

Věra Vávrová a kolektiv

CYSTICKÁ FIBRÓZA



Upozornění pro čtenáře a uživatele této knihy

Všechna práva vyhrazena. Žádná část této tištěné či elektronické knihy nesmí být reprodukována a šířena v papírové, elektronické či jiné podobě bez předchozího písemného souhlasu nakladatele. Neoprávněné užití této knihy bude **trestně stíháno**.

Používání elektronické verze knihy je umožněno jen osobě, která ji legálně nabyla a jen pro její osobní a vnitřní potřeby v rozsahu stanoveném autorským zákonem. Elektronická kniha je datový soubor, který lze užívat pouze v takové formě, v jaké jej lze stáhnout s portálu. Jakékoliv neoprávněné užití elektronické knihy nebo její části, spočívající např. v kopírování, úpravách, prodeji, pronajímání, půjčování, sdělování veřejnosti nebo jakémkoliv druhu obchodování nebo neobchodního šíření je zakázáno! Zejména je zakázána jakákoliv konverze datového souboru nebo extrakce části nebo celého textu, umístování textu na servery, ze kterých je možno tento soubor dále stahovat, přitom není rozhodující, kdo takovéto sdílení umožnil. Je zakázáno sdělování údajů o uživatelském účtu jiným osobám, zasahování do technických prostředků, které chrání elektronickou knihu, případně omezují rozsah jejího užití. Uživatel také není oprávněn jakkoliv testovat, zkoušet či obcházet technické zabezpečení elektronické knihy.



Copyright © Grada Publishing, a.s.



Copyright © Grada Publishing, a.s.

Obsah

Seznam spoluautorů	14
Poděkování	14
Předmluva.	15
1 Úvod.	17
1.1 Historie cystické fibrózy (<i>V. Vávrová</i>)	17
1.1.1 Historie cystické fibrózy ve světě	17
1.1.2 Historie cystické fibrózy u nás	19
1.2 Výskyt cystické fibrózy (<i>V. Vávrová</i>)	19
1.3 Dědičnost cystické fibrózy (<i>M. Macek Jr.</i>)	20
Závěr.	23
Literatura.	23
2 Patogeneze cystické fibrózy	27
2.1 Molekulárně genetická a patofyziologická podstata cystické fibrózy (<i>M. Macek Jr.</i>)	27
2.1.1 Gen <i>CFTR</i>	27
2.1.2 Protein CFTR	30
2.1.3 Mutace a varianty v genu <i>CFTR</i>	33
2.1.4 Populačně genetická charakteristika mutací genu <i>CFTR</i>	42
2.2 Esenciální mastné kyseliny a jejich deriváty v patogenezi cystické fibrózy (<i>V. Vávrová a H. Tomášová</i>)	48
2.2.1 Kyselina arachidonová (AA) a kyselina dokosaheptaenová (DHA).	48
2.3 Genetické modifikátory v patogenezi CF (<i>V. Vávrová, J. Brázová, D. Zemková, M. Macek Jr.</i>)	49
2.3.1 Manózu vázající lektin	50
2.3.2 α_1 -antitrypsin	52
2.3.3 Tumor nekrotizující faktor α	53
2.3.4 Polymorfizmy genů pro některé další mediátory zánětu	54
2.3.5 Gen pro transformující růstový faktor β	54
2.3.6 Varianty endoteliální NO syntázy	55
2.3.7 Antigeny HLA II. třídy	56
2.3.8 Glutathion-S-transferáza	56
2.3.9 β_2 -adrenergní receptor	56
Závěr.	57
Literatura.	58
3 Diagnóza	65
3.1 Klinické podezření (<i>V. Vávrová, J. Bartošová</i>)	65
3.2 Průkaz abnormální funkce proteinu CFTR	69
3.2.1 Potní test (<i>V. Vávrová, D. Zemková</i>)	69

3.2.2	Molekulárně genetické vyšetření u průkazu abnormální funkce genu <i>CFTR</i> (M. Macek Jr.)	73
3.2.3	Transepiteliální rozdíl potenciálů (L. Pelikán)	82
3.3	Stanovení diagnózy (V. Vávrová, D. Zemková, J. Bartošová)	84
3.4	Screening (V. Vávrová, D. Zemková)	85
3.4.1	Novorozenecký screening	86
3.4.2	Antenatální screening	88
3.5	Prenatální genetická diagnostika cystické fibrózy a genetické poradenství (M. Macek Jr., M. Macek)	90
3.5.1	Přímá molekulárně genetická diagnostika cystické fibrózy	91
3.5.2	Nepřímá molekulárně genetická diagnostika cystické fibrózy	92
3.5.3	Aktivita GGT v plodové vodě v prenatální diagnostice cystické fibrózy	93
3.5.4	Ultrazvukové vyšetření v prenatální diagnostice CF	94
3.5.5	Budoucnost prenatální diagnostiky cystické fibrózy	95
3.5.6	Specializované genetické poradenství	96
	Závěr	97
	Literatura	98
4	Mikrobiologie u pacientů s cystickou fibrózou (P. Dřevínek, J. Bartošová, L. Fila, O. Nyč)	107
4.1	Exacerbace plicní nemoci	108
4.2	Získávání materiálu k mikrobiologickému vyšetření	108
4.3	Mikrobiologická diagnostika	109
4.3.1	Mikroskopické vyšetření	109
4.3.2	Kultivace	109
4.3.3	Biochemické testy a testování citlivosti k antibiotikům	110
4.3.4	Molekulárně genetické metody	110
4.3.5	Vyšetření pseudomonádových protilátek	113
4.4	Bakteriální infekce	113
4.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	114
4.4.2	<i>Haemophilus influenzae</i>	114
4.4.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	115
4.4.4	Komplex mikroorganismů <i>Burkholderia cepacia</i>	119
4.4.5	Ostatní patogeny	126
4.4.6	Netuberkulózní mykobakteria	127
4.5	Mykotické infekce	129
4.6	Virové infekce	129
	Závěr	130
	Literatura	130
5	Cystická fibróza – imunita (A. Šedivá)	139
5.1	Vrozená imunita	139
5.1.1	Vrozené imunitní reakce lokální	140
5.1.2	Vrozené imunitní reakce systémové	141
5.2	Specifické, získané imunitní reakce	142
5.2.1	Specifické humorální reakce – protilátky	142
5.2.2	Specifické buněčné reakce – T-lymfocyty	143

5.3	Regulační mechanizmy imunity	143
5.4	Imunita u transplantace plic pro cystickou fibrózu	144
	Závěr	145
	Literatura	145
6	Zánět (<i>V. Vávrová, J. Brázová, H. Tomášová</i>)	147
6.1	Aktivace a průběh zánětu	147
6.2	Úloha neutrofilů	149
6.3	Nejčastěji vyšetřované mediátory zánětu	150
6.3.1	Cytokiny	150
6.3.2	Ukazatelé oxidativního stresu	151
6.3.3	Oxid dusnatý	153
6.3.4	Proteolytické enzymy	153
	Závěr	154
	Literatura	155
7	Vyšetření plic u cystické fibrózy pomocí zobrazovacích metod (<i>E. Čumlivská</i>)	157
7.1	Nativní snímek nitrohrudních orgánů	157
7.2	Počítačová tomografie (CT)	160
7.3	Magnetická rezonance (MR)	162
7.4	Bronchiální angiografie	162
7.5	Scintigrafie	162
7.6	Sonografie	162
7.7	Bronchografie	162
	Závěr	163
	Literatura	163
8	Funkce plic	165
8.1	Funkce plic, její vyšetření a hodnocení u dětí s cystickou fibrózou (<i>A. Zapletal</i>)	165
8.1.1	Základní metody	166
8.1.2	Vývoj některých parametrů funkce plic	173
8.1.3	Nerespirační funkce plic	175
8.2	Hodnocení vyšetření funkce plic u dospělých s CF (<i>L. Fila</i>)	176
	Závěr	178
	Literatura	178
9	Bronchoskopické vyšetření u nemocných cystickou fibrózou (<i>P. Pohunek, T. Svobodová</i>)	181
	Literatura	184
10	Klinické projevy respiračního onemocnění (<i>V. Vávrová, J. Bartošová</i>)	185
10.1	Patogeneze respiračního onemocnění	185
10.1.1	Vliv poruchy proteinu CFTR na fyziologii dýchacích cest a na mukociliární clearance	186
10.1.2	Vliv poruchy proteinu CFTR na infekci <i>P. aeruginosa</i>	190
10.1.3	Důsledky změn	190
10.2	Klinický průběh nemoci	191

10.2.1	Příznaky respiračního onemocnění	191
10.3	Sledování a hodnocení průběhu	194
	Závěr	196
	Literatura	197
11	Komplikace postihující dýchací ústrojí a jejich léčení	199
11.1	Horní cesty dýchací (<i>H. Fišerová</i>)	199
11.1.1	Sinusitis – zánět vedlejších dutin nosních	199
11.1.2	Nosní polypóza	204
11.2	Ostatní respirační komplikace	207
11.2.1	Bronchiektázie (<i>V. Vávrová, J. Bartošová</i>)	207
11.2.2	Atelektázy (<i>V. Vávrová, J. Bartošová</i>)	207
11.2.3	Pneumotorax (<i>V. Vávrová, J. Bartošová, L. Fila</i>)	208
11.2.4	Hemoptýza (<i>V. Vávrová, J. Bartošová, L. Fila</i>)	210
11.2.5	Respirační selhání (<i>V. Vávrová, L. Fila</i>)	211
11.2.6	Alergická bronchopulmonální aspergilóza (ABPA) (<i>L. Fila</i>)	212
11.2.7	Paličkovité prsty (<i>V. Vávrová, D. Zemková</i>)	216
	Závěr	219
	Literatura	219
12	Standardní léčení respiračního onemocnění	225
12.1	Inhalační léčba (<i>V. Vávrová, L. Smolíková</i>)	225
12.2	Mukolytika (<i>V. Vávrová, J. Bartošová</i>)	226
12.3	Bronchodilatancia (<i>J. Bartošová</i>)	229
12.4	Léčebná rehabilitace (<i>L. Smolíková</i>)	230
12.4.1	Respirační fyzioterapie a její metody	231
12.4.2	Pohybová terapie	239
12.4.3	Rehabilitační specifika dospělé populace	240
12.4.4	Respirační fyzioterapie dětí	242
12.5	Léčení infekce	247
12.5.1	Očkování, vakcinace, imunizace u pacientů s CF (<i>J. Brázová, A. Šedivá, J. Škovránková</i>)	247
12.5.2	Prevence proti nejčastějším patogenům (<i>J. Bartošová, P. Dřevínek</i>)	253
12.5.3	Léčba infekce (<i>J. Bartošová, P. Dřevínek, O. Nyč, L. Fila</i>)	255
12.6	Léčení zánětu (<i>V. Vávrová, J. Brázová</i>)	269
12.6.1	Kortikoidy	269
12.6.2	Inhalační kortikoidy	270
12.6.3	Makrolidy	270
12.6.4	Nesteroidní antirevmatika	272
12.6.5	Defensiny a katelicidiny	272
12.6.6	Antagonisté leukotrienových receptorů	272
12.6.7	Antiproteázy	272
12.6.8	Jiné protizánětlivé léky	273
12.7	Dlouhodobá domácí oxygenoterapie a neinvazivní ventilační podpora (<i>L. Fila, V. Vávrová</i>)	273
12.7.1	Dlouhodobá domácí oxygenoterapie	273
12.7.2	Mechanická ventilace	274

Závěr	275
Literatura	278
13 Transplantace plic u pacientů s cystickou fibrózou (R. Lischke)	291
13.1 Historie	291
13.2 Indikace k transplantaci obecně	292
13.3 Výběr pacientů	292
13.4 Čekací fáze	293
13.5 Operace	294
13.6 Pooperační průběh	295
13.6.1 Medikace	295
13.6.2 Ambulantní péče	296
13.7 Akutní rejekce a infekce	296
13.8 Výsledky a dlouhodobé přežívání	297
Závěr	297
Literatura	297
14 Onemocnění gastrointestinálního traktu a exokrinního pankreatu u cystické fibrózy (H. Vaníček, O. Pozler, V. Skalická)	299
14.1 Exokrinní pankreas	300
14.1.1 Patologické změny exokrinního pankreatu u CF	300
14.1.2 Změny exokrinního pankreatu v zobrazovacích metodách	301
14.1.3 Funkční stav exokrinního pankreatu u CF	301
14.1.4 Patofyziologie onemocnění pankreatu u CF	302
14.1.5 Klinické a laboratorní projevy insuficience exokrinního pankreatu	303
14.1.6 Pankreatické funkční testy	304
14.1.7 Léčba pankreatické insuficience	305
14.2 Fibrotizující kolonopatie	307
14.3 Pankreatitida	308
14.4 Mekoniový ileus	308
14.5 Distální intestinální obstrukční syndrom	309
14.6 Invaginace	310
14.7 Apendicitida	310
14.8 Prolaps rekta	311
14.9 Gastroezofageální reflux	311
14.10 Jiné gastrointestinální projevy	312
Literatura	313
15 Onemocnění jater a žlučových cest (O. Pozler, H. Vaníček, P. Rejtar, J. Nožička, P. Nevolová)	317
15.1 Patogeneze	317
15.2 CF-hepatopatie	319
15.2.1 Klinické příznaky	319
15.2.2 Laboratorní vyšetření	320
15.2.3 Definice	325
15.2.4 Steatóza jater	326
15.2.5 Fokální nebo multilobulární biliární cirhóza	326

15.2.6	Sklerózující cholangioitida	327
15.2.7	Komplikace CF-hepatopatie	327
15.2.8	Terapie	328
15.2.9	Profylaktická terapie	332
15.3	Extrahepatální žlučové cesty	332
15.3.1	Klinické příznaky	332
15.3.2	Zobrazovací metody	332
15.3.3	Abnormality žlučníku	333
15.3.4	Stenóza společného žlučovodu	333
15.4	Přirozený vývoj a prognóza	333
	Závěr	334
	Literatura	335
16	Diabetes mellitus na podkladě cystické fibrózy (S. Koloušková)	341
16.1	Výskyt porušené glukózové tolerance	341
16.2	Patofyziologie CFRD	342
16.3	Screening	342
16.3.1	Glykosylovaný hemoglobin	342
16.3.2	Glykemie nalačno	342
16.3.3	Orální GTT	343
16.3.4	Intravenózní GTT	343
16.4	Diagnostická kritéria pro CFRD	344
16.4.1	Klinická diagnostika CFRD	344
16.4.2	Laboratorní kritéria CFRD	345
16.5	Terapie CFRD	346
16.5.1	Cíle léčby CFRD	346
16.5.2	Monitorování glykemie	346
16.5.3	Terapie CFRD inzulinem	346
16.5.4	Dieta u CFRD	347
	Závěr	348
	Literatura	348
17	Výživa nemocných s cystickou fibrózou (V. Skalická).	351
17.1	Příčiny malnutrice	351
17.1.1	Pankreatická insuficience a její substituce pankreatickými enzymy	352
17.1.2	Další faktory malabsorpce	352
17.1.3	Postižení jater a ztráty žlučových solí	352
17.2	Hodnocení stavu výživy	353
17.3	Stanovení nutričních požadavků	353
17.3.1	Stanovení energetické potřeby	353
17.3.2	Potřeba bílkovin	355
17.3.3	Potřeba tuků	355
17.3.4	Potřeba minerálů, stopových prvků a vitaminů	357
17.4	Deficience antioxidantů	361
17.5	Tekutiny, vláknina, probiotika	362
17.6	Běžná péče o výživu v jednotlivých životních obdobích	362
17.6.1	Novorozenci a kojenci	362

17.6.2	Děti starší 1 roku a předškolního věku	363
17.6.3	Školní děti (6–12 let)	363
17.6.4	Dospívání (13–18 let)	363
17.6.5	Dospělost	364
17.6.6	Těhotenství a kojení	364
17.7	Obecný výběr potravin a skladba stravy nemocných CF	364
17.8	Psychologické aspekty příjmu stravy	365
17.9	Nutriční podpora	366
17.9.1	Zvýšení perorálního příjmu	366
17.9.2	Enterální výživa	366
17.9.3	Parenterální výživa	367
17.10	Dietní opatření u pacientů s CFRD	367
	Závěr	368
	Literatura	368

18 Růst, stav výživy a vývoj nemocných s cystickou fibrózou

	<i>(D. Zemková, Z. Šumník, S. Koloušková)</i>	371
18.1	Růst, stav výživy a přežívání u CF	371
18.2	Hodnocení růstu a stavu výživy	372
18.3	Růst a sexuální maturace nemocných s CF	374
18.4	Léčba poruch růstu	376
	Závěr	377
	Literatura	377

19 Ostatní systémy 381

19.1	Potní žlázy <i>(V. Vávrová)</i>	381
19.2	Reprodukční ústrojí <i>(L. Fila)</i>	383
19.2.1	Neplodnost mužů s CF	383
19.2.2	Těhotenství žen s CF	385
19.3	Poruchy kostního metabolismu u pacientů s CF <i>(Z. Šumník, D. Zemková)</i>	389
19.3.1	Diagnostika a klinický význam osteoporózy u CF	389
19.3.2	Etiopatogeneze vzniku osteoporózy u nemocných s CF	390
19.3.3	Prevence a léčba osteoporózy u pacientů s CF	392
19.4	Kloubní manifestace a autoimunitní projevy CF <i>(M. Suková)</i>	393
19.4.1	Hypertrofická plicní osteoartropatie	393
19.4.2	Epizodická artropatie	394
19.4.3	Revmatoidní artritida	395
19.4.4	Artropatie při amyloidóze	395
19.4.5	Artritida indukovaná léky	395
19.4.6	Granulomatózní artritida	395
19.4.7	Jiné artropatie	396
19.4.8	Vaskulitida	396
19.5	Kardiovaskulární komplikace cystické fibrózy	397
19.5.1	Cor pulmonale <i>(V. Hroboňová)</i>	397
19.5.2	Arytmie <i>(V. Hroboňová)</i>	398
19.5.3	Kardiomyopatie <i>(V. Hroboňová, V. Vávrová)</i>	399

