

## Určení stupně malabsorpce žlučových kyselin a vliv polymorfismů v promotoru genu *CYP7A1*

Leníček M.<sup>1</sup>, Lukáš M.<sup>2</sup>, Budišová L.<sup>3</sup>, Jirsa M.<sup>1,3</sup>, Kovář J.<sup>3</sup>, Donoval R.<sup>2</sup>, Bortlík M.<sup>2</sup>, Vítek L.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN, Praha

<sup>2</sup>IV. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha

<sup>3</sup>Centrum experimentální medicíny, IKEM Praha

### SOUHRN

**Cíl studie:** Cílem předkládané studie bylo posoudit vliv běžných polymorfismů v promotoru genu pro cholesterol 7 $\alpha$ -monooxygenasu na poměr sérového 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-onu (cholestenu) a cholesterolu jako ukazatele stupně malabsorpce žlučových kyselin.

**Název a sídlo pracoviště:** Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN, Praha; IV. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha; Centrum experimentální medicíny, IKEM, Praha.

**Materiál a metody:** Sérové koncentrace cholestenu byly stanoveny pomocí HPLC v souboru pacientů s Crohnovou chorobou (CD) po resekci terminálního ilea (n = 77), se zánětlivým postižením terminálního ilea (n = 16) a s postižením lokalizovaným pouze v oblasti tlustého střeva (n = 22). Do studie byli zahrnuti též pacienti s ulcerózní kolitidou (n = 25) a zdraví jedinci (n = 39). Dva běžné polymorfismy v genu *CYP7A1* kódujícím cholesterol 7 $\alpha$ -monooxygenasu (-203A/C, -469C/C) byly detekovány pomocí PCR-RFLP.

**Výsledky:** Při značné malabsorpci žlučových kyselin u nemocných po resekci ilea se poměr sérového cholestenu k cholesterolu lišil mezi pacienty s haplotypem -203CC/-469TT a -203AA/-469CC (medián 13,3  $\mu$ g/mmol vs 31,3  $\mu$ g/mmol, p < 0,01). U zdravých kontrol a u nemocných bez malabsorpce či jen s nízkým stupněm malabsorpce žlučových kyselin nebyly rozdíly v závislosti na haplotypu statisticky významné (výsledky uváděny jako medián  $\mu$ g/mmol): zdravé kontroly 2,4 vs 2,6; ulcerózní kolitida 3,2 vs 3,6; Crohnova kolitida 1,3 vs 3,5 a Crohnova ileitida 3,8 vs 12,8.

**Závěr:** Poměr sérového cholestenu k cholesterolu je významně ovlivněn haplotypem promotoru genu *CYP7A1* pouze u pacientů s těžkou malabsorpcí žlučových kyselin.

**Clíčová slova:** malabsorpce žlučových kyselin, cholesten, *CYP7A1*, polymorfismus.

### SUMMARY

**Leníček M., Lukáš M., Budišová L., Jirsa M., Kovář J., Donoval R., Bortlík M., Vítek L.: Estimation of bile acid malabsorption and the influence of *CYP7A1* gene promoter polymorphisms**

**Objective:** The aim of our study was to assess the influence of common promoter polymorphisms in *CYP7A1* gene on the ratio of serum 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (cholesten) to cholesterol used for quantification of bile acid malabsorption.

**Settings:** Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, 1st Medical Faculty of the Charles University and General Faculty Hospital; IV. Department of Internal Medicine, General Faculty Hospital, Prague; Center of Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague.

**Material and Methods:** Serum levels of cholesten, a novel marker of bile acid malabsorption, were determined by HPLC in a group of Crohn's disease (CD) patients with ileal resection (N = 77), inflammation (N = 16), colonic involvement (N = 22), ulcerative colitis (UC) patients (N = 25) and healthy controls (N = 39). Two common polymorphisms in the promoter of *CYP7A1* gene encoding cholesterol 7 $\alpha$ -monooxygenase, i. e. -203A/C and -469C/T, were analyzed by PCR-RFLP.

