

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Genetická predispozice pro atopickou dermatitidu
dospělých v genu pro „multidrug receptor 1“

Natálie Dastychová
Jihomoravský kraj

Brno, 2020

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Genetická predispozice pro atopickou dermatitidu
dospělých v genu pro „multidrug receptor 1“

Genetic predisposition for atopic dermatitis in adults in
the gene coding for multidrug receptor 1

Autoři: Natálie Dastychová

Škola: Gymnázium Brno, Křenová, příspěvková organizace,
Křenová 304/36, 602 00 Brno

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultant: Prof. MUDr. Anna Vašků, CSc.

Brno, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 31. 3. 2020

Natálie Dastychová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé práce prof. MUDr. Anně Vašků, CSc. za odborné vedení, za cenné rady a pomoc při porozumívání zkoumané problematice. Mé poděkování patří také zdravotním laborantkám Andreji Stejskalové a Daně Ambrozkové za pomoc při laboratorní práci, kdy mě ochotně seznámily s problematikou, metodami, postupy a v případě nejasností vždy poradily.

Anotace

Ve své práci SOČ jsem se zabývala vlivem genotypu v polymorfismu v genu pro MDR1 na atopickou dermatitidu dospělých. Konkrétně se jednalo o jednonukleotidový polymorfismus 3435 C/T v exonu 26. U 90 pacientů s atopickou dermatitidou byla provedena genotypizace. Výsledky byly statisticky zhodnoceny a byla u nich provedena studie genotyp-fenotyp, která porovnávala genetické predispozice s výsledným fenotypem. Genotypizace se prováděla pomocí metody PCR, restrikční analýzy, elektroforézy a následné vizualizace pod UV světlem. Výsledky našeho výzkumu prokázaly u žen možnou souvislost zkoumaného polymorfismu s rodinnou anamnézou atopie, potravinovými alergiemi v osobní anamnéze a jinými nealergickými nemocemi v osobní anamnéze. Signifikantním se také u žen ukázal být začátek klinické manifestace atopické dermatitidy v souvislosti s osobní anamnézou na potravinové alergie a přítomnost či nepřítomnost elevace IgE v souvislosti s TEWL v oblasti předloktí.

Klíčová slova

Atopická dermatitida-genetická predispozice-MDR1-polymorfismus-PCR

Annotation

This thesis SOČ deals with the influence of genotype in polymorphism in the gene coding for MDR 1 on atopic dermatitis in adults. Specifically, it concerns the single nucleotide polymorphism 3435 C/T in exon 26. Genotyping was performed in 90 patients with atopic dermatitis. The results were statistically evaluated and genotype-phenotype study was performed. This genotype-phenotype study compared genetic predispositions with the resulting phenotype. Genotyping was performed using PCR, restriction analysis, electrophoresis and subsequent visualization under the UV light. The results of our research have shown in women a possible association of examined polymorphism with positive family history of atopy, personal history of food allergy and other non-allergic illnesses in personal history. The onset of clinical manifestation of atopic dermatitis in connection with positive personal history of food allergy and the presence or absence of elevation of IgE associated with TEWL in the forearm area has also been significant in women.

Keywords

Atopic dermatitis-genetic predisposition-MDR1-polymorphism-PCR

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. Atopická dermatitida	8
2.1.1. Epidemiologie	8
2.1.2. Etiopatogeneze	9
2.1.3. Klinický obraz	10
2.1.4. Léčba.....	10
2.2. Genetický polymorfismus	10
2.2.1. Jednonukleotidový polymorfismus	10
2.2.2. Asociační studie	11
2.2.3. Modely dědičnosti	11
2.3. Gen MDR1	11
2.3.1. P-glykoprotein.....	12
2.4. Metody molekulární diagnostiky	14
2.4.1. Metoda PCR -Polymerázová řetězová reakce	14
2.4.2. Metoda RFLP-Restrikční analýza	16
2.4.3. Gelová elektroforéza.....	16
2.4.4. Vizualizace DNA	17
3. PRAKTICKÁ ČÁST	18
3.1. Cíl	18
3.2. Materiál a metody	18
3.2.1. Soubor pacientů.....	18
3.2.2. Genotypizace genu MDR1.....	22
3.3. Statistické zpracování výsledků	26
4. VÝSLEDKY	27

5. DISKUZE	31
6. ZÁVĚR.....	32
LITERATURA	33
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	37
SEZNAM TABULEK	37
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	38

1. ÚVOD

Atopická dermatitida je komplexní onemocnění, které se projevuje suchostí kůže, svědivostí a tvorbou zánětlivých ložisek. Její výskyt v populaci se stále zvyšuje (za posledních dvacet let stoupl počet pacientů trpících atopickou dermatitidou až trojnásobně). Atopická dermatitida postihuje děti i dospělé a vede k dlouhodobému snížení kvality jejich života. U dětí patří mezi nejčastější kožní onemocnění. Atopická dermatitida se řadí mezi tzv. multifaktoriální onemocnění (tj. vzniká na základě vlivu více faktorů). Mezi takovéto faktory patří ku příkladu vlivy vnějšího prostředí, porušenost epidermální bariéry a také genetická predispozice. [1, 37]

V průběhu genetických studií bylo již několik genů asociováno s atopickou dermatitidou. Geny, které jsou určitým způsobem podezřelé z toho, že mají nějaký vliv na dané onemocnění, se označují jako tzv. kandidátní geny. Studie kandidátních genů jsou založeny na znalosti biologické funkce a patofyziologii produktu daného genu na onemocnění. Kandidátní geny jsou velmi častým předmětem genetického výzkumu. Mezi takovéto geny asociované s atopickou dermatitidou patří mimo jiné i gen MDR1. [39]

MDR1 gen kóduje bílkovinu (P-glykoprotein), která hraje významnou roli při tvorbě epidermální bariéry a transportu mnohých léčiv. Pokud je však MDR1 gen nějakým způsobem pozměněn, může to mít ve svém důsledku vliv na fungování P-glykoproteinu. Špatná funkce této bílkoviny pak může zapříčinit poruchy epidermální bariéry, které vedou k jejímu vysychání a větší náchylnosti na alergeny a jiné látky z vnějšího prostředí, což může být jedna z příčin vzniku atopické dermatitidy. Dále může vést ke špatnému transportu léčiva do kůže (při lokální aplikaci) či z mozku do krve (u jiného způsobu aplikace). V případě špatného transportu přes kůži jsou pak léčiva méně účinná či úplně neúčinná a v případě špatného transportu z mozku do krve se léčiva v mozku hromadí a mohou zde mít toxický účinek. Již zmíněné lokální aplikace léčiv se hojně využívá právě při léčbě atopické dermatitidy a špatný transport léčiva by mohl při léčbě přinést značné komplikace. [1, 4, 13]

Tato práce se věnovala zkoumání podoby určitého exonu (části genu, která kóduje bílkovinu) daného úseku v MDR1 genu. Konkrétně se jednalo o jednonukleotidový polymorfismus C3435T v exonu 26. Zmíněný polymorfismus je stav, kdy existuje pro jeden znak více genetických variant a zároveň jsou tyto varianty v populaci v zastoupení vyšším než 1%. [8, 9, 10]

Naším cílem bylo pomocí metod molekulární diagnostiky provést genotypizaci u dospělých pacientů s atopickou dermatitidou a následně, na základě statistického zhodnocení výsledků, určit vliv zvoleného polymorfismu na výslednou podobu atopické dermatitidy.

Objasnění genetické predispozice k onemocnění, v našem případě k atopické dermatitidě, umožňuje prohloubení našich znalostí o patogenezi daného onemocnění, což vede ke zlepšení diagnostiky a léčby, dále také umožňuje zavést specifickou a strategickou prevenci. Ve výsledku pak může vést k vývoji kauzální léčby (léčby zaměřené na příčinu onemocnění), v případě atopické dermatitidy tedy specifické genové terapie. [39]

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Atopická dermatitida

Atopická dermatitida (AD), též atopický ekzém, je chronické, recidivující, svědivé, neinfekční kožní onemocnění s variabilním průběhem i morfologií. Podle formy a lokalizace má různé projevy v podobě erytému, papul, suchých ložisek, krust a jiných. K propuknutí dochází ve většině případů v kojeneckém či dětském věku, často v kombinaci s pozitivní osobní či rodinnou anamnézou na alergickou rýmu, zánět spojivek a bronchiální astma. AD ve svém důsledku vede ke snížení kvality života a přináší riziko systémových alergických chorob. [1, 2, 3, 4, 5]

2.1.1. Epidemiologie

Celosvětová prevalence AD ve všech věkových skupinách se pohybuje v rozmezí 1-30 %. Prevalence AD pro evropskou populaci činí pro děti 15-20 % a pro dospělé 2-5 %. Největší množství případů (až 70 %) se manifestuje do šesti let věku, přičemž maximum je v kategorii do tří let věku. U většiny nemocných dětí dojde ke spontánnímu ústupu nemoci před dosažením dospělosti. První projev nemoci může však také nastat až v dospělosti. [1, 3]

AD má v posledních dekadách převážně trvale rostoucí trend. Pro nárůst počtu nemocných může přinést vysvětlení tzv. hygienická teorie či tzv. hapténová hypotéza. [1, 3]

Hygienická teorie poukazuje na nedostatečnost kontaktu dítěte v raném věku s alergeny, mikroby, potravinovými a dalšími vlivy, které jsou podstatné pro správné fungování regulační a stimulační funkce imunitního systému. Tato absence potřebného kontaktu je výsadou zejména populací s vyšší životní úrovní. [3]

Hapténová hypotéza pak odůvodňuje rostoucí trend mechanismy nespecifické imunity, kdy jsou organismy podprahově vystavovány látkám hapténové povahy, což jsou látky schopné navozovat imunitní odpověď či tvorbu protilátek. Největší vliv má vystavování se těmto látkám v těhotenství a kojeneckém či batolecím věku, kdy dochází k navozování imunologické tolerance. Hapténová teorie tedy doporučuje v těhotenství a ve výše zmíněném kritickém věku omezit opakovaný kontakt s těmito látkami, mezi které se řadí například konzervanty, detergenty, barvy, parfémy, lepidla, dezinfekční látky, kosmetické přípravky a další látky chemického průmyslu. [3]

V některých západoevropských zemích však trend již nevykazuje růst a je stabilizovaný, jelikož manifestace AD v populaci pravděpodobně dosáhla hodnot genetické predispozice. [1]

2.1.2. Etiopatogeneze

AD patří mezi multifaktoriální onemocnění. Stěžejní je zde interakce mezi geny a faktory vnějšího prostředí, které se projeví jako defekt kožní bariéry a imunologická dysbalance. Důležitý je také fakt souvislosti AD s různými typy alergií, protože až 80 % atopiků má zvýšenou hladinu protilátek v krvi (elevace IgE). [1, 3, 4, 5, 6]

Genetická zátěž má v etiopatogenezi AD velice významnou roli. Dědičnost atopických onemocnění je komplexním procesem a nepodléhá klasickým Mendelovým zákonům. Jedná se totiž o multifaktoriální typ dědičnosti, kde má na výslednou podobu fenotypu vliv nejen více genů, ale také mnohé zevní faktory. Podílející se geny mohou být geny s neúplnou penetrací, z čehož vyplývá, že přítomnost dominantní alely nemusí nutně vést ke klinickému projevu. [1, 4]

Geny, které jsou spojovány se vznikem atopické reaktivity, byly nalezeny na více chromozomech. Za všeobecnou predispozici k atopii pravděpodobně zodpovídá lokus 5q31-33. Zde se nachází shluk interleukinů-4 (IL-4) - skupin proteinů regulujících imunitní odpověď. Dále se jedná především o komplex genů tzv. epidermální diferenciaci, geny kódující serinové proteázy a geny kódující syntézu celkového IgE. [1, 3, 4, 6]

Mezi geny epidermální diferenciaci se řadí gen pro filagrin, klaudin, lorikrin a jiné. Zejména filagrin a jeho metabolity jsou velmi významné z hlediska svého konečného důsledku na tvorbu kožní bariéry. [1, 4]

Mutace genu serinové proteázy pak může vést k abnormálně vysoké koncentraci kožních proteáz, které štěpí vazby mezi korneocyty (povrchovými buňkami pokožky) a zapříčiňují tak snížení její ochranné vrstvy. [1, 4]