19.6	Ledviny (<i>V. Vávrová</i>)	401
19.6.1	Funkce ledvin a regulace rovnováhy vody a solí	402
19.6.2	Klinické projevy renálního postižení u CF	403
19.7	Funkce štítné žlázy u nemocných s CF (<i>Z. Šumník</i>)	404
19.8	Amyloidóza (<i>V. Vávrová</i>)	405
19.9	Nervový systém (<i>V. Vávrová</i>)	406
19.9.1	Pseudotumor cerebri	406
19.9.2	Absces mozku	406
19.9.3	Chiariho syndrom	406
19.9.4	Obrny nervů	407
19.9.5	Neurosenzorická ztráta sluchu	407
19.9.6	Neuritis optiku a periferních nervů	407
19.9.7	Oční postižení	407
	Závěr	407
	Literatura	409
20	Atypické formy cystické fibrózy	
	(<i>V. Vávrová, M. Macek Jr., D. Zemková</i>)	419
20.1	Izolovaná obstruktivní azoospermie	423
20.2	„Idiopatická“ chronická pankreatitida	425
20.3	Mírná plicní onemocnění	426
20.3.1	Roztroušené (diseminované) bronchiektázie	426
20.3.2	Alergická bronchopulmonální aspergilóza (ABPA)	427
20.3.3	Astma	427
	Závěr	427
	Literatura	428
21	Vztah genotypu a fenotypu (<i>M. Macek Jr., V. Vávrová, D. Zemková</i>) . . .	429
21.1	Korelace genotypu s fenotypem u exokrinní funkce pankreatu	432
21.2	Korelace genotypu s fenotypem u sinopulmonálního onemocnění . .	433
21.3	Korelace genotypu s fenotypem u potní žlázy	434
21.4	Reprodukční systém	435
21.5	Korelace genotypu s fenotypem u dalších projevů CF	435
	Závěr	436
	Literatura	436
22	Nové možnosti léčby (<i>V. Vávrová, M. Macek Jr.</i>)	439
22.1	Genová terapie	439
22.2	Proteinová terapie	440
22.2.1	Terapie zaměřená na ovlivnění komplexní role proteinu CFTR	440
22.2.2	Terapie zaměřená na ovlivnění resorpce natria	442
22.3	Ovlivnění abnormálního hlenu	442
22.4	Boj proti destrukci tkání infekcí a zánětem	443
22.4.1	Potlačení infekce	443
22.4.2	Boj proti zánětu	444
	Závěr	447
	Literatura	447

23 Psychologická a psychosociální problematika (<i>H. Chladová</i>)	451
23.1 Obecná část	451
23.1.1 Kvalita života nemocných CF	451
23.1.2 Compliance – vstřícnost ve vztahu k léčbě a léčebným postupům	452
23.1.3 Výskyt psychiatrické symptomatologie u nemocných CF	454
23.1.4 Adaptace na onemocnění	454
23.1.5 Problémy s výživou a poruchy příjmu potravy	455
23.1.6 Docházka do školy	455
23.1.7 Dospělí s cystickou fibrózou	456
23.1.8 Rodina	456
23.1.9 Nakládání s onemocněním – řízení péče	458
23.1.10 Péče o tým	458
23.2 Praktická část	459
23.2.1 Stanovení diagnózy	459
23.2.2 Psychologická péče o pacienty s CF a její podoby	460
23.2.3 Rodina a pacient s CF	463
23.2.4 Psychologická péče před a po transplantaci plic	464
23.2.5 Komplexní péče o pacienty s CF	465
23.3 Speciální část – psychologická a psychotherapeutická péče o pacienty s CF v jednotlivých věkových obdobích	466
23.3.1 Novorozenecké a kojenecké období	466
23.3.2 Období batolecí a předškolní	467
23.3.3 Období školní – mladší a starší školní věk	470
23.3.4 Adolescence a raná dospělost	472
Závěr	475
Literatura	476
24 Prognóza cystické fibrózy (<i>V. Vávrová, J. Bartošová, D. Zemková, M. Hladíková</i>)	477
24.1 Genetické faktory v prognóze CF	477
24.2 Vliv faktorů okolí na prognózu CF	477
24.3 Změny prognózy v posledních sedmi desetiletích	477
24.4 Vývoj prognózy u nás	479
Závěr	480
Literatura	481
25 Organizace cystické fibrózy v zahraničí a u nás (<i>V. Vávrová, J. Bartošová, H. Chladová, P. Valentová</i>)	483
25.1 Organizace pro CF ve světě	483
25.2 Organizace pro CF v Evropě	484
25.3 Organizace pro CF u nás	484
Literatura	485
Zkratky	487
Rejstřík	497

Seznam spoluautorů

MUDr. Jana Bartošová, Pediatrická klinika UK 2. LF a FN Motol, Praha
MUDr. Jitka Brázová, Ústav imunologie, UK 2. LF, Praha
MUDr. Eliška Čumlivská, Klinika zobrazovacích metod, UK 2. LF a FN Motol, Praha
MUDr. Pavel Dřevínek, PhD., Pediatrická klinika UK 2. LF a FN Motol, Praha
MUDr. Libor Fila, Pneumologická klinika, UK 2. LF a FN Motol, Praha
MUDr. Hana Fišerová, Klinika ušní, nosní a krční, UK 2. LF a FN Motol, Praha
Mgr. Marie Hladíková, Ústav informatiky, UK 2. LF, Praha
doc. MUDr. Věra Hroboňová, CSc., Pediatrická klinika, UK 2. LF a FN Motol, Praha
Mgr. Helena Chladová, Klub nemocných a Centrum cystické fibrózy, Praha
MUDr. Stanislava Koloušková, CSc., Pediatrická klinika, UK 2. LF
a FN Motol, Praha
MUDr. Alice Krebsová, PhD., Ústav biologie a lékařské genetiky, UK 2. LF Praha
MUDr. Robert Lischke, III. Chirurgická klinika, UK 1. LF, Praha
doc. MUDr. Milan Macek, CSc., Ústav biologie a lékařské genetiky, UK 2. LF, Praha
prof. MUDr. Milan Macek Jr., DrSc., Ústav biologie a lékařské genetiky,
UK 2. LF, Praha
MUDr. Pavla Nevolová, Klinika dětské chirurgie, UK 2. LF a FN Motol, Praha
MUDr. Jan Nožička, PhD., Fingerlandův ústav patologie, Fakultní nemocnice,
Hradec Králové
MUDr. Otakar Nyč, Ústav mikrobiologie UK 2. LF a FN Motol, Praha
MUDr. Luděk Pelikán, Pediatrická klinika, UK 2. LF a FN Motol, Praha
doc. MUDr. Petr Pohunek, CSc., Pediatrická klinika, UK 2. LF a FN Motol, Praha
doc. MUDr. Oldřich Pozler, CSc., Dětská klinika UK LF a FN, FN Hradec Králové
MUDr. Pavel Rejtar, Radiologická klinika UK LF a FN, FN Hradec Králové
MUDr. Veronika Skalická, Pediatrická klinika, UK 2. LF a FN Motol, Praha
PaedDr. Libuše Smolíková, Klinika rehabilitace, UK 2. LF, Praha
MUDr. Martina Suková, Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2. LF
a FN Motol, Praha
MUDr. Tamara Svobodová, CSc., Pediatrická klinika, UK 2. LF a FN Motol, Praha
doc. MUDr. Anna Šedivá, CSc., Ústav imunologie, UK 2. LF, Praha
MUDr. Jitka Škovránková, Ambulance pro očkování, Poliklinika FN Motol, Praha
MUDr. Zdeněk Šumník, PhD., Pediatrická klinika, UK 2. LF a FN Motol, Praha
prof. RNDr. Helena Tomášová, CSc., Ústav lékařské chemie a biochemie,
UK 2. LF, Praha
Mgr. Pavla Valentová, Klub nemocných a Centrum cystické fibrózy, Praha
MUDr. Hubert Vaníček, PhD., Dětská klinika UK LF a FN, Hradec Králové
doc. MUDr. Věra Vávrová, DrSc., Pediatrická klinika, UK 2. LF a FN Motol, Praha
prof. MUDr. Alois Zapletal, DrSc., Pediatrická klinika, UK 2. LF a FN Motol, Praha
RNDr. Daniela Zemková, CSc., Pediatrická klinika, UK 2. LF a FN Motol, Praha

Poděkování

Děkujeme MUDr. Pavlu Rejtarovi za poskytnutí rentgenových nálezů z materiálu Radiologické kliniky FN v Hradci Králové.
Za poskytnutou dokumentaci děkujeme MUDr. Janu Markovi a MUDr. Jiřímu Gilí-
kovi z Kardiocentra FN Motol.

Předmluva

Cystická fibróza (CF) je známa jako klinická jednotka 65 let. U málokterého onemocnění došlo v relativně krátké době k tak velkému rozvoji poznání a k změnám v nazírání na podstatu jejích projevů jako právě u cystické fibrózy. Výzkumné úsilí zejména v posledních dvou dekáдах přineslo obdivuhodné výsledky. Začínáme rozumět podstatě nemoci i tomu, jak se základní defekt promítá do klinických projevů a co konečný výsledek ovlivňuje. Na podkladě těchto znalostí se objevují nové léčebné postupy, které sice ještě neznamenají kauzální léčbu, ale již dnes mohou příznivě ovlivnit průběh nemoci.

V uplynulých 65 letech se výrazně změnila prognóza nemoci. Zatímco ještě po skončení 2. světové války umírala většina dětí v kojeneckém věku, přežívá dnes 50 % nemocných do 4. dekády života a naděje na další zlepšení stále rostou. Smyslem péče však není jen prodlužování života, ale především zlepšení jeho kvality. I to se nesporně daří, i když ještě zůstává mnoho nevyřešených problémů.

Cystická fibróza je nemoc závažná a její dopad na nemocného a jeho okolí je značný. Diagnóza CF přináší problémy jak zdravotní, tak psychologické, sociální i ekonomické. Podle úrovně péče o CF se posuzuje v evropských zemích obecná úroveň zdravotní péče. Malá informovanost o nemoci v naší populaci v porovnání se zeměmi na západ od našich hranic znesnadňuje život nemocným a jejich rodinám. Setkávají se s nepochopením ve školách, v zaměstnání i na úřadech. Zdravé děti u nás nejsou dostatečně vedeny k toleranci a pochopení různých handicapů u svých vrstevníků a dovedou jim život velmi nepříjemnit. Pokládáme proto rozšiřování znalostí o CF a o problémech nemocných v široké veřejnosti za nesmírně důležitou součást péče o nemocné.

Odborné znalosti o CF rostou téměř každým dnem. Počet publikací zabývajících se jak základním výzkumem, tak klinickou problematikou každoročně stoupá, v současné době přesahuje 2000 prací za rok. Jen v anglosaské literatuře vyšlo v posledním desetiletí 10 rozsáhlých monografií o CF. Každoročně se zabývají výhradně touto nemocí Evropské a Severoamerické konference, ale i řada dalších mezinárodních a nespočet národních symposií, konferencí a sjezdů.

Situace u nás byla do konce 80. let nepříznivá, protože jsme neměli přístup k řadě moderních léků, ačkoli jsme o nich z literatury věděli. To se projevovalo na zdravotním stavu našich nemocných. O to větší pokrok pozorujeme po roce 1990. Se znalostí problematiky v širší lékařské veřejnosti nemůžeme být zcela spokojeni. Stále se setkáváme s pozdní diagnózou i typických forem nemoci a při méně typickém průběhu se na CF již vůbec nemyslí. Někde stále přežívají názory o naprosto infaustním průběhu nemoci již v prvních letech života. Ve světě se věří, že záhy bude již polovina nemocných v dospělém věku. U nás je dnes 1/3 nemocných starších než 18 let a přesto je dospělý nemocný s CF pokládán za výjimku. U těch nemocných, kteří unikli diagnóze v průběhu dětství, se v diferenciální diagnostice v dospělém věku na CF vůbec nemyslí.

Proto jsme se rozhodli shrnout své dlouholeté zkušenosti s CF do knížky, v které se pokoušíme o přehled současného stavu vědomostí o podstatě nemoci a o pochodech, které se v organizmu nemocných odehrávají, i o příznacích, které by měly na nemoc upozornit a vést k včasné diagnóze. Domníváme se, že bez znalosti určitých teoretických podkladů není možné pochopit nové moderní léčebné postupy. Proto věnujeme určitý prostor i této „šedé“ teorii. Jsme si vědomi toho, že řada otázek je dosud předmětem úvah a sporů a že leckteré publikované výsledky si odporují. Věříme však, že většinu otázek se podaří v nepříliš vzdálené době vyřešit a že nová poznání podstatně zlepší současné léčebné postupy a tím i vyhlídky nemocných. Než tomu tak bude, je však třeba dbát o včasnou diagnózu a intenzivní léčbu dosud známými metodami.

V Praze v dubnu 2005

Věra Vávrová

1.1 Historie cystické fibrózy

1.1.1 Historie cystické fibrózy ve světě

Historická pátrání ukazují, že charakteristické příznaky cystické fibrózy (CF) byly popisovány již ve středověku. Dr. Busch z Rostocku [4] věnoval mnoho let hledání pověr a lidových popěvek, které se týkaly začarovaných dětí a slané chuti jejich potu. První patologicko-anatomickou zprávu popisující těžké změny na pankreatu u 11leté „začarované“ kachektické dívky podal v roce 1595 Pieter Pauw, profesor botaniky a anatomie v Leidenu [citováno podle 37]. V literatuře bývá citován i prof. Rokitan-ski. Na vztah mekoniového ileu a změn na pankreatu upozornil v roce 1905 K. I. Landsteiner. Ve 20. a 30. letech se v literatuře objevovaly zprávy o dětech se steato-reou a bronchopneumoniemi, šlo-li o CF lze však jen předpokládat.

Před 65 lety – v roce 1938 – popsala americká patoložka Dorothy Andersenová [1] patologicko-anatomické nálezy u 49 dětí, z nichž 20 zemřelo na onemocnění, pro které užila označení cystická fibróza pankreatu. Již dva roky před tím sice Q. Fanconi publikoval sdělení o klinických a anatomických nálezech u tří dětí, o kterých se sou-dilo, že měly celiakii, a u kterých rozpoznal současnou poruchu pankreatu a bronchi-ektázie [14], podrobné studii D. Andersenové však patří priorita přesného definování příznaků a popisu poměrně velkého souboru nemocných. V roce 1938 se objevily dvě další malé zprávy o CF, avšak po mnoho dalších let se na onemocnění myslelo jen zřídka a ještě v roce 1954 se o ní mluvilo jako o „nové nemoci“.

V roce 1938 byla CF ve světě poprvé rozpoznána u žijícího dítěte na základě kli-nických příznaků respiračního onemocnění a vyšetření duodenální šťávy, svědčícího pro pankreatickou insuficienci [9]. Zatímco většina dětí v té době umírala na CF v prvním roce života, tento první pacient, kterého P. di Sant’Agnese označuje jako JD, žil i při nedostatku účinné léčby 10–11 let.

Zprávy o nemocných s plicním onemocněním, průjmy a abnormální funkcí pan-kreatu se ve větší míře v literatuře začaly objevovat po ukončení 2. světové války. Ve snaze zdůraznit charakter hlenu a upozornit na skutečnost, že pankreas není tím nej-důležitějším orgánem, zavedl S. Farber [15] označení „mukoviscidosis“, které ještě dnes užívají francouzští a někdy němečtí autoři.

V prvním období se znalost o existenci CF šířila jen velmi zvolna. Ve Spojených státech se nemocní koncentrovali většinou do Babies Hospital v New Yorku, kde pro práci na problematice CF získala D. Andersenová Paula di Sant’Agnese, a v Bostonu, kde se CF zabýval prof. Harry Shwachman [43]. V té době stoupl počet diagnostiko-vaných nemocných na 50–60 ročně. Léčení CF spočívalo v podávání málo účinné pankreatické substituce a postupně s rozvojem antibiotik i v léčení respirační infekce. Di Sant’Agnese zjistil, že nemocní s CF mohou mít i normální exokrinní sekreci pan-kreatu [11].

Důležitým mezníkem v historii CF je objev potní anomálie. V době, kdy neexistovala klimatizace, se stávalo, že v období horka se některé děti dostávaly do stavu těžké dehydratace a oběhového šoku. V roce 1948 bylo o pěti z deseti dětí, přijatých do Babies Hospital v šoku z horka, známo, že mají CF, a u dalšího byla CF diagnostikována později. Podobně tomu bylo u 6 nemocných s CF hospitalizovaných v létě 1952. Ukázalo se, že nemocní s CF jsou velmi citliví na horké podnebí. Paul di Sant'Agnese se spolupracovníky [10] začali proto studovat pot nemocných CF a zjistili, že se tyto děti sice nepotí víc než zdravé, že však jejich pot obsahuje mnohem víc solí. Smrti ze šoku lze zabránit rychlou i.v. rehydratací a úpravou složení elektrolytů i objemu extracelulární tekutiny. Objev vysoké koncentrace solí, především chloridů v potu měl velký význam pro diagnostiku. Na jeho podkladě se začala CF diagnostikovat i u nemocných s normální funkcí pankreatu.

Pro praktické uplatnění potní anomálie měla základní význam práce Gibsona a Cooka [16], kteří vypracovali jednoduchou metodu stimulace potních žláz pilokarpinovou iontoforézou. V potu sebraném po této stimulaci bylo možno standardním způsobem vyšetřit koncentraci chloridů. Tak vznikl potní test, který je již více než 40 let pokládán za zlatý standard v diagnostice CF.

S přibývajícím počtem nemocných, zlepšujícími se znalostmi o CF a s lepší dostupností nových léků se rozvíjela i racionální terapie. V roce 1957 se začal v Rainbow Babies and Children Hospital v Clevelandu uplatňovat intenzivní léčebný postup, který je základem klasické léčby CF dodnes [12, 36]. Jeho pozitivním důsledkem bylo prodloužení života nemocných na 5 let [5]. V následujících letech přibyla do léčebného arzenálu nová antibiotika, především semisyntetické peniciliny. Princip léčby, který zavedl L. W. Matthews, se však nezměnil [44]. Nemocní žili do 10 let. K dalšímu zlepšování léčebných postupů došlo s účinnějšími formami pankreatické substituce, s tzv. heparinovým uzávěrem pro i.v. antibiotickou léčbu, s novými metodami léčebné rehabilitace a s inhalacemi rhDNázy. Postupné zavádění nových metod [28] zlepšovalo i prognózu nemoci, a tak se zvolna zvyšoval průměrný věk dožití z 15 let v roce 1972 až na současných 33,4 let v USA [17] (kap. 24).

Ve výzkumu CF znamenal zásadní krok v hledání základního defektu objev impermeability buněčných membrán pro chloridy. Tento objev byl vyvrcholením dlouholetého studia biochemických změn, kterému zasvětil svůj život prof. Paul M. Quinton, sám nemocný CF [38, 39]. V 80. letech objevil M. R. Knowles transepiteliální rozdíl potenciálů [26], který se v současné době užívá jak diagnosticky, tak výzkumně.

Quintonův objev nastartoval intenzivní výzkum podstaty CF a závody v hledání genu CF. Gen CF (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *CFTR*) byl v roce 1987 lokalizován na dlouhé raménko chromozomu 7 (lokus 7q31.3) a v srpnu 1989 byl identifikován pomocí reverzního klonování [24, 40, 41]. Tento významný objev kanadsko-americké skupiny vědců byl počátkem rozvoje nových poznatků o CF (kap. 2.1).