**Results:** Serum levels of cholesten corrected to serum cholesterol differed markedly between patients with severe bile acid malabsorption carrying haplotype 203CC/-469TT and -203AA/-469CC (median 13.3  $\mu$ g/mmol vs. 31.3  $\mu$ g/mmol, P < 0.01); no significant differences were detected in healthy controls and patients with no or a mild degree of bile acid malabsorption (results expressed as median  $\mu$ g/mmol): healthy controls 2.4 vs. 2.6; ulcerative colitis 3.2 vs. 3.6; Crohn's colitis 1.3 vs. 3.5 and Crohn's ileitis 3.8 vs. 12.8.

**Conclusion:** Serum cholesten to cholesterol ratio is influenced by promoter polymorphisms in *CYP7A1* gene only in patients with severe bile acid malabsorption.

**Key words:** bile acid malabsorption, cholesten, *CYP7A1*, polymorphism.

## Úvod

Žlučové kyseliny (ŽK) vznikají z cholesterolu v hepatocytech, odkud jsou po konjugaci s taurinem či glycinem secernovány do žluče. Žlučovými cestami se dostávají do duodena, kde mají za úkol emulgovat tuky z potravy. Jako biologicky cenné látky jsou ŽK z velké části vstřebávány zpět do cirkulace. Vstřebávání se

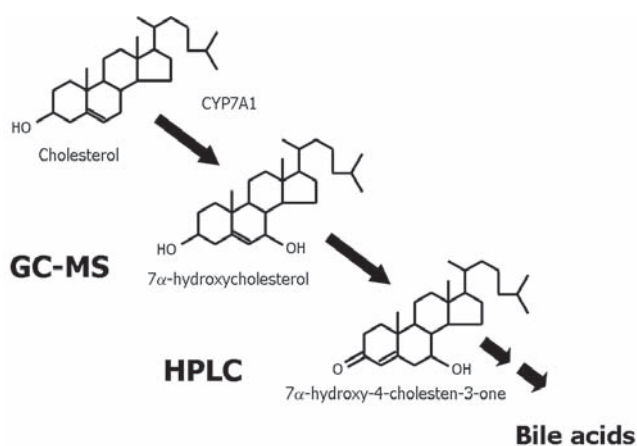
děje buď pasivním transportem (tak jsou vstřebávány konjugované ŽK z tenkého a nekonjugované ŽK z tlustého střeva), nebo účinnějším aktivním transportem. Aktivně jsou vstřebávány konjugované ŽK v terminálním ileu prostřednictvím ileálního transportéru ŽK IBAT (synonyma ASBT, SLC10A2) [1].

Je-li nějakým způsobem vyřazena funkce IBAT (resekce či bypass terminálního ilea, postiradiační, toxic-

ké či zánětlivé poškození ilea, případně vzácné mutace IBAT), dochází ke značnému narušení enterohepatické cirkulace ŽK. ŽK zůstávají ve střevě, kde jako silné detergenty mohou poškozovat sliznici střeva, způsobují průjmy a chelatují vápenaté ionty. Relativní nedostatek vápenatých iontů ve střevě vede spolu se solubilizačním účinkem malabsorbovaných ŽK ke zvýšenému vstřebávání bilirubinu a oxalátů [2, 3], které mohou následně přispět ke vzniku žlučových a ledvinových kamenů [4–8].

Pacienti s Crohnovou chorobou (CD) mají ve srovnání se zdravou populací asi 3krát vyšší výskyt cholelitiázy [4, 9]. Navzdory původním představám o cholesterolovém původu konkrementů [10, 11] bylo prokázáno, že se může jednat o kameny pigmentové, jejichž základem je kalcium bilirubinát [3, 12]. Naše recentní studie prokázala souvislost malabsorpce ŽK s výskytem cholelitiázy u pacientů s CD a poukázala na význam rutinního stanovení malabsorpce ŽK u všech pacientů s CD [13].

