

Prof. MUDr. Miroslav Merta, CSc.

Skutečnost, že život jedince a případný vývoj onemocnění se odvíjí na pozadí interakce či interakcí mezi dědičnými vlivy a vlivy zevního prostředí, byla předpokládána již v dávné minulosti. Zatímco odhalení základních zákonitostí genetiky bylo započato před necelými 200 lety (objevy G. J. Mendela a C. R. Darwina), trvalo přibližně dalších sto let, než se podařilo formulovat hypotézu o přenosu informací prostřednictvím chromosomů (T. H. Morgan). V roce 1953 byl zveřejněn model dvojšroubovice DNA (J. Watson a F. Crick), avšak trvalo další čtvrtstoletí, než byl v roce 1985 nalezen genový podklad nejrozšířenější dědičné nemoci ledvin – polycystické choroby ledvin autosomálně dominantního typu (PCHLAD) (S. T. Reeders). Tento objev znamenal průlom ve výzkumu vrozených a dědičných onemocnění ledvin. Předznamenal éru nástupu metod molekulární biologie. V průběhu dalších dvou desetiletí do současnosti se podařilo identifikovat geny či genové produkty u valné části všech dosud známých významnějších dědičných onemocnění ledvin monogenního charakteru. Celé skupiny onemocnění ledvin, charakterizované donedávna pouze klinickým obrazem či typem dědičného přenosu, lze nyní odlišit stanovením jejich genového podkladu. Jako příklad lze uvést skupinu *cystických onemocnění ledvin* (polycystická choroba ledvin autosomálně dominantního typu, polycystická choroba ledvin autosomálně recesivního typu, nefrotíza, Bartterův-Biedlův syndrom aj.), skupinu *glomerulárních onemocnění* (Alportův syndrom, kongenitální nefrotický syndrom finského typu, steroid-rezistentní nefrotický syndrom, syndrom nehet-česka), skupinu *tubulárních onemocnění* (Bartterův syndrom, Gitelmanův syndrom, nefrogenní diabetes insipidus, cystinóza, Gordonův syndrom, Liddleův syndrom), skupinu *nemocí spojených s nefrolitiázou* (Dentova choroba, cystinurie, hyperoxalurie aj.) a konečně skupinu *renálních tumorů* (Wilmsův tumor, Von-Hippel-Lindauova choroba, tuberózní skleróza). Zdá se, že tento trend v odhalování nových dědičných chorob ledvin (monogenního charakteru) nebyl dosud ukončen, neboť množství nově identifikovaných genů kódujících onemocnění s renálním postižením nadále každoročně roste.

Znalosti genového podkladu těchto a některých dalších dědičných nemocí ledvin lze využít v bezprostřední klinické praxi spočívající v možnosti přesné a často preklinické diagnostiky (případně prenatalní diagnostiky). Výtěžnost ze znalostí molekulárně biologického podkladu dědičných nemocí ledvin se však zdaleka neomezuje na využití v diagnostickém procesu. Změny v genu (mutace) se projevují v tvorbě strukturálně/funkčně změněného genového produktu (proteinu) a následně se promítají do klinického obrazu (fenotypu). Nabízí se tak jedinečný nástroj k pochopení vzniku a uplatnění genového defektu (etiologie) na vývoj (patogenezi) onemocnění. Jedním z prostředků, jak tohoto cíle dosáhnout, je analýza vztahů mezi *genomikou* a *proteomikou*, tedy novou vědní disciplínou zabývající se analýzou proteinů získaných v čase od daného organismu v různých biologických tkáních.

Díky tomuto modelovému přístupu bylo možno např. u skupiny tzv. *monogenních forem arteriální hypertenze* odhalit význam a mechanismus působení poruch tubulárního transportu NaCl (Liddleův syndrom či Gordonův syndrom) nebo nadměrné tvorby aldosteronu (u tzv. syndromu aldosteronismu léčitelného glukokortikoidy – GRA) při poruše regulace arteriálního krevního tlaku a vývoji arteriální hypertenze. Naopak studium Bartterova a Gitelmanova syndromu na úrovni DNA umožnilo zčásti objasnit vztah mezi tubulárními ztrátami NaCl a vývojem hypotenze.