Nezanedbatelnými pro predispozici k AD jsou též geny, které kódují syntézu celkového IgE - typu imunoglobulinů (protilátek), které hrají hlavní roli při vzniku alergií. [1]

Samotný defekt kožní bariéry je ve výsledku zapříčiněn špatným rohovatěním (keratinizací) a poruchou ceramidů. Na procesy rohovatění má vliv výše zmíněný filagrin a proteázy. Ceramidy (lipidové molekuly) jsou pak hlavní složkou lamelárních tělísek, která jsou vylučována do mezibuněčných prostor Strata granulosa (třetí vrstvy epidermis), kde se podílejí na hospodaření pokožky s vodou (zamezují nadměrnému vysychání pokožky a přílišnému pronikání vody do ní). Porucha ceramidů může vést ke snížení kožní lipidové bariéry, což následně způsobuje zvýšené ztráty vody a tím i menší hydrataci pokožky, která zapříčiňuje její suchost a ve vodném prostředí snadné rozmočení. Takto postižená kůže je pak citlivější na škodlivé látky, iritanty a alergy. [4, 7]

Nutno zmínit, že u lidí s AD také nastává určitá imunologická dysbalance, způsobená změnami a stimulacemi Th-lymfocytů, vyvolanými rozličnými zevními faktory. [1]

2.1.3. Klinický obraz

Podoba a projev AD je závislí na věku pacienta. Vzhledem k tomu je rozlišována forma kojenecká, dětská, adolescentní a forma dospělých. [1,3]

2.1.4. Léčba

Léčba AD je komplexní a z velké části závisí na závažnosti ekzému. Důležitá jsou preventivní opatření, identifikace a odstranění provokačních či zhoršujících faktorů. Při léčbě pacientů s AD je nejčastěji uplatňována topická léčba (lokální kortikosteroidy, lokální antibiotika nebo antiseptika a další) a fyzikální terapie (fototerapie, systémová terapie, antihistaminika, systémová antibiotika a další). [1]

2.2. Genetický polymorfismus

Genetický polymorfismus je stav, kdy se v populaci vyskytují pro jeden znak minimálně dvě alely (genetické varianty) a zároveň je výskyt méně četné alely větší než 1%. Pokud má méně četná alela v populaci frekvenci nižší než 1%, jedná se o vzácnou alelu. Přítomnost genetických polymorfismů hraje důležitou roli v intrapopulační genetické variabilitě. Jednotlivé alely jsou děděny od biologických rodičů. Polymorfismus se nemusí nutně projevit, zvláště pokud se nachází v intronech (nekódujících oblastech). Polymorfismy, které se fenotypově neprojevují lze odhalit pouze metodami molekulární genetiky. [8, 9, 10]

Polymorfismus se může v populaci vyskytovat pouze na přechodnou dobu, nebo být udržován trvale. Při trvalém výskytu se jedná o tzv. balancovaný polymorfismus, při kterém je poměr alel dlouhodobě stabilní. [9]

V situaci, kdy je polymorfismus nacházen při srovnávání populací z různých území, hovoříme o geografickém polymorfismu. [9]

Mezi nejvýznamnější typy polymorfismů, které jsou dnes hlavním předmětem studia genetiky člověka, patří jednonukleotidové polymorfismy a tandemové repetice. [8, 10]

2.2.1. Jednonukleotidový polymorfismus

Jednonukleotidový polymorfismus (anglicky *single-nucleotide polymorphism*-SNP) je nejmenší možná změna v sekvenci DNA, kdy dochází k záměně jednoho nukleotidu za druhý. SNP je v genomu přítomen v 1 z 1000 párů bází (bp) libovolně vybraného úseku DNA (prokázáno při sekvenování stejného úseku DNA různých jedinců). Frekvence jednonukleotidových polymorfismů je typická pro jednu populaci a v porovnání s populací jinou se může lišit. Jednonukleotidové polymorfismy vznikají mechanismem bodové mutace, kdy dochází k substituci, delecii nebo inzerci v určitém místě DNA. [4, 10]

SNP může, ale také nemusí mít vliv na konečnou podobu a funkci proteinu. V případě synonymní mutace, kdy nedojde ke změně podstaty kódujícího řetězce, bude kódována stejná

aminokyselina a funkce proteinu zůstane nezměněna. Avšak, v situaci, kdy nastane mutace měnící podstatu kódujícího řetězce, bude docházet k translaci jiné aminokyseliny, což může vést ke změně či ztrátě funkčnosti výsledného proteinu. Právě tyto mutace měnící podstatu tvoří až polovinu všech mutací podílejících se na dědičných onemocněních u člověka. [10]

V organismu se geny jaderných chromozomů diploidních buněk vyskytují v párech, každý jednotlivý znak je potom řízen párem genů. Konkrétní forma genů (alel) téhož genu zajišťuje výsledný fenotypový projev genu. V situaci, kdy jsou v párových lokusech obě alely shodné, se jedná o homozygota (dominantního, či recesivního), jsou-li alely různé, jedná se o heterozygota. [11]

2.2.2. Asociační studie

Asociační studie slouží zejména k odhalování genetických predispozic k multifaktoriálním nemocem. Předmětem jejího výzkumu jsou tedy genotypy zvyšující, či snižující riziko dané nemoci. Tato studie se zaměřuje na rozdílnou frekvenci výskytu studované alely mezi skupinami. [4, 12]

Nejčastěji aplikovanou studií je studie *case-control* (tzv. studie případ-kontrola), při níž je cílem prokázat vyšší frekvenci studované alely v souboru navzájem nepřibuzných jedinců trpících danou nemocí v porovnání s kontrolním souborem navzájem nepřibuzných zdravých jedinců. Ke zkoumání jsou voleny tzv. kandidátní geny, u nichž se předpokládá určitý vliv na dané onemocnění. [4, 10, 12]

Dalšími studiemi jsou: *family-based association study* (metoda asociační studie v rodinách), *case-case* (tzv. studie případ-případ) či studie genotyp-fenotyp. [4, 10]

2.2.3. Modely dědičnosti

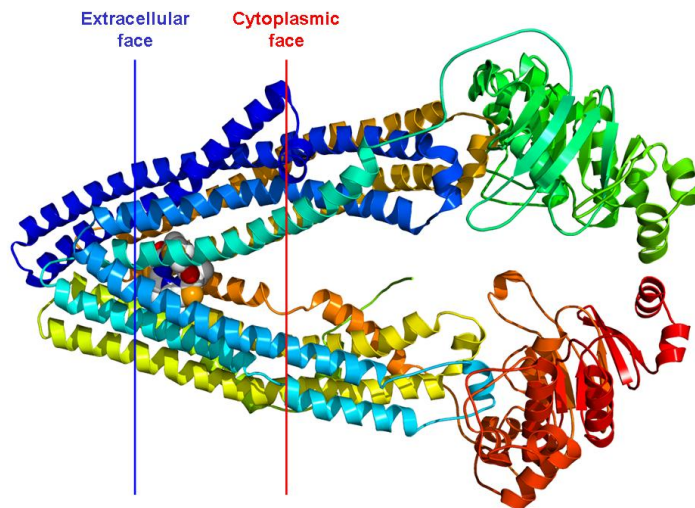
Rozlišujeme genotypové a alelické modely dědičnosti. Mezi genotypové modely je řazen model **dominantní/recesivní, kodominantní a výhoda heterozygota**. Dominantní/recesivní model je charakterizovaný vztahem AA:(Aa+aa) nebo aa:(AA+Aa), kde **A** je dominantní alela a **a** recesivní alela. Tento model se projevuje dvěma fenotypy. Kodominantní model se vztahem AA:Aa:aa se projevuje třemi fenotypy a u výhody heterozygota se vztahem Aa:(AA+aa) dochází k projevu dvou fenotypů.

2.3. Gen MDR1

Gen MDR1 (multidrug resistance 1, ABCB1) je gen kódující P-glykoprotein. Nachází v poloze 7q21, má délku přibližně 100 kbp (kilobase pairs) a obsahuje 28 exonů. Doposud bylo v kódující sekvenci identifikováno 66 SNPs, z nichž bylo 24 shodných. Z těchto 24 SNPs jsou pro svůj klinický důsledek nejvíce zkoumány shodné SNPs C3435T, C1236T a neshodné SNP G2677A/T. [13, 15]

2.3.1. P-glykoprotein

P-glykoprotein (označován též MDR1 protein či ABCB1 protein) je bílkovina, která patří do skupiny ABC transportérů (ATP-binding cassette), jenž zprostředkovávají transport molekul přes fosfolipidovou dvojvrstvu biologických membrán u všech živých organismů. P-glykoprotein je tvořen 1280 aminokyselinami uspořádaných do dvou polovin. Každá polovina obsahuje šest hydrofobních transmembránových alfa-helixů (tvar pravotočivé šroubovice) a oblast vázající ATP (viz obr. 1). [13, 14, 15, 16, 17]



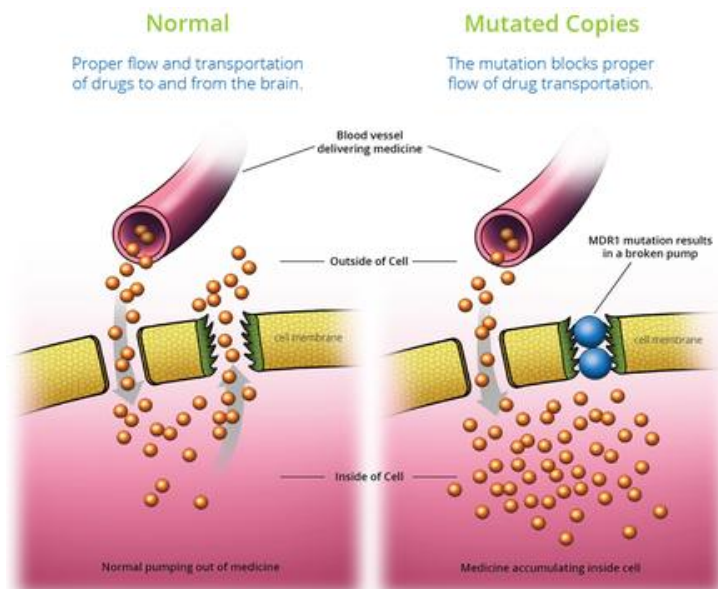
Obr. 1: Struktura P-glykoproteinu [13]

P-glykoprotein se řadí do skupiny proteinů tvořících tzv. efluxní pumpy (aktivní transportéry tvořené proteiny). Rozlišováno je pět skupin takovýchto proteinů (RND-Resistance nodulation division family, MFS-Major facilitator superfamily, SMR-Staphylococcal multiresistance family (small multidrug resistance), MATE-Multidrug and toxic compound extrusion a **ABC**-ATP binding cassette). Z důvodu aktivního vylučování je pro efluxní pumpy nutný nějaký zdroj energie. Skupiny RND, MFS a SMR využívají jako zdroj energie protonový gradient na membráně, skupina MATE využívá gradient Na^+ iontů a **skupina ABC** využívá hydrolyzu ATP (adenosintrifosfátu). [15, 18]

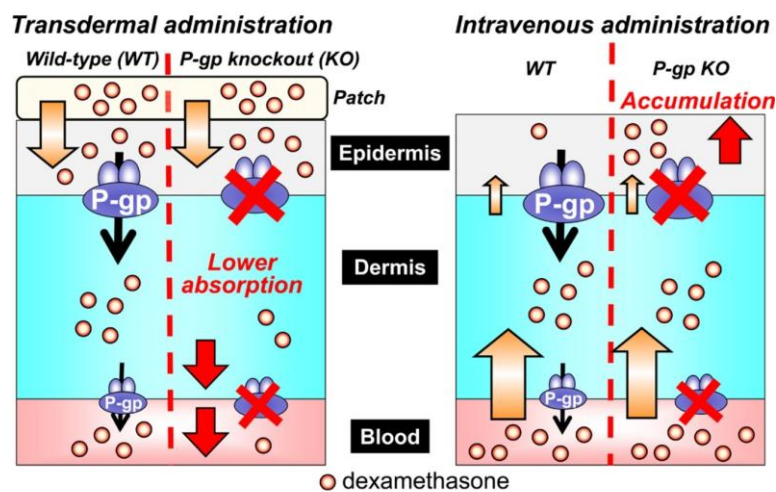
Sám P-glykoprotein se pak podílí na transportu široké škály rozličných molekul. Důležitou roli hraje jeho účast při transportu téměř všech klinicky významných léčiv (léků proti rakovině, antibiotik, antidepresiv, antivirotik, kortikosteroidů, imunosupresiv a dalších). Ačkoli odpověď organismu na podaný lék ovlivňuje mnoho faktorů, jako je věk, funkce orgánů, povaha nemoci, interakce mezi více léčivy a další, je zde genetický faktor nezanedbatelný. Jeho podíl na funkčnosti a schopnosti zpracování daného léku se odhaduje na 20-95 % (velké rozmezí je způsobeno různorodou povahou jednotlivých léčiv). Funkčnost proteinů asociovaných v dráze zpracování a transportu léčiv může tedy zčásti ovlivnit odpověď organismu na podaný lék. Z tohoto důvodu jsou geny, kódující takovéto proteiny, předmětem mnohých studií. Zkoumány jsou především SNPs na jejich exonech. U genu MDR1 bylo zjištěno, že i jeho synonymní SNP, který by neměl měnit podstatu kodonu a tím ani vlastnosti kódovaného proteinu, má vliv na schopnost interakce proteinu se substráty.

