslo	Výsledek
<b>Vzorek č.1</b>	22,30 ng/ml
<b>Vzorek č.2</b>	31,32 ng/ml
<b>Vzorek č.3</b>	36,75 ng/ml
<b>Vzorek č.4</b>	44,79 ng/ml
<b>Vzorek č.5</b>	41,28 ng/ml
<b>Vzorek č.6</b>	47,89 ng/ml
<b>Vzorek č.7</b>	30,00 ng/ml
<b>Vzorek č.8</b>	54,68 ng/ml
<b>Vzorek č.9</b>	29,25 ng/ml
<b>Vzorek č.10</b>	17,73 ng/ml
<b>Vzorek č.11</b>	56,55 ng/ml
<b>Vzorek č.12</b>	48,82 ng/ml

*(Zdroj: Vlastní)*

## **11.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Jedná se o metodu, která slouží k namnožení neboli amplifikaci určitého úseku DNA. Pro zahájení syntézy DNA jsou nezbytné dva oligonukleotidy, tzv. primery, které jsou přibližně 15-25 bází dlouhé. (Passarge, 2019). PCR je automatizovaný proces, který probíhá v přístroji označovaném thermocycler (Otová et al., 2020). V mém případě jsem

pracovala se 7 páry primerů, které jsou specifické pro úseky vyšetřovaného genu – *D372N*, *G241R*, *K469E*, *R702W*, *E266K*, *G908R* a *1007fs* (Özen et al., 2006) (Tabulka 3).

Tabulka 3: Primery použité pro PCR a sekvenování

Primery	Forward	Reverse
<b>R702W</b>	5'-AGATCACAGCAGCCTTCCTG-3'	5'-CACGCTCTTGGCCTCACC-3'
<b>G908R</b>	5'-CTCTTTTGGCCTTTTCAGATTCTG-3'	5'-CAGCTCCTCCCTCTTCACCT-3'
<b>1007fs</b>	5'-GGCAGAAGCCCTCCTGCAGGGCC-3'	5'-CCTCAAATTCCTGCCATTCC-3'
<b>E266K</b>	5'-TGAGACCATCTTCATCCTGG-3'	5'-CTTCCCACTGAGCAGGTTG-3'
<b>D372N</b>	5'-GTGCCTGACAGCTCCTGC-3'	5'-CAGGGTCATCGTGCAGTCG-3'
<b>G241R</b>	5'-CGTGGTCTGTTCCCTGT-3'	5'-CTCCTGGCTCTGGTTCC-3'
<b>K469E</b>	5'-TTCCCAGCAGACTCCATTGT-3'	5'-GGATACAACAGGCGGTGAGG-3'

(Zdroj: Vlastní)

Než jsem začala pracovat, bylo nutné si připravit primery naředit podle pokynů výrobce. Nově objednané primery totiž do laboratoře vždy přijdou v lyofilizované formě. Množství deionizované vody, kterou jsem pipetovala do primerů bylo dáno na dodacích listech od dodavatele, kterým byl KR. Na dodacích listech je vždy napsáno, do jakého primeru a kolik demineralizované vody máme přidat (Tabulka 4).

Tabulka 4: Množství přidávané deionizované vody

Primery	Forward	Reverse
<b>R702W</b>	add 275 µl	add 406 µl
<b>G908R</b>	add 260 µl	add 223 µl
<b>1007fs</b>	add 328 µl	add 359 µl
<b>E266K</b>	add 284 µl	add 443 µl
<b>D372N</b>	add 242 µl	add 313 µl
<b>G241R</b>	add 327 µl	add 348 µl
<b>K469E</b>	add 192 µl	add 384 µl

(Zdroj: Vlastní)

Jakmile jsem si připravila primery, dlouze jsem je zvortexovala a dala je krátce stočit do centrifugy.

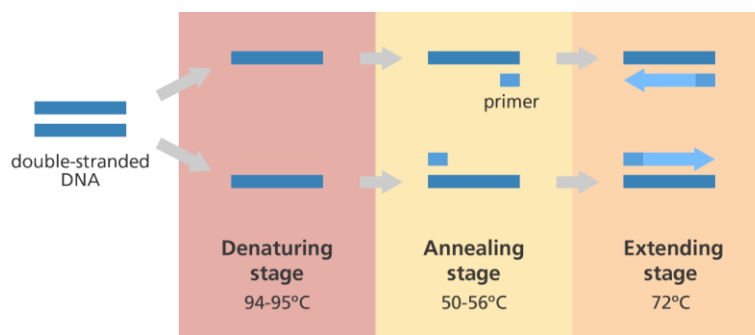
Dále jsem si musela primery naředit pro další použití. Vždy jsem napipetovala 10 µl příslušného primeru a 90 µl injekční vody (PCR vody). Opět jsem zvortexovala a dala krátce stočit.

Takto už jsem měla všechno připravené a mohla jsem začít připravovat PCR mix. Pracovala jsem v laminárním boxu. Připravila jsem si do stojánku PCR mikrozkušavky o objemu 0,2 ml a řádně je popsala. Dále jsem do každé popsané zkumavky napipetovala

12,5 µl Master Mixu, 0,5 µl forward i reverse primeru, 1,5 µl vyzolované DNA a nakonec 10 µl PCR vody. Všechny mikrozkušavky jsem potom zvortexovala a dala krátce stočit.

Nakonec bylo nutné vzorky vložit do thermocycleru, aby došlo k amplifikaci DNA. V thermocycleru dochází nejdříve k denaturaci, následuje annealing a poslední fází reakce je elongace. Toto se opakuje v každém cyklu. PCR se v průměru skládá z 25–30 cyklů. U jednotlivých primerů, se kterými jsem pracovala, je to rozdílné.

U denaturace se jedná o tepelnou reakci při 95 °C, kdy dochází k rozdělení DNA na dva jednoduché řetězce. Dále nastává ochlazení vzorku na cca 50–60 °C, tato fáze se nazývá annealing a dochází k nasedání primerů na komplementární 3' konce cílové DNA (Bartůňková et al., 2011). Poslední fází je elongace, kdy se zdvojuje počet přítomných řetězců (Beránek, 2016) (Obrázek 14).



Obrázek 14: Polymerázová řetězová reakce (zdroj: [www.yourgenome.org](http://www.yourgenome.org))

U příslušných primerů, se kterými jsem pracovala se lehce lišila teplota ve fázi annealingu (Tabulka 5). Bylo tedy nutné nastavit vhodné programy do thermocycleru.

Tabulka 5: Teploty fází PCR dle příslušných primerů

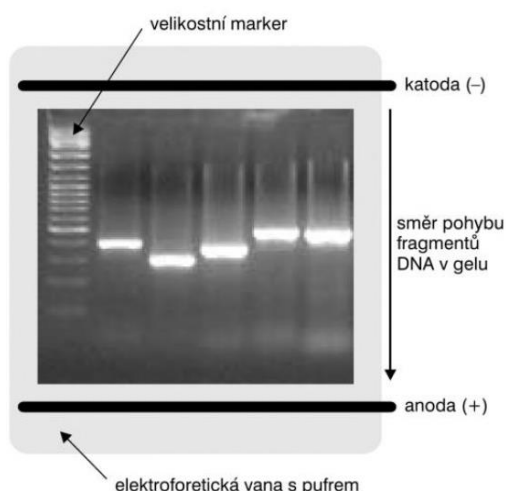
Fáze PCR	G241R	G908R+1007fs+D372N+K469E	R702W+E266K
Počáteční denaturace	95 °C (5')	95 °C (5')	95 °C (5')
Denaturace	95 °C (1')	95 °C (1')	95 °C (1')
Annealing	52 °C (1')	60 °C (1')	58 °C (1')
Elongace	72 °C (2')	72 °C (2')	72 °C (2')
Konečná Elongace	72 °C (7')	72 °C (7')	72 °C (7')

(Zdroj: Vlastní)

Následovala kontrola pomocí elektroforézy, aby se zjistilo, zda byla amplifikace úspěšná.

### 11.3 Elektroforéza

Jedná se o metodu, která slouží k separaci, identifikaci a purifikaci nukleových kyselin (dále jako NK), a to na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli (Beránek, 2016) (Obrázek 15). Elektroforéza vždy probíhá za přítomnosti vhodného pufru a na vhodném nosiči (Bartůňková et al., 2011). Elektronegativitu DNA i RNA způsobují zbytky kyseliny fosforečné, ty společně s pětiuhlíkatými cukry tvoří páteř polynukleotidových vláken (Beránek, 2016). Molekuly NK se po aplikaci do separačního gelu a po zapnutí elektrického proudu pohybují ke kladné elektrodě (anodě). V důsledku fosfátových skupin mají NK za neutrálního pH záporný náboj (Cibula a Petruželka, 2009; Beránek, 2016). Jako vhodné médium můžou být využity gely ze škrobu, agarózy nebo akrylamidu (Passarge, 2019).



Obrázek 15 - Schéma elektroforézy NK (zdroj: Cibula a Petruželka, 2009)

Začátek elektroforézy spočíval v navážení 2,50 g agarózy na laboratorních předvážkách. Toto množství bylo důležité, abych získala 2,5% gel. Následně jsem ji přesypala do Erlenmeyerovy baňky a dále jsem přidala 100 ml pufru. Řádně jsem baňku promíchala a vložila do mikrovlnky přibližně na 2 minuty, dokud nedošlo k varu a tekutina nebyla úplně čirá. Takto připravený horký gel jsem následně zchladila. Baňku jsem vložila pod proud tekoucí ledové vody a lehce s ní kroužila. Do zchladlého gelu jsem ještě napipetovala 7  $\mu$ l ethidium bromidu.

V dalším kroku jsem si složila formu na gel, kterou bylo nutné pevně uzavřít a vložit do ní 2 hřebínky, které v gelu vytvoří jamky na vložení vzorků. Dále jsem do ní vložila vodováhu, protože je nutné, aby aparatura byla úplně rovná, aby nedošlo k nerovnoměrnému rozliti gelu. Připravený ještě tekutý gel jsem nalila do aparatury a nechala pořádně ztuhnout. Po ztuhnutí jsem gel i s aparaturou vložila do elektroforetické vany a začala pipetovat vzorky. Do první a poslední jamky jsem vždy pipetovala DNA ladder (100 bp) a dál jsem pipetovala vzorky jednotlivě podle čísel. Po napipetování vzorků jsem vanu uzavřela, zapnula a nastavila na 130 V na 30 minut.