U pacientů s geneticky *vázanou přítomností karcinomů ledvin* může mít identifikace genu mimořádný význam pro diagnostiku a příslušnou léčbu. Z nových poznatků akumulovaných z geno-

mové a proteomové analýzy u karcinomu ledvin však mohou již dnes (či budou moci v budoucnosti) profitovat i další nemocní ohrožení tumory ledvin (např. recentně byla vyvinuta vakcína proti genu Wilmsova tumoru – tzv. WT1 – proti hematopoetickým a solidním tumorům) (Oka Y, 2006).

Značných úspěchů bylo v posledních letech dosaženo ve výzkumu *polycystické choroby ledvin* a dalších cystických onemocnění ledvin. Byla prokázána genetická heterogenita u PCHLAD, kdy nemocní s formou podmíněnou mutacemi na genu PKD-1 (cca 85 % všech nemocných) mají poněkud méně příznivý průběh choroby ve srovnání s nemocnými, u nichž je přítomna forma podmíněná mutacemi na genu PKD-2 (cca 15 % všech nemocných). Strukturální podoba obou genů a jejich genových produktů – polycystinů 1 a 2 (PC-1 a PC-2) – byla rovněž popsána. Význam interakce obou genových produktů na vývoji cystických a dalších abnormit u PCHLAD je předmětem intenzivního výzkumu. Velkou pozornost vzbudila v posledních letech přítomnost polycystinů v *ciliárních strukturách nefronu* (zvl. tubulech) a možný podíl těchto struktur na vývoji cyst. Změny polohy těchto bičíkatých struktur (ať již mechanicky či v závislosti na změně toku tekutiny) vedou k vzestupu nitrobuňkové koncentrace vápníku. Funkčně komplex PC-1/PC-2 v ciliích patrně působí jako senzor toku tekutiny a udržuje buňku v diferencovaném stavu. U nemocných s PCHLAD lze prokázat poruchu ciliární funkce a poruchu lokalizace polycystinu. Navíc se zdá, že obdobná porucha ciliárních struktur je přítomna i u dalších cystických onemocnění ledvin, např. u nefrotízy (Badano JL, 2006). Z hlediska léčby tohoto onemocnění je značná naděje vkládána do léčebné aplikace látek zasahujících do koncentrační schopnosti ledvin nemocných s PCHLAD. Vasopressin a katecholaminy jsou hlavními hormonálními modulátory adenyllyl cyklázové aktivity v buňkách sběrných kanálků. Působení vasopressinu se uplatňuje přes receptory  $V_2$  a  $V_{1a}$ . Působení vasopressinu na adenyllyl cyklázu, původ cyst ve sběrných kanálkách u nemocných s PCHLAD a cystogenní potenciál cAMP byly základními důvody, které vedly k realizaci experimentálních a posléze klinických studií testujících účinnost léčby *antagonisty receptoru  $V_2$  pro vasopressin* (Torres VE, 2005).

Značný pokrok prodělal výzkum v oblasti *geneticky podmíněných poruch narušujících fyziologickou funkci glomerulárního filtru*. Poslední dekáda byla ve znamení objevů na úrovni *podocytních proteinů*. Byl prokázán význam strukturálních/funkčních změn řady podocytních proteinů, jejichž porucha, přítomná u některých dědičných chorob ledvin, se projevuje různým stupněm zvýšené propustnosti filtrační bariéry. Poměrně široké spektrum různých dědičných chorob vyznačujících se proteinurií, zahrnuje na jedné straně stavy mírné proteinurie a pozvolné progresse chronické renální insuficience (např. u heterozygotních jedinců s mutacemi genů TRPC6 či ACTN4) a na straně druhé závažné stavy s kongenitálním nefrotickým syndromem, jako např. u jedinců s mutacemi v genu NPHS1 (nefrinu). Nově se tento výzkum obohatil a zkomplikoval o nové poznatky, naznačující, že rovněž složky glomerulární bazální membrány si zasluhují podobnou pozornost, jaká byla věnována podocytopatiím. U několika nemocných s tzv. Piersonovým syndromem byla totiž prokázána porucha genu pro laminin  $\beta 2$  (*LAMB2*), coby příčina vzniku závažného nefrotického syndromu v dětském věku (Dandapani SV, 2006).