Tento jev je vysvětlován tím, že pokud na exonu dojde k záměně běžného kodonu za vzácný, bude ovlivněno načasování kotranslačního skládání a vložení proteinu do membrány, kvůli čemuž dojde ke změně interakčních míst substrátu a inhibitoru. [14, 15, 16, 17]

P-glykoprotein se nachází mimo jiné v játrech, ledvinách, lymfocytech, hematoencefalické bariéře a kůži. Jeho přítomnost v hematoencefalické bariéře je významná z hlediska transportu léčiv z mozku do krve, kdy může v případě nesprávného fungování proteinu dojít k hromadění léčiva v mozku, což může vést k potížím s nervovou soustavou (křeče, selhání dýchání a v krajním případě i smrt) (viz obr. 2). V kůži pak ovlivňuje její schopnost nakládat s léčivem. Při špatné funkci P-glykoproteinu je snížena její schopnost absorpce léčiva, které se tudíž nedostane do krve ani dostatečně hluboko do kůže nebo naopak se dostatečné množství léčiva nedostane z krve do kůže (viz obr. 3). [14, 15, 17]



Obr. 2: Transport léčiv do mozku a z mozku (vlevo-funkční P-glykoprotein, vpravo-nefunkční P-glykoprotein) [19]



Obr. 3: Transport léčiv přes kůži do krve (vlevo) a naopak (vpravo)-při funkčním P-glykoproteinu na každém z obrázků (vlevo) a při nefunkčním (vpravo) [20]

2.4. Metody molekulární diagnostiky

Molekulárně biologické techniky umožňují rychlejší a přesnější určení diagnózy. Z tohoto důvodu jsou jimi dnes nahrazovány starší, ne tak exaktní, metody. Molekulární diagnostika je v dnešní době hojně využívaná a rychle se rozvíjející. Její metody vychází z tzv. centrálního dogmatu molekulární biologie, které hovoří o způsobu přenosu genetické informace do biologických makromolekul. Jsou zde popsány mechanismy replikace DNA (syntézy DNA podle vzoru DNA), transkripce (syntézy RNA podle vzoru DNA) a translace (syntézy podle vzoru mRNA), na jejichž principech jsou pak jednotlivé techniky založeny. Mezi nejvyužívanější patří metody amplifikující (tj. zvyšující koncentraci) cílovou sekvenci (polymerázová řetězová reakce, ligázová řetězová reakce aj.), metody amplifikující signál (hybrid capture a různé formy *in situ* hybridizace) a další (komparativní genomová hybridizace a různé formy sekvenování DNA). [1]

2.4.1. Metoda PCR -Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR), anglicky *Polymerase Chain Reaction*, patří mezi metody amplifikující cílovou sekvenci. Provádí se zcela *in vitro* (ve zkumavce). Jejím cílem je namnožení požadované sekvence DNA dostatečně na to, aby ji bylo možno zviditelnit nebo s ní dále pracovat. Výhodou této reakce je její rychlost, specifičnost, přesnost a spotřeba pouze malého množství DNA. Díky tomu se jí využívá nejen v základním výzkumu a aplikovaném genetickém výzkumu, ale také v klinických disciplínách, kriminalistice, soudním lékařství, potravinářství a mnoha dalších oborech. [1, 21, 22, 24]

Pro správný průběh PCR je zapotřebí reakční směs (Master Mix), která obsahuje všechny potřebné reagenty. Skládá se z termostabilní DNA polymerázy, směsi nukleotidů, dvou primerů, pufru, solí (zejména hořčičných iontů) a beznukleázové vody. Po řádném promíchání těchto všech látek se k ní přidává zkoumaný vzorek DNA (templát). [1, 4, 21, 22, 24]

Zmiňovaná DNA polymeráza je enzym, který katalyzuje syntézu DNA. Jeho termostabilita je při této reakci velice důležitá, jelikož část PCR probíhá za vysokých teplot, u kterých by mohlo v případě nestabilní polymerázy dojít k její denaturaci a tím i k její nedostatečné funkci. Z termostabilních DNA polymeráz je nejvyužívanější tzv. Taq polymeráza, jejíž optimální teplota se pohybuje okolo 75 °C, kdy je schopna přidat k primeru asi 150 bází za sekundu. Při teplotách vyšších než 90 °C nevykazuje aktivitu, avšak je schopna odolat denaturaci. [4, 21]

Směs nukleotidů potom musí obsahovat všechny čtyři deoxynukleosidtrifosfáty (dNTP), mezi něž patří Deoxyadenosintrifosfát (dATP), Deoxythymidin trifosfát (dTTP), Deoxycytidin trifosfát (dCTP) a Deoxyguanosin trifosfát dGTP. V reakci slouží jako zdroje budoucích nukleotidů. [4, 25]

Používané primery jsou oligonukleotidy zpravidla o délce 17-28 nukleotidů, které jsou pro každou PCR reakci specifické, určují totiž, jaký úsek DNA se bude amplifikovat.

Žádoucí je u nich již zmíněná specifická a pokud možno úplná komplementarita k začátku úseku, na který mají dosedat. Dále by neměly být vzájemně komplementární (mohlo by vést k tomu, že se během reakce začnou chovat sami jako templát) ani vnitřně komplementární (riziko tvorby smyček-vnitřní hybridizace). Oba primery by měly mít také podobnou teplotu tání a nasedání (optimálně alespoň 50 °C). Páry AT a GC v jednotlivých by měly být co nejrovnoměrněji rozloženy. Pro PCR je potřeba dvou primerů, jeden, který se elonguje ve směru transkripce (*forward primer*) a druhý, který se elonguje proti směru transkripce (*reverse primer*). [4, 21, 22, 24]

Puf, soli a voda v Master Mixu pak vytváří vhodné prostředí a podmínky pro průběh reakce. [4, 21, 22]

Samotná PCR reakce se odehrává v přístrojích zvaných termocyclery. Jejich úkolem je cyklicky měnit teplotu reakce v průběhu jednotlivých fází. Těmito fázemi jsou-denaturace, hybridizace a extenze. [4, 21, 22]

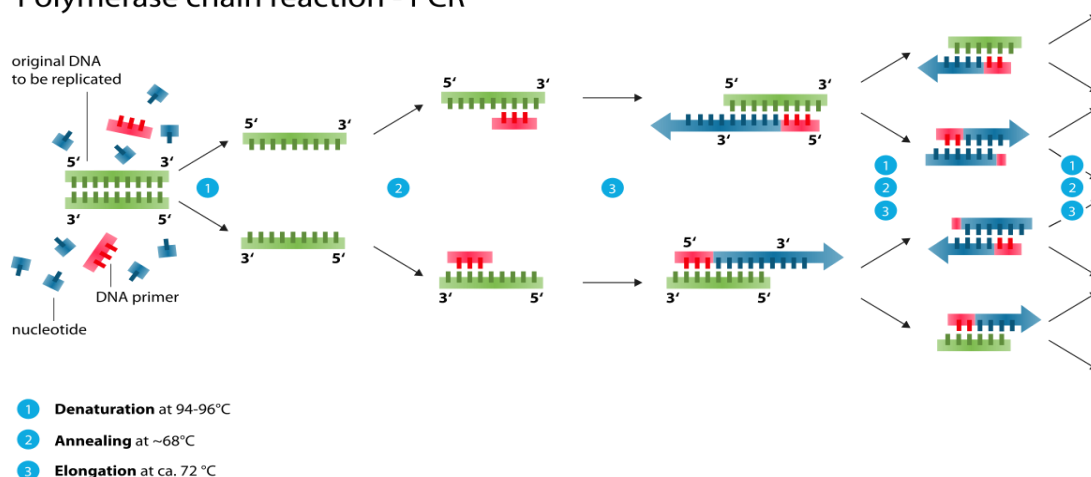
V denaturační fázi se nastává denaturace zkoumané DNA. Denaturace probíhá za teploty 95°C, kdy dojde k rozpadu vodíkových můstků v DNA a dvoušroubovice DNA (dsDNA-double-stranded DNA) se rozpojí. Výsledkem je vznik jednořetězcové DNA (ssDNA-single-stranded DNA). [21, 22, 25]

Hybridizace (též annealing-v překladu žihání, tedy zahřátí na vysokou teplotu a následné prudké ochlazení) označuje fázi, ve které nasedají primery. Molekuly jednořetězcové DNA mají nyní tendenci renaturovat (pojit se zpět do podoby dvouřetězcového DNA), avšak primery, které jsou ve směsi v nadbytku, jsou schopny hybridizovat rychleji než dlouhé jednořetězcové molekuly. Dojde tedy k nasednutí primeru jeho komplementární sekvencí na templátovou jednořetězcovou DNA. Teplota je nastavena v závislosti na použitých primerech, nejčastěji se pohybuje mezi 50-60 °C. [21, 22, 24]

V průběhu extenze přidává Taq polymeráza volné nukleotidy z reakční směsi k primerům přesně podle templátového vlákna DNA. Takto dochází k syntetizaci pouze námi požadované sekvence, kterou jsme určili použitím příhodných primerů. Jiná část DNA syntetizována nebude, protože polymeráza neumí provádět syntézu bez přítomnosti primerů a v reakční směsi jsou pouze dva námi zvolené primery. Tento vznik nových řetězců probíhá za teploty 65-75 °C. [4, 21, 22]

Tyto fáze se mohou opakovat ve více za sebou jdoucích cyklech (často třiceti). Výsledkem prvního cyklu je dvojnásobný počet požadovaných sekvencí, v dalším cyklu už může být templátem, krom dané sekvence na templátové DNA, i nově nasyntetizovaná sekvence, takže při dalších cyklech dochází k exponenciálnímu nárůstu nových sekvencí, podle vzorce $p = 2^n$ (p-počet kopií požadovaného úseku DNA, n-počet cyklů). Po proběhnutí třiceti cyklů pak máme zhruba 10^9 kopií dané sekvence. Skutečné naamplifikované množství však přesně neodpovídá matematickému modelu (empiricky zjistitelná účinnost cyklu je 60-80 %). Avšak i takové výsledné množství sekvencí je již bez problémů detekovatelné. [1, 4, 21, 22, 24]

Polymerase chain reaction - PCR



Obr. 4: Princip PCR [36]