Po proběhnutí elektroforézy jsem vyndala gel z vany a vložila na UV lampu, vyfotografovala a uložila si fotku do počítače. Následně jsem si všechny fotky popsala čísly příslušných vzorků.

#### ***11.4 Enzymatické přečištění PCR produktu***

Začala jsem tím, že jsem si připravila ke každému primeru 12 mikrozkušavek, které jsem postupně polepila příslušnými čárovými kódy (barcode) a 12 mikrozkušavek o objemu 0,2 ml. Mikrozkušavky (0,2 ml) jsem si řádně popsala lihovým fixem a pipetovala do nich 5  $\mu$ l PCR produktu, 0,5  $\mu$ l Exo 1 (Exonuclease 1 od BioLabs) a 1  $\mu$ l rSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase od BioLabs). Následovala inkubace 15 minut při 37 °C a hned poté inkubace 15 minut při 80 °C, kvůli inaktivaci enzymu. Po inkubaci jsem měla PCR produkty přečištěné, ale bylo nutné je ještě krátce stočit, aby se obsah zkušavek dostal z víčka. Nakonec jsem je připravila na sekvenaci.

#### ***11.5 Sekvence DNA***

Sekvenování DNA nám umožňuje stanovit pořadí nukleotidů v určitém úseku DNA (Otová et al., 2020).

Do mikrozkušavek polepených čárovými kódy jsem napipetovala 17,5  $\mu$ l PCR vody, 5  $\mu$ l libovolného primeru (v mém případě jsem pracovala s Forward primerem) a 5  $\mu$ l přečištěného PCR produktu.

Takto připravené vzorky jsem vložila do igelitového pytlíku, a ještě do obálky, kterou jsem odvezla na Biologické centrum Jihočeské univerzity, kde je k dispozici schránka na odesílání vzorků na sekvenování do firmy GenSeq s.r.o.



## 12 Výsledky

Cílem bakalářské práce bylo vyšetření části genů *NOD2/CARD15*, *NOD1/CARD4* a *ICAM-1* u souboru pacientů s CD a UC a vyšetření souboru jedinců bez těchto diagnóz. Výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 6)

Tabulka 6: Amplifikace variant vyšetřovaných genů

Gen	<i>NOD2/CARD15</i>			<i>ICAM-1</i>		<i>NOD1/CARD4</i>	
	<i>R702W</i>	<i>G908R</i>	<i>1007fs</i>	<i>K469E</i>	<i>G241R</i>	<i>D372N</i>	<i>E266K</i>
1	N	N	A	A	N	N	N
2	N	A	A	A	N	A	A
3	A	N	A	A	A	A	A
4	A	A	N	A	A	A	A
5	A	A	A	A	A	A	A
6	A	A	A	A	A	A	A
7	A	A	N	A	N	A	A
8	A	A	A	A	A	A	A
9	A	A	A	A	N	A	A
10	N	A	N	A	A	A	A
11	N	A	A	A	N	N	N
12	N	A	A	A	N	A	N
GenBank	AF385090.1	AF385088.1	AF385086.1	NM_000201.3		NM_006092	

(Zdroj: Vlastní)

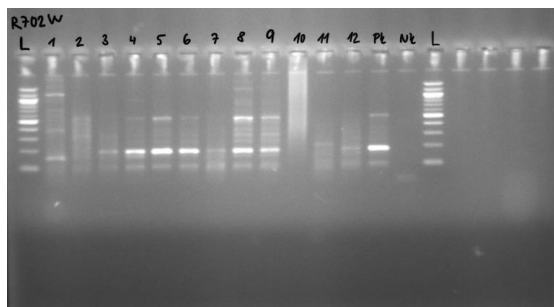
Vysvětlivky: N – nezdařilá amplifikace, A – zdařilá amplifikace

### 12.1 *NOD2/CARD15*

U každého z primerů byla provedena PCR reakce a následně elektroforéza příslušných PCR produktů.

#### 12.1.1 *R702W*

Na obrázku (Obrázek 16) je zobrazena vizualizace PCR produktů 1-12 varianty *R702W* pomocí gelové elektroforézy. Z obrázku vyplývá, že pozitivní výsledek vyšel u čísla 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 12. Vzorky číslo 2, 10 a 11 vyšly s negativním výsledkem.



Obrázek 16: Elektroforeogram PCR produktů R702W: L – ladder (100 bp), 1 – vzorek č. 1 (CD, žena), 2 – vzorek č. 2 (UC, muž), 3 – vzorek č. 3 (zdráva), 4 – vzorek č. 4 (CD, muž), 5 – vzorek č. 5 (CD, muž), 6 – vzorek č. 6 (CD, žena), 7 – vzorek č. 7 (CD, žena), 8 – vzorek č. 8 (CD, žena), 9 – vzorek č. 9 (zdráv), 10 – vzorek č. 10 (UC, muž), 11 – vzorek č. 11 (UC, muž), 12 – vzorek č. 12 (zdráva), NK – negativní kontrola (zdroj: vlastní)

U vzorků číslo 3, 4, 5, 6, 7, 8 a 9 se podařilo amplifikovat úsek pomocí použitých primerů. Osekvenovaný úsek jsem si otevřela a zkontrolovala v programu BioEdit a vložila do nástroje BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), kde jsem úsek porovnála s dostupnými sekvencemi. Ta potvrdila, že amplifikovaný úsek souhlasí s genem *NOD2/CARD15* z 90–98 % (Query cover).

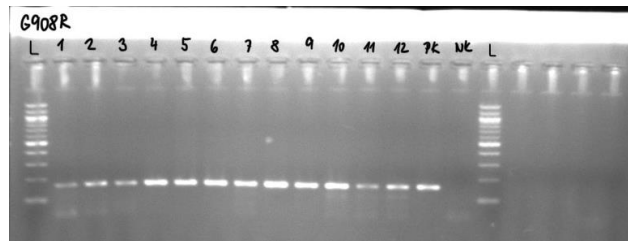
Dále jsem pomocí internetové databáze GenBank našla odpovídající sekvenci exonu 4 (AF385090.1), na kterém se hledaný polymorfismus (2104C→T) nachází na pozici 462bp. Do programu Geneious Prime jsem vložila všechny sekvence vzorků, sekvenci exonu 4 a porovnála je. Na základě Alignmentu vytvořeného v programu Geneious Prime sekvence nelze vyhodnotit. Čtecí rámec amplifikovaného úseku je posunut za místo hledaného polymorfismu (Obrázek 17).



Obrázek 17: Výsledný Alignment sekvencí varianty R702W genu *NOD2/CARD15* (zdroj: vlastní)

### 12.1.2 G908R

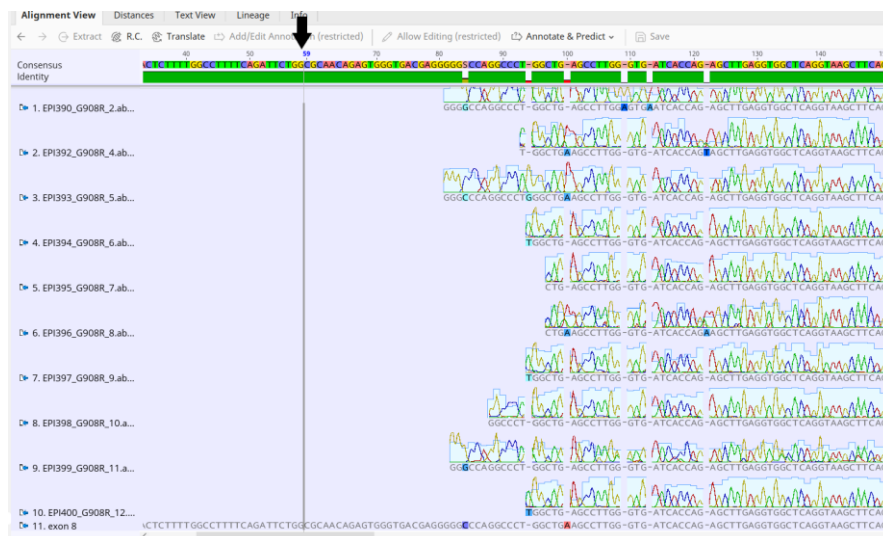
Z příslušného obrázku (Obrázek 18), který značí vizualizaci PCR produktů 1-12 varianty G908R pomocí gelové elektroforézy lze vidět, že pozitivně vyšly všechny vzorky. Žádný vzorek nevyšel s negativním výsledkem.



Obrázek 18: Elektroforeogram PCR produktů G908R: L – ladder (100 bp), 1 – vzorek č. 1 (CD, žena), 2 – vzorek č. 2 (UC, muž), 3 – vzorek č. 3 (zdráva), 4 – vzorek č. 4 (CD, muž), 5 – vzorek č. 5 (CD, muž), 6 – vzorek č. 6 (CD, žena), 7 – vzorek č. 7 (CD, žena), 8 – vzorek č. 8 (CD, žena), 9 – vzorek č. 9 (zdráv), 10 – vzorek č. 10 (UC, muž), 11 – vzorek č. 11 (UC, muž), 12 – vzorek č. 12 (zdráva), NK – negativní kontrola (zdroj: vlastní)

U vzorků číslo 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 a 12 se podařilo amplifikovat úsek pomocí použitých primerů. Následně jsem pokračovala stejně jako v předchozím bodě. Nástroj BLAST potvrdil, že amplifikovaný úsek souhlasí s genem *NOD2/CARD15* z 97–100 % (Query cover).

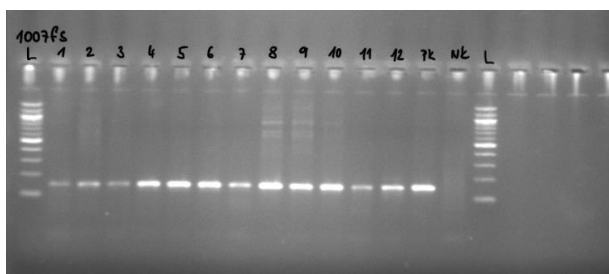
Pomocí stejné internetové databáze jsem našla odpovídající sekvenci exonu 8 (AF385088.1), na kterém se hledaný polymorfismus (2722G→C) nachází na pozici 59bp. Následně jsem pokračovala stejným způsobem jako u předchozího bodu. Výsledek je stejný jako u R702W (Obrázek 19).