Do dnešního dne objevili vědci více než 1300 mutací genu *CFTR*. Jsou dostupné informace o jejich závažnosti, o vztahu genotypu a fenotypu a intenzivně se pracuje na metodách genové terapie. Všechny tyto otázky budeme diskutovat v dalších kapitolách.

1.1.2 Historie cystické fibrózy u nás

První nemocný s CF byl na II. dětské klinice v Praze diagnostikován v květnu 1946. V české literatuře se objevily první kazuistiky CF záhy po 2. světové válce a již v roce 1948 popsali Švejcar, Benešová a Houštek [45] první malý soubor nemocných s CF.

S určitým zpožděním se k nám dostávaly informace o nových názorech na patogenезi nemoci i na její rozpoznávání a léčení. Do roku 1960 bylo na II. dětské klinice v Praze hospitalizováno 30 dětí, u kterých byla na základě klinického podezření nebo sekčního nálezu prokázána CF. Všechny tyto děti však záhy umíraly, takže 1. 1. 1960 žil pouze jeden nemocný. Onemocnění se v té době diagnostikovalo výhradně u kojenců na základě klinického podezření potvrzeného laboratorním průkazem pankreatické insuficience. Ten spočíval ve vyšetření duodenální šťávy, v mikroskopickém vyšetření stolice a v nepřímém průkazu nedostatku pankreatických enzymů. Nedostatek lipázy se prokazoval lipiodolovým testem, nedostatek proteolytických enzymů nedostatečným natrávením želatinové vrstvy fotografického filmu postupně ředěnou stolicí.

V roce 1960 jsme začali s vyšetřováním chloridů v potu po stimulaci pilokarpinovou iontoforézou [46]. Od té doby každoročně přibýval počet nově diagnostikovaných nemocných i mezi staršími dětmi [47, 48]. Klinika se začala CF zabývat i výzkumně, zaváděly se nové léčebné metody, prodlužoval se život našich nemocných a do určité míry se zlepšovala i jeho kvalita. Nicméně srovnání stavu výživy a funkce plic našich nemocných se stavem nemocných ve vyspělých zemích pro nás bylo ještě na počátku 90. let velmi nepříznivé.

Po roce 1989 se naše situace výrazně zlepšila. Začala se tvořit specializovaná centra pro léčbu CF (kap. 25). Zlepšila se dostupnost léků, především účinné pankreatické substituce, přípravků podpůrné enterální výživy, nových účinných antibiotik, od roku 1995 i rekombinantní lidské DNázy. Od roku 1998 se provádějí i transplantace plic. Kontakt se zahraničními pracovišti nám pomohl v zavedení nových metod fyzioterapie a různých respiračních pomůcek.

Naše zkušenosti se opírají o sledování 602 nemocných, kteří byli od roku 1946 na klinice léčení. Výzkumně se CF tým v Motole zabýval jak klinickým výzkumem a sledováním možných léčebných metod, tak základním především genetickým výzkumem i zaváděním nových diagnostických postupů (PCR diagnostika *B. cepacia* komplexu aj.).

V roce 1990 začalo fungovat laické sdružení rodičů a přátel nemocných CF a v roce 1992 byl ustaven Klub nemocných CF (kap. 25).

1.2 Výskyt cystické fibrózy

CF je nejčastější závažné autozomálně recesivní onemocnění u evropských populací. Údaje o jejím výskytu se však značně liší. Obecně se udává výskyt jednoho dítěte na 2500–4500 novorozenců.

Epidemiologickými studiemi klinicky a sekčně diagnostikovaných onemocnění ve Středočeském kraji [20–23] a molekulárně genetickými metodami vyšetření naší

CF populace [29, 32] byla u nás stanovena incidence 1 : 2736 novorozenců. Z takto relativně vysoké incidence vyplývá, že každý 26. jedinec je zdravým nosičem tohoto závažného onemocnění a každé 676. manželství může být partnerstvím dvou nosičů, kteří mají 25% riziko, že budou mít nemocné dítě. Dále tento výskyt znamená, že při současné porodnosti se v České republice narodí každý rok přibližně 33 dětí s CF. Diagnostikují se však maximálně 2/3 [47] a je velmi pravděpodobné, že mnoho nemocných žije pod jinými diagnózami, například jako chronický zánět průdušek, sinobronchiální syndrom, nosní polypóza, ale i celiakie, opakované záněty slinivky břišní a v neposlední řadě mužská neplodnost. V současné době víme v ČR asi o 500 diagnostikovaných nemocných s CF.

V neevropských populacích je incidence CF výrazně nižší [27]. Zatímco u bílé populace v USA se udává incidence mezi 1 : 1900 až 1 : 3700, je výskyt u hispánské, asijské a africko-americké populace nižší (1 : 9000, 1 : 32000 a 1 : 15000, respektive) [17]. Nepředpokládá se, že by se na těchto populačních rozdílech v rámci USA podílela horší diagnostika, přesnější údaje jsou však sporé.

1.3 Dědičnost cystické fibrózy

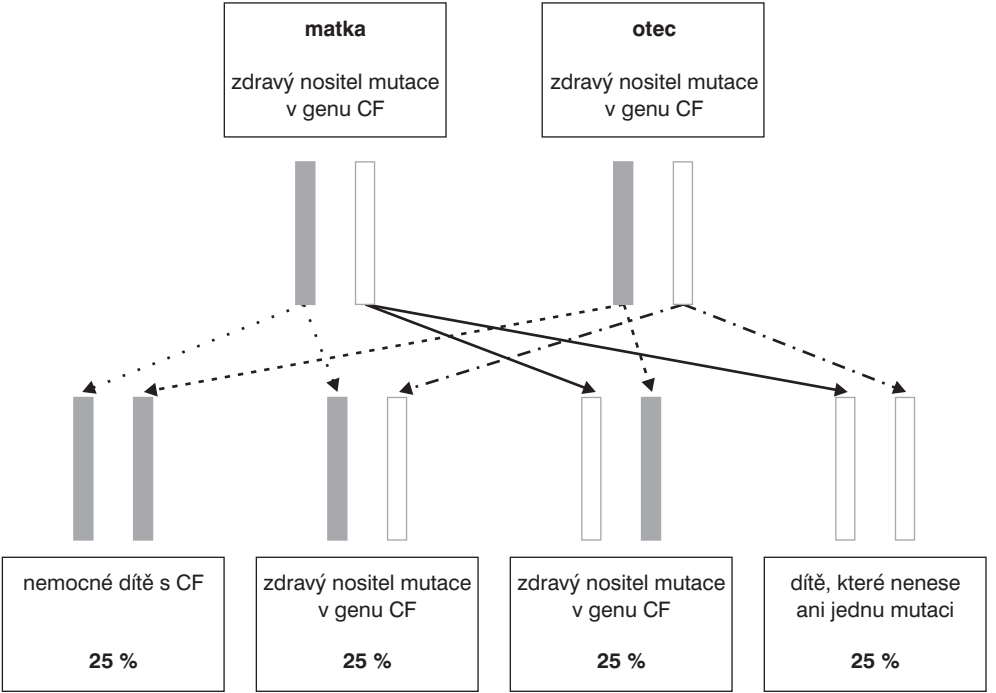
Cílem této krátké kapitoly není obecný přehled molekulární genetiky. V tomto ohledu je čtenář odkázán na vynikající monografické učebnice, jako je například Thompson and Thompson: Klinická genetika (6. vydání 2004, český překlad; Triton Praha). V následující odstavci uvedeme pouze základní principy mutací/variant a autozomálně recesivní dědičnosti z úhlu pohledu CF. Z obecného hlediska je dědičná informace obsažena v kyselině deoxyribonukleové (DNA). O DNA v případě CF viz blíže v přehledných kapitolách [7, 48]. DNA je tvořena ze 4 základních stavebních článků, tzv. nukleotidových bází (adeninu, cytosinu, guaninu, tymidinu), které jsou propojeny a tvoří tak dlouhé vlákno spojené ze dvou protichůdných řetězců. Změny ve složení nukleotidových bází jsou buďto zodpovědné za některých okolností za rozvoj onemocnění [42], další fungují při opravě poškozené DNA nebo působí při evoluci živočišných a rostlinných druhů [35].

Z klinického hlediska je důležité uvést základní pojmy, tj. mutace, varianty/polymorfizmy v DNA. Změny v pořadí či přítomnosti/nepřítomnosti nukleotidových bází DNA, které porušují funkci genu, se nazývají mutace. Tento termín je spíše arbitrární povahy, protože se vždy jedná o srovnání sekvence DNA nalezené u daného pacienta s referenční sekvencí v databázi pomocí bioinformatických metod [35]. Zde pak změna, která je v jedné populaci patogenní, může mít ve druhé populaci neutrální povahu apod. Důležité je rovněž vysledovat, zda se stejná změna vyskytuje u téhož fenotypu (tj. například CF), zda je předávána nemocnému od obou rodičů (u autozomálně recesivních onemocnění) a nenachází se u zdravých sourozenců, kteří mají pouze jednu nebo žádnou kopii (u autozomálně recesivních onemocnění) [24]. Jinak se hodnotí segregace mutací u autozomálně dominantních onemocnění (například achondroplazie) nebo gonozomálně recesivních onemocnění (např. hemofilie A/B).

Většina mutací však nezpůsobuje onemocnění, protože jsou lokalizovány buďto v nekódujících oblastech genu (tj. intronech), anebo dokonce i v kódujících exonech

různých genů a nazývají se tak varianty. Tyto varianty mohou být z klinického úhlu pohledu benigní (tj. I506V, která se nachází pouze 2 aminokyseliny před hlavní mutací genu *CFTR* – F508del), nebo pouze potenciálně patogenní, jako například I148T, M470V a IVS-8 5/7/9 T nebo IVS-8 10/1/12 TG [25, 19] (kap. 2.1). Jejich klinický dopad není vždy zřejmý, ale mohou za určitých okolností vytvořit polyvariantní haplotyp, kde efekt jednotlivých variant lokalizovaných v pozici *cis* (tj. na stejném homologním chromozomu) může být aditivní až multiplikativní a vést tak k rozvoji onemocnění [6, 49] (také kap. 2.1). Z uvedeného vyplývá, že rozdělení alterací sekvence DNA na varianty a patogenní mutace je spíše arbitrární povahy a mezi oběma kategoriemi existuje kontinuum z hlediska jejich patogenetického potenciálu [13]. Pro CF byla vypracována kritéria pro klasifikaci mutací z hlediska jejich patogenetického dopadu [42] (také kap. 2.1). Mutační nomenklatura je rovněž dána mezinárodně schválenými doporučeními [2, 8, 18] a populační distribuce mutací je podrobně studována u nás [30, 31] a ve světových populacích [3].

Pokud se varianty vyskytují v obecné populaci ve více než v jednom procentu, nazývají se také (neutrální) polymorfizmy, což je spíše obecný termín pro neutrální alelu/variantu, která je „polymorfní“ a vyskytuje se v populaci v mnoha různých formách. Mikrosatelitové nebo také STR (short tandem repeats = krátké tandemové repetice) polymorfizmy se s úspěchem používají při genovém mapování nebo při nepřímé molekulárně genetické diagnostice [24].



Obr. 1.1 Schematické znázornění dědičnosti cystické fibrózy

Geny se obecně dědí po dvojicích, přičemž jeden člen této dvojice je nazýván „alela“, tj. alternativní varianta téhož genu na homologních chromozomech paternálního a maternálního původu. CF je monogenní onemocnění, což znamená, že dominantní vliv na přítomnost onemocnění mají mutace v jednom genu (viz dále gen a protein CFTR, kap. 2). Další genetické modifikátory pak ovlivňují závažnost jednotlivých příznaků a jsou podrobně diskutovány v kapitole 2.3 [49].

Gen cystické fibrózy (*CFTR*) byl objeven před více než 14 lety a nachází se na dlouhém raménku chromozomu 7 v oblasti lokusu 7q31 [24, 40, 41]. CF je tedy autozomálně recesivně dědičné onemocnění, kde nacházíme klasický „mendelistický štěpný poměr“ při „křížení“ dvou obligátních (tj. nemanifestujících se – zdravých) heterozygotů, tj. rodičů nemocných s CF, 25 % potomků (nebo také „1“) jsou zdraví bez mutace, 50 % zdraví nositelé mutace (nebo také „2“) a 25 % nemocní homozygoti (nebo opět „1“) (obr. 1.1). Z uvedeného vyplývá, že partnerství dvou rodičů, nositelů mutace v genu CF má 25% riziko, že jejich dítě bude nemocné, 50% pravděpodobnost narození zdravých nositelů a ve 25 % všech případů neponese dítě ani jednu z mutovaných alel genu CF (kap. 3.5). U autozomálně recesivních onemocnění je důležité, že u rodičů „zdravá“ nemutovaná alela vyváží svou aktivitou nedostatečnou funkci mutované alely, a proto se CF u nich neprojeví. U nemocných s CF je z tohoto důvodu určující pro výsledný fenotyp relativně mírnější mutovaná alela genu CF (kap. 21).

Vzhledem k relativně vysoké incidenci nemocných s CF (1 : 2736 novorozenců) [20] lze odvodit četnost nositelů mutovaného genu CF v obecné populaci podle Hardyho-Weinbergova zákona na přibližně 1 : 26 jedinců [29]. Z této hodnoty vyplývá, že jedno na 676 (26×26) manželství/partnerství má 25% (1 : 4) pravděpodobnost narození dítěte s CF. Mendelistická rizika jsou pro jednu daná a riziko narození dalšího nemocného nebo zdravého dítěte neroste s počtem nemocných nebo zdravých dětí v rodině (oproti empirickým rizikům u polygenních onemocnění, jako je například ischemická choroba srdeční nebo diabetes mellitus typu 1–2). Tak mohou mít oba rodiče – nositelé mutací v genu CF, několik zdravých dětí a o své dispozici ani nevědět, tak jako existovaly v minulosti i partnerství s opakovaným porodem nemocného dítěte. Tato situace by se v současné době měla vyskytovat velmi zřídka, především v situacích, kdy by rodiny z náboženských důvodů odmítaly prenatální genetickou diagnostiku [33, 34]. Riziko nositelství mutace genu pro CF významně stoupá, jestliže se v příbuzenstvu CF již u někoho vyskytla, a proto je důležité v těchto rodinách indikovat genetické poradenství a molekulárně genetickou („DNA“) diagnostiku (kap. 3.5).

Každý člověk, zvláště pak pokrevní příbuzní, kteří si přejí určení mutací CF genu, by měli navštívit genetickou ambulanci, kde lékař stanoví statistické riziko nositelství mutace a zajistí molekulárně genetické vyšetření. V případě pozitivního nálezu mutací doporučujeme vyšetření partnera či partnerky prokázaného nositele na nejčastější mutace CF genu a zajišťujeme veškerou péči během těhotenství, aby se maximálně snížilo riziko narození dítěte s CF [33] (kap. 3.5).

Závěr

CF je jako klinická jednotka známa od roku 1938. V prvních letech byla pokládána za vzácné onemocnění, diagnostikované na základě těžkých klinických příznaků, na které většina dětí záhy umírala. Objev potní anomálie a zavedení pilokarpinové iontoforézy vedl k diagnostice i u méně závažných průběhů nemoci. Začaly se rozvíjet komplexní léčebné postupy, zlepšující prognózu. Objev impermeability buněčných membrán pro chloridy a transepiteliálního rozdílu potenciálů v 80. letech byly počátkem intenzivní výzkumné činnosti, která vyvrcholila v roce 1989 objevem genu *CFTR* a následně i jeho četných mutací a variant.

V České republice byli první nemocní s CF diagnostikováni po skončení 2. světové války. V roce 1960 byla zavedena spolehlivá diagnostika potním testem, rozvíjel se výzkum a začaly se uplatňovat novější léčebné postupy. Avšak až po roce 1989 se s lepší dostupností antibiotik, účinných forem pankreatické substituce a přímým kontaktem se zahraničními pracovišti zlepšily naše léčebné možnosti.

Výskyt CF v ČR se neliší od výskytu u jiných evropských populací. Stanovili jsme jej na 1 : 2736 novorozenců, což znamená, že se u nás každým rokem narodí přibližně 33 dětí s CF. Celá jedna třetina však není diagnostikována a velmi pravděpodobně žije pod jinými diagnózami.

CF je autozomálně recesivně dědičné onemocnění. Oba rodiče jsou tedy obligátní heterozygoti, tj. zdraví nositelé mutace v genu *CFTR* a mají 25% riziko, že jejich dítě bude nemocné. Genetické poradenství a molekulární genetická diagnostika se nabízí všem rodinám, ve kterých se CF vyskytla.

Literatura

1. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. A clinical and pathological study. *Amer J Dis Child* 1938; 56: 344–399.
2. Beaudet A, Tsui L-C. A suggested nomenclature for designating mutations. *Hum Mut* 1993; 2: 245–248.
3. Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis. A worldwide analysis of *CFTR* mutations – correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mut* 2002; 19: 575–606.
4. Busch R. On the history of cystic fibrosis. *Acta Univ Carol* 1990; 36: 13–15.
5. Crozier DN. Cystic fibrosis. A not so fatal disease. *Pediatr Clin North Am* 1974; 21: 935–948.
6. Cuppens H, Teng H, Raeymaekers P, et al. *CFTR* haplotype backgrounds on normal and mutant *CFTR* genes. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 607.
7. Cutting GR. Cystic fibrosis. In: *Principles and Practice of Medical Genetics*. Rimo DL, Connor JM, Pyeritz RD, eds. New York: Churchill Livingstone, 1997; 2685–2717.
8. Dequeker E, Cuppens H, Dodge J, et al. Recommendations for quality improvement in genetic testing for cystic fibrosis – European Concerted Action on Cystic Fibrosis. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: S2–S24.