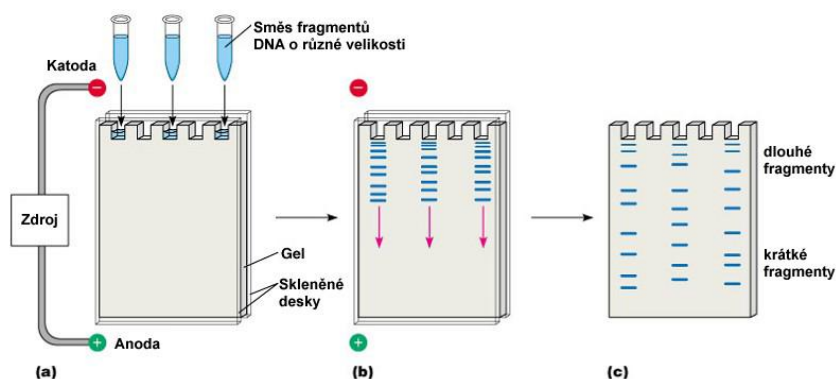
2.4.2. Metoda RFLP-Restrikční analýza

Restrikční analýza je metoda, která se využívá v diagnostice a při popisu DNA. Často jí předchází PCR metoda, která provede naamplifikování daných úseků DNA. Restrikční analýza funguje na principu rozštěpení nukleové kyseliny na menší fragmenty. K tomuto štěpení se využívá bakteriálních endonukleáz (restriktáz). Bakteriální endonukleázy jsou enzymy schopné štěpit fosfodiesterové vazby DNA, za podmínky, že štěpená DNA obsahuje přesně definovanou sekvenci nukleotidů. Restriktázy se evolučně vyvinuly v bakteriích, kde jsou využívány ke štěpení cizí DNA, která do nich pronikne (např. restriktáza EcoRI-získána z bakterie *Escherichie coli*). Dnes je jich známo již kolem 1500. Sekvence, která je endonukleázami rozpoznávána, je ve většině případů složena pouze z několika párů bází a často je to sekvence palindromická (např. endonukleáza KpnI s rozpoznávací sekvencí GGTACC). Každá restriktáza vyžaduje jinou teplotu, aby mohla štěpení bez potíží provést. Metody se často využívá při hledání jednonukleotidových polymorfismů (SNP-Single Nucleotide Polymorphism), kdy je restriktáza volena tím způsobem, aby štěpila DNA přesně v místě hledaného polymorfismu. Výsledkem štěpení je pak nerozštěpená původní sekvence (štěpné místo nebylo nalezeno), či různě dlouhé fragmenty, kdy je tento jev označován jako délkový polymorfismus restriktčních fragmentů (RFLP), na jehož základě se následně stanovují výsledné polymorfismy a případné mutace. Naštípané fragmenty jsou pomocí elektroforézy separovány a dále detekovány. [4, 30, 31, 32, 33]

2.4.3. Gelová elektroforéza

Detekce naštípaných sekvencí se nejčastěji provádí pomocí elektroforézy. DNA nese vlivem fosfátových skupin záporný náboj. Elektroforéza pak probíhá na principu pohybu záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě (využívá se zde jednosměrného elektrického proudu). K oddělení jednotlivých molekul DNA dochází na základě různých rychlostí pohybu přítomných molekul v gelu. Tato rychlost je nepřímo úměrná velikosti molekuly DNA. Nejvyužívanější je agarózová elektroforéza. [4, 24, 26, 27, 29]

Agarozová elektroforéza se provádí v agarózovém gelu. Agaróza, ze které se gel připravuje, je přírodní polysacharid, který je součástí agaru vyráběného z mořských řas. Samotná agaróza je pak teoreticky zcela nenabitá. Struktura agarózového gelu vytváří síťovitý materiál (síť polymerních molekul s póry), v němž může elektroforéza probíhat. Výroba agarózového gelu se provádí rozpouštěním agarózy v pufru. Pufir pak dále plní i funkci elektrolytu v elektroforetické vaně. Před zahájením elektroforézy je k naštípaným vzorkům přidán nanášecí (vkládající) pufir s přidáním barviva (často bromfenolovou modří). Pufir zajistí zatížení DNA, díky kterému klesne do agarózového gelu a může se v něm přemísťovat, obarvení pak umožní pozorovat migrační dráhu fragmentů DNA v gelu. Takto připravené vzorky jsou po jednom nanášeny do jamek v gelu, které byly vytvořeny pomocí hřebínku již při jeho přípravě. Krom vzorků je do gelu nanesen i velikostní marker (*DNA ladder*-žebříček, hmotnostní standard), který slouží pro odhad a porovnání velikosti jednotlivých fragmentů zkoumaných sekvencí DNA, jelikož velikost jednotlivých fragmentů markeru je definovaná. Velikost konstantního napětí užitého při elektroforéze se pohybuje okolo 90-120V. Elektroforéza trvá do okamžiku, kdy se fragmenty začnou blížit k okraji agarózového gelu.[4, 24, 26, 72, 28, 29]



Obr. 5: Princip gelové elektroforézy [29]

2.4.4. Vizualizace DNA

Vizualizace DNA se provádí po skončení elektroforézy, kdy jsou jednotlivé fragmenty zkoumané sekvence DNA rozestoupeny podle délky. Zviditelnění DNA se docílí obarvením fluorescenčním barvivem, které je schopno se vázat na DNA. Jako barvivo je často využíván ethidiumbromid (od jeho používání se kvůli jeho karcinogenitě a mutagenitě odstupuje), RED GEL či SYBR Green. Tato barviva jsou aplikována do gelu již při jeho přípravě. Fragmenty DNA se pak stávají viditelnými pod UV zářením v UV transiluminátoru. Tento přístroj nejčastěji využívá vlnové délky 302-365 nm. Méně častým způsobem vizualizace je radioaktivní značení, hybridizace se značenou sondou či přímá izolace z gelu. Na základě vizualizace rozestoupených fragmentů lze určit o jaký genotyp (alelu) se jedná. [4, 24, 29, 32]

3. PRAKTICKÁ ČÁST

V praktické části byl zkoumán soubor celkem 90 vzorků DNA, v nichž byl pomocí metody PCR, restrikční analýzy, elektroforézy a následné vizualizace vyšetřován polymorfismus C3435T v exonu 26 (rs1045642) v genu pro MDR1. Výsledky byly následně statisticky zpracovány.

3.1. Cíl

Cílem této práce bylo zkoumání vlivu genetického polymorfismu v genu pro MDR1 na atopickou dermatitidu dospělých. Vybrali jsme si polymorfismus v genu pro MDR1 v restrikčním místě 3435. Po genotypizaci DNA pacientů s atopickou dermatitidou byla provedena studie genotyp-fenotyp, v níž bylo cílem porovnat genetické predispozice s výslednými fenotypickými projevy.

3.2. Materiál a metody

Zkoumaná DNA pocházela od pacientů s pozitivní osobní anamnézou na atopickou dermatitidu. Jeho izolace byla provedena z leukocytů v periferní krvi. Zpracování odebrané krve probíhalo v laboratoři Molekulární medicíny Ústavu patologické fyziologie Lékařské fakulty Masarykovi univerzity. Výsledkem izolace, která byla provedena již před začátkem mého výzkumu, byl zásobní roztok DNA. Tento roztok se dále uchovával při teplotě -20 °C.

3.2.1. Soubor pacientů

Do souboru bylo od roku 2008 do roku 2011 zařazeno 90 nepříbuzných pacientů s diagnostikovanou atopickou dermatitidou (diagnóza na základě kritérií Hanifina a Rajka). Pacienti byli vyšetřeni na dermatovenerologickém oddělení Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně. Mezi pacienty zařazenými do zkoumaného souboru bylo 31 mužů a 59 žen. Průměrný věk mužů byl 29,9 let a průměrný věk žen 30,1 let (viz tab. 1).

Tab. 1. Věkové struktura zkoumaných pacientů s AD

Pohlaví	Věkový průměr	n	Věk-min	Věk-max	Věkový medián
Ženy	29,9	31	18	71	26
Muži	30,1	59	18	58	28
Celkem	30	90	18	71	27,5

n-počet pacientů, věk-min-minimální věk, věk-max-maximální věk

U určitého množství pacientů se krom pozitivní osobní anamnézy na atopickou dermatitidu objevuje i pozitivní osobní anamnéza na jiné formy atopie. 71 pacientů mělo zároveň s AD také alergii na vzdušné alergenů (pyl, prach roztoči a zvířecí srst), 48 pacientů trpělo astmatem či alergickou rinitidou, 33 mělo potravinovou alergii a 42 pacientů mělo pouze atopickou dermatitidu s žádnými dalšími projevy atopie (viz tab. 2).

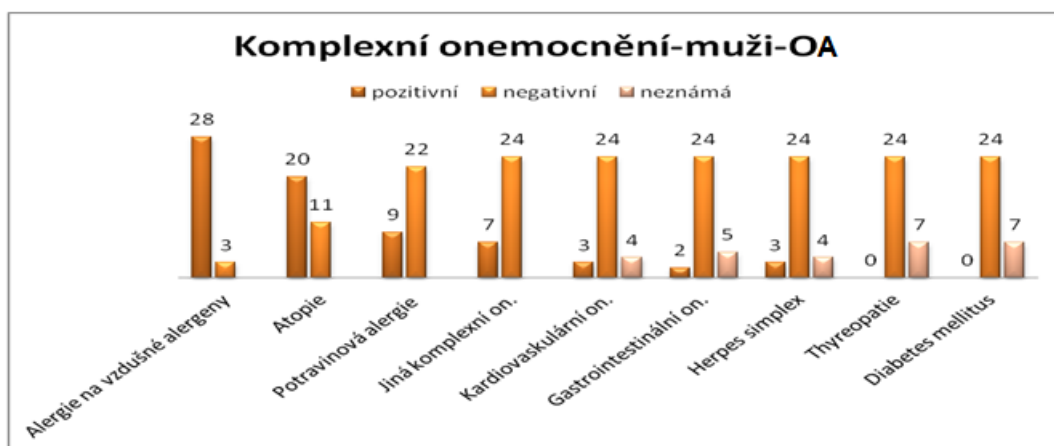
Tab. 2: Další projevené atopie zkoumaných pacientů

Typ další projevené atopie	Absolutní četnost	Procentuální četnost
Alergie na vzdušné alergenů	71	78 %
Astma/alergická rinitida	48	53 %
AD (samostatná forma)	42	46 %
Potravinová alergie	33	37 %

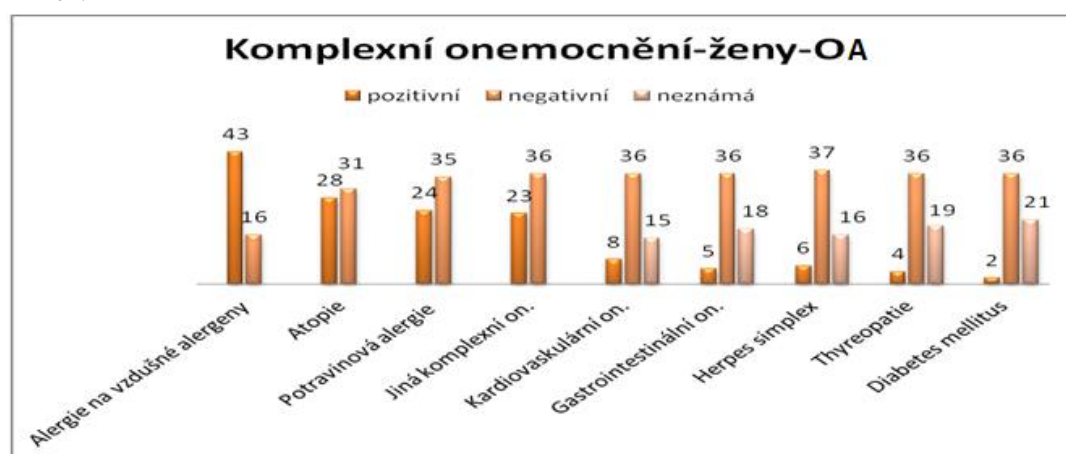
U pacientů byla diagnostikována také jiná komplexní onemocnění, která se ve zkoumaném souboru vyskytovala opakovaně. Jednalo se o kardiovaskulární onemocnění (hypertenzi, ischemickou chorobu srdeční, arytmií a stav po infarktu), gastrointestinální onemocnění (Crohnovu chorobu, ulcerózní kolitidu, vředovou chorobu gastroduodena a hemeroidy), Herpes simplex, thyreopatii a diabetes mellitus (viz tab. 3). Zastoupené nemoci v závislosti na pohlaví jsou patrné na obr. 6 (muži) a na obr. 7 (ženy).