Zřetelný přesah uplatnění metod molekulární biologie z rámce původně omezeného především na identifikaci genu/genů do oblastí dříve relativně vzdálených se dnes stává realitou a nabývá různé podoby. Jednou z takovýchto oblastí je vývoj a tvorba *rekombinantních látek* – za použití metod molekulární biologie – které nahrazují látky endogenně vytvářené, jejichž produkce je

z různých důvodů snížena (klasickým příkladem je rekombinantně vytvořený erythropoetin podávaný nemocným s anémií renálního původu, recentnějším příkladem je zavedení tzv. náhradní enzymové terapie enzymem  $\alpha$ -galaktosidázou podávané nemocným s Fabryho chorobou, u nichž je tvorba tohoto enzymu vrozeně snižena či chybí). Další příkladem netradiční aplikace výsledků v oblasti molekulární biologie je výzkum *propustnosti peritoneální membrány*. Zatímco předchozím výzkumem byly identifikovány geny z rodiny aquaporinů (AQP) uplatňujících se při nefrogenním diabetes insipidus (AQP2), podařilo se nově prokázat význam genů AQP1 pro propustnost peritoneální membrány, což představuje klinický význam pro nemocné léčené peritoneální dialýzou (Ni J, 2006). Značné úsilí je rovněž věnováno možnostem klinického uplatnění genové terapie, farmakogenetiky a dalším metodám či disciplínám založeným na použití technik molekulární biologie.

**Závěrem** lze uvést, že vývoj v oblasti vrozených a dědičných onemocnění ledvin prodělává svůj „zlatý věk“, dále, že „hon“ na geny pokračuje a že aplikace metod molekulární biologie se rozšiřují daleko za rámec pouhé diagnostiky těchto onemocnění.

#### Literatura

- Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006;22:125–148.  
 Dandapani SV, Pollak MR. The glomerular filter: biologic and genetic complexity. *Kidney Int* 2006;70:980–982.  
 Ni J, Verbavatz JM, Rippe A, et al. Aquaporin-1 plays an essential role in water permeability and ultrafiltration during peritoneal dialysis. *Kidney Int* 2006;69:1518–1525.  
 Oji Y, Sugiyama H. Development of WT1 peptide cancer vaccine against hematopoietic malignancies and solid cancers. *Curr Med Chem* 2006;13:2345–2352.  
 Oka Y, Tsuboi A, Kawakami M, et al. Vasopressin antagonists in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2005;68:2405–2418.

## DNA polymorfismy u ledvinných onemocnění

Mondry A, Loh M, Laurence KB, Low N. DNA polymorphisms and renal disease: a critical appraisal of studies presented at the annual ERA/EDTA and ASN conferences in 2004 and 2005. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:2775–2779.

**A**utoři předložili v článku kritickou analýzu studií, zabývajících se DNA polymorfismy u ledvinných onemocnění, prezentovaných na konferencích ERA/EDTA a ASN v letech 2004 a 2005.

Znalost a správná interpretace lidské genomové sekvence je klíčem k hlubšímu pochopení patofyziologických procesů a případně k rozvoji nových a účinnějších druhů léčby. Během posledních několika dekád byly učiněny mnohé pokusy o nalezení spojitosti mezi DNA polymorfismy a některými nemocemi s komplexním genetickým podkladem. Kauzální vazba však nebyla nalezena. Z tohoto důvodu odmítla Americká nefrologická společnost (ASN) zařadit do oponentního řízení k publikaci práce, které neodpovídají souhrnu kritérií, vyžadovaných pro určení vazby mezi genem a nemocí (viz tab.). *Journal of ASN (JASN)* je v současné době jedním z mála časopisů, které se řídí požadavky na tuto oblast výzkumu, tak jak byly neformálně projednány a navrženy koncem předchozí dekády (Anonymous, 1999). Nerespektování požadavků na kvalitu studií způsobuje problémy na různých úrovních. V první řadě stojí výzkum čas a peníze. Za druhé, ačkoli výsledky u řady prací jsou následně zpochybněny a odvolány, zůstávají práce nezdělané v oběhu a jsou dále citovány (Budd, 1998). Za třetí, případná aplikace nesprávné prognózy v klinické praxi může poškodit pacienta.