Obrázek 19: Výsledný Alignment sekvencí varianty G908R genu *NOD2/CARD15* (zdroj: vlastní)

### 12.1.3 1007fs

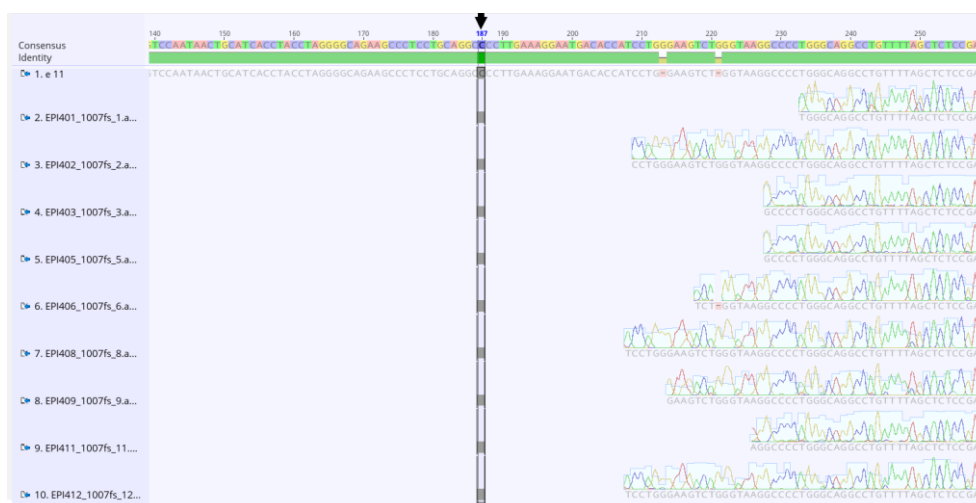
Na obrázku (Obrázek 20) ukazujícím vizualizaci PCR produktů 1-12 varianty *1007fs* pomocí gelové elektroforézy lze opět vidět, že pozitivně vyšly všechny vzorky. Tím pádem žádný vzorek nevyšel negativně.



Obrázek 20: Elektroforeogram PCR produktů *1007fs*: L – ladder (100 bp), 1 – vzorek č. 1 (CD, žena), 2 – vzorek č. 2 (UC, muž), 3 – vzorek č. 3 (zdráva), 4 – vzorek č. 4 (CD, muž), 5 – vzorek č. 5 (CD, muž), 6 – vzorek č. 6 (CD, žena), 7 – vzorek č. 7 (CD, žena), 8 – vzorek č. 8 (CD, žena), 9 – vzorek č. 9 (zdráv), 10 – vzorek č. 10 (UC, muž), 11 – vzorek č. 11 (UC, muž), 12 – vzorek č. 12 (zdráva), NK – negativní kontrola (zdroj: vlastní)

U vzorků číslo 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11 a 12 se podařilo amplifikovat úsek pomocí použitých primerů. Dále jsem pokračovala stejně jako u předchozích bodů. Pomocí nástroje BLAST se potvrdilo, že amplifikovaný úsek souhlasí s genem *NOD2/CARD15* z 95–100 % (Query cover).

Opět jsem využila stejnou internetovou databázi, pomocí které jsem našla odpovídající exon 11 (AF385086.1). Na tomto exonu se hledaná inserce (3020insC) nachází na pozici 187bp. Následovaly stejné kroky jako u předchozích bodů. Výsledek opět stejný jako u *R702W* a *G908R* (Obrázek 21).

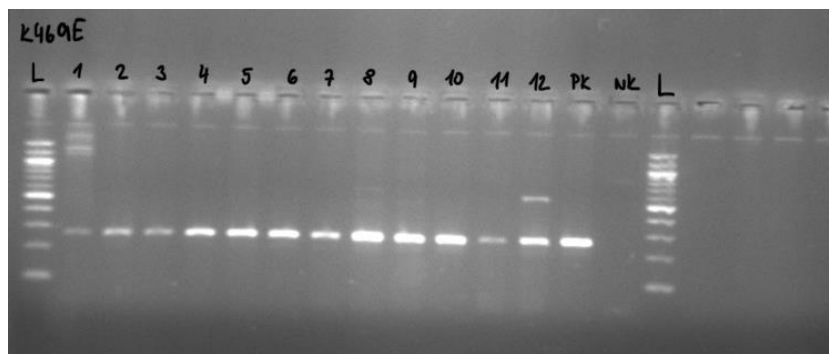


Obrázek 21: Výsledný Alignment sekvencí varianty *1007fs* genu *NOD2/CARD15* (zdroj: vlastní)

## 12.2 ICAM-1

### 12.2.1 K469E

Podle obrázku gelové elektroforézy (Obrázek 22), na kterém je znázorněna vizualizace PCR produktů 1-12 varianty *K469E* lze poznat, že pozitivně vyšly všechny příslušné vzorky. Žádný vzorek nevyšel negativně.



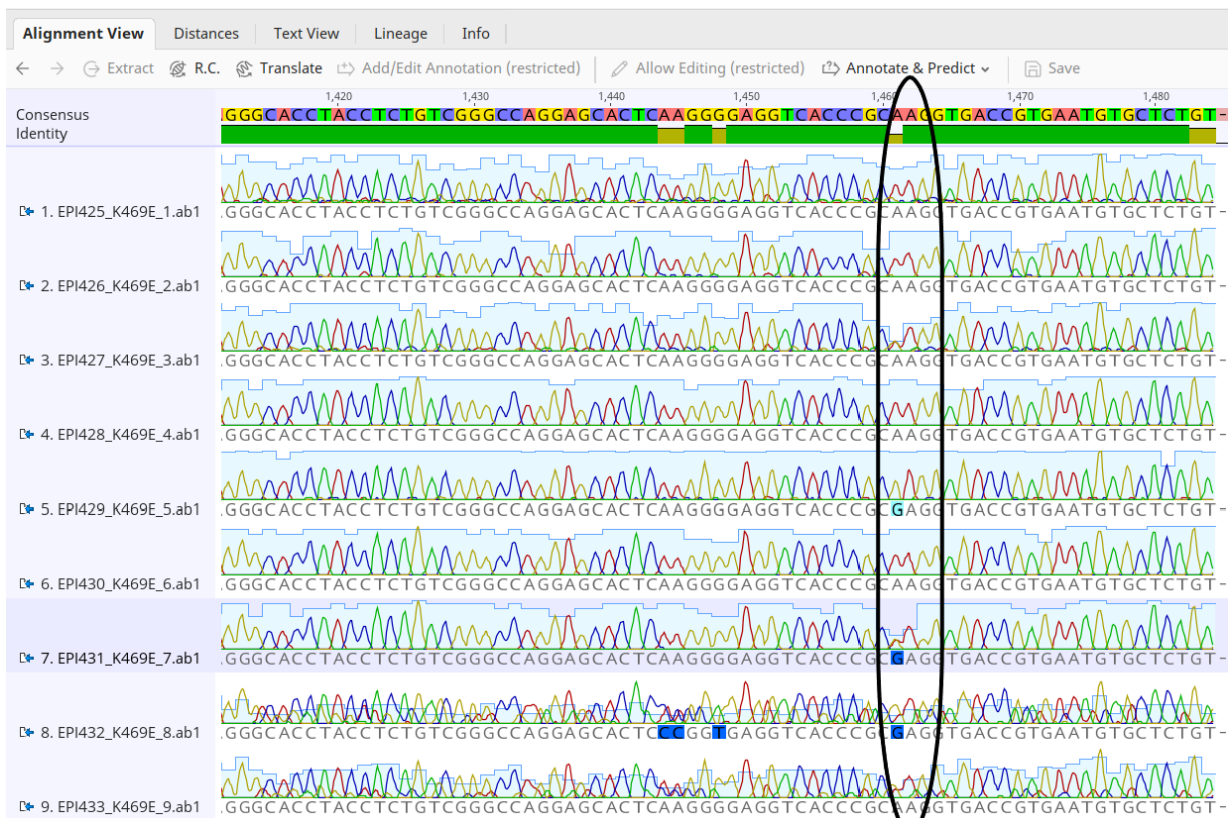
Obrázek 22: Elektroforeogram PCR produktů *K469E*: L – ladder (100 bp), 1 – vzorek č. 1 (CD, žena), 2 – vzorek č. 2 (UC, muž), 3 – vzorek č. 3 (zdráva), 4 – vzorek č. 4 (CD, muž), 5 – vzorek č. 5 (CD, muž), 6 – vzorek č. 6 (CD, žena), 7 – vzorek č. 7 (CD, žena), 8 – vzorek č. 8 (CD, žena), 9 – vzorek č. 9 (zdráv), 10 – vzorek č. 10 (UC, muž), 11 – vzorek č. 11 (UC, muž), 12 – vzorek č. 12 (zdráva), NK – negativní kontrola (zdroj: vlastní)

U všech vzorků se podařilo amplifikovat úsek pomocí použitých primerů. Stejně jako u předchozích bodů jsem osekvenovaný úsek vložila a zkontrolovala v příslušném programu. Pomocí nástroje BLAST se potvrdilo, že amplifikovaný úsek souhlasí s genem *ICAM-1* z 99–100 % (Query cover).

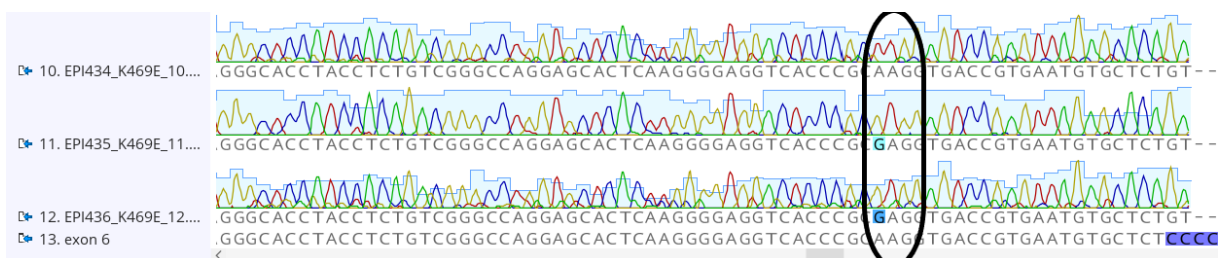
Pomocí příslušné databáze jsem našla odpovídající exon 6 (NM\_000201.3), na kterém se hledaný polymorfismus (1462A→G) nachází na pozici 1462bp.