Tab. 3. Další komplexní onemocnění zkoumaných pacientů v jejich osobní anamnéze

Onemocnění	Absolutní četnost	Procentuální četnost
Alergie na vzdušné alergenů	71	78 %
Atopie	48	53 %
Potravinová alergie	33	37 %
Jiná komplexní onemocnění	30	33 %
Kardiovaskulární onemocnění	11	12 %
Gastrointestinální onemocnění	7	8 %
Thyreopatie	4	4 %
Diabetes mellitus	2	2 %



Obr. 6: Graf-komplexní onemocnění u mužů ze souboru (osobní anamnéza); OA-osobní anamnéza; on.–onemocnění

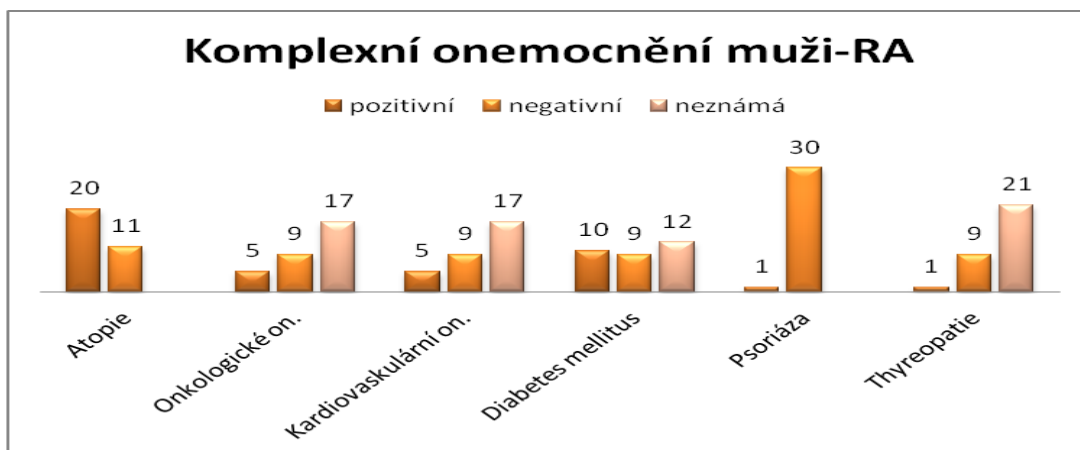


Obr. 7 : Graf-komplexní onemocnění u žen ze souboru (osobní anamnéza); OA-osobní anamnéza on.–onemocnění

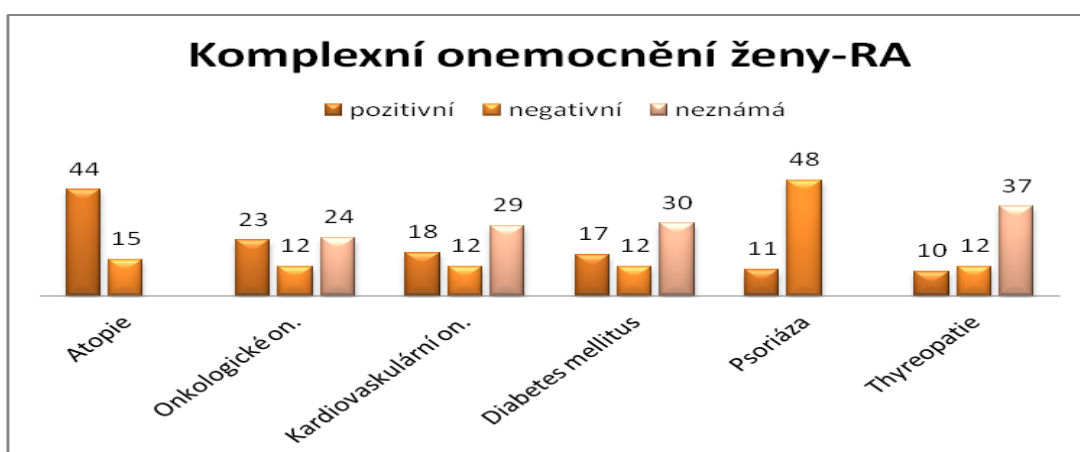
Mimo onemocnění pacientů je nám známa i jejich rodinná anamnéza se zaměřením na atopii, psoriázu, thyreopatii, diabetes, kardiovaskulární a onkologická onemocnění (viz tab. 4). Rodinné anamnézy zastoupených nemocí v závislosti na pohlaví jsou patrné na obr. 8 (muži) a na obr. 9 (ženy).

Tab. 4. Onemocnění v rodinné anamnéze zkoumaných pacientů

Onemocnění	Absolutní četnost	Procentuální četnost
Atopie	64	64 %
Onkologické onemocnění	28	28 %
Kardiovaskulární onemocnění	27	27 %
Diabetes	23	23 %
Psoriáza	12	12 %
Thyreopatie	11	11 %

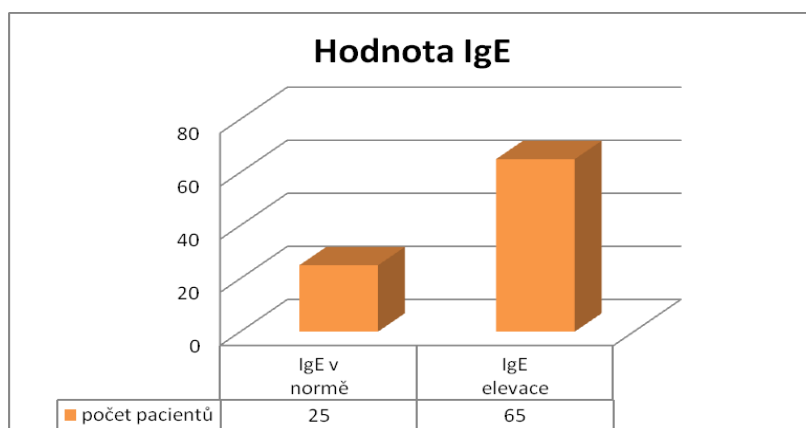


Obr. 8: Graf-komplexní onemocnění u mužů (rodinná anamnéza); RA-rodinná anamnéza; on.-onemocnění



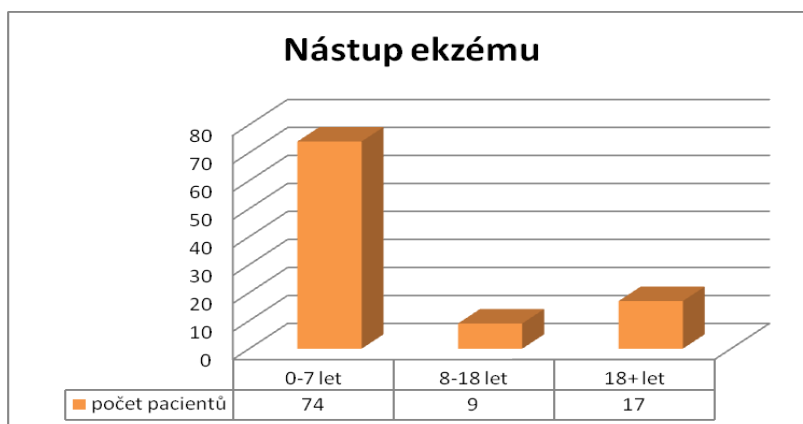
Obr. 9: Graf-komplexní onemocnění u žen (rodinná anamnéza); RA-rodinná anamnéza; on.-onemocnění

U souboru zkoumaných pacientů byla dále zjištěna hodnota celkového IgE (imunoglobulinu E). 65 pacientů mělo zvýšenou hodnotou IgE (nad 158 IU/ml) a u zbylých 25 pacientů byla hodnota IgE (pod 158 UI/ml) v normě (viz obr. 10).



Obr. 10: Graf-rozdělení pacientů dle hladiny IgE

Pacienti byli také rozděleni na základě nástupu atopické dermatitidy. U 74 pacientů ekzém nastoupil do 7 letu věku, u 9 pacientů ve věkovém rozmezí 8-18 let a u 17 pacientů v dospělosti (viz obr. 11).



Obr. 11: Graf-rozdělení pacientů dle nástupu ekzému

3.2.2. Genotypizace genu MDR1

Veškerá laboratorní práce byla provedena v laboratořích Molekulární medicíny Ústavu patologické fyziologie Lékařské fakulty Masarykovi univerzity.

Genotypizace byla provedena v 90 zásobních roztocích izolovaného DNA (viz obr. 12).

První použitou metodou byla polymerázová řetězová reakce (PCR). V první fázi se pracovalo v PCR boxu (viz obr. 13), který bylo nutné nechat před použitím 15-20 minut vyzářit UV-světlem. (V průběhu vyzářování boxu bylo třeba zajistit, aby nedocházelo k ozařování osob ani vzorků.) Po vyzáření zde byl připraven Master Mix. Master Mix se skládal z (údaje uváděny pro jeden vzorek):

- PCR voda (speciálně upravená, bez nukleáz)- 9,9 µl
- pufr- 1,5 µl
- Primer č. 1 (MDR-11)- 0,5 µl
- Primer č. 2 (MDR-12)- 0,5 µl
- Taq polymeráza- 0,1 µl

Použit byl primer MDR-11 se sekvencí 5'-TGTTTTTCAGCTTGATGG-3' a primer MDR-12 se sekvencí 5'-AAGGCATGTATGTTGGCCTC-3'.

Po připravení byl Master Mix krátce vortexován, aby došlo k důkladnému promíchání všech jeho složek. (vortex mixer viz obr. 14).

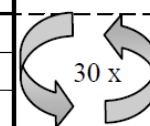
Následně byly do Eppendorfových zkumavek (o objemu 200 µl~0,2 ml) (viz obr. 15) napipetovány (viz obr. 16) 2 µl DNA, ke které bylo přidáno 13 µl Master Mixu.

(Při pipetování vzorků bylo třeba dbát na změnu špičky pipety na každý jednotlivý vzorek, aby nedošlo k jejich smíchání a tím i jejich znehodnocení.) Takto připravená směs byla zakápnuta kapkou organického oleje, aby nedocházelo k vypařování látek a změně jejich koncentrace.

Připravené zkumavky byly naskládány do termocycleru (viz obr. 17) a byl spuštěn program pro PCR.

Tab. 5: Teplotní fáze v termocycleru při programu PCR

Fáze	Teplota	Délka trvání
Počáteční denaturační fáze	95 °C	5 min
Denaturační fáze	95 °C	50 s
Annealing	58 °C	30 s
Extenzní fáze	72 °C	40 s
Terminální elongace	72 °C	7 min
Chlazení	10 °C	10 min



Po skončení programu PCR byly vzorky vytaženy z termocycleru a následovala příprava druhého Master Mixu, který se skládal (údaje uváděny pro jeden vzorek):

- PCR vody- 2,7 µl
- pufr- 2,0 µl
- E MboI- 0,3 µl

Použita byla endonukleáza MboI, která štěpí sekvenci následovně:

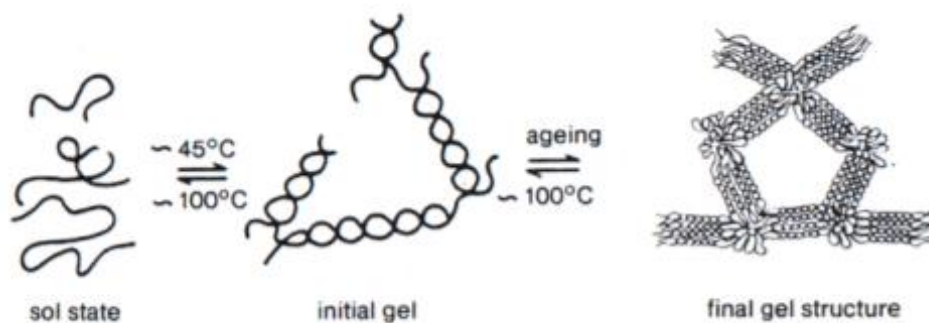


Po jeho připravení bylo 5,0 µl přidáno ke každému PCR produktu (15,0 µl) a vše 24 hodin ponecháno v laboratorním biologickém termostatu při teplotě 37 °C (vhodná teplota pro optimální funkci MboI). Vzniklé fragmenty měly délku 197 bp u TT genotypu, 162 bp+35 bp u CC genotypu a 197 bp, 162 bp+35 bp u genotypu CT.

Následně byla provedena agarózová elektroforéza.