9. di Sant'Agnese PA, Darlig MD, Perera G, Shea A. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 1953; 12: 549–563.
10. di Sant'Agnese PA. Fibrocystic disease of the pancreas with normal or partial pancreatic function. Current views on pathogenesis and diagnostics. *Pediatrics* 1955; 15: 683–697.
11. di Sant'Agnese PA. Experiences of a pioneer researcher. Discovery of the sweat electrolyte defect and the early medical history of cystic fibrosis. In: Doershuk CF, ed. *Cystic Fibrosis in the 20th Century. People, Events and Progress*. Cleveland, Ohio: AM Publishing, Ltd, 2000; 17–35.
12. Doershuk CF, Matthews LW, Tucker AS, et al. A 5 year clinical evaluation of a therapeutic program in patients with cystic fibrosis. *J Pediat* 1964; 65: 677–693.
13. Estivill X. Complexity in a monogenic disease. *Nature* 1996; 12: 348–350.
14. Fanconi G, Uhlinger E, Knauer C. Das Coeliac-syndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasien. *Wien Med Wochenschr* 1936; 86: 753.
15. Farber S. Some organic digestive disturbances in early life. *J Mich State Med Soc* 1945; 44: 587–594.
16. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959; 23: 545–549.
17. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. State of art. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 918–951.
18. Girodon-Boulantet E, Cazeneuve C, Goossens M. Screening practices in the CFTR Gene ABCC7. *Hum Mut* 2000; 15: 135–149.
19. Groman JD, Hefferon TW, Casals T, et al. Variation in a repeat sequence determines whether a common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 176–179.
20. Houštěk J, Vávrová V. K výskytu cystické fibrosy pankreatu v ČSSR. *Čs Pediat* 1962; 17: 445–451.
21. Houštěk J, Vávrová V. Frequency and forms of mucoviscidosis in Czechoslovakia. *Čs Pediat* 1965; 20: 412–414.
22. Houštěk J, Vávrová V. Notre expérience à propos de la mucoviscidose. *Rev Med Liège* 1967; 22: 421–426.
23. Houštěk J, Vávrová V. Výskyt a klinické formy mukoviscidosy. *Prakt Lék* 1969; 49: 219–222.
24. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, et al. Identification of the cystic fibrosis gene. Genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073–1080.
25. Kiesewetter SS, Macek Jr M, Davis C, et al. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nature Genetics* 1993; 5: 274–278.

26. Knowles MR, Gatzky JT, Boucher RC. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *New Eng J Med* 1981; 305: 1489–1495.
27. Lewis PA. The epidemiology of cystic fibrosis. In: Hodson ME, Geddes DM, eds. *Cystic Fibrosis*. 2nd ed. London: Arnold, 2000; 13–25.
28. Littlewood J. The history of the development of cystic fibrosis care. Perspective of a general paediatrician at a provincial teaching hospital. Available from: <http://www.cysticfibrosismedicine.com>
29. Macek M Jr, Macek M, Krebsová, et al. Possible association of the allele status of the CS.7/HhaI polymorphism 5' of the CFTR gene with postnatal female survival. *Hum Genet* 1997; 99: 565–572.
30. Macek Jr M, Krebsová A, Macek M, et al. Current possibilities of prenatal and postnatal molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis in Czech and Slovak Republics. *Čs Pediat* 1997a; 52: 557–564.
31. Macek M Jr, Mercier B, Macková A, et al. Sensitivity of the denaturing gradient gel electrophoresis technique in detection of known mutations and novel Asian mutations in the CFTR gene. *Hum Mut* 1997b; 9: 136–147.
32. Macek M Jr, Vávrová V. Cystická fibróza. Model komplexní patogeneze u monogenních onemocnění. *Postgrad Med* 2002; 4: 530–534.
33. Macek M, Macek M Jr, Krebsová A. Molekulárně genetická diagnostika v prenatální genetické prevenci VVV a chorob. In: Prenatální diagnostika. Hájek Z, Kulovaný E, Macek M, eds. Praha: Grada, 2000.
34. Macek M, Vilímová Š, Potužníková P, et al. Využití lékařské genetiky v reprodukční medicíně. *Čas Lék čes* 2002; 141: 28–34.
35. Macháčková E. Disease-causing mutations versus neutral polymorphism. Use of bioinformatics and DNA diagnosis. *Čas Lék čes* 2003; 142: 150–153.
36. Matthews LW, Doershuk CF, Wise M, et al. A therapeutic regimen for patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1964; 65: 558–575.
37. Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 1983; 301: 421–422.
38. Quinton PM. Physiological basis of cystic fibrosis. A historical perspective. *Physiol Rev* 1999; 79: 3–22.
39. Quinton PM. Dueling with cystic fibrosis. Finding the chloride defect. In: Doershuk CF, ed. *Cystic Fibrosis in the 20th Century. People, Events and Progress*. Cleveland, Ohio: AM Publishing, Ltd, 2000; 36–55.
40. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, et al. Identification of the cystic fibrosis gene. Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066–1073.
41. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059–1065.
42. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis. A consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* 1998; 132: 589–595.
43. Shwachman H, Kulczycki LL. Long-term study of 105 cystic fibrosis patients. *Am J Dis Child* 1958; 96: 6–15.

44. Schiøtz PO, Hoiby N, Flensborg EW. Cystic fibrosis in Denmark. In: Warwick WJ, ed. 100 Years of Cystic Fibrosis. Minnesota: 1981; 141–146.
45. Švejcar J, Benešová D, Houštěk J. Cystická fibrosa pankreatu. Čas Lék čes 1948; 87: 1116–1122.
46. Tomášová H, Vávrová V, Vokáč Z. Metodika stanovení chloridů v potu v diagnostice mukoviscidosy. Čs Pediat 1962; 17: 324–331.
47. Vávrová V, Zemková D, Bartošová J, Macek M Jr. Cystická fibrosa. Postgrad Med 1999; 1: 24–32.
48. Vávrová V, Zemková D, Macek M Jr. Pohled na cystickou fibrózu v roce 2002. Trendy v medicíně 2002; 4: 24–34.
49. Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, et al. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. 8th ed. New York: McGraw-Hill Inc., 2001; Vol III, Chapter 201.
50. Zielenski J. Genotype & phenotype in cystic fibrosis. Respiration 2000; 67: 117–133.

2.1 Molekulárně genetická a patofyziologická podstata cystické fibrózy

2.1.1 Gen *CFTR*

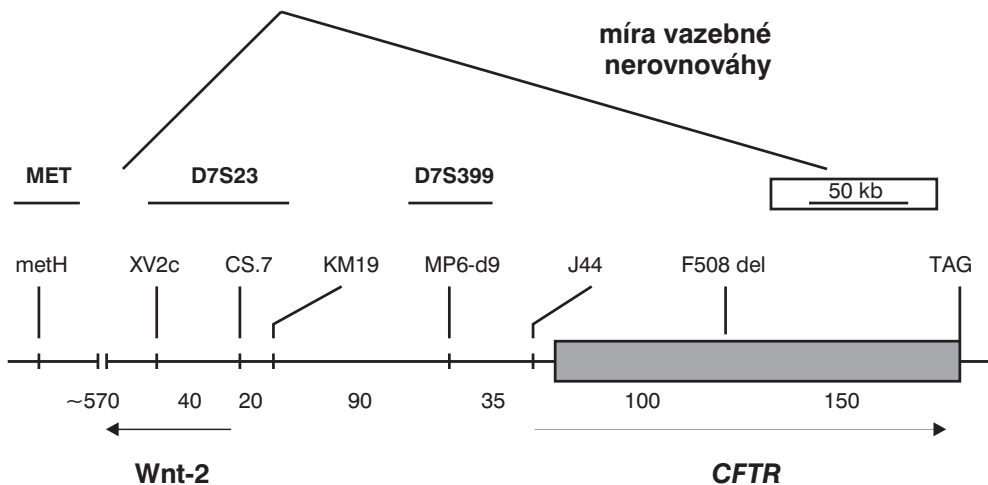
Poté co byl v roce 1946 potvrzen autozomálně recesivní charakter dědičnosti CF (kap. 1.3), začalo celosvětové úsilí o hledání defektního proteinu, který by zodpovídal za patogenezi CF [3]. Teprve výrazný pokrok v molekulární genetice od 80. let minulého století umožnil lokalizovat gen zodpovědný za CF metodou tzv. pozičního klonování, tj. aniž by byla známa jeho funkce nebo příslušný protein [79].

Nejprve byl gen pro CF mapován na chromozom 7 pomocí segregace CF s enzymem paraoxonázou a brzy poté byl identifikován anonymní marker DOCRI-917, který úzce segregoval s lokusem CF na dlouhém raménku chromozomu 7 v oblasti 7q31.3. Upřesnění lokalizace genu pro CF umožnilo objev dalších vázaných markerů, jako jsou například methI a D7S8, které jsou v daleko užší vazbě ($< 1\text{cM}$) se samotným genem CF. Další studie potvrdily, že tyto markery překrývají gen CF v pořadí meth/CF-lokus/D7S8 [8].

Objev extragenových dinukleotidových markerů vázaných ke genu pro CF ve druhé polovině 80. let minulého století měl i významný praktický dopad. Umožnil totiž nepřímou molekulárně genetickou prenatální a postnatální diagnostiku a odhalení nositelů CF zjištěním segregace markerů CF vyšetřením probanda a jeho rodičů, nepostižených, obligátních (tj. nemanifestujících) heterozygotů [84].

Určení oblasti na chromozomu 7, ve které se nachází *CFTR* lokus, vedlo nejprve k nalezení kandidátního genu pro CF [28]. Analýza předpovězené sekvence aminokyselin tohoto genu však prokázala, že tento gen (později nazvaný int-related protein, *IRP*, nyní přejmenovaný na *Wnt-1*) patří do skupiny růstových faktorů, které z fyziologického hlediska neodpovídají kandidátnímu genu pro CF [30]. Následný nález rodin s rekombinací mezi *IRP* a CF tento gen jednoznačně vyloučil [30, 89, 90].

I přes toto zklamání byly v rámci genu *IRP* objeveny další dva SNP markery XV2c/TaqI, v samotném genu *IRP* a Km19/PstI, v jeho 5' oblasti, které jsou v mimořádně vysoké vazebné nerovnováze s CF lokusem a jejichž četnost rekombinací v rodinách s CF je menší než 1 % [28, 57]. Vazebná nerovnováha v rámci lokusu *CFTR* se samotnou CF je paradoxně nejvyšší právě v oblasti markerů Km19-CS7-XV2c, vzdálených přibližně 190 kb v 5' oblasti od promotoru genu CF (obr. 2.1). Tyto markery jsou v prakticky absolutní vazebné nerovnováze [57] a tvoří hlavní součást tzv. haplotypu „B“ (XV2c/TaqI alela „1“ – nepřítomnost restrikčního místa a Km19/PstI alela „2“ – přítomnost příslušného restrikčního místa). Posléze byla vazebná nerovnováha rozšířena na skupinu dalších extragenových SNP markerů – meth/MspI, CS7/HhaI, Mp6-d9/MspI a J44/XbaI, které pokrývají oblast až 750 kb dlouhou, a to až po marker J3.11/MspI lokalizovaný z 3' strany genu *CFTR* (obr. 2.1). Nález vysoké vazebné nerovnováhy také znamenal, že v genu CF s pravděpodobností existuje



Obr. 2.1 Vazebná nerovnováha v oblasti genu *CFTR*

Je pozoruhodné, že vazebná nerovnováha je nejvyšší v 5' oblasti od promotoru genu *CFTR* v oblasti markerů CS.7 / Km19 a zasahuje až 190 kb před promotorovou oblast genu *CFTR* [66].

pouze jedna hlavní patogenní mutace [57] a má klíčový význam pro spolehlivou nepřímou molekulárně genetickou diagnostiku tohoto onemocnění [84].

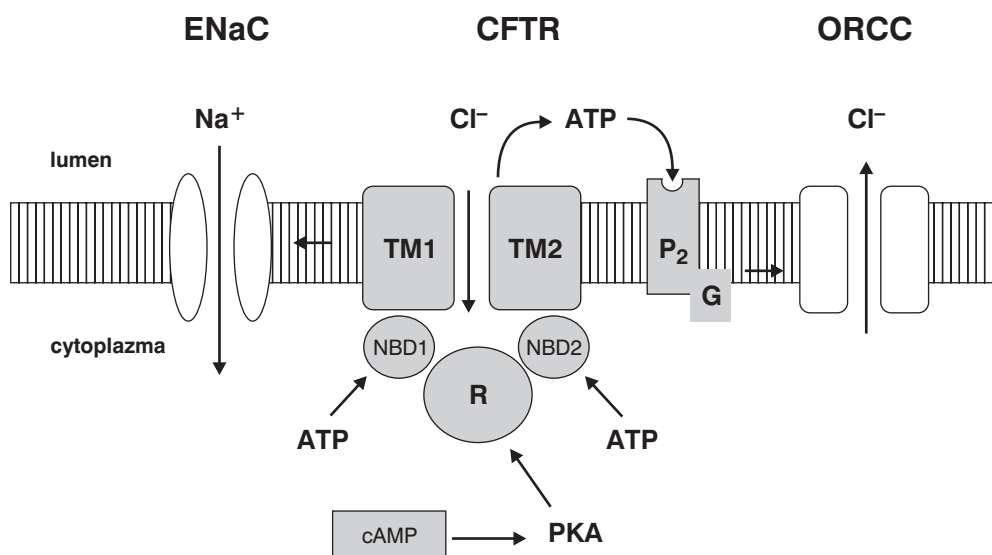
Gen CF byl s konečnou platností lokalizován pozičním klonováním v rámci chromozomálního úseku 7q31.3. To umožnilo v srpnu 1989 publikovat objev genu CF v sérii tří následných článků v časopise Science, které popsaly jeho klonování, genetickou a fyziologickou predikční analýzu [57, 79, 81].

Tento gen byl nazván „prozetelné“ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, ve zkratce gen *CFTR*, tj. volně přeloženo regulátor transmembránové vodivosti iontů [79]. V současné době je tento gen také nazýván podle nové terminologie ABCC7 [44]. Detailně je jeho současná klasifikace, terminologie a charakteristika uvedena na webové stránce OMIM (www.pubmed.com – OMIM; registrační číslo 602421).

Genetickou analýzou v reprezentativním souboru kanadsko-amerických rodin nemocných s CF byla nalezena hlavní a nejčastější mutace CF, delece 3 pb v exonu 10 genu *CFTR* – F508del (podle dřívější nomenklatury rovněž nazývaná $\Delta F508$). Tato mutace se nalézá v celkem 750 kb dlouhé oblasti silné vazebné nerovnováhy na základním haplotypu „B“ (obr. 2.1–2.2) [57]. Později se také potvrdilo, že většina dalších častých patogenních mutací v genu *CFTR* se rovněž nachází na pozadí haplotypu „B“ [58, 25]. Tento nálezní potvrzuje, že selekční výhoda nositelů mutací genu *CFTR* je dána nejenom samotnými mutacemi, které pravděpodobně v heterozygotní podobě snižují závažnost bakteriálních průjmových onemocnění, ale také tím, že faktory v 5' oblasti (okolo markeru Km19) zvyšují celkovou zdatnost („fitness“) nositelů haplotypu „B“ [66].

Nositelé závažných mutací v genu *CFTR* jsou odolnější k průjemovým onemocněním, protože bakteriální enterotoxiny mohou vyvolat pouze poloviční sekretorickou odpověď ve střevě (nosiči mutací mají totiž pouze poloviční „dávku“ plně funkčních proteinů CFTR). Celosvětové rozšíření průjemových onemocnění však není v souladu s praktickou nepřítomností CF u východoasijských populací. Z tohoto důvodu je snaha nalézt další, etnicky specifické genetické faktory vně genu *CFTR* a v rámci haplotypu „B“, které by byly zodpovědné za zvýšenou četnost nositelů v evropských populacích.

Gen *CFTR* má 27 exonů a rozprostírá se v oblasti přibližně 250 kb dlouhé [79, 81]. Genový produkt, který je kódován tímto genem, se nazývá protein CFTR, který se skládá z 1480 aminokyselin a patří do nadrodiny tzv. „ATP-binding cassette“ transmembránových transportních proteinů. Protein CFTR plní především funkci chloridového kanálu, ale také reguluje i další ostatní chloridové, například „outwardly rectified chloride channels“ (ORCC) nebo sodíkové „epithelial sodium (Na^+) channels“ (ENaC) kanály [79, 98] (obr. 2.3).



Obr. 2.3 Jednodimenzionální schéma regulačních funkcí proteinu CFTR

Protein CFTR a jeho domény, ATP = adenosintrifosfát, cAMP = cyklický adenosinmonofosfát, ENaC = epitelový sodíkový kanál, P₂G = G protein funguje jako přenašeč molekulárních signálů, ORCC = „outwardly rectified chloride channel“; protein CFTR pozitivně reguluje sekreční chloridový kanál ORCC a negativně reguluje resorpční kanál ENaC

Dosud však není přesně známo, jaké genetické a negenetické faktory regulují transkripci genu *CFTR*, který patří mezi evolučně vysoce konzervované provozní („housekeeping“) geny [98]. Prokázalo se také, že transkripce genu *CFTR* začíná na několika místech, tj. například na methioninu na začátku exonu 4. Funkční význam tohoto alternativního startu transkripce není zatím znám. Rovněž tak transkripce je

výrazně tkáňově specifická, protože neepiteliální buňky mají pouze minimální množství *CFTR*-mRNA. V současné době je snaha nalézt tkáňově specifické transkripční faktory, které by zodpovídaly za rozdílnou expresi proteinu CFTR v různých tkáních a tak objektivizovaly variabilní průběh CF [89]. Je zajímavé, že pomocí RNA analýzy byly nalezeny izoformy *CFTR*-mRNA. Například *CFTR*-mRNA v ledvinách nemá části exonů 13 a 14A, a je proto nepravděpodobné, že by takto fyziologicky pozměněný protein fungoval jako chloridový kanál. Je však pozoruhodné, že i „neúplný“ protein CFTR má většinou zachovanou regulační funkci dalších iontových kanálů [89].

V této souvislosti je dokumentována zajímavá skutečnost, že se dysfunkce proteinu CFTR v ledvinách klinicky neprojevuje [56]. Může to být dáno jak „molekulárním bypassem“ jeho kanálové funkce dalšími iontovými kanály, tak i tím, že protein CFTR má v ledvinách další, dosud neznámou funkci [92]. Studium izoform proteinu CFTR bude patřit k nejobtížnějším, ale současně i nejzajímavějším součástem základního výzkumu CF s významným klinickým dopadem.

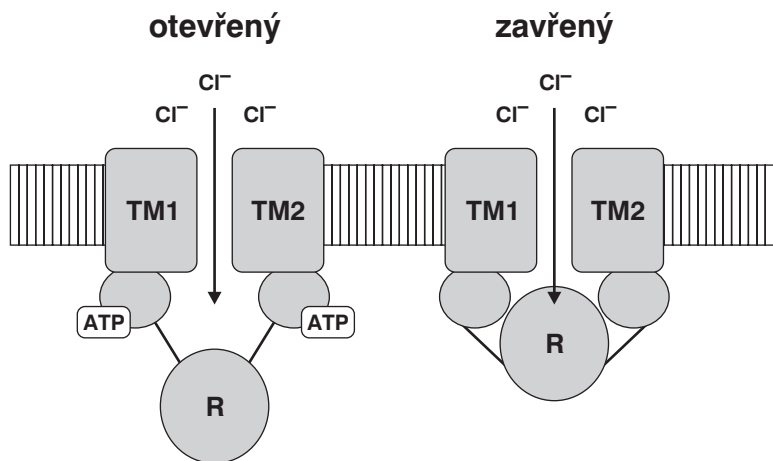
Například u zdravého králíka zcela chybí exon 5 genu *CFTR*, zatímco u lidí je patogeneticky nejdůležitější alternativní sestřih exonu 9, vedoucí ke vzniku isoformy *CFTR* 9- (tj. bez exonu 9), která je spojena s variantami IVS-8 5/7/9T [59] (blíže kap. 21).