Jednonukleotidový polymorfismus (dále jako SNP) *K469E* (rs5498) se nachází v exonu 6 a spočívá ve výměně nukleotidu A za G na kodonu 469, což podporuje aktivaci lysinu (AAG) za kyselinu glutamovou (GAG). Změna aminokyseliny mění pátou Ig doménu a ovlivňuje vazbu adhezivní molekuly 1 (CD54) s lymfocyty LFA-1 (CD8/CD11a), tak i Mac-1 makrofágů (CD8/CD11b). To znemožňuje transepiteliální migraci leukocytů k příslušnému zánětu (Bessa et al., 2016).

Prostřednictvím Alignmentu jsem našla tento SNP na daném místě (Obrázek 23) (Obrázek 24).



Obrázek 23: Výsledný Alignment sekvencí varianty K469E genu ICAM-1 1. část (zdroj: vlastní)



Obrázek 24: Výsledný Alignment sekvencí varianty K469E genu ICAM-1 2. část (zdroj: vlastní)

Vzorky číslo 1, 2, 3, 4, 6, 9 a 10 vyšly jako dominantní homozygoti s variantou K/K, vzorky 7 a 8 jako heterozygoti K/E a vzorky 5, 11 a 12 jako recesivní homozygoti E/E (Tabulka 7).

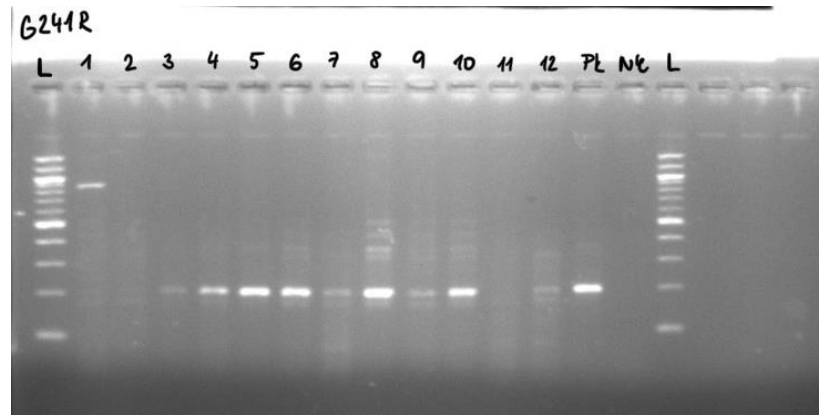
Tabulka 7: Početní zastoupení vyšetřovaných probandů s variantou K469E

<b>K469E</b>	<b>CD</b>	<b>UC</b>	<b>Zdráv</b>
<b>K/K</b>	3	2	2
<b>K/E</b>	2	0	0
<b>E/E</b>	1	1	1

(Zdroj: Vlastní)

### 12.2.2 G241R

Na obrázku gelové elektroforézy (Obrázek 25), pomocí které jsem provedla vizualizaci PCR produktů 1-12 varianty *G241R* lze vidět, že pozitivně vyšly vzorky číslo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 a 12. Negativně vyšly vzorky číslo 1, 2 a 11.



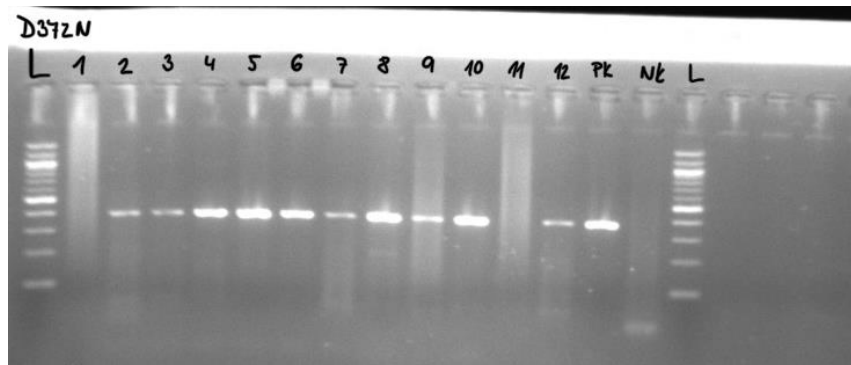
Obrázek 25: Elektroforeogram PCR produktů *G241R*: L – ladder (100 bp), 1 – vzorek č. 1 (CD, žena), 2 – vzorek č. 2 (UC, muž), 3 – vzorek č. 3 (zdráva), 4 – vzorek č. 4 (CD, muž), 5 – vzorek č. 5 (CD, muž), 6 – vzorek č. 6 (CD, žena), 7 – vzorek č. 7 (CD, žena), 8 – vzorek č. 8 (CD, žena), 9 – vzorek č. 9 (zdráv), 10 – vzorek č. 10 (UC, muž), 11 – vzorek č. 11 (UC, muž), 12 – vzorek č. 12 (zdráva), NK – negativní kontrola (zdroj: vlastní)

Vzorky číslo 3, 4, 5, 6, 8 a 10 se podařilo amplifikovat pomocí PCR. Avšak sekvence dle nástroje BLAST neodpovídá *ICAM-1* genu, nýbrž genu *ADCY1* (adenylate cyclase 1). Z tohoto důvodu nelze sekvenci vyhodnotit pro hledaný polymorfismus.

## 12.3 *NOD1/CARD4*

### 12.3.1 *D372N*

Dle příslušného obrázku (Obrázek 26), na kterém jsou vyobrazeny výsledky gelové elektroforézy, která slouží k vizualizaci PCR produktů 1-12 varianty *D372N* lze říct, že pozitivně vyšly vzorky číslo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 a 12. S negativním výsledkem vyšly vzorky číslo 1 a 11.

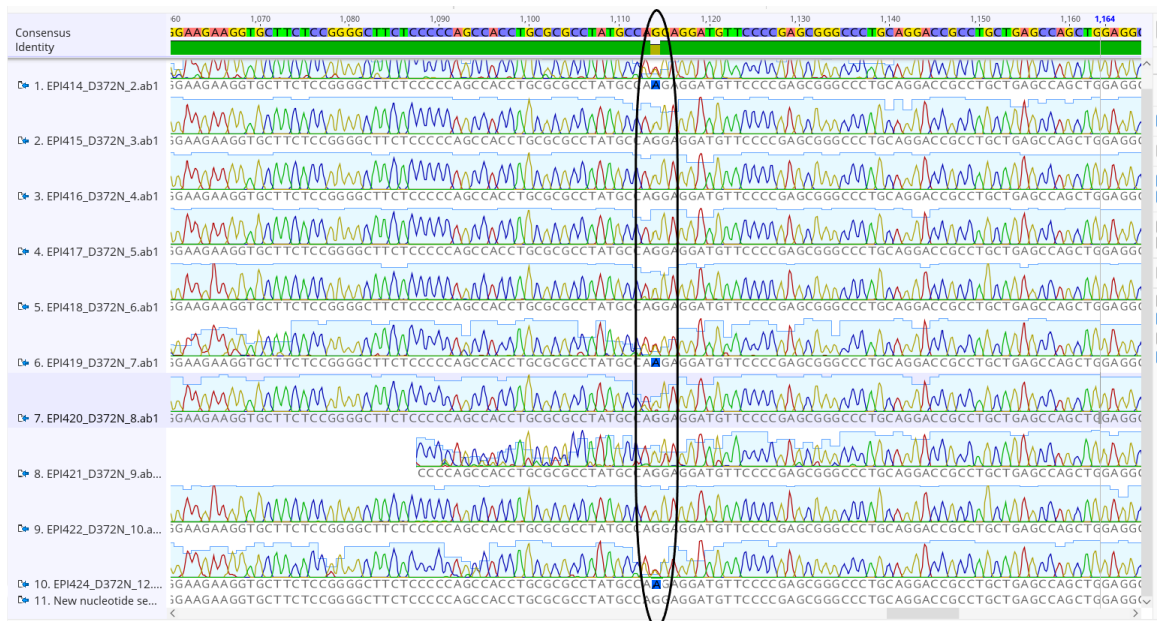


Obrázek 26: Elektroforeogram PCR produktů *D372N*: L – ladder (100 bp), 1 – vzorek č. 1 (CD, žena), 2 – vzorek č. 2 (UC, muž), 3 – vzorek č. 3 (zdráva), 4 – vzorek č. 4 (CD, muž), 5 – vzorek č. 5 (CD, muž), 6 – vzorek č. 6 (CD, žena), 7 – vzorek č. 7 (CD, žena), 8 – vzorek č. 8 (CD, žena), 9 – vzorek č. 9 (zdráv), 10 – vzorek č. 10 (UC, muž), 11 – vzorek č. 11 (UC, muž), 12 – vzorek č. 12 (zdráva), NK – negativní kontrola (zdroj: vlastní)

U vzorků číslo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 a 12 se podařilo amplifikovat úsek pomocí použitých primerů. Opět jsem pokračovala úplně stejně a pomocí BLASTU se potvrdilo, že amplifikovaný úsek souhlasí s genem *NOD1/CARD4* z 99–100 % (Query cover).

Pomocí internetové databáze GenBank jsem našla odpovídající exon 3 (NM\_006092), na kterém se hledaný polymorfismus (1114G→A) nachází na pozici 1114bp. Do příslušného programu jsem vložila všechny sekvence vzorků, sekvenci exonu 3 a porovnála je. Na základě Alignmentu jsem našla hledaný SNP na daném místě (Obrázek 27).





Obrázek 27: Výsledný Alignment sekvencí varianty D372N genu NOD1/CARD4 (zdroj: vlastní)

Vzorky číslo 3, 4, 5, 6, 8, 9 a 10 vyšly jako dominantní homozygoti s variantou G/G, vzorky 2, 7 a 12 jako heterozygoti G/A a jako recesivní homozygot nevyšel žádný vzorek (Tabulka 8).