Agarózový gel byl připraven smícháním 100 ml 1% TBE pufru (Tris-borát + kyselina boritá + EDTA¹) se 3 g práškové agarózy v Erlenmeyerově baňce. Směs byla následně vložena do mikrovlnné trouby nastavené na 550-770 W, kde byla rozpouštěna. V průběhu rozpouštění bylo nutné sledovat změnu její konzistence. Rozpuštěný gel byl z mikrovlnné trouby vytažen až v něm nebyly viditelné žádné krystalky agarózy (změna struktury agarózy viz obr. 18).

¹ EDTA- kyselina ethylendiamintetraoctová

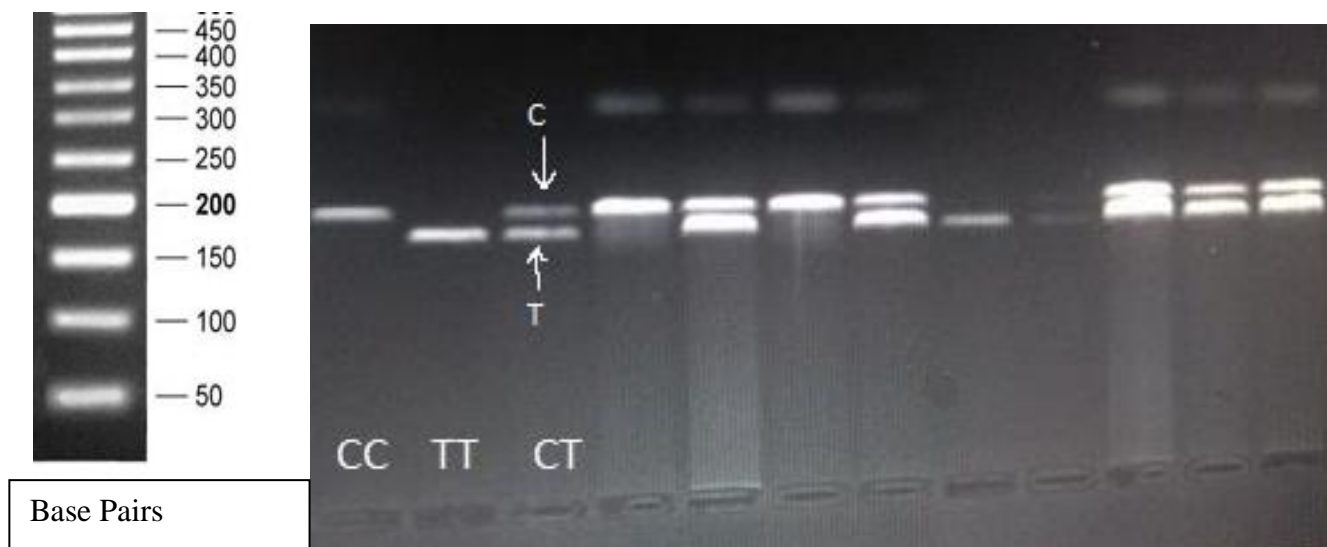


Obr. 18: Vznik porézní struktury připravovaného agarózového gelu [27]

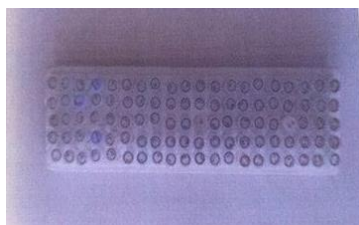
V průběhu rozpouštění gelu byla sestavena plastová vanička pro nalití gelu, kam byl následně gel nalit. Do tekutého gelu ve vaničce byl vložen tzv. hřebínek (pro vytvoření jamek, kam bude nanášen roztok DNA), bylo přidáno 5 μl fluorescenčního barviva GelRed a takto připravený gel se nechal v digestoři vychladit a ztuhnout. Po ztuhnutí byl gel vyjmut z plastové vaničky a vložen do elektroforetické vany, kam se nalilo cca 700 ml TBE pufru, který zde plnil funkci elektrolytu.

Před nanášením do gelu v elektroforetické vaně byly vzorky smíchány s 15-20% ficollem (polysacharid s vysokou hmotností, který umožnil vzorkům zapadnout do jamky v gelu a neroztýlit se v elektrolytu) a 0,125% bromthymolovou modří (umožnila odhad polohy vzorků v gelu-má velmi podobnou rychlost migrace jako vzorky). Připravené vzorky byly poté pipetou vnášeny do jamek v gelu. Do poslední jamky byl nanášen marker molekulových hmotností (DNA ladder, žebříček). Následně byla elektroforetická vana připojena k elektrickému proudu o napětí 130 V. Elektroforéza se nechala probíhat do chvíle, kdy se barevné čelo (barva, která byla v gelu nejvíce vepředu) blížilo ke konci agarózového gelu.

Po skončení elektroforézy byl gel vytažen z elektroforetické vany a přenesen do UV transiluminátoru (viz obr. 19), kde proběhla vizualizace a fotodokumentace (viz obr. 20) rozdělených frakcí. Fotodokumentace byla prováděna pomocí systému POLAROID DIRECT SCREEN INSTANT CAMERA DS 34 (viz obr. 21).



Obr. 20: Vizualizace vzorků² (snímek elektroforetického gelu s nanesenými vzorky po proběhlé elektroforéze). TT, CC a CT jsou alely MDR1-Exonu26. Alela T má délku 197 bp, alela C má délku 162+35 bp. V případě genotypu TT nedošlo ke štěpení restriktázou, obě nemutované alely T tedy zůstaly vcelku o nezměněné délce 197 bp. V případě genotypu CT došlo k jednomu štěpení na mutované alele C. Výsledkem pak byla alela T o délce 197 bp a dva fragmenty alely C o délkách 162 bp a 35 bp. U genotypu CC došlo ke štěpení obou mutovaných alel C, výsledkem tedy byly čtyři fragmenty o délkách 2x162 bp a 2x 35 bp. Rychlost migrace v gelu při elektroforéze ovlivňuje velikost migrující částice (čím je částice větší, tím je rychlost migrace menší a naopak). Delší fragmenty alel T tudíž migrovaly gelem pomaleji (nedostaly se v něm tak daleko) v porovnání s kratšími fragmenty štěpené alely C. [DNA ladder-36]



Obr. 12: Zásobní roztoky DNA [4]



Obr. 13: PCR box (DNA box)²



Obr. 14: VORTEX MIXER²



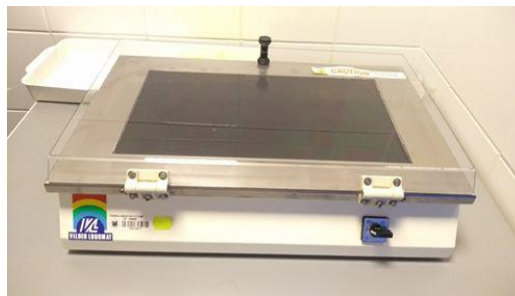
Obr. 15: Eppendorfova zkumavka²



Obr. 16: Vlevo pipety, vpravo pipetování²



Obr. 17: Termocycler²



Obr. 19: UV transluminátor²



Obr. 21: Zobrazovací systém Polaroid²

3.3. Statistické zpracování výsledků

Statistická analýza byla provedena za použití programového balíku Statistica verze 13.2. (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). U souboru byla aplikována Hardyho-Weinbergova analýza k určení rozdílu v distribuci genotypů byl použit Chi square (χ^2) test a k určení rozdílu v distribuci alel Fisher's exact test. Dále bylo vypočítáno odds ratios (OR) s 95% konfidenčním intervalem. Pro porovnání vztahu mezi genotypem a fenotypem byl použit Kruskal-Wallis ANOVA test. Hodnoty $P \leq 0,05$ byly považovány za staticky signifikantní. U jednotlivých testů byla také určena senzitivita, specifita a síla testu. Vypočítán byl též Spearman R (Spearman's rank correlation coefficient).

²Foto autor

4. VÝSLEDKY

V případě dospělých mužů s atopickou dermatitidou jsme nenašli žádné signifikantní asociace ve studii genotyp MDR1-fenotypy atopické dermatitidy.

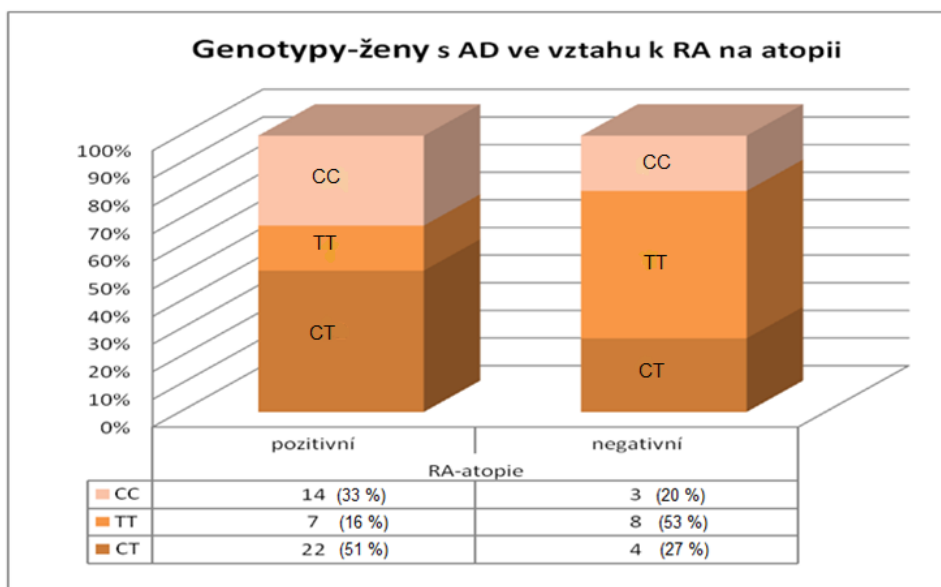
U žen s atopickou dermatitidou bylo v polymorfismu genu pro MDR1 zjištěno, že mají téměř 6krát častěji pozitivní rodinnou anamnézu na atopii, pokud mají genotyp CT+CC. Tento test je značně klinicky senzitivní, jeho senzitivita je 0,837. Lze tedy konstatovat, že je zde poměrně velká pravděpodobnost, že pacientky s genotypem CT nebo CC budou mít pozitivní rodinnou anamnézu na atopii. Výsledek tohoto testu je signifikantní ($P=0.008$). Specifita testu je 0,533 a síla testu je 0,688. (viz Tab. 6 a Obr. 22)

Tab. 6: Frekvence alel MDR1-Ex26 u žen s AD vztažena k jejich rodinné anamnéze na atopii

alela MDR1-Ex26	RA-atopie	
	pozitivní	negativní
CT (%)	22 (51%)	4 (27 %)
TT (%)	7 (16 %)	8 (53 %)
CC (%)	14 (33 %)	3 (20 %)
celkem (%)	43 (100 %)	15 (100 %)

RA-rodinná anamnéza, Ex26-Exon26

7/36 vs 8/7, $P_{corr}=0,02$, $OR=5,88$ (95% konfidenční interval 1,60-21,52)



Obr. 22: Graf-genotypy u žen s AD ve vztahu k rodinné anamnéze na atopii; AD-atopická dermatida, RA-rodinná anamnéza

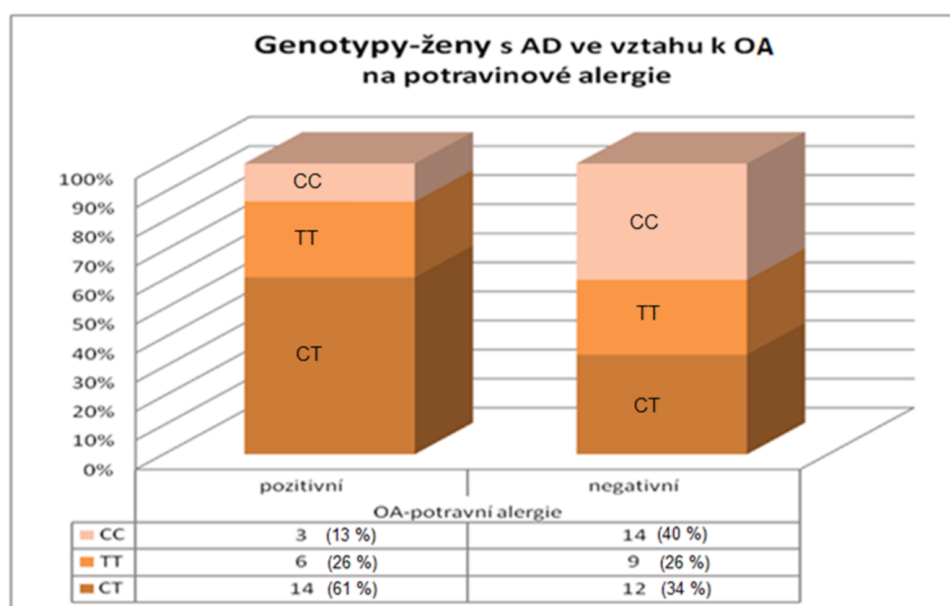
Dále bylo prokázáno, že ženy s AD mají 4,4krát častěji pozitivní osobní anamnézu na potravinové alergie, pokud mají genotyp CT+TT oproti genotypu CC. Senzitivita tohoto testu je 0,870, specifita 0,04 a síla 0,480. (viz Tab. 7 a Obr. 23)