Stupeň malabsorpce ŽK lze určit čtyřmi metodami. Kvantitativní stanovení ŽK ve stolici není pro obtížné spojené se zpracováním vzorku používáno. Metoda využívající <sup>75</sup>Se značený derivát kyseliny cholové (23-seleno-25-homotaurocholovou kyselinu = <sup>75</sup>SeHCAT) [14, 15], dodnes v některých zemích považovaná za zlatý standard, u nás není povolena kvůli dlouhému poločasu rozpadu <sup>75</sup>Se. Zbylé dvě metody jsou založeny na stanovení sérových či plazmatických koncentrací meziproduktů syntézy ŽK (obr. 1), která se v důsledku deplece ŽK při malabsorpci zvyšuje.



**Fig. 1.** Bile acid synthesis

The rate of bile acid synthesis depends on the activity of cholesterol 7β-monooxygenase, which can be determined by measuring intermediate metabolite concentration.

Koncentraci mevalonátu a 7α-hydroxycholesterolu lze stanovit pomocí GC-MS [16], koncentraci cholestenu pomocí HPLC [17]. Provedení HPLC analýzy je jednodušší, levnější, dostupnější a její výsledky dobře korelují s výsledky <sup>75</sup>SeHCAT testu [18], proto dochází v současné době k postupnému rozšiřování této metody.

V promotoru genu *CYP7A1* kódujícím klíčový enzym syntetické dráhy ŽK cholesterol 7α-monooxygenasu jsou popsány polymorfismy -203A/C a -469C/T, které mohou ovlivňovat expresi tohoto enzymu [19, 20].

Cílem naší studie bylo zjistit, zda přítomnost těchto polymorfismů ovlivňuje koncentraci cholestenu a tím i přesnost určení stupně malabsorpce ŽK.

## Metody

**Pacienti:** Do studie bylo zařazeno celkem 151 pacientů s CD, 24 pacientů s ulcerózní kolitidou (UC) a 61 zdravých jedinců. Pacienti byli vybráni z databáze Gastroenterologického centra IV. interní kliniky 1. LF UK a VFN v Praze. Jednalo se o nemocné s verifikovanou diagnózou CD a UC. Studie byla provedena podle pravidel schválených Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

**Stanovení sérových hladin cholestenu:** Stanovení koncentrace cholestenu bylo provedeno podle Galmana et al. [17]. Směs 900 μl séra, 40 ng vnitřního standardu (7β-hydroxy-4-cholesten-3-on, Steraloids, Inc., USA) a 2 ml fyziologického roztoku byla sonikována po dobu 15 minut a poté inkubována 15 minut při 37 °C. Následovala extrakce na kolonce STRATA SPE C8 (Phenomenex, USA) při 64 °C, promytí 65% metanolem při laboratorní teplotě a eluce směsí hexan : chloroform (95 : 5). Po odpaření rozpouštědel při 60 °C proudem dusíku byly vzorky rozpuštěny ve 400 μl ace-tonitrilu. 150 μl vzorku bylo nanášeno na HPLC (kolona SGX C18, 4 x 250 mm, velikost částic 4 μm, Tessek) s mobilní fází acetonitril : voda (95 : 5, 1 ml/min). Detekce cholestenu byla provedena při 241 nm s referenční vlnovou délkou 360 nm. Koncentrace cholestenu byla vypočtena z plochy pod křivkou po vztažení na vnitřní standard. Jelikož o aktivitě cholesterol 7α-monooxygenasy (a tím i o malabsorpci ŽK) vypovídá lépe poměr cholesten/cholesterol [21], byla malabsorpce ŽK kvantifikována tímto poměrem, vyjádřeným v μg/mmol.