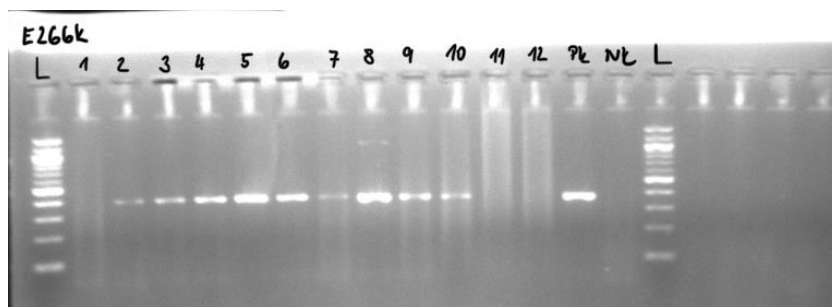
Tabulka 8: Početní zastoupení vyšetřovaných probandů s variantou D372N

D372N	CD	UC	Zdráv
G/G	4	1	2
G/A	1	1	1
A/A	0	0	0

(Zdroj: Vlastní)

### 12.3.2 E266K

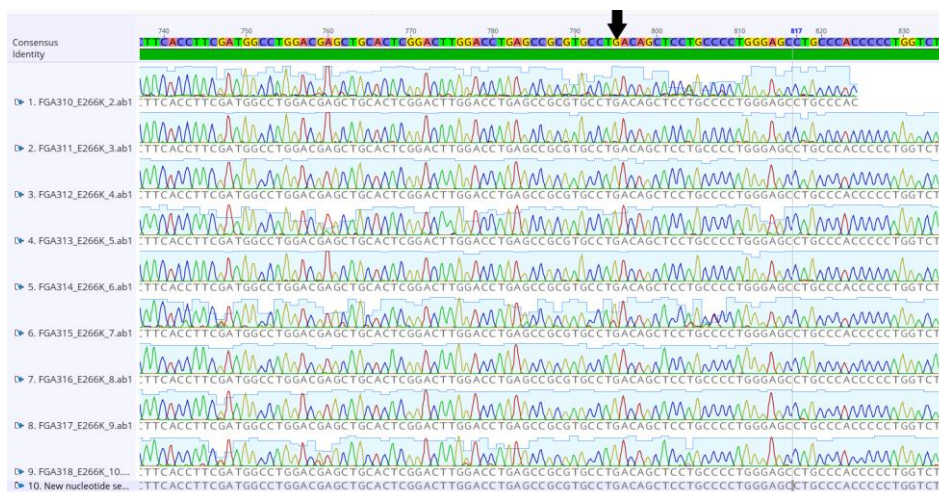
Podle obrázku (Obrázek 28), na kterém jsou vizualizovány PCR produkty 1-12 varianty E266K pomocí gelové elektroforézy lze vidět pozitivní výsledky u vzorků číslo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 10. Negativně vyšly vzorky číslo 1, 11 a 12.



Obrázek 28: Elektroforeogram PCR produktů E266K: L – ladder (100 bp), 1 – vzorek č. 1 (CD, žena), 2 – vzorek č. 2 (UC, muž), 3 – vzorek č. 3 (zdráva), 4 – vzorek č. 4 (CD, muž), 5 – vzorek č. 5 (CD, muž), 6 – vzorek č. 6 (CD, žena), 7 – vzorek č. 7 (CD, žena), 8 – vzorek č. 8 (CD, žena), 9 – vzorek č. 9 (zdráv), 10 – vzorek č. 10 (UC, muž), 11 – vzorek č. 11 (UC, muž), 12 – vzorek č. 12 (zdráva), NK – negativní kontrola (zdroj: vlastní)

U vzorků číslo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 10 se podařilo amplifikovat úsek pomocí použitých primerů. Následovaly stejné kroky jako v předchozích bodech a pomocí nástroje BLAST se potvrdilo, že amplifikovaný úsek souhlasí s genem *NOD1/CARD4* z 88–100 % (Query cover).

Pomocí příslušné internetové databáze jsem našla odpovídající exon 3 (NM\_006092), na kterém se hledaný polymorfismus (796G→A) nachází na pozici 796bp. Stejně jako v předchozích bodech jsem do příslušného programu vložila všechny sekvence vzorků, sekvenci exonu 3 a porovnála je. Opět jsem na základě Alignmentu našla hledaný SNP na daném místě (Obrázek 29).



Obrázek 29: Výsledná sekvenace E266K (zdroj: vlastní)

Vzorky číslo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 10 vyšly jako dominantní homozygoti s variantou G/G a jako heterozygot a recesivní homozygot nevyšel žádný vzorek pozitivně (Tabulka 9).

Tabulka 9: Početní zastoupení vyšetřovaných probandů s variantou E266K

<b>E266K</b>	<b>CD</b>	<b>UC</b>	<b>Zdráv</b>
<b>G/G</b>	5	2	2
<b>G/A</b>	0	0	0
<b>A/A</b>	0	0	0

(Zdroj: Vlastní)

Tabulka 10: Přehled výsledků

<b>Gen</b>	<b>NOD2/CARD15</b>			<b>ICAM-1</b>		<b>NOD1/CARD4</b>	
	<b>R702W</b>	<b>G908R</b>	<b>1007fs</b>	<b>K469E</b>	<b>G241R</b>	<b>D372N</b>	<b>E266K</b>
<b>1</b>	N	N	N	K/K	N	N	N
<b>2</b>	N	N	N	K/K	N	G/A	G/G
<b>3</b>	N	N	N	K/K	N	G/G	G/G
<b>4</b>	N	N	N	K/K	N	G/G	G/G
<b>5</b>	N	N	N	E/E	N	G/G	G/G
<b>6</b>	N	N	N	K/K	N	G/G	G/G
<b>7</b>	N	N	N	K/E	N	G/A	G/G
<b>8</b>	N	N	N	K/E	N	G/G	G/G
<b>9</b>	N	N	N	K/K	N	G/G	G/G
<b>10</b>	N	N	N	K/K	N	G/G	G/G
<b>11</b>	N	N	N	E/E	N	N	N
<b>12</b>	N	N	N	E/E	N	G/A	N

(Zdroj: Vlastní)

Vysvětlivky: N – Nelze vyhodnotit; K/K – dominantní homozygot; K/E – heterozygot; E/E – recesivní homozygot; G/G – dominantní homozygot; G/A – heterozygot

## 13 Diskuze

Crohnova choroba a ulcerózní kolitida jsou choroby, které se řadí mezi idiopatické střevní záněty. Průběh těchto onemocnění je charakterizován remisemi a recidivami po celou dobu trvání nemoci a hlavním rozdílem mezi těmito chorobami je lokace postižení střev. Jejich přesná etiologie je dodnes zatím neznámá, z toho důvodu jsou označovány jako idiopatické. Jedna z nejčastějších příčin je genetická predispozice.

Lukáš a Hoch (2018) uvádí, že incidence UC je v Evropě 24,3 nových případů na 100 000 obyvatel za rok. Celkově je UC postiženo 800 000 lidí v USA a 1,4 milionů lidí v Evropě. Častěji se UC vyskytuje v Evropě a Severní Americe než v Asii a Oceánii (Lukáš a Hoch, 2018). V České republice je incidence 3–5 nových případů na 100 000 obyvatel (Gabalec, 2009a). U CD je roční incidence v Evropě 12,7 nových případů na 100 000 obyvatel (Lukáš a Hoch, 2018). V České republice je dle Gabalce (2009b) incidence CD přibližně 4–6 nových případů na 100 000 obyvatel za rok.

V metodické části bylo mým hlavním cílem prokázat, zda se u některého z mých probandů nachází alespoň jedna z mutací genu, která je s rozvojem IBD spojovaná. Jedná se o geny *NOD2/CARD15*, *NOD1/CARD4* a *ICAM-1*. Abych tento cíl splnila, tak bylo nutné si sehnat osoby, které trpí alespoň jedním z IBD a odebrala jim vzorek – bukalní stěr. Sehnala jsem 12 probandů, z nichž 6 trpělo onemocněním CD, 3 UC a 3 byli zdraví v příbuzenském vztahu s nemocnými. U těchto vzorků jsem provedla izolaci DNA a následně bylo nutné amplifikovat specifický úsek genu pomocí PCR. PCR produkty jsem v dalším kroku vizualizovala pomocí gelové elektroforézy, poté jsem je enzymaticky přečistila a poté je poslala na sekvenaci. Následně jsem použila internetovou databázi GenBank, pomocí které jsem vždy našla odpovídající sekvenci exonu, na kterém se nacházel hledaný polymorfismus. Nakonec jsem použila program Geneious Prime, do kterého jsem vždy vložila sekvence všech vzorků, sekvenci příslušného exonu a porovnávala je.

Gen *NOD2/CARD15* je nejčastějším genem, který je spojován s IBD (Lukáš a Hoch, 2018). Heliö et al. (2003) uvádí, že v genu *NOD2/CARD15* je identifikováno více než 60 sekvenčních variant, z nichž 3 hlavní (*R702W*, *G908R*, *1007fs*) jsou spojovány s rozvojem CD. V mém případě jsem tyto mutace genu neprokázala ani u jednoho z probandů. Hlavním důvodem, proč se u žádného probanda mutace neprokázala bylo, že pomocí internetové databáze GenBank nedošlo ke správnému zhodnocení. U všech tří

variant čtecí rámec sekvence nesouhlasil s těmi sekvencemi, které jsem našla na GenBanku. Z tohoto důvodu jsem ani nemohla vyhodnotit, zda probandi danou mutaci mají nebo ne.

U genu *NOD1/CARD4* jsou s rozvojem IBD spojovány 2 hlavní polymorfismy *E266K* a *D372N*. Özen et al. (2006) uvádí, že tento gen byl považován za kandidátní gen kvůli jeho strukturálním a funkčním podobnostem genu *NOD2/CARD15*. U varianty *E266K* se mutace genu projeví změnou G za A na pozici 796bp. V mém případě se u žádného z probandů tato změna neprojevila. U varianty *D372N* se mutace genu projeví stejnou změnou G za A, ale na pozici 1114 bp. V mém případě došlo k této změně u vzorku číslo 1 (CD), 6 (CD) a 10 (UC). U těchto probandů se tedy projevila přítomnost mutace genu *NOD1/CARD4* s variantou *D372N*.