Tab. 7: Frekvence alel MDR1-Ex26 u žen s AD vztažena k jejich osobní anamnéze na potravinové alergie

alela MDR1-Ex26	OA-potravinové alergie	
	pozitivní	negativní
CT (%)	14 (61 %)	12 (34 %)
TT (%)	6 (26 %)	9 (26 %)
CC (%)	3 (13 %)	14 (40 %)
celkem (%)	23 (100 %)	35 (100 %)

OA-rodinná anamnéza, Ex26-Exon 26

3/20 vs 14/21, OR=4,4 (95% konfidenční interval 1,11-17,83), P=0,03



Obr. 23: Graf-genotypy u žen s AD ve vztahu k osobní anamnéze na potravinové alergie, AD-atopická dermatitida, OA- osobní anamnéza

Prokázáno bylo také, že ženy s AD mají 4,4krát častěji pozitivní osobní anamnézu na jiná onemocnění, pokud mají genotyp CT+CT oproti genotypu CC. Senzitivita tohoto testu je 0,870, specifita 0,04 a síla 0,480.

(viz Tab. 8 a Obr. 24)

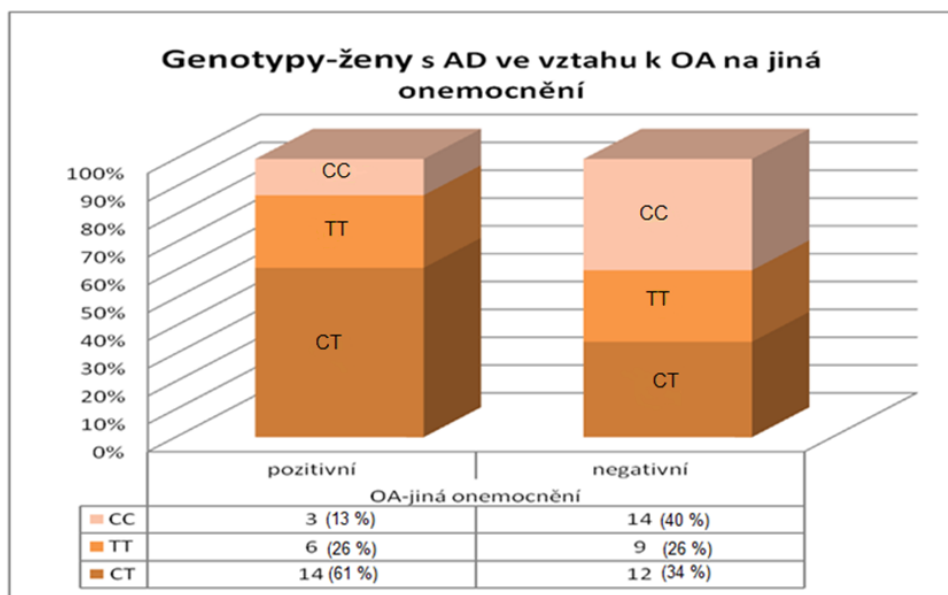
Tento výsledek je překvapivě identický s pozitivitou na potravinové alergie.

Tab. 8: Frekvence alel MDR1-Ex26 u žen s AD vztažena k jejich osobní anamnéze na jiná onemocnění

alela MDR1-Ex26	OA-jiná onemocnění	
	pozitivní	negativní
CT (%)	14 (61 %)	12 (34 %)
TT (%)	6 (26 %)	9 (26 %)
CC (%)	3 (13 %)	14 (40 %)
celkem (%)	23 (100 %)	35 (100 %)

OA-rodinná anamnéza, Ex26-Exon 26

3/20 vs 14/21, OR=4,4 (95% konfidenční interval 1,11-17,83), P=0,03

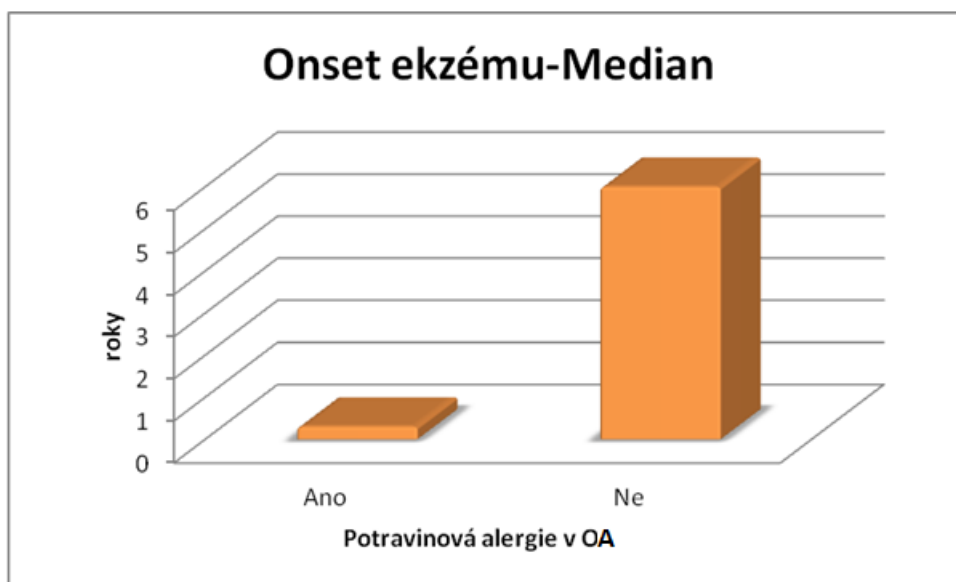


Obr. 24: Graf-genotypy u žen s AD ve vztahu k osobní anamnéze na jiná onemocnění, AD-atopická dermatitida, OA- osobní anamnéza

Signifikantní výsledek ($p=0,008912$) přinesl i onset ekzému u žen s AD ve vztahu k osobní anamnéze na potravinovou alergii. Medián onsetu ekzému ukazuje, že u pacientek s potravinovou alergií dochází nejčastěji k onsetu již ve 4 měsících, kdežto u pacientek bez potravinové alergie až v 6 letech. (viz Tab. 9 a Obr. 25)

Tab. 9: Onset ekzému u žen s AD v závislosti na osobní anamnéze na potravinové alergie

Potravinová alergie	Počet pacientek	Onset ekzému-roky Minimum	Onset-roky Maximum	Onset ekzému-roky Medián
Ano	24	0,100000	54,000000	0,300000
Ne	35	0,100000	50,000000	6,000000
Obě skupiny	59	0,100000	54,000000	3,000000



Obr. 25: Graf-onset ekzému u žen (medián) ve vztahu k osobní anamnéze na potravinové alergie, OA-osobní anamnéza

Dále jsme u žen zaznamenali souvislost mezi přítomností a nepřítomností elevace IgE a TEWL (transepidermálními ztrátami vody) v oblasti předloktí. (viz Tab. 10)

Tab. 10: IgE ve vztahu k TEWL-předloktí u žen s atopickou dermatidou

Porovnávané hodnoty	počet pacientek	t (N-2)	Spearman R	p-value
elevace IgE (ano, ne) & TEWL: předloktí	59	2,32271	0,294049	0,023788

IgE-immunoglobuliny E, TEWL-transepidermální ztráty vody, t-počet rozdělení, N-počet stupňů volnosti

5. DISKUZE

S objasněním lidského genomu přišlo období zkoumání genomové variability mezi jednotlivci v závislosti na specifických podmínkách. Nové zkoumání vedlo k rozvoji celogenomových asociačních studií. Tyto studie umožnily urychlení výzkumu nových genů či potvrzení úlohy již dříve popsaných genů. V posledních letech se některé práce věnovaly zkoumání genů asociovaných přímo s atopickou dermatitidou či atopiemi a alergiemi, v závěru se na atopickou dermatitidu vztahujících. Do roku 2009 bylo publikováno pět celogenomových studií se zaměřením pouze na atopickou dermatitidu. Čtyři z těchto prací prováděli výzkum v rodinách evropského původu a jedna prováděla studii v japonských rodinách. Výsledky některých studií se shodovaly, jiné se lišily. U těchto studií je třeba podotknout, že zde nehraje roli jen genetická heterogenita samotná, ale také zde mají výrazný vliv nongenetické faktory (různé definice fenotypu, rozdílná metodika v jednotlivých studiích atd.). [4, 40]

Odkazovat lze však i na studie zabývající se primárně astmatem či atopickou rýmou, jelikož se jedná o alergická onemocnění s podobnými příčinami jako má atopická dermatitida. Lze tedy předpokládat, že mohou mít společný genetický základ. [4, 40]

Výsledky těchto studií přinášejí souhrn genů a genetických variant, u kterých byla určena spojitost s atopickou dermatitidou. [4, 40]

Námi zkoumaný polymorfismus 3435 C/T je častým předmětem výzkumu především v souvislosti s vlivem na transport různých léčiv a tedy i jejich efektivitu v různých populacích. [14, 15, 17]

V literatuře jsme nenašli srovnatelnou práci, která by hodnotila vliv variability v genu pro MDR1 na fenotypy onemocnění atopickou dermatitidou, takže naše výsledky můžeme považovat za prioritní.

Jediná práce pojednávající o podobném tématu se zabývá možnou žlučovou exkrecí metabolitů nového léku pro závažné astma a atopickou dermatitidu (Fevipirant – nový orální antagonist receptoru pro prostaglandin D2 -DP2; také znám jako CRTh2) (Pearson D et al., 2017). [38]

Z našich výsledků tedy můžeme vyvodit, že přítomnost rodinné anamnézy atopie, potravinové alergie nebo jiných nealergických nemocí u žen může souviset s genotypem v polymorfismu C3435T v genu pro MDR1. Z našeho souboru pacientů je také zřejmá souvislost začátku klinické manifestace atopické dermatitidy s pozitivní osobní anamnézou na potravinové alergie a dále souvislost přítomnosti či nepřítomnosti elevace IgE s TEWL v oblasti předloktí.

6. ZÁVĚR

Cílem našeho výzkumu bylo určit vliv polymorfismu C3435T v genu pro MDR1 na fenotypy atopické dermatitidy. Svého stanoveného cíle jsme dosáhli a prokázali možnou souvislost fenotypu se zkoumaným polymorfismem.

Při nálezů rizikových variant v genu pro MDR1 u pacienta by bylo možné na základě genetického vyšetření onemocnění včas diagnostikovat, předpokládat jeho další vývoj, zavést patřičná preventivní opatření či zvolit vyhovující léčbu. Zmíněné skutečnosti by měly pozitivní dopad na pacienty a přispěly by ke zlepšení kvality jejich života.

Námi zvolené restrikční místo v genu má totiž určitý vliv na správnou funkci P-glykoproteinu, který hraje nezanedbatelnou roli při vzniku atopické dermatitidy a také v účinnosti podaných léčiv.