2.1.2 Protein CFTR

Protein CFTR patří do skupiny „ABC transportérů“ (blíže www.pubmed.com – OMIM; registrační číslo 602421 a databáze SwissProt). Tato proteinová nadrodina je zodpovědná za transport malých molekul, jako jsou například některé ionty (Cl^-), cytotatika, proteiny, ATP a disacharidy [89]. Protein CFTR se skládá ze dvou opakujících se motivů transmembránových segmentů: TM1 a TM2 (transmembrane domains; synonymum MSD1 a MSD2 – „membrane spanning domain“) a v cytoplazmě lokalizovaných domén vázajících aktivované nukleotidy, tj. hlavně ATP (adenosintrifosfát). NBD1 a NBD2 (nucleotide binding domains) a z jednoho nepárového motivu – regulační domény „R“ (regulatory domain) (obr. 2.3 a 2.4). Protein CFTR funguje jako chloridový kanál, který je aktivovaný cAMP prostřednictvím fosforylace „R“ domény proteinkinázou a následnou hydrolýzou ATP na povrchu NBD1 a NBD2 [4, 89].

Podle mechanického modelu funkce proteinu CFTR transmembránové domény TM1 a TM2 vytvářejí vlastní chloridový kanál, spojující cytoplazmatickou oblast s lumen exokrinních žláz, a ukotvují protein CFTR v buněčné membráně. Domény NBD1 a NBD2 jsou konformačně aktivní a umožňují zavírání a otevírání chloridového kanálu „vertikálním posunem“ regulační domény „R“ (obr. 2.3 a 2.4). Podle tohoto „mechanického“ modelu fungování proteinu CFTR „R“ doména funguje jako jakýsi „ventil“, který uzavírá tok iontů chloridovým kanálem proteinu CFTR.

U CF je generalizovaně defektní epiteliální transport chloridových iontů, který je daný poruchou funkce proteinu CFTR, jakožto chloridového kanálu [79, 92]. Protein CFTR je exprimován tkáňově specifickým způsobem, a to ve shodě s klinickým obrazem CF [56].



Obr. 2.4 Mechanický model regulace toku iontů kanálem proteinu CFTR

Tento model fungování proteinu CFTR předpokládá vazbu ATP na konformačně aktivní doménu NBD1, které pomocí vertikálního pohybu regulační domény „R“ nechávají iontový kanál buďto otevřený, nebo zavřený.

V dýchacích cestách se protein CFTR nachází na apikální membráně buněk submukózních žlázek dýchacích cest, zatímco v potní žláze je jak v apikální, tak i v bazální části sekretorických buněk. Protein CFTR se nachází v epiteliálních buňkách zodpovědných za patogenezi CF, tj. např. v submukózních žlázkách bronchiolů, v malých vývodech pankreatu, ve vývodech potní žlázy a v malých biliárních vývodech [79]. Protein CFTR byl také nalezen v submukózních žlázkách jejunoileu, Brunnerových žlázkách duodena, kolon a v testes [98]. Protein CFTR se rovněž dosud ne zcela jasným způsobem exprimuje i v průběhu ontogeneze, především mužského reprodukčního traktu v rámci embryonálních struktur mesonephros – Wolffových embryonálních vývodů [89].

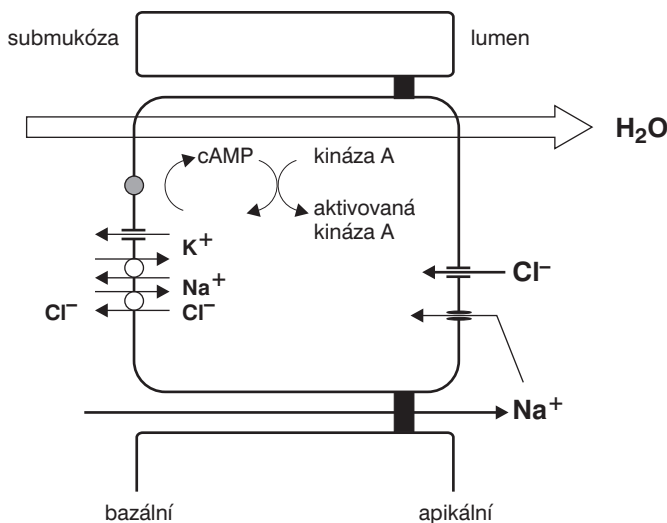
Imunohistochemické studie jsou v souladu s expresními studiemi *CFTR*-mRNA [56]. V této souvislosti je pozoruhodná nepřítomnost klinicky zjevného postižení ledvin a centrálního nervového systému u CF, při celkové expresi germinálními mutacemi poškozeného proteinu CFTR [56, 89].

Názory na podstatu iontové poruchy u CF prošly v posledních několika letech vývojem a dosud není úplná podstata iontového defektu u CF zcela jasná [4, 89]. V současné době se odborné názory ustálily na tom, že v důsledku narušení proteinu CFTR, jakožto chloridového kanálu, dochází k abnormálnímu transportu chloridových a sodíkových iontů přes epiteliální membrány. Tím je porušena osmotickými mechanismy podmíněná hydratace mukoidních sekretů dýchacích cest a vývodů pankreatu. Tento mechanismus vede k jejich zvýšené viskozitě, rekurentní obstrukci, produktivnímu a resorpčnímu zánětu a progresivní destrukci postižených cílových orgánů, tj. plic, slinivky břišní a mužského reprodukčního systému ireverzibilní fibrotizací.

Zvýšená viskozita sekretů v plicních bronchiolích je dána rovněž vysokomolekulární DNA, která se uvolňuje z rozpadlých buněk při chronickém zánětu [39]. V principu je tedy CF podmíněna kombinací sekretorického a resorpčního defektu jak chloridových, tak sekundárně i sodíkových iontů [92]. Hlavní patogenetický princip CF tedy spočívá v inaktivitě chloridových a hyperaktivitě sodíkových kanálů [89].

Schematicky je podstata kombinovaného sekretoricko-resorpčního defektu u CF znázorněna na obr. 2.3, 2.4 a 2.5. Za normálního stavu Na^+ a Cl^- ionty prostupují mezibuněčnými membránami a osmoticky s sebou „táhnou“ vodu. Tímto způsobem je zajištěna správná hydratace vývodů exokrinních žláz. U CF je resorpční funkce proteinu CFTR porušena a současně není proteinem CFTR inhibován resorpční sodíkový kanál ENaC (obr. 2.3). Tento vzájemně provázaný patogenetický mechanismus vede k iontové nerovnováze v lumen vývodů exokrinních žláz, dehydrataci mukoidních sekretů exokrinních žláz a k poruše funkce faktorů vrozené imunity, které jsou velmi citlivé na iontovou nerovnováhu v extracelulárním prostředí [92].

Kombinovaný sekretoricko-resorpční defekt u CF ukázal na skutečnost, že protein CFTR reguluje v rámci buňky i další iontové kanály, jako je například další



Obr. 2.5 Model proteinem CFTR zprostředkované resorpce chloridových a sodíkových iontů v potní žláze

Za normálního stavu jsou mukoidní sekrety hydratovány volným paracelulárním tokem sodíkových a chloridových iontů, přičemž jejich výsledná extracelulární koncentrace je dána resorpční aktivitou CFTR a ENaC iontových kanálů. *Poznámka:* Navržený model je platný pro potní žlázu, kde porucha proteinem CFTR zprostředkované resorpce iontů vede k diagnosticky zvýšeným koncentracím chloridů v potu. Jiné studie například uvádějí „opačný“ tok iontů v dýchacích cestách, pankreatu nebo jejunoileu. Je však zřejmé, že složení periciliární tekutiny dýchacích cest je velmi obtížné přesně analyzovatelné a uvedený model se bude jistě zpřesňovat s rozvojem fyziologických diagnostických mikrometod.

chloridový kanál ORCC. Dosud však není vyřešeno, zda je protein CFTR schopný regulovat kanály pro další ionty (například draselné, kalciové apod.) v dalších buňkách a nebo dokonce jiných tkáních [92]. Aktivační/inhibiční profily CFTR a ORCC chloridových kanálů jsou fyziologicky vyšetřovány *in vitro* měřením intenzity toku iontů, tj. hlavně Na^+ a/nebo Cl^- , přes buněčné membrány, *in vivo* metodami „patch-clamping“, vyšetřením odtoku radioaktivně značených chloridových iontů *in vitro* pomocí tzv. „chloride efflux assay“ a inhibičními analýzami toku iontů přes ORCC pomocí DIDS (kyseliny 4,4'-diizothio-cyanato-stilbene-2,2'-disulfonové) nebo CFTR pomocí glybenklamidu [98].

Je pozoruhodné, že protein CFTR rovněž funguje jako „internalizační“ endocytózní receptor pro oportunní mikroorganismy, jako je především *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* a *Aspergillus fumigatus* [78]. Navíc proteinem CFTR zprostředkovaná acidifikace intracelulárních fagocytárních endozomů je zodpovědná za zvýšenou náchylnost pacientů s CF ke kolonizaci oportunními patogeny [89], protože nedochází k jejich účinné intracelulární destrukci po jejich fagocytóze makrofágy.

Detailně jsou všechny tyto další funkce proteinu CFTR diskutovány z pohledu jejich možné patogeneze CF v přehledné kapitole v monografii Welshe et al. [89]. S rozvojem studia funkce proteinu CFTR je zřejmé, že budou jistě objeveny jeho další role a patogenetické vazby.

2.1.3 Mutace a varianty v genu *CFTR*

Do současné doby bylo nalezeno více než 1300 alterací nukleotidové sekvence genu *CFTR* v různých světových populacích. Jedná se prakticky pouze o mutace germinální (tj. zárodečného původu, vyskytující se tak ve všech buňkách jedince), protože somatické mutace (jako jsou například u nádorů) nebyly v genu *CFTR* dosud popsány. Mutace v genu *CFTR* jsou tedy „ancestrální“ povahy a jsou proto přenášeny z generace na generaci. Germinální *de novo* mutace (časté například u autozomálně dominantních onemocnění) jsou v genu *CFTR* velmi vzácné. V této souvislosti je nutno zdůraznit, že ne všechny dosud nalezené změny sekvence genu *CFTR* lze považovat za patogenní změny – tj. mutace. U více než 400 dosud evidovaných mutací není rovněž jednoznačně určen jejich patogenní potenciál [44, 82].

Aktuální stav distribuce mutací v genu *CFTR* je uveden v pravidelně aktualizované mutační databázi vedené torontskou pracovní skupinou. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC; <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). Databáze CFGAC je výsledkem dlouhodobé spolupráce více než 100 předních světových genetických laboratoří. CFGAC jsou také průběžně hlášeny nové mutace genu *CFTR*, a to před jejich publikováním [88].

Základní a nejčastější mutací genu *CFTR* je delece 3 pb, která vede ke ztrátě fenylalaninu („F“ v jednopísmenném kódu aminokyselin) na pozici 508 proteinu proteinu CFTR – F508del [57] (obr. 2.2 v barevné příloze a 2.6). Nachází se v exonu 10 genu *CFTR* a porušuje tak funkci klíčové domény proteinu CFTR-NBD1. Tato mutace je více než 50 000 let stará a má jeden společný původ [77]. Nachází se celosvětově

v průměru na 66 % všech CF chromozomů u všech dosud testovaných pacientů s CF (tab. 2.1) [10, 27, 88].

Tab. 2.1 Celosvětový přehled 45 nejčastějších patogenních mutací genu *CFTR* s četností > 0,1 %

	mutace	molekulární patogeneze	svět (43849)	USA (25030)	Evropa (27177)	výskyt
1	G85E	Gly → Glu na pozici 85	0,15	0,17	0,21	středozezí
2	E92K	Glu → Lys na pozici 92	<0,1	<0,1	5,13#	Turecko
3	A96E	Ala → Glu na pozici 96	<0,1	<0,1	2,30#	Turecko
4	CFTRde- le2,3(21kb)	delece exonů 2 a 3	0,51	<0,1	1,00#	Slované
5	394delTT	delece TT od nukl. 394	0,10	<0,1	0,16#	oblast Baltu
6	R117H*	Arg → His na pozici 117	0,30	0,67	0,29	Anglosasové
7	451+1 G→A	sestříhová porucha mRNA	<0,1	<0,1	3,81#	Ashk. Židé
8	457TAT→A	TAT → A od nukl. 457	<0,1	<0,1	0,12#	jižní Alpy
9	H139L	His → Leu na pozici 139	<0,1	<0,1	7,02#	Arabové
10	M152V	Met → Val na pozici 152	<0,1	<0,1	0,12#	Turecko
11	621+1G→T	sestříhová porucha mRNA	0,72	0,90	0,54	F. Kanad'ané
12	711+1G→T	sestříhová porucha mRNA	0,11	<0,1	0,11	F. Kanad'ané
13	1078delT	posun se stop kodónem	0,13	<0,1	0,13	Bretonci
14	R334W	Arg → Trp na pozici 334	0,12	0,22	0,16	vých. Evropa
15	R347P	Arg → Pro na pozici 347	0,24	0,24	0,20	stř. Evropa
16	R347H	Arg → His na pozici 346	<0,1	<0,1	5,13#	Turecko
17	A455E*	Ala → Glu na pozici 455	0,14	0,12	0,20	Holand'ané
18	1677delTA	del TA od nukleotidu 1677	<0,1	<0,1	0,44#	Černomoří
19	I507del	delece Ile na pozici 507	0,21	0,31	0,23	Anglosasové
20	F508del	delece Phe na pozici 508	66,00	68,8	66,8	Evropané
21	1717-1G→T	sestříhová porucha mRNA	0,65	0,28	0,83	Francie/Itálie
22	G542X	nestabilní mRNA	2,42	2,43	2,64	středozezí
23	G551D	Gly → Asp na pozici 551	1,64	2,12	1,50	Keltové
24	R533X	nestabilní mRNA	0,73	0,90	0,75	stř. Evropa
25	S549N	Ser → Asn na pozici 549	<0,1	<0,1	0,10	středozezí
26	S549R	Ser → Arg na pozici 549	<0,1	<0,1	2,02#	Arabové
27	R560T	Arg → Thr na pozici 560	0,15	0,19	0,18	Severní Irsko

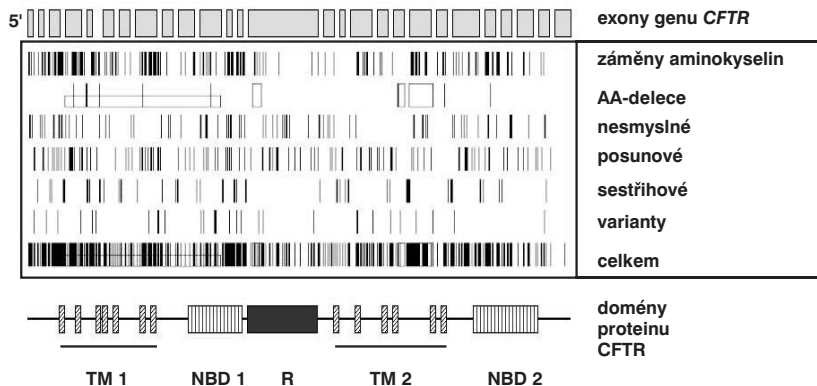
28	1548delG	delece G od nukl. 1548	<0,1	<0,1	15,02#	Arabové
29	1898+1G→A	sestříhová porucha mRNA	0,12	<0,1	0,22	Wales
30	2789+5G→A*	sestříhová porucha mRNA	0,12	0,31	0,11	vých. Evropa
31	2143delT	posun se stop kodónem	<0,1	<0,1	0,27#	Slované
32	2183AA→G	posun se stop kodónem	<0,1	<0,1	0,29#	Tyrolsko
33	2184insA	posun se stop kodónem	<0,1	<0,1	0,28#	Slované
34	E822X	předčasný stop kodón	<0,1	<0,1	0,12#	Řekové
35	3120+1 G→A	sestříhová porucha mRNA	0,6	1,0	<0,1	Afrika/Arábie
36	R1070Q	Arg → Gln na pozici 1070	<0,1	<0,1	0,14#	Bulhaři
37	M1101K	Met → Lys na pozici 1101	<0,1	<0,1	69,01#	Habáni
38	R1158X	předčasný stop kodón	<0,1	<0,1	0,11#	Řekové
39	R1162X	předčasný stop kodón	0,29	0,22	0,51	sev. Itálie
40	3569delC	posun se stop kodónem	0,12	0,17	0,14	Švédové
41	3849+10kb C→T*	sestříhová porucha	0,24	0,67	0,15	Ashk. Židé
42	3905insT	posun se stop kodónem	<0,1	<0,1	0,10#	Švýcaři
43	W1282X	nestabilní mRNA	1,22	1,41	1,01	Ashk. Židé
44	N1303K	Asn → Lys na pozici 1303	1,34	1,25	1,64	středomoří
45	4374+1 G→A	sestříhová porucha mRNA	<0,1	<0,1	0,8#	Slované

Mutace jsou seřazeny vzestupně podle jejich výskytu v jednotlivých exonech genu *CFTR*; jsou znázorněny patogenní mutace vyskytující se > 0,1 % ve 3 reprezentativních souborech; čísla v závorkách uvádějí počet testovaných CF chromozomů.

* = mutace může být spojena s atypickou CF; Ashk. Židé = Ashkenazi – židovské populace, F. Kanad'ané = francouzští Kanad'ané; nukl. = nukleotid; # = mutace, které jsou časté pouze v uvedených populacích nebo oblastech [10]

Na obrázku 2.6 je uvedena distribuce jednotlivých mutací v rámci genu *CFTR*. Většina mutací je rovnoměrně rozložena po celé kódující sekvenci a postihuje tak všechny jednotlivé funkční domény proteinu CFTR. Mutace v exonech 3–7 postihují funkci domény TM1, v exonech 9–12 porušují funkci domény NBD1, v exonu 13 postihují funkci „R“ domény, v exonech 14–18 porušují funkci domény TM2 a v exonech 19–22 narušují fungování domény NBD2 proteinu CFTR.