Gen *ICAM-1* obsahuje dva polymorfismy, *K469E* a *G241R*. U varianty *K469E* se mutace projevuje změnou A za G na pozici 1462bp. V mém případě k této změně došlo u vzorku číslo 5 (CD), 7 (CD), 8 (CD), 11 (UC) a 12 (zdravá dcera vzorku č. 11). Tím pádem se u těchto probandů v tomto případě projevila mutace genu s variantou *K469E*. Vainer (2005) uvádí, že tento gen je spojován spíše s rozvojem UC, což se dle mého výzkumu nepotvrdilo, naopak se tato mutace projevila u více probandů s CD.

Variantu *G241R* se bohužel nepodařilo vyhodnotit vůbec, a to pravděpodobně z důvodu špatných primerů. Přestože velikost PCR produktu odpovídala správné velikosti a vzorek se tak jevil jako pozitivní amplifikovaný úsek, díky sekvenování jsem zjistila, že tomu tak není. Po zadání příslušných sekvencí do nástroje BLAST a srovnání s databází GenBank byly všechny vzorky vyhodnoceny jako gen *ADCY1* nikoliv *ICAM-1*.

Z finančních a časových důvodů nebylo možné na stanovení této varianty navázat, ale návrh vlastních primerů podle sekvencí genu v databázi GenBank a jejich optimalizace by mohly být jednou z metod pro úspěšné stanovení této varianty.

Metodiku mého výzkumu jsem založila na publikaci Özen et al. (2006) v němž autoři vyšetřovali polymorfismy v příslušných genech, které jsou asociovány s rozvojem IBD. Daná studie se zaměřovala na turecké pacienty, autoři pracovali s o dost větším počtem probandů než já a prováděli navíc metodu RFLP neboli štěpení izolované DNA restrikcími endonukleázami, kterou z důvodu časové a finanční náročnosti nebylo

možné v mé práci použít. V mém případě jsem porovnávala příslušné sekvence se sekvencemi v GenBanku.

Výsledkem zmíněné studie bylo, že se ani u jednoho z příslušných genů neprokázala souvislost s rozvojem IBD. V mé práci, i když jsem oproti dané studii pracovala s velmi malým počtem probandů, se souvislost genů s rozvojem IBD objevila. To však může souviset se zmíněným odlišným etnikem probandů (Turci – Češi).

Kdybych měla v budoucnu tuto práci opakovat a měla na to dostatek financí a času, tak vím, že bych se určitě rozhodla pro práci s více probandy a v metodické části bych učinila určité změny. Využila bych například metodu RFLP stejně jako autoři zmíněné studie, aby bylo možné genetické predispozice prozkoumat z větší části.

## 14 Závěr

V této bakalářské práci s názvem „Molekulárně genetická vyšetření predispozic Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy“ jsem se v teoretické části zabývala převážně těmito dvěma chorobami, které nesou společný název idiopatické střevní záněty. Popisovala jsem jednotlivá onemocnění, jejich příznaky, komplikace, etiologii, ve které jsem se zabývala zejména genetickou predispozicí, dále jsem popsala diagnostiku a léčbu.

Cílem mé bakalářské práce bylo zjistit, zda se u některého z probandů vyskytovala alespoň jedna z mutací genu, které jsou zodpovědné za vznik IBD. Jednalo se o 12 probandů, kteří trpěli CD, UC nebo o zdravé jedince v příbuzenském vztahu s nemocnými. Nejčastější mutace genu, které jsou spojované s rozvojem IBD jsou *NOD2/CARD15*, *NOD1/CARD4* a *ICAM-1*.

Na základě výsledků mé práce jsem prokázala mutaci genu pouze ve dvou případech. U genu *NOD1/CARD4* u varianty *D372N* se projevila tato mutace u tří probandů, z toho dva trpěli CD a jeden UC. Druhým případem byla mutace genu *ICAM-1* u varianty *K469E*, tato mutace se projevila celkem u pěti probandů, z nichž tři trpěli CD, jeden UC a u jednoho se jednalo o zdravou dceru pacienta s UC. Jak již bylo zmíněno v diskuzi, v mém případě jsem pracovala s malým počtem vzorků, tudíž nelze výsledky považovat za zobecnitelné, ale i přesto došlo ke splnění cíle mé práce.

Díky této práci jsem se naučila spoustu nových molekulárně genetických metod jako je izolace DNA, PCR, elektroforéza včetně její kompletní přípravy, řádně jsem si procvičila pipetování a naučila se práci s odbornou literaturou, ale také s internetovými genetickými databázemi a programy.

Téma mé práce jsem zvolila vzhledem k jeho přesahu i do mého osobního života. Onemocnění UC máme v blízké rodině, díky čemuž vím, jak nepříjemnou komplikací může pro nemocného (i jeho rodinu) být. Do budoucna doufám, že se obě nemoci podaří lépe prozkoumat, což by mohlo mít za následek zlepšení kvality života u lidí, u nichž se jedna či druhá nemoc již projevila. Též by mohlo dojít ke zlepšení možností v prevenci těchto onemocnění.

## 15 Seznam literatury

1. ANANTHAKRISHNAN, A.N., XAVIER, R.J., PODOLSKY, D.K., 2017. *Inflammatory Bowel Diseases: A Clinician's Guide*. West Sussex, UK: John Wiley. ISBN 1119077605.
2. AUTENRIETH, D., BAUMGART, D., 2012. Toxic Megacolon. *Inflammatory Bowel Diseases* [online]. 18(3), 584–591 [cit. 2023-4-7]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ibd.21847>
3. AVERBOUKH, F. et al., 2011. Colorectal carcinoma in inflammatory bowel disease: a comparison between Crohn's and ulcerative colitis. *Colorectal Disease* [online]. 13(11), 1230-1235 [cit. 2023-4-9]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2011.02639.x>
4. BALVAN, J., RAUDENSKÁ, M., MASAŘÍK, M., 2021. *Buněčná smrt: Její význam ve fyziologii a patologické fyziologii*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-4155-5.
5. BARTŮŇKOVÁ, J. et al., 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii. 2., přepracované a doplněné vydání*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-3533-7.
6. BAUMGART, D.C., 2009. The Diagnosis and Treatment of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Deutsches Ärzteblatt International* [online]. 106(8), 123–133 [cit. 2023-4-12]. Dostupné z: [10.3238/arztebl.2009.0123](https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0123)
7. BECKER, C., NEURATH, M.F., WIRTZ, S., 2015. The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *ILAR Journal* [online]. 56(2), 192–204 [cit. 2023-4-11]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ilar/ilv030>
8. BERÁNEK, M., 2016. *Molekulární genetiky pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum. ISBN 9788024632247.
9. BESSA, N.Z. et al., 2016. Polymorphisms of ICAM-1 and IL-6 genes related to endometriosis in a sample of Brazilian women. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [online]. 33(11), 1487–1492 [cit. 2023-4-22]. Dostupné z: [10.1007/s10815-016-0796-z](https://doi.org/10.1007/s10815-016-0796-z)
10. BORTLÍK, M., 2014. Idiopatické střevní záněty. *Kardiologická revue – interní medicína* [online]. 16(3), 240-243 [cit. 2022-11-19]. Dostupné z: <https://www.kardiologickarevue.cz/casopisy/kardiologicka-revue/2014-3/idiopaticke-strevni-zanety-49245>



11. BURDA, P., ŠOLCOVÁ, L., 2016. *Ošetrovatelská péče 2. díl: pro obor ošetrovatel*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-5334-8.
12. CAI, Z., WANG, S., LI, J., 2021. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review. *Frontiers in Medicine* [online]. 8(2021) [cit. 2023-4-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.765474>
13. CIBULA, D., PETRUŽELKA, L., 2009. *Onkogynekologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2665-6.
14. ČELEDOVÁ, L. et al., 2017. *Člověk ve zdraví i v nemoci: Podpora zdraví a prevence nemoci ve stáří*. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum. ISBN 978-80-246-3829-4.
15. ČERVENKOVÁ, R., 2009. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-600-7.
16. ČIHÁK, R., 2013. *Anatomie 2: Třetí, upravené a doplněné vydání*. 3. vyd. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-9210-1.
17. DESAI, J., ELNAGGAR, M., HANFY, A., DOSTI, R., 2022. Toxic Megacolon: Background, Pathophysiology, Management Challenges and Solutions. *Clinical and Experimental Gastroenterology* [online]. 13(2020), 203-210 [cit. 2023-4-7]. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2147/CEG.S200760>
18. DYLEVSKÝ, I., 2009. *Funkční anatomie*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-7030-7.
19. EADEN, J., 2004. Colorectal carcinoma and inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* [online]. 20(4), 24-30 [cit. 2023-4-9]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.02046.x>
20. FALT, P. et al., 2015. *Koloskopie*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-5284-6.
21. FARRAYE, F.A., 2017. *Questions and Answers about Ulcerative Colitis*. Second Edition. Burlington: Jones & Bartlett Learning. ISBN 978-1-284-12372-2.
22. FEUERSTEIN, J.D., CHEIFETZ, A.S., 2014. Ulcerative Colitis: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clinic Proceedings* [online]. 89(11), 1553-1563 [cit. 2023-4-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2014.07.002>
23. FEUERSTEIN, J.D., CHEIFETZ, A.S., 2017. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clinic Proceedings* [online]. 92(7), 1088-1103 [cit. 2023-4-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.04.010>
24. FIALA, P., VALENTA, J., EBERLOVÁ, L., 2015. *Stručná anatomie člověka*. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum. ISBN 978-80-246-2705-2.