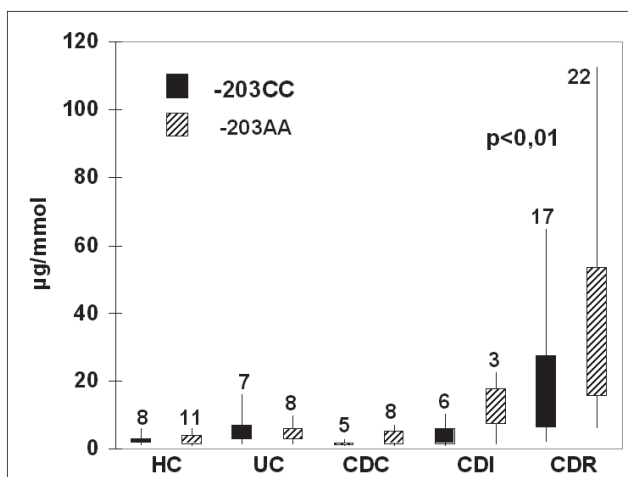
**Genotypizace:** Určení haplotypu v lokusech -203A/C a -469C/T promotoru genu *CYP7A1* bylo provedeno metodou PCR-RFLP s použitím restričních enzymů *Eco311* a *Tal* (Fermentas).

**Statistická analýza:** Vzhledem k distribuci dat, která neodpovídá normálnímu rozdělení, jsou výsledky uváděny jako medián a k jejich srovnání byl použit neparametrický test (Mann-Whitney Rank Sum test). Rozdíl byl považován za signifikantní, pokud byla hodnota  $p < 0,05$ .

## Výsledky

Stanovení poměru cholesten/cholesterol bylo provedeno u zdravých kontrol ( $n = 39$ ), pacientů s ulcerózní kolitidou ( $n = 25$ ) a pacientů s CD ( $n = 115$ ). Podle charakteru a rozsahu postižení byli pacienti s CD chorobou rozděleni do 3 skupin. První skupinu tvořili pacienti s resekcí terminálního ilea ( $n = 77$ ), druhou pacienti se zánětlivým postižením terminálního ilea bez resekce ( $n = 16$ ). V poslední skupině byli pacienti s postižením lokalizovaným výhradně v tlustém střevě ( $n = 22$ ). V rámci jednotlivých skupin, uvnitř kterých lze do jisté

míry očekávat obdobnou malabsorpci ŽK, byli vybráni jedinci homozygotní ve sledovaných polymorfismech. Vzhledem k tomu, že oba polymorfismy jsou ve vazbě, vyskytují se jen 2 typy homozygotů -203AA/-469CC (dále jen -203AA) a -203CC/-469TT (dále jen -203CC). Homozygoti pro alelu -203A vykazují ve všech sledovaných skupinách vyšší poměr cholesten/cholesterol než homozygoti pro alelu -203C (medián: kontroly 2,6 vs 2,4; pacienti s ulcerózní kolitidou 3,6 vs 3,2; s Crohnovou kolitidou 3,5 vs 1,3; s Crohnovou ileitidou 12,8 vs 3,8 a pacienti s resekci terminálního ilea 31,3 vs 13,3 ( $p < 0.01$ ) – obrázek 2. S výjimkou poslední skupiny pacientů s Crohnovou chorobou po resekci terminálního ilea jsou tyto rozdíly statisticky nevýznamné. Rozložení haplotypů v celém vyšetřovaném souboru odpovídá Hardyho-Weinbergově rovnováze.



**Fig. 2.** Cholesterol  $7\alpha$ -monooxygenase activity and -203A/C polymorphism

Cholesterol  $7\alpha$ -monooxygenase activity (mirrored by  $7\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one to cholesterol ratio) is decreased in -203CC homozygous patients (black boxes) compared to -203AA homozygotes (hatched boxes). Number of patients in individual groups is indicated. Data are expressed as 25%–75% (boxes) and min-max (whiskers). HC = healthy controls, UC = ulcerative colitis, CDC = Crohn's disease colitis, CDI = Crohn's disease ileitis, CDR = Crohn's disease resection.

## Diskuse

Výsledky naší studie podporují předpoklad, že haplotyp -203CC/-469TT snižuje expresi cholesterol  $7\alpha$ -monooxygenasy. Nižší aktivita tohoto enzymu vede k nižšímu odbourávání cholesterolu i tvorby cholesterenu, což vede ke snížení poměru cholesten/cholesterol. Efekt „slabšího“ promotoru byl patrný pouze u pacientů po resekci terminálního ilea, kteří mají závažnou malabsorpci ŽK. Tento fakt vysvětluje značná funkční rezerva cholesterol  $7\alpha$ -monooxygenasy, která dokáže přítomnost „slabšího“ promotoru kompenzovat. K vyčerpání rezervy dochází teprve při těžké malabsorpci ŽK, kdy je exprese cholesterol  $7\alpha$ -monooxygenasy maximálně stimulována a limitujícím faktorem se stává maximální aktivita promotoru závislá na jeho haplotypu.