Z celkového počtu dosud známých mutací v genu *CFTR* pouze přibližně 20 mutací – F508del, G542X, G551D, R553X, 1717-1 G→A, 621+1 G→T, W1282X, N1303K, 3849+10kb C→T, CFTRdele2,3/21kb/, 1677delTA, 2184insA, 2143delT, R334W, R347P, R1162X, 2183AA→G, 394delTT, 1898+1G→A a 3120+1 G→A – představuje celosvětově populačně a klinicky nejdůležitější alely genu *CFTR* ve vel-



Obr. 2.6 Distribuce jednotlivých typů mutací v celé kódující sekvenci genu *CFTR*

TM1 a TM2 = transmembránové domény, NBD1 a NBD2 = domény, které vážou ATP, R = regulační doména, AA = delece, které nepoškozuji čtecí rámec genu *CFTR*, jako například mutace F508del (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>)

kých heterogenních evropsko-amerických bělošských populacích (tab. 2.1). Ostatní mutace jsou vzácné, tj. „privátní“ a vyskytují se ojediněle v jednotlivých rodinách s CF [27]. Tyto mutace je však velmi obtížné rutinně molekulárně geneticky vyšetřovat.

Některé celosvětově jinak vzácnější mutace však mohou dosáhnout pozoruhodně vysokých četností, tj. až 5 %, v některých izolovaných populacích v důsledku genetického driftu, jako například mutace G551D u keltských populací, nebo v důsledku efektu zakladatele, jako například mutace W1282X u Ashkenazi – židovských populací. Přehled nejčastějších mutací a jejich etnická a regionální distribuce jsou uvedeny v publikaci Bobadilla et al. [10]. Pro potřeby této monografie se dále budeme zabývat pouze distribucí mutací u české a slovenské populace.

U většiny jednotlivých mutací genu *CFTR* byl haplotypovou analýzou jejich intragenového pozadí pomocí markerů nalezen jejich společný původ [77]. Tak lze objektivně sledovat populačně genetické a historické vazby, které utvářely současný genofond evropských populací [10]. Naopak u několika častých mutací, které vznikly v rámci CpG dinukleotidu, jako jsou například mutace R553X, R117H a R334W, byl prokázán jejich nezávislý původ („rekurentní charakter“), což vysvětluje jejich přítomnost v geneticky nepříbuzných populacích.

Nejčastějšími mutacemi v genu *CFTR* jsou záměny aminokyselin („missense“ mutace). Tyto mutace tvoří 42 % všech dosud známých mutací tohoto genu a jejich typickým příkladem je mutace G551D. Posunové („frameshift“) mutace způsobující poruchu čtecího rámce vložím určitého počtu nukleotidů, který není dělitelný třemi. Vyskytují se ve 23 % všech případů a jejich typickým představitelem je alela 2143delT. Nesmyslné mutace („nonsense“) vytvoří předčasný stop kodón z původní-

ho kodónu příslušné aminokyseliny. Vyskytují se v 17 % všech případů a jejich typickým představitelem je například mutace G542X a vedou k tvorbě nestabilní *CFTR*-mRNA (tab. 2.1). Abnormální sestřih exonů genu *CFTR* způsobují sestřihové mutace („splicingové“), které se vyskytují ve 12 % všech případů. Jejich typickým představitelem je například mutace 1898+1 G→A [10].

Pokud se sestřihové mutace nacházejí v „konsenzuální“ sestřihové sekvenci na rozhraní exonů a intronů v oblasti ± 5 pb od začátku nebo konce exonu, je možné je asociovat s rozvojem klasické formy CF [82]. Existují však i výjimky, jako je například mutace 3272-26 A→G, která je relativně „hluboko“ v intronu a u které expresní studie potvrdily její patogenní potenciál spojený s rozvojem atypické formy CF [44].

V poslední době se nalézají pomocí analýzy *CFTR*-mRNA sestřihové mutace, které se nacházejí velmi „hluboko“ v intronech (až 10 kb) genu *CFTR*. Typickým příkladem jsou alely 3849+10kb C→T nebo 1811+1.6kb C→T, které vedou k aktivaci přepisu kryptických exonů v příslušných intronech tím, že vytvoří příslušná exon/intronová rozhraní [51, 54]. Klinický dopad mutací uložených hluboko v intronech není jednoznačný a je spojený se značnou fenotypickou variabilitou CF [89]. Tyto mutace způsobují diagnostické rozpaky, protože pacienti s těmito mutacemi jsou často pankreaticky suficientní a mají hraniční (30–60 mmol/l) koncentrace chloridů v potu.

V 6 % všech případů se vyskytují delece nebo inserce násobků tří pb DNA, které neporušují čtecí rámec genu *CFTR*. Typickým představitelem těchto mutací „hlavní“ delece genu *CFTR* – mutace F508del, která vede ke ztrátě kodónu pro aminokyselinu fenylalanin. Rozsáhlé intragenové delece postihují nebo nepostihují čtecí rámeček podle toho, zda je kódující sekvence příslušných exonů/intronů, kterou eliminují, dělitelná třemi. Typickým příkladem rozsáhlých intragenových delecí je „slovanská“ mutace *CFTR*dele2,3(21kb) [24]. Podle posledních studií jsou rovněž intragenové přestavby a rozsáhlé delece zahrnující několik exonů nebo přilehlých intronů v genu *CFTR* relativně časté (Audrezet MP, Chen JM, Raguenes O, et al. Genomic rearrangements in the *CFTR* gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms. Hum Mutat 2004; 23(4): 343–357.).

„Patogenní“ mutace nejsou dosud nalézány v promotoru genu *CFTR* nebo v oblasti pro polyadenylační signál *CFTR*-mRNA („3' untranslated region“). Ukazuje se však, že četné promotorové varianty, jako například 125 G/C, jsou v silné vazebné nerovnováze s dalšími mutacemi v genu *CFTR* [20]. Funkční dopad tohoto nálezu však není dosud znám, ale je velmi užitečný pro molekulární genetickou diagnostiku CF.

2.1.3.1 Mutace v patogenezi CF – třídy mutací genu *CFTR*

Přítomnost dvou mutací genu *CFTR*, paternálního a maternálního původu, v pozici *trans*, u nichž byla prokázána a/nebo předpověděna kauzální asociace s klasickou formou CF potvrzuje její klinickou diagnózu. Nepřítomnost mutací u klinicky jinak jednoznačného případu CF diagnózu nevylučuje (kap. 20). Mutace s prokázanou nebo předpovězenou kauzální asociací s CF se nazývají patogenní mutace („CF causing mutations“), oproti všem ostatním alteracím sekvence genu *CFTR* („*CFTR* gene mutations“) [82, 89].

Uvedená patogenetická klasifikace je velmi důležitá při použití mutační analýzy k diferenciální diagnostice CF a především v prenatální diagnostice, kdy je nutné roz-

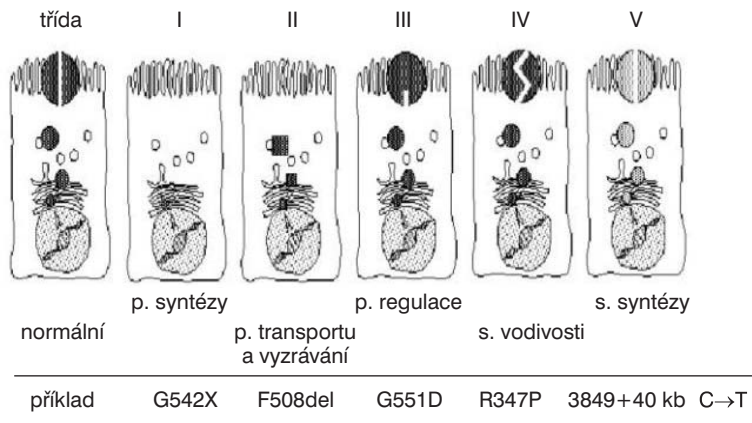
hodnout o tom, zda vyšetřovaný plod má klasickou formu CF [82]. V tomto ohledu je však velmi obtížné posoudit patogenetický dopad sestřihových mutací, které jsou dále než ± 5 pb v intronu od příslušného místa sestřihu. Příkladem je mutace 3849+10kb C→T spojená s atypickými a monosymptomatickými formami CF, u které jsou přítomny hraniční koncentrace chloridů v potu (viz výše). Dále je nutné přihlédnout ke vlivu intragenových variant v pozici *cis*, které mohou modifikovat patogenetický dopad „hlavní“ mutace, jako je tomu v případě mutace R117H a varianty IVS8-„5T“ (R117H-5T versus R117H-7T/9T) [59] (kap. 20).

V souhrnu je tedy nutné k přesné diferenciální diagnostice různých forem CF rozlišovat mezi mutacemi genu *CFTR*, tj. všemi mutacemi tohoto genu, a mutacemi, u kterých bylo potvrzeno, že způsobují CF. Předejde se tak nejen špatné interpretaci molekulárně genetického nálezu při genetickém poradenství, ale i zbytečné psychické iatrogenní traumatizaci vyšetřovaných pacientů a jejich rodin [98, 99].

Z patogenetického hlediska většina dosud známých nesmyslných, posunových a sestřihových mutací postihuje složení a/nebo funkci *CFTR*-mRNA. Přesný mechanismus této komplexní molekulární patogeneze není dosud i přes jeho intenzivní a více než desetileté studium přesně stanovený [89]. Navíc mnohé studie byly provedeny *in vitro* u buněk s uměle zvýšenou („over-expression“) expresí mutovaných proteinů CFTR, a tak nebylo jasné, zda tato situace nastává také *in vivo* u pacientů s CF. V souhrnu z uvedeného vyplývá, že studium molekulární patogeneze jednotlivých mutací v genu *CFTR* je velmi technicky a časově náročnou záležitostí. Navíc mnohé studie poskytují kontroverzní výsledky vzhledem k tomu, že jsou u nich používány nestandardní expresní metodiky, rozdílné buněčné kultury a malé soubory příslušných testovaných mutací. V roce 2000 proto vznikla v rámci konzorcia Evropské unie CF Thematic European Working Group on CFTR Expression, tj. Pracovní skupina pro expresní studie proteinu CFTR (www.cfnetwork.be), která si v první fázi svého působení vytýčila cíl sjednotit metodiku expresních studií u genu *CFTR*/proteinu CFTR. Podrobný popis molekulární patogeneze u jednotlivých typů mutací není předmětem této monografie a lze jej nalézt v přehledných článcích [89, 98].

Klinicky „závažné“ mutace genu *CFTR* jsou spojené s pankreatickou insuficiencí a většinou klasickou formou CF, zatímco „mírné“ mutace spíše s pankreatickou suficiencí a s atypickými formami CF (kap. 20). Vzhledem k tomu, že je velmi obtížné u jednotlivých mutací objektivně stanovit jejich molekulární patogenezi a tak předpovědět jejich klinický dopad, byla snaha je rozdělit do jednotlivých patogenetických tříd [88, 98].

K získání alespoň rámcového přehledu o funkčním dopadu různých mutací genu *CFTR* Tsui et al. [88] navrhli dosud stále platnou základní patogenetickou klasifikaci 5 tříd mutací genu *CFTR* na základě expresními studiemi potvrzeného a/nebo modelově předpovězeného mechanismu jejich molekulárních dysfunkcí (obr. 2.7). Později bylo původních 5 tříd rozšířeno o další 2 patogenetické třídy s postupným rozvojem poznání o molekulární patogenezi mutací genu *CFTR* [98]. V kapitole pojednávající o korelacích genotypu s fenotypem se z praktických důvodů však držíme pouze klasifikace do tříd I–V. V budoucnu možná budou s rozvojem znalostí o molekulární patogenezi porušené funkce proteinu CFTR stanoveny ještě další třídy mutací nebo budou dosavadní třídy „zkonsolidovány“ jako v případě nové klasifikace navržené



Obr. 2.7 Základní patogenetické třídy mutací genu *CFTR*

p – porucha funkce, s – snížení funkce CFTR proteinu [88, 98]

Welshem et al. [89]. Tito autoři navrhuji pouze 4 základní patogenetické třídy mutací genu *CFTR*, poté co sloučili třídy I (kvalitativní defekt syntézy proteinu CFTR) a V (kvantitativní defekt syntézy proteinu CFTR) do jedné společné třídy a ponechali původní patogenetické třídy II–IV. Další třídy, tj. VI–VII jsou proto dnes považovány za „nadstavbové“, a tak doplňující charakteristiku 4 základních tříd nové klasifikace [98]. Dále uvádíme základní charakterizaci jednotlivých tříd mutací podle jejich převažujícího a společného patogenetického dopadu.

Třída I. „Narušená syntéza proteinu CFTR, který tak chybí na apikální membráně.“ Tyto mutace blokují syntézu nebo těžce alterují strukturu proteinu CFTR. Jedná se tedy hlavně o nesmyslné mutace, jako jsou například alely G542X, R553X, R1162X a W1282X, které zavedou předčasný stop-kodón do sekvence genu *CFTR*. Jsou zde zařazeny i posunové mutace, jako například alely 2143delT, 2184insA a 2183delAA→G, které vytvoří zkrácené formy proteinu CFTR, včetně některých sestřihových mutací (1898+1G→A) nebo i záměn aminokyselin, které změní iniciační kodón translace, tj. methionin na pozici 1 – M1V. Výsledkem je nepřítomnost proteinu CFTR na apikální membráně epitelálních buněk, protože zkrácené a dysfunkční formy proteinu CFTR jsou rychle degradovány v endoplazmatickém retikulu. Tato třída mutací je spojena se závažným průběhem CF, pankreatickou insuficiencí a malou variabilitou klinického průběhu CF (obr. 2.7).

Je pozoruhodné, že se v poslední době prokázalo, že aminoglykosidová antibiotika, jako například gentamicin, mohou mitigovat molekulární patogenezi spojenou nesmyslnými mutacemi, které zavedou předčasný stop kodón do sekvence genu *CFTR*, a tak vedou k přeskočení exonu, ve kterém se vyskytují. Původně byl tento fenomén prokázán *in vitro* a v současné době již dokonce probíhají nadějně studie s gentamicinem *in vivo* u izraelských pacientů s jejich častou mutací W1282X [91].

Třída II. „Abnormální posttranslační glykosylace a intracelulární transport proteinu CFTR, spojený s jeho nepřítomností na apikální membráně.“ Tyto mutace omezují nebo dokonce zcela blokují vyzrávání, tj. správnou posttranslační glykosylaci

a výslednou terciární konformaci proteinu CFTR a jeho následný transport na „místo určení“, tj. apikální membránu. Důsledkem této skupiny mutací, jejichž typickým představitelem je hlavní mutace F508del, je nepřítomnost proteinu CFTR na apikální membráně epitelálních buněk. Tak jako u třídy I, i tyto mutace jsou spojeny se závažným průběhem CF, pankreatickou insuficiencí a malou variabilitou klinického průběhu CF (obr. 2.7).

Protein CFTR, porušený mutacemi ze třídy II, za určitých podmínek může fungovat prakticky normálně. Terapeuticky se *in vivo* například uplatňují nízkomolekulární stabilizátory terciární konformace proteinu CFTR, jako je například 4-fenylbutyrát [89, 96] (také kap. 22).

Třída III. „Porucha regulace proteinu CFTR, který je přítomný na apikální membráně.“ Tyto mutace postihují aktivaci a/nebo regulační funkce proteinu CFTR jakožto chloridového kanálu. Jedná se především o blokádu vazby ATP na NBD1 a/nebo NBD2, které jsou nezbytné pro aktivaci a otevření/zavření iontového kanálu proteinu CFTR. Typickým příkladem je mutace G551D, která však nejenom blokuje vazbu ATP na NBD1, ale i regulaci dalšího chloridového kanálu ORCC (obr. 2.7), a tak se u ní uplatňuje i patogenetický mechanismus třídy VI. Také u této třídy mutací genu *CFTR* je klinický průběh CF závažný, je spojený s pankreatickou insuficiencí a variabilita klinického průběhu CF je rovněž minimální.

V případě proteinu G551D-CFTR je možné jeho správné fungování *in vivo* pozitivně ovlivnit inhalační terapií analogem ATP-uridintrifosfátem (UTP). UTP se v nadbytku může stericky navázat na mutované vazebné místo v rámci domény NBD1 a tak plně aktivovat i mutovaný protein CFTR [89, 98]. Tento typ genotypově specifické terapie se již využívá v klinické praxi [96] (také kap. 22).

V souhrnu jsou patogenetické třídy I–III spojeny s minimální aktivitou a/nebo nepřítomností proteinu CFTR, a tak s klasickou formou CF, tj. se zvýšenými koncentracemi chloridů v potu, exokrinní pankreatickou insuficiencí, progresivním sino-pulmonálním onemocněním a mužskou neplodností. Tyto první tři třídy jsou také spojeny s relativně menší variabilitou klinického průběhu CF mezi jednotlivými pacienty s CF [98].

Třída IV. „Snížená vodivost chloridového kanálu s normálním množstvím proteinu CFTR na apikální membráně, který má reziduálně zachovanou funkci chloridového kanálu.“ Tyto mutace snižují vodivost chloridového kanálu proteinu CFTR. Hlavně se zde jedná o záměny aminokyselin, jako jsou například alely R117H, R347P a R334W, postihující domény TM1 nebo TM2 proteinu CFTR, které vytváří jeho iontový kanál (obr. 2.7). Tyto mutace umožňují normální syntézu proteinu CFTR a jeho transport na apikální membránu, ale „deformují“ samotný iontový kanál. Jedná se o klinicky „mírné“ mutace spojené s pankreatickou suficiencí, ale variabilnějším průběhem sino-pulmonálního onemocnění. Fenotypický dopad těchto mutací je často modifikován dalšími intragenovými variantami a faktory, jako je například polytymidinový trakt před exonem 9 – IVS-8 „T(n)“ nebo poly TG trakt v téže oblasti – IVS-8 TG(n) [62] (blíže kap. 21).

Třída V. „Redukovaná syntéza, zhoršený intracelulární transport a snížené množství plně funkčního proteinu CFTR na apikální membráně.“ Zde se jedná se o nejružnější typy sestřihových mutací, které vedou k nesprávnému a/nebo neefektivnímu

sestříhu mRNA genu *CFTR*. Tyto mutace „dovolují“ syntézu většího množství plnohodnotné *CFTR*-mRNA. Tím vznikají nestabilní izoformy proteinu CFTR, což výsledně snižuje podíl „plnohodnotného“ proteinu na apikální buněčné membráně, jako například u mutace 3849+10kb C→T [51]. Tato třída mutací je spojena s mírným průběhem CF, s hraničními koncentracemi chloridů v potu a mužskou fertilitou, ale opět s variabilním průběhem plicního onemocnění. Tento typ mutací se také ve zvýšené míře vyskytuje u atypických a monosymptomatických forem CF, včetně onemocnění příbuzných CF (kap. 20) (obr. 2.7).