25. FRÜHAUF, P., 2017. Střevní mikrobiota a možnosti ovlivnění. *Farmacie pro praxi: Praktické lékárenství*[online]. 18(4), 239-242 [cit. 2023-4-2]. Dostupné z: <https://farmaciepropraxi.cz/pdfs/lek/2018/02/06.pdf>
26. GABALEC, L., 2009. Crohnova nemoc – klasifikace, diagnostika, léčba a kvalita života. *Interní medicína pro praxi* [online]. 11(1), 16-20 [cit. 2023-4-26]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2009/01/03.pdf>
27. GABALEC, L., 2009. Ulcerózní kolitida – klasifikace, diagnostika, léčba a kvalita života. *Interní medicína pro praxi*[online]. 11(6), 276-281 [cit. 2022-12-17]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2009/06/06.pdf>
28. GAN, S.-I., BACK, P.L., 2003. A new look at toxic megacolon: an update and review of incidence, etiology, pathogenesis, and management. *The American Journal of Gastroenterology* [online]. 98(11), 2363-2371 [cit. 2023-4-8]. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(03\)00702-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(03)00702-0)
29. GEREMIA, A., SATSANGI, J., 2018. The role of genetics in Crohn's disease: how could it influence future therapies? *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* [online]. 12(11), 1075-1077 [cit. 2023-1-7]. DOI: 10.1080/17474124.2018.1513323. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17474124.2018.1513323>
30. HARBORD, M. et al., 2016. The First European Evidence-based Consensus on Extra-intestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis* [online]. 10(3), 239–254 [cit. 2023-4-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv213>
31. HELIÖ, T. et al., 2003. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* [online]. 52(4), 558–562 [cit. 2023-1-7]. DOI: 10.1136/gut.52.4.558. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1773614/>
32. HNATYSZYN, A. et al., 2019. Colorectal carcinoma in the course of inflammatory bowel diseases. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* [online]. 17(18), 1-9 [cit. 2023-4-9]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13053-019-0118-4>
33. HOLUBEC, L. et al., 2004. *Kolorektální karcinom: současné možnosti diagnostiky a léčby*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0636-9.
34. HORÁK, L. et al., 2013. *Praktická proktologie*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-3595-5.

35. HOSÁK, L., HRDLIČKA, M., LIBIGER, J., 2015. *Psychiatrie a pedopsychiatrie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-2998-8.
36. HUGOT, J.-P., 2006. CARD15/NOD2 Mutations in Crohn's Disease. *INFLAMMATORY BOWEL DISEASE Genetics, Barrier Function, Immunologic Mechanisms, and Microbial Pathways* [online]. 1072(1), 9-18 [cit. 2023-1-8]. DOI: 10.1196/annals.1326.011. Dostupné z: <https://doi.org/10.1196/annals.1326.011>
37. HUGOT, J.P., ZOUALI, H., LESAGE, S., THOMAS, G., 1999. Etiology of the inflammatory bowel diseases. *International journal of colorectal disease* [online]. 14(1), 2-9 [cit. 2022-12-18]. DOI: 10.1007/s003840050175. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10207723/>
38. CHENG, D., LIANG, B., 2015. Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) Polymorphisms and Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Iranian Journal of public Health* [online]. 44(5), 615–624 [cit. 2023-4-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4537618/>
39. JOSE, F.A., HEYMAN, M.B., 2008. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [online]. 46(2), 124-133 [cit. 2023-4-9]. Dostupné z: 10.1097/MPG.0b013e318093f4b0
40. KACHLÍK, D., 2018. *Anatomie pro nelékařské zdravotnické obory*. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum. ISBN 978-80-246-4058-7. KŘIVÁNKOVÁ, M., HRADOVÁ, M., 2009. *Somatologie: Učebnice pro střední zdravotnické obory*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-6899-1.
41. KAITHA, S., BASHIR, M., ALI, T., 2015. Iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* [online]. 6(3), 62–72 [cit. 2023-4-11]. Dostupné z: 10.4291/wjgp.v6.i3.62
42. KASPER, H., 2015. *Výživa v medicíně a dietetika: Překlad 11. vydání*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-4533-6.
43. KUPKA, T. et al., 2014. Crohnova nemoc – genetické faktory z pohledu etiopatogeneze. *Vnitřní lékařství* [online]. 60(7-8), 635–639 [cit. 2023-1-7]. Dostupné z: <https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2014/07/18.pdf>

44. LANGAN, R.C., GOTSCH, P.B., KRAFCZYK, M.A., SKILLINGE, D.D., 2007. Ulcerative Colitis: Diagnosis and Treatment. *American Family Physician* [online]. 76(9), 1323-1330 [cit. 2023-4-12]. Dostupné z: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2007/1101/p1323.html>
45. LARSEN, S., BENDTZEN, K., NIELSEN, O.H., 2009. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: Epidemiology, diagnosis, and management. *Annals of Medicine* [online]. 42(2), 97-114 [cit. 2023-4-9]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/07853890903559724>
46. LEVINE, J.S., BURAKOFF, R., 2011. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & Hepatology* [online]. 7(4), 235–241 [cit. 2023-4-9]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3127025/>
47. LOW, J.H. et al., 2006. Inflammatory Bowel Disease Is Linked to 19p13 and Associated with ICAM-1. *Inflammatory Bowel Diseases* [online]. 10(3), 173-181 [cit. 2023-4-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/00054725-200405000-00001>
48. LUKÁŠ, K. et al., 2005. *Gastroenterologie a hepatologie pro zdravotní sestry*. Praha: Grada Publishing. ISBN 80-247-1283-0.
49. LUKÁŠ, K. et al., 2007. *Gastroenterologie a hepatologie*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-6720-8.
50. LUKÁŠ, K., HOCH, J., ed., 2018. *Nemoci střev*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0353-9.
51. LUKÁŠ, M., 2014. Etiologie a patogeneze idiopatických střevních zánětů. *Vnitřní lékařství* [online]. 60(7-8), 640-644 [cit. 2022-11-9]. Dostupné z: <https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2014/07/19.pdf>
52. MAČÁK, J., MAČÁKOVÁ, J., 2004. *Patologie*. Praha: Grada Publishing. ISBN 9788024707853.
53. MATSUOKA, K., KANAI, T., 2015. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Seminars in Immunopathology* [online]. 37(1), 47–55 [cit. 2023-4-11]. Dostupné z: [10.1007/s00281-014-0454-4](https://doi.org/10.1007/s00281-014-0454-4)
54. NAIR, M., PEATE, I., 2015. *Patofyziologie: pro zdravotnické obory*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0229-7.
55. NAVRÁTIL, L. et al., 2008. *Vnitřní lékařství: pro nelékařské zdravotnické obory*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-6990-5.

56. NAVRÁTIL, L. et al., 2017. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory: 2., zcela přepracované a doplněné vydání*. Praha: Grada Publishing. ISBN 9788027191826.
57. NAVRÁTIL, V. et al., 2021. Mimostřevní komplikace idiopatických střevních zánětů. *Vnitřní lékařství* [online]. 67(2), 92-96 [cit. 2023-4-9]. Dostupné z: 10.36290/vnl.2021.020
58. NEČAS, E. et al., 2021. *Obecná patologická fyziologie*. Vydání páté. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-4633-6.
59. NI, J., WU, G.D., ALBENBERG, L., TOMOV, V.T., 2017. Gut microbiota and IBD: causation or correlation?. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* [online]. 14(10), 573-584 [cit. 2023-4-11]. Dostupné z: 10.1038/nrgastro.2017.88
60. NISHIDA, A. et al., 2018. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical Journal of Gastroenterology* [online]. 11(1), 1–10 [cit. 2023-4-2]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12328-017-0813-5>
61. OREL, M., 2019. *Anatomie a fyziologie lidského těla: Pro humanitní obory*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-1179-4.
62. OTOVÁ, B., MIHALOVÁ, R., BOBKOVÁ, K., 2020. *Základy biologie a genetiky člověka*. Vydání druhé. Univerzita Karlova, Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-4583-4.
63. ÖZEN, S.C. et al., 2006. NOD2/CARD15, NOD1/CARD4, and ICAM-1 gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology* [online]. 41(4), 304–310 [cit. 2023-4-17]. Dostupné z: 10.1007/s00535-005-1780-z
64. PASSARGE, E., 2019. *Barevný atlas genetiky*. Překlad 5. vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-3099-8.
65. PAVELKA, K. et al., 2014. *Biologická léčba zánětlivých autoimunitních onemocnění: v revmatologii, gastroenterologii a dermatologii*. Praha: Grada Publishing. ISBN 8024750481.
66. PITHADIA, A.B., JAIN, S., 2011. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacological Reports volume* [online]. 63(3), 629–642 [cit. 2023-4-12]. Dostupné z: [https://link.springer.com/article/10.1016/S1734-1140\(11\)70575-8](https://link.springer.com/article/10.1016/S1734-1140(11)70575-8)
67. QIU, P. et al., 2022. The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2022(12), 1-14 [cit. 2023-4-2]. Dostupné z: 10.3389/fcimb.2022.733992

68. RAJESH, A., SINHA, R., ed., 2014. *Crohn's Disease: Current Concepts*. London: Springer. ISBN 978-3-319-01912-3.
69. RIMOLA, J., ed., 2019. In: ZIMMERMANN, E.M. *Cross-Sectional Imaging in Crohn's Disease*. Switzerland: Springer, s. 2. ISBN 9783319965864.
70. ROTHFUSS, K.S., STANGE, E.F., HERRLINGER, K.R., 2006. Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 12(30), 4819–4831 [cit. 2022-12-17]. Dostupné z: 10.3748/wjg.v12.i30.4819
71. ŘÍHOVÁ, B., ŠŤASTNÝ, M., 2021. *Jak se dělá imunita*. Brno: CPRESS. ISBN 978-80-264-3571-6.
72. SEYEDIAN, S.S., NOKHOSTIN, F., MALAMIR, M.D., 2019. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *Journal of Medicine and Life* [online]. 12(2), 113-122 [cit. 2023-4-12]. Dostupné z: 10.25122/jml-2018-0075
73. SIMPSON, P., 2022. *Užitečné bakterie pro zdravou pokožku: Jak nám pomohou pre- a probiotika?*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-1304-0.
74. SLEZÁKOVÁ, L. et al., 2012. *Ošetřovatelství pro střední zdravotnické školy I – Interna. 2., doplněné vydání*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-3601-3.
75. SOUČEK, M. et al., 2005. *Vnitřní lékařství pro stomatology*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-7001-7.
76. SOUČEK, M. et al., 2011. *Vnitřní lékařství*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-2110-1.
77. SOUČEK, M. et al., 2019. *Vnitřní lékařství v kostce*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-1095-7.
78. STĚPANOV, A., STUDNIČKA, J., 2021. *Oční projevy systémových onemocnění*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-1683-6.
79. STIDHAM, R.W., HIGGINS, P.D.R., 2018. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Clinics in Colon and Rectal Surgery* [online]. 31(03), 168-178 [cit. 2023-4-9]. Dostupné z: [https://doi.org/ 10.1055/s-0037-1602237](https://doi.org/10.1055/s-0037-1602237).
80. STRÍTESKÝ, J., 2001. *Patologie*. Olomouc: Epava. ISBN 80-86297-06-3.
81. STURM, A., WHITE, L., ed., 2019. *Inflammatory Bowel Disease Nursing Manual*. Switzerland: Springer. ISBN 9783319750224.
82. ŠAFRÁNKOVÁ, A., NEJEDLÁ, M., 2006. *Interní ošetřovatelství I*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-6915-8.



