

retenci a sérovými hladinami FGF23 mohou přispět k objasnění zatím nejjasné potenciální role FGF23 v progresi chronické renální insuficience.

Literatura

- Alfrey AC. The role of abnormal phosphorus metabolism in the progression of chronic kidney disease and metastatic calcification. *Kidney Int Suppl* 2004;90:S13–S17.
- Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, et al. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis* 1998;31:607–617.
- Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, et al. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2205–2215.
- Liu S, Gupta A, Quarles D. Emerging role of fibroblast growth factor 23 in a bone-kidney axis regulating systemic phosphate homeostasis and extracellular matrix mineralization. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007;16:329–335.
- Nagano N, Miyata S, Abe M, et al. Effect of manipulating serum phosphorus with phosphate binder on circulating PTH and FGF23 in renal failure rats. *Kidney Int* 2006;69:531–537.
- Ogata H, Ritz E, Odoni G, et al. Beneficial effects of calcimimetics on progression of renal failure and cardiovascular risk factors. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:959–967.

Rozlišit různé typy glomerulopatií by mohlo být v budoucnu možné i bez renální biopsie

Varghese SA, Powell TB, Budisaevljovic MN, et al. Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:913–922.

Vyšetření proteinurie se v současné době zaměřuje zejména na kvantitativní vyšetření celkové proteinurie, event. albuminurie, méně často se vyšetřují některé další proteinové či peptidové močové markery, např. β_2 -mikroglobulin nebo volné řetězce imunoglobulinů. Je zřejmé, že diagnostický potenciál kvalitativního vyšetření proteinurie zatím nebyl vyčerpán.

Autoři vyšetřili moč 32 pacientů s proteinurií vyšší než 3 g/24 h, z nichž 27 mělo diagnózu renálního onemocnění ověřenou biopsticky (včetně části pacientů s diabetickou nefropatií). U pěti pacientů byla diagnóza diabetické nefropatie stanovena na základě typického klinického nálezu (trvání diabetu déle než 15 let, přítomnost diabetické retinopatie, absence hematurie). Pacienti byli z hlediska klinickopatologické diagnózy rozděleni do čtyř skupin: fokálně segmentální glomeruloskleróza, membranózní nefropatie, lupusová nefritida a diabetická nefropatie.

U biotovaných pacientů byla moč odebrána bezprostředně před biopsií. Po zjištění celkové koncentrace bílkovin byly jednotlivé proteiny a peptidy odděleny pomocí dvojrozměrné elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) a vybrané proteiny byly poté identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF-MS). Kromě toho byla v každé moči stanovena koncentrace IL-6, IL-8 a MCP-1.

Nálezy z elektroforézy moči a koncentrace vybraných cytokinů v moči u 16 pacientů (čtyři z každé diagnostické skupiny) byly zpracovány pomocí umělé neuronové sítě (artificial neural network – Almeida, 2002) se snahou identifikovat markery, které s nejlepší senzitivitou a specifitou odlišují vzorky pacientů s různými glomerulopatiemi. Počet markerů potřebných ke spolehlivému odlišení jednotlivých glomerulárních chorob byl postupně snižován.

Hlavními klinicko-laboratorními rozdíly mezi pacienty s jednotlivými glomerulopatiemi byly věk (pacienti s diabetickou nefropatií byly starší, pacienti s lupusovou nefritidou mladší), pohlaví (častější zastoupení žen mezi pacienty s lupusovou nefritidou), sérový kreatinin (vyšší koncentrace u pacientů s diabetickou nefropatií) a proteinurie (vyšší u pacientů s membranózní nefropatií).

Většina pacientů byla léčena inhibitory ACE nebo antagonisty angiotensinu.

Elektroforetickým vyšetřením moči se nepodařilo najít žádný jednotlivý marker, který by spolehlivě odlišil jednotlivé glomerulopatie, a k identifikaci markerů proto bylo nutno použít arteficiální neuronovou síť. Markery nalezené při analýze vzorků od čtyř pacientů z každé diagnostické skupiny byly poté validovány na zbývajících 16 pacientech. Přesnost předpovědi diagnózy na základě identifikovaného souboru biomarkerů byla v celé skupině použité pro validaci 83 %, senzitivita se pohybovala mezi 75–86 %, specifita mezi 92–67 %. K určení významu jednotlivých proteinů pro správnou diagnózu autoři postupně snižovali množství proteinových skvrn použitých k predikci. Zatímco senzitivita se podstatně neměnila až do použití pouhých pěti markerů, přesnost stanovení diagnózy začala klesat při použití méně než 50 markerů a významně klesla při použití méně než 20 markerů. Predikce závisela na typu glomerulárního onemocnění: byla nejlepší u lupusové nefritidy, dobrá u FSGS a diabetické nefropatie a špatná u membranózní nefropatie.

Jedenáct proteinů s nejvyšší diagnostickou senzitivitou pro každé studované glomerulární onemocnění (celkem 21 proteinů) bylo vybráno pro identifikaci pomocí MALDI-TOF a 20 z 21 proteinů bylo úspěšně identifikováno. Všechny identifikované proteiny byly plazmatické proteiny, většina z nich glykoproteiny a často šlo o fragmenty těchto plazmatických bílkovin, např. o fragmenty albuminu, α_1 -antitrypsinu, transferinu, orosomukoidu, zinkového α_2 -glykoproteinu, faktor B komplementu, haptoglobin, hemopexin a protein vázící retinol nebo vitamin D.