Třída VI. „Ztráta regulační funkce dalších iontových kanálů.“ Tyto mutace mohou postihnout schopnost proteinu CFTR regulovat další iontové kanály, jako je například „epithelial sodium (Na⁺) channel (ENaC)“ nebo „outwardly rectified chloride channel (ORCC)“, přičemž ztráta této regulační aktivity může výrazně ovlivnit průběh CF (obr. 2.3) [98]. Příkladem je mutace G551D, která spadá také do třídy III, oproti mutaci A455E, která je pouze spojena s patogenetickým mechanismem třídy III a ne třídy VI. Z tohoto důvodu je sino-pulmonální onemocnění spojené s mutací A455E mírné [41].

Třída VII. „Snížená stabilita jinak plně funkčního proteinu CFTR na apikální membráně.“ Nedávné studie prokázaly, že zkrácení karboxylového konce proteinu CFTR o přibližně 70–100 bp vede ke zvýšené nestabilitě jinak plně funkční varianty proteinu. Jedná se zde převážně o nesmyslné a posunové mutace přítomné na „konci“ genu *CFTR*, jako jsou například alely Q1412X, 4396delTC, 4279insA a S1455X, které jsou spojeny se méně závažným průběhem onemocnění CF [76].

V souhrnu je možno říci, že mutace ze tříd IV–VII jsou spojeny s relativně větší variabilitou klinického průběhu CF oproti třídám I–III. Mutace ze tříd IV–VII se také signifikantně častěji nalézají u atypických, monosymptomatických forem CF, včetně onemocnění příbuzných CF [89]. Uvedené příklady „genotypově specifické terapie“ u jednotlivých patogenetických tříd svědčí pro to, jak znalost přesné molekulární patogeneze umožní individuálně optimalizovat léčbu pro jednotlivé pacienty s CF. V tomto ohledu je CF opět modelem pro budoucí genotypově specifickou terapii všech ostatních dědičných onemocnění [89, 96].

2.1.3.2 Varianty v patogenezi CF

V sekvenci genu *CFTR* bylo dosud nalezeno více než 400 variant/polymorfizmů (viz databáze CFGAC – <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). Podle uznávané populačně genetické definice se varianta, která se vyskytuje ve více než 1 % v obecné populaci, již považuje za „neutrální polymorfizmus“ [11]. Varianty/polymorfizmy jsou tedy relativně časté alely, které se ve svých četnostech mezi jednotlivými populacemi výrazně liší, protože evolučně nejsou předmětem „sdílené“ selekce v rámci haplotypu „B“ (viz výše). Jednotlivé varianty/polymorfizmy však samy o sobě nezpůsobí klasickou formu CF, jak ukázaly studie zdravých nosičů „závažných“ mutací genu *CFTR* s variantami v pozici *trans*. Podobné výsledky přinesly i studie zjevně zdravých jedinců z obecné populace, u kterých se jednotlivé varianty/polymorfizmy našly také ve vzájemné pozici *trans* a ve zvýšených četnostech [82, 11].

Některé varianty/polymorfizmy mohou kvantitativně „snížit“ správnou funkci proteinu CFTR řádově pouze o několik procent, což se v této „izolované“ podobě kli-

nicky neprojeví. Pokud však jich je více v pozici *cis*, může být jejich účinek aditivní nebo dokonce i multiplikativní. Navíc fenotypický projev mutací genu *CFTR* ať již v homozygotní, nebo heterozygotní konstituci je rovněž ovlivňován variantami v intronu 8 genu *CFTR* [59] – IVS-8 T(n) a IVS-8 TG(n) a variantou 1540 A/G (M470V) v exonu 10 genu *CFTR* [19].

V současné době jsou totiž známy pouze základní charakteristiky populačního výskytu nejčastějších variant / polymorfizmů u pacientů s různými *CFTR*patiemi (tj. chorobami spojenými s mutacemi v genu *CFTR*) a v kontrolní populaci [11]. Proto určení populační četnosti různých variant/polymorfizmů genu *CFTR* je důležitým předpokladem k objasnění patogeneze nejrůznějších *CFTR*patií [92]. Z uvedeného vyplývá, že rozdělení alterací sekvence genu *CFTR* na „benigní“ polymorfismy a „patogenní“ mutace je arbitrární povahy, protože mezi nimi neexistuje z funkčního hlediska přesná hranice [98]. Tato skutečnost však v současné době vytváří značné potíže pro přesné genetické poradenství u CF.

2.1.4 Populačně genetická charakteristika mutací genu *CFTR*

2.1.4.1 Česká republika

V letech 1990–2004 jsme studovali reprezentativní soubor 270 českých rodin s CF. Tento soubor pacientů zahrnuje všechny dosud známé české pacienty s klasickou formou CF k lednu 1996 a byl použit jako referenční soubor v následujících letech pro stanovení populační distribuce nejčastějších mutací v naší populaci [65]. Většinou se jednalo o rodiny, které byly v dlouhodobé péči Centra pro diagnostiku a léčbu cystické fibrózy Fakultní nemocnice v Praze Motole (CF centrum Praha – Motol, ublg.lf2.cuni.cz/cf.htm/). Kromě toho byly do souboru zahrnuty i další rodiny z celé republiky, které byly v molekulárně genetické laboratoři CF Centra Praha – Motol prenatálně geneticky vyšetřovány.

V tabulce 2.2 je uveden přehled všech nalezených mutací genu *CFTR* v České republice ze 540 analyzovaných CF chromozomů, tj. 270 českých pacientů s CF [65]. K dosažení současné 95,98% záchytnosti mutací genu *CFTR* přispěl zásadním způsobem objev „slovanské“ mutace CFTRdele2,3(21kb) na konci roku 1998, která se vyskytuje v naší populaci ve 4,63 % (25/540 CF chromozomů) a je tak druhou nejčastější mutací v naší populaci [24].

Tab. 2.2 Distribuce mutací genu *CFTR* v České republice

evropské mutace	N	%
W57G	1	0,19
G85E	1	0,19
R117H	1	0,19
Y122X	1	0,19
621+1G→T	1	0,19
R334W	1	0,19
R347P	4	0,74

F508del	382	70,74
1717-1G→A	2	0,37
G542X	11	2,04
G551D	20	3,70
R553X	1	0,19
1898+1 G→A	11	2,03
1898+1 G→C	1	0,19
2183 AA→G	1	0,19
2184insA	1	0,19
2789+5 G→A	1	0,19
R1162X	2	0,37
3659delC	1	0,19
3849+10kb C→T	2	0,37
W1282X	3	0,56
N1303K	15	2,78
E92X	2	0,37
4374+1 G→A	2	0,37
I336K	1	0,19
S945L	1	0,19
-	470/540	87,03
populačně specifické „národní“ mutace		
L320F	1	0,19
V1212I-F508del	1	0,19
2622+1G→A	1	0,19
185+1 G→T	1	0,19
M952I	1	0,19
L997F	1	0,19
S1118F	1	0,19
3944delGT	1	0,19
–	8 / 540	1,48
slovanské mutace		
2143delT	6	1,11
CFTRdele2,3(21kb)	40/628*	6,36
–	46/540 (628)	7,47
celkem	524/540 (628)	95,98

N = počet nalezených mutací, * = některé mutace byly vyšetřovány na rozdílně velkých souborech, % = procentuální zastoupení jednotlivých mutací [65]

Tímto výsledkem jsme se zařadili mezi evropské státy s dosud nejvyšší populační záchytností, tj. více než 90 % mutací genu *CFTR* [23]. Navíc jsme „překonali“ hraniční 95% populační záchytnosti všech mutací [23, 10], která je předpokladem pro rozvoj dvoustupňového novorozeneckého screeningu (IRT/DNA) CF, který je v současné době ve fázi pilotní studie [23].

V průběhu naší studie bylo také nalezeno a charakterizováno 5 nových mutací v genu *CFTR*, které se nacházejí pouze u českých pacientů s CF: 185+1G→T, L320F, S1118F, V1212I a 3944delGT (tab. 2.3; databáze CFGAC – www.genet.sickkids.on.ca/cftr/). Tyto mutace lze považovat za specificky české, privátní alely genu *CFTR*, které dosud nebyly nalezeny u jiných evropských populací.

Tab. 2.3 Nově nalezené mutace u českých pacientů

mutace	nukleotidová změna	lokalizace	typ mutace
185+1 G→T	G→T na 185	I 2	sestřihová
L320F	A→T na 1092	E 7	záměna aminokyselin (Leu → Phe)
S1118F	C→T na 3485	E 17B	záměna aminokyselin (Ser → Phe)
V1212I	G→A na 3766	E 20	záměna aminokyselin (Val→Ile)
3944delGT	delGT na 3944	E 20	posunová

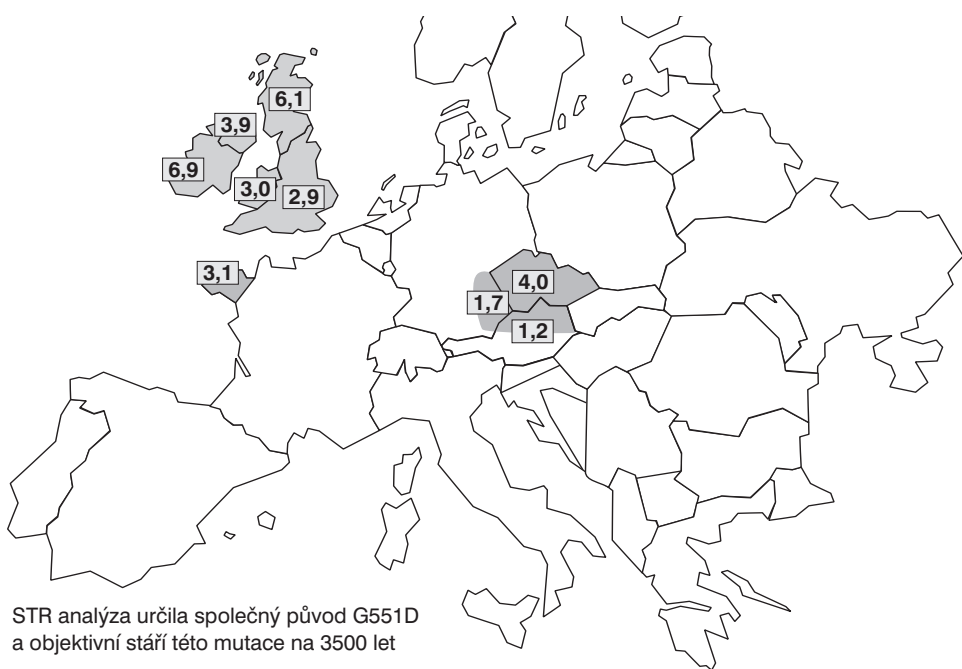
nukleotidová změna na příslušném nukleotidu *CFTR*-cDNA;

I = intron a E = exon genu *CFTR* [65]

Relativně vysoká populační četnost hlavní mutace genu *CFTR*-F508del v 70,74 % našich pacientů (tab. 2.2) potvrzuje severojižní gradient výskytu této mutace v Evropě [29]. Stanovení stáří mutace F508del pomocí tzv. parsimoniální analýzy rekombinačních četností intragenových haplotypů mikrosatelitových markerů na více než 50 000 let [77] rovněž potvrdilo naši původní hypotézu o paleolitickém původu mutace.

Srovnávací analytická studie potvrdila naši hypotézu o keltském původu mutace G551D, dokumentovanou historicky a archeologicky prokázanou keltskou etnogenezí v České republice a severním Rakousku [67, 68]. Svědčí o tom také následně prokázaný zvýšený výskyt této mutace v oblastech s perzistencí keltského etnika v západní Evropě [31], tj. v Bretani, Irsku, na Britských ostrovech a v severním Rakousku [10, 47, 68] (obr. 2.8). Stanovení objektivního stáří mutace G551D pomocí tzv. parsimoniální analýzy rekombinačních četností intragenových haplotypů mikrosatelitových markerů v genu *CFTR* na více než 3500 let a její unikátní asociace s intragenovým haplotypem „16-7-17“ [16] objektivizovalo naši hypotézu o společném keltském původu a šíření této mutace [10, 68]. Předpovězené stáří na 3500 let odpovídá historicky potvrzenému období středoevropské keltské etnogeneze [31] (obr. 2.8).

O slovanském původu naší populace svědčí to, že druhou nejčastější mutací genu *CFTR* u českých pacientů s klasickou formou CF je delece *CFTR*dele2,3(21kb) [25]. Tato mutace je přítomna pouze na těch územích střední, východní a jižní Evropy, kam ve druhé polovině prvního tisíciletí našeho letopočtu migrovaly slovanské kme-



Obr. 2.8 Celoevropská populační distribuce mutace G551D

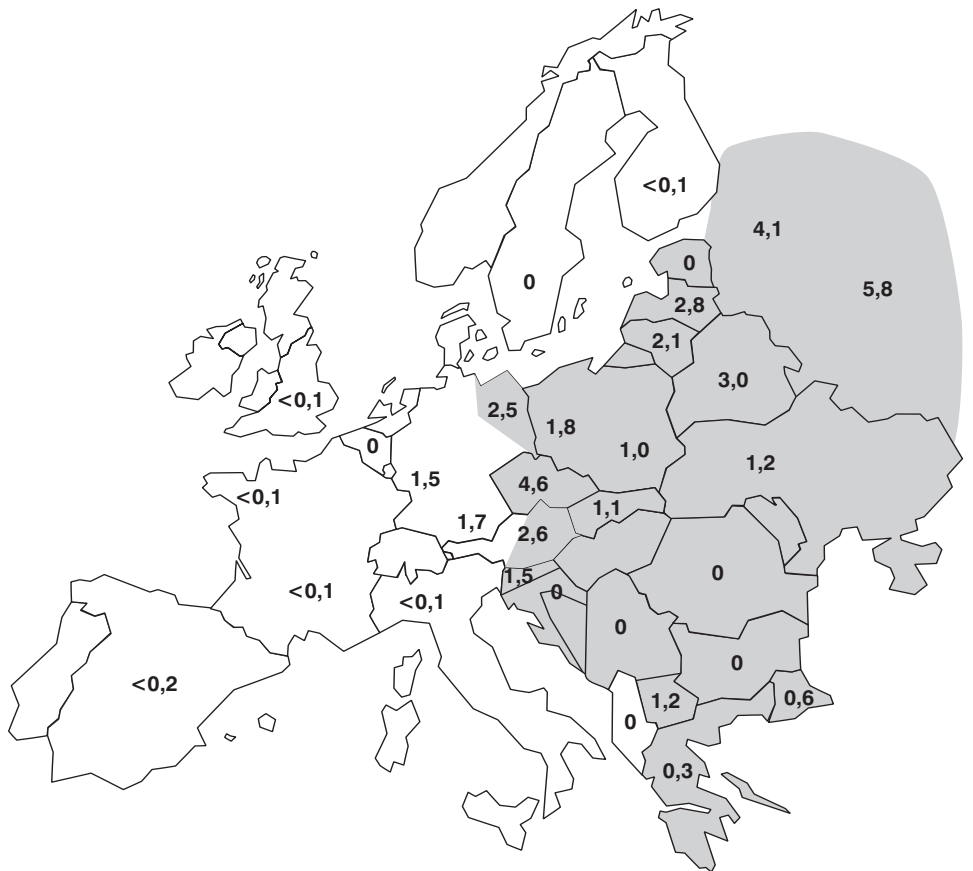
Mutace G551D je spjata s historickými a/nebo současnými keltskými populacemi ve střední a západní Evropě [10, 16, 27, 47, 67, 68].

ny ze severovýchodu [31, 68]. Mutace 2143delT se vyskytuje relativně často u nás, v Polsku a Rusku a také patří mezi další slovanské mutace [10, 27] (obr. 2.9).

Výsledky našich studií prokazují prakticky shodnou prevalenci hlavních historických populací na našem území, tj. slovanského a keltského etnika. Jihoevropské etnické vlivy v naší současné populaci jsou reprezentovány výskytem mutací G542X a N1303K, které jsou časté ve středomoří. Mutace G542X je asociována s Féničany [64] a prokazuje významné migrační vlivy proti proudu velkých evropských řek (v důsledku tehdejšího silného zalesnění celé Evropy podobně jako v dnešní Amazonii) především z jihu na sever Evropy, tj. v případě českých zemí například po Dunaji a jeho přítocích.

Nález mutací W1282X a 3849+10kb C→T [10] svědčí o prokazatelné přítomnosti židovského etnika u nás, tak jako i v jiných zemích střední, východní a jižní Evropy, a to i přes rozsáhlé negativní změny v jeho genofondu v důsledku nacistického Holocaustu. Genetická a etnická charakteristika nejčastějších mutací u českých pacientů s CF rovněž potvrzuje, že naše země byla křížovatkou všech hlavních historických migrací severo-j jižních a západno-východních [68].

Srovnání populačních četností 9 nejčastějších mutací v české a slovenské populaci je uvedeno v tabulkách 2.4 a 2.5 [65].



Obr. 2.9 Maximální rozšíření slovanských populací v I. milleniu n.l. a relativní četnost slovanské mutace *CFTRdele2,3(21kb)*

Mutace *CFTRdele2,3(21kb)* je spjata s historickými a/nebo současnými slovanskými populacemi ve střední, jižní a východní Evropě [10, 24, 68].

Tab. 2.4 Distribuce mutací genu *CFTR* ve Slovenské republice

evropské mutace	N	%
G85E	1/110	0,91
R75X	1/110	0,91
S42F	1/110	0,91
R347P*	4/234	1,71
F508del*	139/234	55,40
G542X*	13/234	5,56
R553X*	8/234	3,42
W1282X*	2/234	0,85
N1303K*	7/234	2,99

1898+1 G→A	1/110	0,91
3849+10kb C→T*	1/234	0,43
-	178/110 (234)	74,00
populačně specifické mutace		
605insT	1/110	0,90
slovanské mutace		
CFTRdele2,3(21kb)*	3/234	1,28
2143delT	2/110	1,82
-	5/110 (234)	3,10
celkem	184/110 (234)	78,00

N = počet nalezených mutací, * = některé mutace byly vyšetřovány na rozdílně velkých souborech; % = procentuální zastoupení jednotlivých mutací; [10, 65]

Tab. 2.5 Srovnání četnosti nejčastějších mutací genu *CFTR* mezi českou a slovenskou populací

mutace genu <i>CFTR</i>	Česká republika	Slovenská republika	χ^2 P
F508del	382/540 (70,74)	139/234 (55,40)	9,54 < 0,01
G542X	11/540 (2,04))	13/234 (5,56)	6,73 < 0,01
G551D	20/540 (3,70)	0/234 (0,00)	7,96 < 0,01
R553X	1/540 (0,19)	8/234 (3,42)	14,85 < 0,001
CFTRdele2,3(21kb)	40/628 (4,63)	3/234 (1,28)	9,19 < 0,01
1898+1 G→A	11/540 (2,03)	1/110 (0,91)	n. s.
2143delT	6/540 (1,11)	2/110 (1,82)	n. s.
W1282X	3/540 (0,56)	2/234 (0,85)	n. s.
N1303K	15/540 (2,78)	7/234 (2,99)	n. s.