83. ŠPIČÁK, J. et al., 2017. *Novinky v gastroenterologii a hepatologii II*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0318-8.
84. ŠRÁMKOVÁ, T., 2013. *Poruchy sexuality u somaticky nemocných a jejich léčba*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-4453-7.
85. ŠVÁB, J. et al., 2008. *Chirurgie vyššího věku*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-6219-7.
86. TORRES, J., MEHANDRU, S., COLOMBEL, J.-F., PEYRIN-BIROULET, L., 2017. Crohn's disease. *The Lancet* [online]. 389(10080), 1741-1755 [cit. 2022-12-14]. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31711-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1)
87. VAINER, B., 2005. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ulcerative colitis: Presence, visualization, and significance. *Inflammation Research* [online]. 54(2005), 313–327 [cit. 2023-4-18]. Dostupné z: 10.1007/s00011-005-1363-8
88. VAN LIMBERGEN, J., RUSSELL, R.K., NIMMO, E.R., SATSANGI, J., 2007. The Genetics of Inflammatory Bowel Disease. *American Journal of Gastroenterology* [online]. 102(12), 2820–2831 [cit. 2023-4-11]. Dostupné z: 10.1111/j.1572-0241.2007.01527.x
89. VAN LIMBERGEN, J., WILSON, D.C., SATSANGI, J., 2009. The Genetics of Crohn's Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* [online]. 10(2009), 89-116 [cit. 2023-1-8]. DOI: 10.1146/annurev-genom-082908-150013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-150013>
90. VAVRICKA, S.R. et al., 2015. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* [online]. 21(8), 1982–1992 [cit. 2023-4-9]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000392>
91. VEAUTHIER, B., HORNECKER, J.R., 2018. Crohn's Disease: Diagnosis and Management. *American Family Physician*[online]. 98(11), 661-669 [cit. 2023-4-12]. Dostupné z: [https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2018/1201/p661.html?utm\\_medium=email&utm\\_source=transaction](https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2018/1201/p661.html?utm_medium=email&utm_source=transaction)
92. VIGUÉ, J., ed., 2015. *Atlas lidského těla*. 13. vyd. Čestlice: Rebo International CZ. ISBN 978-80-255-0976-0.
93. VODIČKA, J., 2014. *Speciální chirurgie*. Praha: Karolinum Press. ISBN 8024625121.
94. VRÁNOVÁ, D., 2013. *Chronická onemocnění a doporučená výživová opatření*. Olomouc: ANAG. ISBN 978-80-7263-788-1.

95. WILLIAMS, H., WALKER, D., ORCHARD, T.R., 2008. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Current Gastroenterology Reports* [online]. 10(6), 597–605 [cit. 2023-4-9]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11894-008-0108-6>
96. YAMAMOTO, T., WATANABE, T., 2014. Surgery for luminal Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 20(1), 78-90 [cit. 2023-4-12]. Dostupné z: 10.3748/wjg.v20.i1.78
97. ZONETTI DE ARRUDA LEITE, A., ANDRADE, G.M., 2016. Epidemiology of inflammatory bowel disease. In: SCHMIDT CARDOZO, W., WALTER SOBRADO, C. *Inflammatory bowel disease*. 2nd edition. Denmark, The Netherlands: River Publishers, s. 11-16. ISBN 978-87-93379-18-3.
98. ZVONÍKOVÁ, A., ČELEDOVÁ, L., ČEVELA, R., 2010. *Základy posuzování invalidity*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-3535-1.



## 16 Seznam obrázků

Obrázek 1: Popis tenkého střeva (zdroj: <a href="http://www.myhealth.alberta.ca">www.myhealth.alberta.ca</a> ).....	10
Obrázek 2: Popis tlustého střeva (zdroj: <a href="http://www.lepsipece.cz">www.lepsipece.cz</a> ).....	12
Obrázek 3: Postižení střev u CD (zdroj: <a href="http://wikiskripta.cz">wikiskripta.cz</a> ) .....	16
Obrázek 4: Postižení tlustého střeva u UC (zdroj: <a href="http://www.wikiskripta.cz">www.wikiskripta.cz</a> ) .....	18
Obrázek 5: Lokace genu NOD2/CARD15 na chromozomu 16 (zdroj: <a href="http://www.mediagraphic.com">www.mediagraphic.com</a> ).....	21
Obrázek 6: Umístění ICAM-1 na chromozomu 19 (zdroj: Low et al., 2006) .....	22
Obrázek 7: Klasifikace kolorektálního karcinomu (zdroj: <a href="https://www.priznaky-projevy.cz">https://www.priznaky-projevy.cz</a> ) .....	25
Obrázek 8: Erythema nodosum (zdroj: Vavricka et al., 2015) .....	27
Obrázek 9: Pyoderma gangrenosum (zdroj: Vavricka et al., 2015).....	27
Obrázek 10: Primární sklerozující cholangitida (zdroj: <a href="https://www.priznaky-projevy.cz">https://www.priznaky-projevy.cz</a> ) .....	28
Obrázek 11: Episkleritida (zdroj: Vavricka et al., 2015).....	29
Obrázek 12: Uveitida (zdroj: Vavricka et al., 2015).....	29
Obrázek 13: Kolektomie s pouchem (zdroj: Lukáš a Hoch, 2018) .....	32
Obrázek 14: Polymerázová řetězová reakce (zdroj: <a href="http://www.yourgenome.org">www.yourgenome.org</a> ).....	38
Obrázek 15 - Schéma elektroforézy NK (zdroj: Cibula a Petruželka, 2009) .....	39
Obrázek 16: Elektroforeogram PCR produktů R702W (zdroj: vlastní) .....	42
Obrázek 17: Výsledný Alignment sekvencí varianty R702W genu NOD2/CARD15 (zdroj: vlastní).....	42
Obrázek 18: Elektroforeogram PCR produktů G908R (zdroj: vlastní) .....	43
Obrázek 19: Výsledný Alignment sekvencí varianty G908R genu NOD2/CARD15 (zdroj: vlastní).....	43
Obrázek 20: Elektroforeogram PCR produktů 1007fs (zdroj: vlastní).....	44
Obrázek 21: Výsledný Alignment sekvencí varianty 1007fs genu NOD2/CARD15 (zdroj: vlastní).....	44
Obrázek 22: Elektroforeogram PCR produktů K469E (zdroj: vlastní) .....	45
Obrázek 23: Výsledný Alignment sekvencí varianty K469E genu ICAM-1 1. část (zdroj: vlastní).....	46
Obrázek 24: Výsledný Alignment sekvencí varianty K469E genu ICAM-1 2. část (zdroj: vlastní).....	46

Obrázek 25: Elektroforeogram PCR produktů G241R (zdroj: vlastní) .....	47
Obrázek 26: Elektroforeogram PCR produktů D372N (zdroj: vlastní) .....	48
Obrázek 27: Výsledný Alignment sekvencí varianty D372N genu NOD1/CARD4 (zdroj: vlastní).....	49
Obrázek 28: Elektroforeogram PCR produktů E266K (zdroj: vlastní) .....	50
Obrázek 29: Výsledná sekvenace E266K (zdroj: vlastní) .....	51

## 17 Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled probandů.....	34
Tabulka 2: Výsledky koncentrací vyizolované DNA.....	36
Tabulka 3: Primery použité pro PCR a sekvenování.....	37
Tabulka 4: Množství přidávané deionizované vody.....	37
Tabulka 5: Teploty fází PCR dle příslušných primerů.....	38
Tabulka 6: Amplifikace variant vyšetřovaných genů.....	41
Tabulka 7: Početní zastoupení vyšetřovaných probandů s variantou K469E.....	46
Tabulka 8: Početní zastoupení vyšetřovaných probandů s variantou D372N.....	49
Tabulka 9: Početní zastoupení vyšetřovaných probandů s variantou E266K.....	51
Tabulka 10: Přehled výsledků.....	51

## 18 Seznam použitých zkratek

5-ASA – kyselina 5-aminosalicylová

A – adenin

ADCY1 – adenylate cyclase 1

ASCA – anti *sacharomyces cerevisiae* antibodies (protilátky proti *sacharomyces cerevisiae*)

ATB – antibiotika

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

C – cytosin

CD – Crohn's disease (Crohnova choroba)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EN – erythema nodosum

EXO 1 – exonuclease 1

G – guanin

GIT – gastrointestinální trakt

IBD – inflammatory bowel disease (idiopatický střevní zánět)

KR-CA – kolorektální karcinom

mRNA – mitochondriální ribonukleová kyselina

NK – nukleová kyselina

NOD1/CARD4 – nucleotide-binding oligomerization domain 1/caspase recruit-ment domain 4

NOD2/CARD15 – nucleotide-binding oligomerization domain 2/caspase recruit-ment domain 15

pANCA – perinuclear antineutrophil cytoplasmatic antibodies (perinukleární cytoplazmatické protilátky proti neutrofilům)

PCR – polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

PG – pyoderma gangrenosum

PSC – primární sklerozující cholangitida

RNA – ribonukleová kyselina

rSAP – Shrimp Alkaline Phosphatase

SNP – single nucleotide polymorphism (jednonukleotidový polymorfismus)

T – tymin

TM – toxické megakolon

UC – ulcerative colitis (ulcerózní kolitida)