Z naší studie vyplývá, že haplotyp promotoru genu *CYP7A1* významně ovlivňuje hodnotu poměru sérového cholesterenu k cholesterolu pouze u nemocných s těžkou malabsorpcí žlučových kyselin.

## Literatura

1. Love, M. W., Dawson, P. A. New insights into bile acid transport. *Curr. Opin. Lipidol.*, 1998, 9, 3, p. 225–229.
2. Donovan, J. M., Leonard, M. R., Batta, A. K., Carey, M. C. Calcium affinity for biliary lipid aggregates in model bile: complementary importance of bile salts and lecithin. *Gastroenterology*, 1994, 107, 3, p. 831–846.
3. Brink, M. A., Slors, J. F., Keulemans, Y. C. et al. Enterohepatic cycling of bilirubin: a putative mechanism for pigment gallstone formation in ileal Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1999, 116, 6, p. 1420–1427.
4. Andersson, H., Bosaeus, I., Fasth, S., Hellberg, R., Hulthen, L. Cholelithiasis and urolithiasis in Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1987, 22, 2, p. 253–256.
5. Buno, S. A., Torres, J. R., Oliveira, A., Fernandez-Blanco, H., I, Montero, G. A., Mateos, A. F. Lithogenic risk factors for renal stones in patients with Crohn's disease. *Arch. Esp. Urol.*, 2001, 54, 3, p. 282–292.
6. Worcester, E. M. Stones from bowel disease. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, 2002, 31, 4, p. 979–999.
7. Chadwick, V. S., Modha, K., Dowling, R. H. Mechanism for hyperoxaluria in patients with ileal dysfunction. *N. Engl. J. Med.*, 1973, 289, 4, p. 172–176.
8. Vitek, L., Carey, M. C. Enterohepatic cycling of bilirubin as a cause of 'black' pigment gallstones in adult life. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2003, 33, 9, p. 799–810.
9. Heaton, K. W., Read, A. E. Gall stones in patients with disorders of the terminal ileum and disturbed bile salt metabolism. *Br. Med. J.*, 1969, 3, 669, p. 494–496.
10. Rutgeerts, P., Ghoo, Y., Vantrappen, G., Fevery, J. Biliary lipid composition in patients with nonoperated Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.*, 1986, 31, 1, p. 27–32.
11. Rutgeerts, P., Ghoo, Y., Vantrappen, G. Effects of partial ileocelectomy and Crohn's disease on biliary lipid secretion. *Dig. Dis. Sci.*, 1987, 32, 11, p. 1231–1238.
12. Mendez-Sanchez, N., Brink, M. A., Paigen, B., Carey, M. C. Ursodeoxycholic acid and cholesterol induce enterohepatic cycling of bilirubin in rodents. *Gastroenterology*, 1998, 115, 3, p. 722–732.
13. Leníček, M., Lukáš, M., Dudková, L., Adamec, S., Vitek, L. Vztah malabsorpce žlučových kyselin a rizika cholelitiázy u pacientů s Crohnovou chorobou. *Čes. Slov. Gastroent. Hepatol.*, 2006, 61, 2, s. 71–74.
14. Boyd, G. S., Merrick, M. V., Monks, R., Thomas, I. L. Se-75-labeled bile acid analogs, new radiopharmaceuticals for investigating the enterohepatic circulation. *J. Nucl. Med.*, 1981, 22, 8, p. 720–725.
15. Scheurlen, C., Kruis, W., Bull, U., Stellaard, F., Lang, P., Paumgartner, G. Comparison of  $^{75}\text{Se}$ HCAT retention half-life and fecal content of individual bile acids in patients with chronic diarrheal disorders. *Digestion*, 1986, 35, 2, p. 102–108.
16. Yoshida, T., Honda, A., Tanaka, N. et al. Simultaneous determination of mevalonate and 7 alpha-hydroxycholesterol in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry

as indices of cholesterol and bile acid biosynthesis. *J. Chromatogr.*, 1993, 613, 2, p. 185–193.