■ KOMENTÁŘ

Prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc.

Močové markery, které by umožnily spolehlivě odlišit různé typy glomerulopatií, jsou neúspěšně hledány již několik desetiletí. V posledních deseti letech se pozornost zaměřila např. na močové cytokiny (např. MCP-1), adhezni molekuly (např. VCAM-1) či produkty aktivace (C5b-9) či degradace (C3d) komplementu (např. Rovin et al., 2005). Většina podobných markerů sice volně koreluje s aktivitou zánětlivých glomerulopatií, jejich specifita pro jednotlivé glomerulopatie je však velmi nízká (Tesař et al., 1998).

Proteomika moči je novým přístupem k identifikaci biomarkerů, které by mohly pomoci rozlišit neinvazivně (bez renální biopsie) různé typy glomerulárních onemocnění a monitorovat jejich aktivitu a odpověď na terapii, event. odhadnout i riziko jejich progresu do terminálního selhání ledvin. Proteomika umožňuje identifikovat kandidátní markery, které pak mohou být jednotlivě nebo v různých kombinacích validovány na definovaných souborech nemocných. Výhodou močové proteomiky je, že umožňuje rozlišit mezi nativními proteiny a jejich degradačními produkty a také umožňuje odlišit varianty proteinů s různými posttranslačními modifikacemi (zejména různým stupněm glykace).

V komentované práci autoři identifikovali soubor kandidátních biomarkerů, a poté na jiném souboru nemocných potvrdili schopnost definovaných biomarkerů odlišit s různou mírou spolehlivosti čtyři typy sledovaných glomerulopatií (lupusovou nefritidu, fokálně segmentální glomerulosklerózu, membranózní nefropatii a diabetickou nefropatii). Hlavním přínosem komentované studie je právě úspěšná validace identifikovaných markerů, která v předchozích studiích nebyla prováděna nebo nebyla úspěšná (např. Oates et al., 2005).

Komentovaná práce ukázala, že pro odlišení různých typů glomerulopatií nelze využít žádný jednotlivý marker a že systém arteficiální neuronové sítě je pro hledání diskriminačních skupin biomarkerů výraz-

ně užitečnější než některé dříve používané postupy (např. tzv. clusterová analýza).

Zajímavé je, že identifikované diskriminační močové proteiny jsou bez výjimky plazmatické (nikoli tedy proteiny podocytární nebo tubulární). Navíc některé proteiny jsou součástí diskriminačního souboru ve více posttranslačních modifikacích. Není jasné, zda k těmto posttranslačním modifikacím dochází u jednotlivých chronických glomerulopatií během průchodu jednotlivých proteinů renálními tubuly, nebo zda jde o různé posttranslační modifikace existující již v plazmě. Zdá se, že různé zastoupení diskriminačních biomarkerů v moči pacientů s různými glomerulopatiemi je důsledkem různé permeabilní poruchy glomerulární kapilární stěny, která zabruhuje i různou změnu selektivity dle náboje, a je zřejmě pro jednotlivé glomerulopatie do jisté míry specifická.

Autoři připouštějí, že diagnostická přesnost identifikovaného souboru diskriminačních biomarkerů je zatím pro klinickou praxi nedostatečná a jsou si vědomi nutnosti diagnostickou přesnost zvýšit. K tomuto cíli by mohla přispět nižší heterogenita v rámci jednotlivých skupin glomerulopatií (markery mohou být např. specifičtější, pokud budou samostatně hodnoceni pacienti s proliferativní a membranózní lupusovou nefritidou nebo dokonce s jednotlivými histologickými typy lupusové nefritidy, nebo pokud budou samostatně hodnoceni pacienti s normální a sníženou renální funkcí apod.). Nutné bude zřejmě také doplnit standardní vyšetření močových proteinů o metody (např. specifické monoklonální protilátky), které budou schopny odlišit různý elektrický náboj (izoelektrický bod) jednotlivých bílkovin a jejich fragmentů.

Důležité bude také doplnění dalších skupin glomerulárních onemocnění. V praxi zpravidla není příliš obtížné diagnostikovat i bez renální biopsie diabetickou nefropatii či lupusovou nefritidu (renální biopsii provádíme spíše k určení typu lupusové nefritidy, aktivity a chronicity onemocnění). Praktický význam by spíše mělo odlišení fokálně segmentální glomerulosklerózy nejen od membranózní nefropatie, ale také od nefrotického syndromu s minimálními změnami glomerulů, nebo odlišení IgA nefropatie od hypertenzní nefrosklerózy.

Přes všechny zmíněné nedostatky a problémy se ale komentované studii podařilo dojít zatím nejdále na cestě od proteomického vyšetření moči k praktické aplikaci ve formě identifikace souboru markerů, které by mohly v budoucnu s poměrně vysokou mírou spolehlivosti odlišit různá glomerulární onemocnění, a tak do jisté míry nahradit (zpočátku zejména u rizikových pacientů) renální biopsii.

Literatura

- Almeida JS. Predictive non-linear modeling of complex data by artificial neural networks. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:72–76.
- Oates JC, Varghese S, Bland AM, et al. Prediction of urinary protein markers in lupus nephritis. *Kidney Int* 2005;68:2588–2592.
- Rovin BH, Song H, Birmingham DJ, et al. Urine chemokines as biomarkers of human systemic lupus erythematosus activity. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:467–473.
- Tesař V, Mašek Z, Rychlík I, et al. Cytokines and adhesion molecules in renal vasculitis and lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:1662–1667.