Ačkoli se s výše uvedenými obtížemi potýkají i další lékařské disciplíny, představuje monitorace procesů a metod molekulární biologie v nefrologii zvláště zajímavé téma. S cílem zjistit, do jaké míry jsou v oblasti nefrologie naplňovány normy kvality kladené na vazebné studie, byla uskutečněna analýza abstraktů prací

prezentovaných na každoročních konferencích ASN a Evropské renální společnosti/Evropské dialyzační a transplantační společnosti (ERA/EDTA) v letech 2004 a 2005. Byly vyhledány a hodnoceny práce zabývajících se tématy „gen“ a „polymorfismus“, a to s ohledem na skutečnost, nakolik by vyhovovaly kritériím pro uveřejnění v JASN (tab.). V roce 2004 byly nejčastěji studovány geny kódující proteiny systému renin-angiotensin-aldosteron či geny kódující látky účastnící se zánětlivých procesů. Analyzované soubory (včetně kontrolních skupin) byly málo početné a obsahovaly v průměru 245 členů (resp. 185 – při vyřazení několika studií obsahujících extrémní hodnoty, tj. např. při velikosti souboru přesahující 1 SD proti průměrné velikosti souboru). V 31 studiích bylo hodnoceno méně než 100 osob dohromady. Pouze v 17 studiích ze 107 (16 %) byla splněna sekundární kritéria, takže by pouze tento podíl mohl být zařazen do review procesu k publikaci v JASN. V roce 2005 se průměrný počet členů souborů zvýšil na 354 (resp. na 276 – při vyřazení několika „extrémních“ studií). Méně než 100 osob v analyzovaných souborech bylo přítomno ve 13 studiích. Sekundární kritéria k publikaci v JASN splňovalo 38/77 (49 %) studií.

*Gen-vazebné studie – iluze možného vysvětlení?* Již od sklonku 18. století se při diskusích o podstatě onemocnění brala v úvahu představa o jejich možném dědičném podkladu. Významu vybraných genotypů u konkrétních onemocnění je věnována pozornost nadále, i když popularita tohoto tématu je patrně za svým zenitem. Zatímco v roce 2004 byla na významných nefrologických konferencích prezentována 2 % gen-vazebných prací, klesl tento podíl o rok později na 1,4 %. Ve stejnou dobu se zvýšil významně počet prací, které splnily sekundární požadavky (dle kritérií JASN). Obtížnější však lze doložit, nakolik se podařilo zajistit plnění primárních požadavků. Jedním z největších nedostatků u gen-vazebných studií bývá nedostatečná velikost souboru. Není-li známa frekvence výskytu minoritní alely u kandidátního genu, představuje požadovaný počet testovaného souboru 239 členů a kontrolní soubor rovněž dalších 239 členů, za předpokladu snahy o testování s 80% statistickou významností při 5% hladině významnosti (Mondry, 2005). Vezmeme-li v úvahu, že po vyřazení „extrémních“ studií (tedy studií ležících např. z hlediska velikosti souboru výrazně mimo průměr) se průměrná velikost souboru (včetně kontrolní populace) skládala v roce 2004 ze 185 osob a v roce 2005 z 276 osob, je zřejmé, že požadavky na adekvátní velikost souboru byla splněna pouze z 38 %, resp. 58 %. Statistická síla byla u takto malých souborů nepříjemně snížena. Možných východisek k řešení této situace je několik: tlak na dodržení přísných kritérií pro publikaci gen-vazebných studií, registrace probíhajících gen-vazebných studií, vytváření metaanalýz, zapojení se do recentních výzkumných iniciativ mířených na spolupráci v rámci gen-vazebných studií (např. Renal Genome Network).

#### Kvalitativní kritéria pro studie, které mohou být zařazeny do schvalovacího řízení pro časopis JASN

Primární požadavky	Sekundární požadavky
Výsledky musejí být biologicky smysluplné	Údaje prokazující účinek polymorfismu na funkci proteinu či expresi genu
Testovaný soubor musí být adekvátní	Potvrzení vazby metodou vyšetření rodin
Úprava p-hodnoty pro mnohočetná porovnání	Potvrzení vazby na nezávislém souboru
Vyšetření a úprava výsledků s ohledem na stratifikaci uvnitř souborů	Speciální pozornost věnovaná analýze odhalených „rizikových haplotypů“ spojených s určitým onemocněním