V případě multifaktoriálního onemocnění, jako je atopická dermatitida, je však nutná identifikace dalších genových oblastí, které zde mají vliv. Další komplexnější genetické studie by mohly být uplatněny na účinnější terapii nebo při ovlivňování celkového vývoje atopického pochodu. [4, 40]

LITERATURA

- [1] HERCOGOVÁ, Jana. *Klinická dermatovenerologie*. Praha: Mladá fronta, 2019. Medical services. ISBN 978-80-204-5321-1, 111-115; 143-152
- [2] ČAPKOVÁ, Štěpánka. *Atopický ekzém*. Páté, přepracované a doplněné vydání. Praha: Galén, [2017]. Medical services. ISBN 978-80-7492-300-5
- [3] BENÁKOVÁ, Nina. *Ekzémy a dermatitidy: [průvodce ošetřujícího lékaře]*. 3., rozš. a aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, c2013. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 978-80-7345-331-2.
- [4] KOZÁČIKOVÁ, Zuzana. *Etiopatogenetické súvislosti atopického ekzému*. Brno, 2014. Disertačná práca v obore dermatovenerológia. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Prof.MUDr. Vladimír Vašků.
- [5] *Atopický ekzém*. Wikiskripta [online]. Česká republika, 2018 [cit. 2020-01-14]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Atopick%C3%BD_ekz%C3%A9m
- [6] NOVOTNÝ, František. *Atopický ekzém*. Praha: Triton, 2010. ISBN 978-80-7387-202-1.
- [7] *Dermatologie pro praxi: Role ceramidů v bariérové funkci kůže, jejich význam ve vývoji kožních onemocnění a jejich terapii* [online]. [cit. 2020-01-03]. ISSN 1803-5337. Dostupné z: www.dermatologiepropraxi.cz
- [8] *Polymorfismus*. Wikiskripta [online]. Česká republika, 2019 [cit. 2020-01-18]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Polymorfismus>
- [9] *Genetický polymorfismus*. Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2020-01-18]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Genetick%C3%BD_polymorfismus
- [10] *POLYMORFISMY V GENOMU ČLOVĚKA VEDOUcí K NÁCHYLNOSTI K INFEKČNÍM CHOROBÁM*. [online]. Brno, 2010 [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/mfg8f/BP_Polymorfismy_Jana_Musilova.pdf. Bakalářská práce. MASARYKOVA UNIVERZITA Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Oddělení genetiky a molekulární biologie. Vedoucí práce MUDr. David Šmajsa, Ph.D.
- [11] *Alely*. Wikiskripta [online]. Česká republika, 2016 [cit. 2020-01-18]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Alely>
- [12] *Asociační studie*. Wikiskripta [online]. Česká republika, 2018 [cit. 2020-01-18]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Asocia%C4%8Dn%C3%AD_studie

- [13] MDR1. Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2020-01-27]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Asocia%C4%8Dn%C3%AD_studie
- [14] Cancer Letters. 2006, 234(1). ISSN 03043835. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383505009225>
- [15] BRAMBILA-TAPIA, Aniel Jessica Leticia. MDR1 (ABCB) polymorphisms: functional affects and clinical implications. Revista de Investigación Clínica. 2013, (5), 446-454. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383505009225>
- [16] SEEGER, Markus A. a Hendrik W. VAN VEEN. Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 2009, 1794(5), 725-737. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.12.004. ISSN 15709639. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963908003920>
- [17] TANG, Kun, Li Peng WONG, Edmund J.D. LEE, Samuel S. CHONG a Caroline G.L. LEE. Genomic evidence for recent positive selection at the human MDR1 gene locus. Human Molecular Genetics. 2004, 13(8), 783-797. DOI: 10.1093/hmg/ddh099. ISSN 1460-2083. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddh099>
- [18] PŘIBYLOVÁ, Jana. Efluxní pumpy a jejich význam v mechanismu rezistence bakterií vůči antimikrobiálním látkám [online]. Brno, 2012 [cit. 2020-01]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/gvfq3/bakalarska_prace.pdf. Bakalářská práce. MASARYKOVA UNIVERZITA, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Oddělení mikrobiologie. Vedoucí práce Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.
- [19] La mutación del gen MDR-1 ¿Afecta solo a Collies? Zonacan [online]. [cit. 2020-01-27]. Dostupné z: <http://www.zonacan.com/2016/04/el-gen-mdr-1-afecta-solo-collies.html>
- [20] P-Glycoprotein in skin contributes to transdermal absorption of topical corticosteroids. Sciencedirect [online]. [cit. 2020-01-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517317301631>
- [21] Polymerázová řetězová reakce. Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2020-01-27]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%Bzov%C3%A1_reakce

- [22] Polymerázová řetězová reakce. Wikiskripta [online]. Česká republika, 2017 [cit. 2020-01-27]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce
- [23] Metody molekulární diagnostiky [online]. [cit. 2020-01]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2013/Bi6400/um/39026204/14_Molekularni_diagnostika.pdf?lang=en
- [24] Aplikované analytické a instrumentální techniky v laboratorní medicíně [online]. Brno, 2017 [cit. 2020-01]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/podzim2019/MBKB071p/Aplikovane_analyticke_a_instrumentalni_techniky_v_laboratorni_medicine.pdf. Učební text. Masarykova univerzita.
- [25] Metody molekulární biologie. Biologie a genetik pro bakaláře [online]. [cit. 2020-01]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-metody_molekularni_biologie&lang=cz
- [26] Elektroforéza DNA. Laboratoř molekulární biologie rostlin PřF JU [online]. [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: <http://botanika.prf.jcu.cz/laboratory/elektroforeza.html>
- [27] ELEKTROFOREZA DNA V AGAROVÉ GELU. Nanoed [online]. [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5708/mod_resource/content/1/CV1C_elektroforeza%20DNA.pdf
- [28] Agaróza. Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Agar%C3%B3za>
- [29] Elektroforéza [online]. [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2013/Bi6400/um/39026204/05_Elektroforeza.pdf
- [30] LINHARTOVÁ, Petra. Restrikční analýza [online]. [cit. 2020-01-18]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/jaro2011/ZLGE061c/um/Restrikcni_analyza.pdf
- [31] Polymorfismus délky restrikčních fragmentů. Wikiskripta [online]. Česká republika, 2019 [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Polymorfismus_d%C3%A9lky_restrik%C4%8Dn%C3%ADch_fragment%C5%AF
- [32] Polymorfismus délky restrikčních fragmentů. Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Polymorfismus_d%C3%A9lky_restrik%C4%8Dn%C3%ADch_fragment%C5%AF

- [33] Štěpení DNA. Wikiskripta [online]. [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/%C5%A0t%C4%9Bpen%C3%AD_DNA
- [34] Card Reagents BM012-R500 50 bp DNA Ladder 500ul, for Clinical, 3 min. Indiamart [online]. [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: <https://www.indiamart.com/proddetail/bm012-r500-50-bp-dna-ladder-500ul-9217855191.html>
- [35] Gelová elektroforéza. Molekulární biologie [online]. 2011 [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz
- [36] Polymerase chain reaction. Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction
- [37] Atopická dermatitida - co byste o ní měli vědět. Pravdy o atopii [online]. [cit. 2020-02-01]. Dostupné z: <https://www.pravdyoatopii.cz/clanok/22-atopicka-dermatitida-co-byste-o-ni-meli-vedet>
- [38] PEARSON, David, H. Markus WEISS, Yi JIN, et al. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of the Oral Prostaglandin D2 Receptor 2 Antagonist Fevipiprant (QAW039) in Healthy Volunteers and In Vitro. *Drug Metabolism and Disposition* [online]. 2017, **45**(7), 817-825 [cit. 2020-02-04]. DOI: 10.1124/dmd.117.075358. ISSN 0090-9556. Dostupné z: <http://dmd.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/dmd.117.075358>
- [39] Česko-slovenská dermatologie [online]. 2011(2) [cit. 2020-02-08]. ISSN 1803-6597. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-dermatologie/2011-2/genetika-atopickej-dermatitidy-35072>
- [40] Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology: Výzkum genů souvisejících s alergickou rýmou a alergií pomocí celogenomových asociačních studií [online]. 2015(2) [cit. 2020-02-08]. ISSN 1803-893X. Dostupné z: <http://www.co-allergy.cz/coaci-clanek/vyzkum-genu-souvisejicich-s-alergickou-rymou-a-alergii-pomoci-celogenomovych-asociacnich-studii-52587>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Struktura P-glykoproteinu.....	12
Obr. 2: Transport léčiv do mozku a z mozku.....	13
Obr. 3: Transport léčiv přes kůži do krve a naopak.....	13
Obr. 4: Princip PCR.....	16
Obr. 5: Princip gelové elektroforézy.....	17
Obr. 6: Graf-komplexní onemocnění u mužů ze souboru (osobní anamnéza).....	20
Obr. 7: Graf-komplexní onemocnění u žen ze souboru (osobní anamnéza).....	20
Obr. 8: Graf-komplexní onemocnění u mužů (rodinná anamnéza).....	21
Obr. 9: Graf-komplexní onemocnění u žen (rodinná anamnéza).....	21
Obr. 10: Graf-rozdělení pacientů dle hladiny IgE.....	21
Obr. 11: Graf-rozdělení pacientů dle nástupu ekzému.....	22
Obr. 12: Zásobní roztoky DNA.....	25
Obr. 13: PCR box (DNA box).....	25
Obr. 14: VORTEX MIXER.....	25
Obr. 15: Eppendorfova zkumavka.....	26
Obr. 16: Vlevo pipety, vpravo pipetování.....	26
Obr. 17: Termocycler.....	26
Obr. 18: Vznik porézní struktury připravovaného agarózového gelu	24
Obr. 19: UV transluminátor.....	26
Obr. 20: Vizualizace vzorků.....	25
Obr. 21: Zobrazovací systém Polaroid.....	26
Obr. 22: Graf-genotypy u žen s AD ve vztahu k rodinné anamnéze na atopii.....	27
Obr. 23: Graf-genotypy u žen s AD ve vztahu k osobní anamnéze na potravinové alergie....	28
Obr. 24: Graf-genotypy u žen s AD ve vztahu k osobní anamnéze na jiná onemocnění.....	29
Obr. 25: Graf-onset ekzému u žen (medián) ve vztahu k osobní anamnéze na potravinové alergie.....	30

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Věkové struktura zkoumaných pacientů s AD.....	18
Tab. 2: Další projevené atopie zkoumaných pacientů.....	19
Tab. 3: Další komplexní onemocnění zkoumaných pacientů v jejich osobní anamnéze.....	19
Tab. 4: Onemocnění v rodinné anamnéze zkoumaných pacientů.....	20
Tab. 5: Teplotní fáze v termocycleru při programu PCR.....	23
Tab. 6: Frekvence alel MDR1-Ex26 u žen s AD vztažena k jejich rodinné anamnéze na atopii.....	27
Tab. 7: Frekvence alel MDR1-Ex26 u žen s AD vztažena k jejich osobní anamnéze na potravinové alergie.....	28
Tab. 8: Frekvence alel MDR1-Ex26 u žen s AD vztažena k jejich osobní anamnéze na jiná onemocnění.....	29
Tab. 9: Onset ekzému u žen s AD v závislosti na osobní anamnéze na potravinové alergie...30	
Tab. 10: IgE ve vztahu k TEWL-předloktí u žen s atopickou dermatitidou.....	30

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD- atopická dermatitida, atopický ekzém
MDR1, ABCB1- multidrug resistance 1
IgE- Imunoglobuliny E
IL- Interleukin
DNA- deoxyribonukleová kyselina
RNA- ribonukleová kyselina
A- adenin
T- thymin
G- guanin
C- cytosin
SNP- Single-nucleotide polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus
ATP- Adenosintrifosfát
RND- Resistance nodulation division family
MFS- Major facilitator superfamily
SMR- Staphylococcal multiresistance family (small multidrug resistance)
MATE- Multidrug and toxic compound extrusion
ABC- ATP binding cassette
dNTP- Deoxynukleosidtrifosfáty
dATP- Deoxyadenosintrifosfát
dTTP- Deoxythymidin trifosfát,
dGTP- Deoxyguanosin trifosfát
dCTP- Deoxycytidin trifosfát
PCR- Polymerázová řetězová reakce
RFLP- Polymorfismus délky restrikčních fragmentů
UV- ultrafialové záření
EcoRI- restriktáza získána z bakterie *Escherichie coli*
KpnI- restriktáza získána z bakterie *Klebsielli pneumoniae*
MboI- restriktáza získána z bakterie *Moraxella bovis*
OR- odds ratio
EDTA- kyselina ethylendiamintetraoctová
OA- osobní anamnéza
RA- rodinná anamnéza
TEWL- transepidermální ztráty vody