17. **Galman, C., Arvidsson, I., Angelin, B., Rudling, M.** Monitoring hepatic cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase activity by assay of the stable bile acid intermediate 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one in peripheral blood. *J. Lipid. Res.*, 2003, 44, 4, p. 859–866.
18. **Eusufzai, S., Axelson, M., Angelin, B., Einarsson, K.** Serum 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one concentrations in the evaluation of bile acid malabsorption in patients with diarrhoea: correlation to SeHCAT test. *Gut*, 1993, 34, 5, p. 698–701.
19. **Wang, J., Freeman, D. J., Grundy, S. M., Levine, D. M., Guerra, R., Cohen, J. C.** Linkage between cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase and high plasma low-density lipoprotein cholesterol concentrations. *J. Clin. Invest.*, 1998, 101, 6, p. 1283–1291.
20. **Couture, P., Otvos, J. D., Cupples, L. A., Wilson, P. W. F., Schaefer, E. J., Ordovas, J. M.** Association of the A-204C polymorphism in the cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene

with variations in plasma low density lipoprotein cholesterol levels in the Framingham Offspring Study. *J. Lipid. Res.*, 1999, 40, 10, p. 1883–1889.

21. **Honda, A., Yoshida, T., Xu, G. et al.** Significance of plasma 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one and 27-hydroxycholesterol concentrations as markers for hepatic bile acid synthesis in cholesterol-fed rabbits. *Metabolism*, 2004, 53, 1, p. 42–48.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR GIGH-0670-00-3-846.

Do redakce došlo 7. 4. 2006.

Adresa pro korespondenci:

MUDr. Martin Leníček

Hepatologická laboratoř ÚKB LD 1. LFUK a VFN

U Nemocnice 2

128 08 Praha 2

e-mail: mleni@centrum.cz

01/2006

# ZDRAVOTNICTVÍ A PRÁVO

PRÁVNÍ A DAŇOVÝ PRŮVODCE PRO ZDRAVOTNICTVÍ

Z OBSAHU:

PROVEDENÍ LÉKAŘSKÉHO ZÁKROKU U DÍTĚTE  
PŘI ODEPŘENÍ SVOLENÍ ZÁKONNÝM ZÁSTUPCEM

PŘEDPOKLADY POSKYTNUTÍ ZDRAVOTNÍ PÉČE

ZAMĚSTNANECKÉ VÝHODY  
A JEJICH DAŇOVÉ SOUVISLOSTI

K ZÁKONU O REGISTRAČNÍCH POKLADNÁCH

[www.lexisnexus.cz](http://www.lexisnexus.cz)

 LexisNexus CZ s. r. o.

Praktický rádce lékařů, lékárníků a zdravotnických zařízení přináší aktuální informace o systémových, finančních, právních, daňových a dalších otázkách zdravotnictví. Důraz je kladen na vývoj legislativy v této oblasti, řada problémů je řešena prakticky formou otázek a odpovědí. Měsíčník se zabývá i vztahy a vzájemným postavením poskytovatelů zdravotní péče, zdravotních pojišťoven, farmaceutických firem, státních institucí a pacientů. Rozšíření časopisu od roku 2006 spočívá v zařazení sbírky rozhodnutí českých soudů ve věcech zdravotnických.

Určeno privátním lékařům, lékárníkům a stomatologům, managementu zdravotnických zařízení, zdravotním pojišťovnám, státní správě a samosprávě.

 LexisNexus CZ s. r. o.

**LexisNexus CZ s. r. o.**

Limuzská 2110/8, 100 00 Praha 10

tel.: 274 013 268, fax: 274 013 256

e-mail: [obchod@lexisnexus.cz](mailto:obchod@lexisnexus.cz)

[www.lexisnexus.cz](http://www.lexisnexus.cz)