Statistické výpočty byly provedeny pomocí chi-kvadrátu (χ^2); čísla v závorkách označují četnost v procentech z celkového počtu CF vyšetřovaných chromozomů.
n. s. = nesignifikantní rozdíly populačních četností [65]

Statisticky signifikantně nižší četnost mutace F508del ($p < 0,01$) na Slovensku lze vysvětlit existencí jejího severojižního gradientu [29]. Nižší četnost této mutace je historicky dokumentována vyšším zastoupením populací z okolí Středozemního moře, které migrovaly „retrográdně“ po Dunaji na Slovensko a pak po přítocích Dunaje, tj. do oblastí kolem velkých slovenských řek. Signifikantně nižší výskyt mutace CFTRdele2,3(21kb) ($p < 0,01$) na Slovensku odpovídá vyššímu zastoupení původního neslovanského obyvatelstva, včetně vyššího zastoupení populací ze středoze­mí. Tak lze vysvětlit i statisticky signifikantně vyšší četnost mutace G542X na Slovensku ($p < 0,01$), která je charakteristická pro Fěničany, kteří významně osidlovali oblast středoze­mí [67]. Vliv migrace této populace byl výrazný až do začátku 1. tisíciletí našeho letopočtu v důsledku severní expanze Římského impéria, spojené s osídlením jižního Slovenska [68].

Signifikantně vyšší četnost „germánské“ mutace R553X na Slovensku ($p < 0,001$) může také souviset s rozsáhlou imigrací germánských Kvádů ze severu, které Římané povolávali na Slovensko k ochraně svých severních hranic a/nebo s nedávnou německou hornickou kolonizací středního Slovenska. Naopak nepřítomnost mutace G551D na Slovensku ($p < 0,01$) je v souladu s naší hypotézou o jejím keltském původu. Je historicky dobře dokumentovanou skutečností, že na rozdíl od historických českých zemí byli Keltové ze Slovenska systematicky vyhnáni Římany a Kvády [68] (obr. 2.8). Spektrum mutací genu *CFTR* u Čechů a Slováků je rovněž rozdílné od spektra mutací v Německu, Rakousku a Polsku, což znamená že při vyšetřování pacientů z příslušných zemí musíme použít populačně specifické „panely“, tj. soubory mutací k dosažení optimální populační záchytnosti mutací v genu *CFTR* [10].

V souhrnu tyto nálezy potvrzují naši populačně genetickou hypotézu o tom, že současný genofond evropských populací je dominantně ovlivněn prehistorickými populacemi, které předcházely pozdějšímu etnickému osídlení. Nejstarší populace tak měly nejsilnější vliv na strukturu současného evropského genofondu, o čemž svědčí nejvyšší četnost paleolitické mutace F508del v evropských populacích [68].

2.2 Esenciální mastné kyseliny a jejich deriváty v patogenezi cystické fibrózy

Hlavním úkolem esenciálních mastných kyselin (EFA) je zvyšovat fluiditu buněčných membrán. Kromě toho jsou důležité v prevenci koronárních nemocí, protože se jejich podáváním snižuje koncentrace cholesterolu.

K nutričně důležitým esenciálním mastným kyselinám se řadí kyselina linolová ($\omega 6$; 18 : 2 δ) [41] a linolenová ($\omega 3$; 18 : 3 δ) [9, 35, 86], které jsou prekurzory vyšších polyénových kyselin (20 : 4, 20 : 5, 22 : 5 až 22 : 6 kyseliny dokosahexaenové – DHA).

Deficit esenciálních mastných kyselin (EFAD) se u CF popisuje už dlouho a definiuje se jako snížení koncentrace kyseliny linolové (LA) a α -linolenové. Klinicky se však neprojevuje.

2.2.1 Kyselina arachidonová (AA) a kyselina dokosahexaenová (DHA)

DHA je důležitá pro funkci nervového, imunitního i kardiovaskulárního systému [52]. Má pozitivní vliv na hypertenzi, artritidu, aterosklerózu, deprese, infarkt myokardu, u dospělých na začínající diabetes a některé nádory. Pozitivně ovlivňuje rozvoj mozku i paměti. Ukázalo se, že biologický účinek EFA nezáleží jen na jejich absolutních hladinách, ale i na jejich vzájemném poměru. DHA hraje spolu s AA důležitou roli v regulaci zánětu [63]. Její vliv na zánětlivé parametry spočívá v úpravě membránových lipidů vedoucí ke zvýšené koncentraci kyselin polyénových. DHA se konvertuje na dokosatrieny a 17S skupinu resolvinů, které jsou mohutnými protizánětlivými mediátory, uplatňujícími se za normálních okolností v boji proti zánětu [37].

V roce 1999 popsali Freedman a spol. [36] nepoměr mezi AA a DHA v pankreatu, plicích a ileu u kmene myši s odstraněným genem *CFTR* („knock-out myši“) i to, že dodání DHA tento nepoměr upravilo a snížilo projevy zánětu [38]. To vzbudilo velký zájem a bylo to podnětem k dalšímu výzkumu.

Zjistilo se, že nemocní s CF mají signifikantně nižší procento kyseliny linolové (LA) a DHA v sérových fosfolipidech oproti kontrolnímu souboru. Nízké hladiny DHA jsou i ve tkáních CF (ve vzorcích biopsie nosní a rektální sliznice), a to i u pankreaticky suficientních dobře živěných nemocných. U obligátních heterozygotů leží hladiny DHA mezi hodnotami CF a kontrolních osob [37]. Z toho vyplývá, že změny nevyvolává porucha stavu výživy, ale porucha genu *CFTR*, který ovlivňuje inkorporaci EFA do fosfolipidů membrán [9]. Nelze to však považovat za jediné vysvětlení, protože porucha EFA je přítomna i u mutací, které až k ovlivnění membrán nedosahují [86].

Mechanismus, kterým gen *CFTR* reguluje metabolismus mastných kyselin, není znám, ale předpokládá se, že nízké hladiny DHA jsou důležité v přehnané zánětlivé odpovědi.

Podáváním DHA se upravily histologické změny v pankreatu a ileu a snížila se zvýšená infiltrace plic neutrofily v plicní tkáni knock-out myši, u které byla indukována pseudomonádová pneumonie. O uplatnění této zkušenosti a možném zavedení nových terapeutických postupů [37] u lidí se pochopitelně uvažuje.

Lze tedy uzavřít, že ačkoli je porucha metabolismu mastných kyselin u CF známa již dlouho, objevila se až v posledních letech hypotéza, podle které se nepoměr kyseliny arachidonové (AA) a dokosahexaenové (DHA) podílí na patogenezi CF, především na vzniku zánětu. Dodání DHA nemocným s CF by mohlo přispět ke kauzální léčbě.

2.3 Genetické modifikátory v patogenezi CF

Skutečnost, že závažnost CF nelze jednoznačně vysvětlit pouze typem a lokalizací mutací genu *CFTR*, vedla k úvahám o tom, že ji mohou ovlivnit mimo intragenových faktorů, jako je například varianta IVS-8 T(n) [59], i další geny [1]. Postupně se ukázalo, že protein CFTR ovlivňuje i jiné membránové kanály (například ENaC nebo ORCC). Protein CFTR rovněž transportuje další molekuly (jako například ATP), které mohou hrát důležitou roli v imunitních mechanismech, a nebo v mukociliární clearance [72]. Přítomnost tzv. modifikujících genů prokázaly experimenty na myších modelech CF [49].

Z tohoto důvodu se v současné době intenzivně pátrá po analogických modifikujících genech i u lidí [2, 26, 83]. U nemocných s CF se tyto modifikátory hledají tzv. asociačními studiemi, jejichž podstatou je korelace jednotlivých klinických znaků CF se specifickými genotypy kandidátních modifikujících genů na pozadí jednotného genotypu genu *CFTR* a oproti kontrolnímu souboru. Tyto studie mají však dosud kontroverzní charakter a někdy si dokonce vzájemně protirečí [69]. Rozdíly ve výsledcích jednotlivých studií lze mimo jiné vysvětlit různým věkem studovaných pacientů, neboť variabilita průběhu CF se zvětšuje s věkem. Výsledky srovnání variant

modifikujících genů se závažností CF mohou být tedy různé u stejných pacientů v dětství a v dospělosti [95]. Důležité jsou i přesně stanovené klinické parametry užité pro posouzení závažnosti onemocnění, etnický původ nemocných a dále genotyp genu *CFTR*. Například je rozdíl, studují-li se pouze homozygoti pro mutaci F508del v genu *CFTR*, nebo další daleko méně časté genotypy. Nicméně velice přesné výsledky v tomto ohledu poskytují komparativní studie (dizygotních) sourozenců a především pak dvojčat, které jsou konkordantní nebo diskordantní pro extrémní varianty průběhu CF [12, 73].

Jako možné modifikující faktory se mohou uplatnit proteiny, které přímo nebo nepřímo interferují s proteinem CFTR. Dalšími kandidáty jsou proteiny, které se obecně uplatňují v transkripci, sestřihu nebo zrání všech proteinů, ale i v sekundárních projevech CF, jako je zánět nebo imunitní odpověď. Jejich studium se stalo obtížnější, než se původně předpokládalo, protože se ukázalo, že jsou tkáňově nebo orgánově specifické [98]. Studium vlivu modifikujících faktorů na expresi CF v játrech se zabývali italští autoři [17].

Jedním z prvních jednoznačně identifikovaných modifikátorů je gen CFM1, podílející se na vzniku mekoniového ileu, který nalezla mezinárodní kolaborativní studie vedená torontskou skupinou Zielenskim a spol. [97]. Tento gen se nachází na dlouhém raménku chromozomu 19 (lokus 19q13) a kóduje draselný kanál KCNN4, který je exprimován v distálním ileu. Jeho přesná patogenetická role při rozvoji mekoniového ileu však nebyla jednoznačně stanovena a dosud se přesně nepodařilo stanovit asociované genotypy genu CFM1. Původně předpokládanou patogenetickou roli časté mutace v genu pro hemochromatózu u homozygotů pro mutaci F508del genu *CFTR* s mekoniovým ileem [80] se však v následujících studiích nepodařilo potvrdit.

V posledních letech se především intenzivně pátrá po genech, které působí jako modifikátory plicního postižení [74], které je zodpovědné za většinu morbiditu a mortality u CF. Z důvodu komplexity patogeneze sino-pulmonálního onemocnění u CF se v současné době předpokládá, že modulující efekt nemá pouze jeden gen, ale předběžně se zkouší více než 80 kandidátních genů, které mohou ovlivnit výskyt a průběh infekce a chronického zánětu. Dosud publikované asociační studie prokázaly, že se především uplatňují kandidátní geny kódující manózu vázající lektin (MBL), α_1 -antitrypsin (α_1 AT), tumor nekrotizující faktor α (TNF α), transformující růstový faktor β_1 (TGF β_1), glutathion-S-transferázu (GSTM1 a GSTM3), β -adrenergní receptor (β_2 -AR), angiotensin I konvertující enzym (ACE), syntáza endoteliálního oxidu dusnatého (NO) a HLA antigeny II. třídy.

2.3.1 Manózu vázající lektin

Manózu vázající lektin (mannose-binding lectin – MBL) je důležitý protein vrozeného imunitního systému [62]. Patří do skupiny proteinů podílejících se na specifické vazbě na různé cílové molekuly (tzv. pattern recognition) a je schopen se efektivně vázat na polysacharidové struktury na povrchu mikrobu. MBL bakterie buďto neutralizuje a/nebo je opsonizuje aktivací komplementu pomocí nedávno objevené tzv. lektinové cesty. MBL patří do skupiny plazmatických kolektinů (C-typ lektinu s kolagenu podobnou doménou) a je syntetizovaný v játrech. Gen MBL je lokalizován na

chromozomu 10–MBL2 (MBL1 je inaktivní pseudogen) [43]. Náhradou první nukleotidové báze v exonu 1 genu MBL2 vznikají 3 různé izoformy, které nezávisle na sobě snižují celkové hladiny aktivního MBL proteinu. Společný název těchto tří variant je „0“, zatímco normální alela se nazývá „A“. Každá ze tří variant snižuje množství funkčních podjednotek MBL u nosičů 5–10×. Výsledné koncentrace proteinu MBL se liší v populaci více než tisícinásobně, což prokazují kombinace dnes již sedmi popsanych haplotypů spojených s různými formami genu MBL. V souhrnu asi 10 % populace s nejnižšími hodnotami MBL je pokládáno za „MBL insuficientní“ a má sklon k častým infekcím, ale i k neinfekčním chorobám [60].

Na plazmatickou koncentraci MBL však mají vliv i negenetické faktory. Osoby s nízkým cirkulujícím MBL jsou zranitelnější vůči různým infekcím u řady klinických stavů, zejména je-li tento stav kombinovaný se sekundárním imunodefektem. Deficit MBL je rovněž důležitý rizikový faktor u kojeneckých infekcí, u osob léčených chemoterapií nebo po transplantacích. Snížení aktivity MBL také ovlivňuje průběh různých závažných nemocí, jako je například meningokoková sepe, chronická revmatoidní artritida, jaterní cirhóza, nebo může být i příčinou opakovaných potratů [61].

Vliv variability aktivity MBL na průběh CF sledovali Garred a spol. [42], kteří prokázali, že pacienti s jednou „defektní“ kopií MBL (A/0) měli o 11 %, nemocní se dvěma kopiemi (0/0) dokonce o 25 % nižší hodnoty funkce plic než homozygoti s genotypem A/A. Nemocní s nízkými hladinami MBL měli již v 8 letech mírně snížené hodnoty funkčního vyšetření plic a do 16 let věku u nich došlo k dalšímu významnému zhoršení, zatímco u nemocných s normální hladinou MBL byly plicní funkce relativně konstantní. Statisticky signifikantně nižší hodnoty funkce plic u homozygotů pro mutaci F508del genu *CFTR* s variantními alelami MBL ve srovnání s nemocnými s normálním MBL našli i Gabolde a spol. [40] a Buranawuti a spol. [14].

Kolaborativní studie Yardenové a spol. [94], na které jsme se podíleli, rovněž prokázala, že alela „0“ MBL proteinu predisponuje k celkově závažnějšímu průběhu sino-pulmonálního onemocnění. Původně mírný vliv u dětí se však zesiluje se stářím pacientů [22]. Je možné, že některé funkce MBL mohou působit v dětství ochranně a teprve s postupujícím věkem se projeví negativně. Yarden et al. rovněž potvrdili vztah MBL, TNF α , TGF β ₁ a GSTM1 k závažnosti plicního postižení. Současně zjistili, že MBL se uplatňuje i u chronické obstruktivní plicní nemoci (CHOPN).

Je zajímavé, že ani normální hladiny MBL nezabrání chronické kolonizaci pacientů s CF bakterií *P. aeruginosa*. Tato skutečnost se vysvětluje tím, že se MBL syntetizuje výhradně v játrech a dostává se tak do lokalizovaného zánětlivého ložiska až relativně pozdě. Garred a spol. [42] našli MBL protein ve sputu pouze u 4 ze 100 vyšetřených, přičemž všichni měli navíc genotyp „A/A“. Z tohoto nálezu se usuzuje, že MBL je degradován lyzozomálními enzymy polymorfonukleárů. Je také nepravděpodobné, že by MBL měl přímý vliv na cidii nebo opsonizaci *P. aeruginosa*. Může však mít důležitou roli při neutralizaci lipopolysacharidů (LPS), včetně ostatních toxických substancí uvolňovaných z tohoto mikroba, a může i významně chránit před virovou superinfekcí.

Studie z roku 1999 [43] prokázala, že z deseti nemocných infikovaných *B. cepacia* byli 4 heterozygoti a 3 homozygoti variantních alel genu MBL, což svědčí o velkém riziku této infekce při snížené „ochranné“ aktivitě MBL proteinu. Vzhledem

k tomu, že *B. cepacia* vyvolává vyšší stupeň zánětu u nemocných s CF než *P. aeruginosa*, MBL je v dýchacích cestách prokazován u těchto pacientů v časnějších stadiích. Davies a spol. [21] prokázali, že MBL se váže na *B. cepacia* a zahajuje tak aktivaci komplementu. *In vivo* to může vést buď k přímé destrukci mikroba, nebo k jeho fagocytóze. „MBL deficitní“ nemocní mají vyšší riziko infekce *B. cepacia* a měli by tedy profitovat z budoucí možnosti tzv. „MBL terapie“ (kap. 22). Terapeutické podávání MBL by mohlo zmírnit závažnost revmatoidní artritidy (HPOA) a zlepšit funkci plic nebo jater u CF (ale i ovlivnit další imunodeficientní projevy). Možné riziko této terapie však spočívá v komplementem zprostředkovaném poškození hostitele [87]. Podávání purifikovaného MBL u nemocných s jeho deficitem, kteří trpěli těžkým, rychle se zhoršujícím plicním onemocněním, již zkoušeli Garred a spol. [42]. Velké naděje se vkládají do rekombinantní formy proteinu MBL, kde je teoreticky možné modifikovat komplement aktivující domény a snížit tak i rizika této terapie. V souhrnu je však nutno vyčkat na další studie, především pak u pacientů infikovaných *B. cepacia*, které by komplexně zhodnotily výhody a nevýhody této formy substituční léčby.

V současné době se studuje i nezávislý vliv proteinů MBL a surfaktantu A (SPA) a D (SPD). SPA je tzv. vrozenou složkou plicního obranného mechanismu, funguje jako imunomodulátor a současně i jako opsonin. Má šest trimerických podjednotek, každá z nich obsahuje dva SPA1 polypeptidy a jeden téměř identický SPA2 polypeptid. V exonu 1 genu SPA2 se nachází důležitá dimorfická varianta v rámci kodónu 9 (treonin „T“ nebo asparagin „N“), které jsou spojeny s vysokými („T“) nebo nízkými („N“) hladinami SPA1-mRNA, jejichž důsledkem je vysoké, nebo nízké množství proteinu SPA. Frangolias [33] však nepředpokládá, že by polymorfizmy SPA a SPD měly výrazný vliv na progresi plicního postižení u CF.

Gabolde [40] potvrdil asociaci tíže jaterního postižení u 216 CF pacientů homozygotních pro F508del s polymorfizmem genu pro MBL. Signifikantně vyšší výskyt jaterní cirhózy byl u CF pacientů s homozygotní či heterozygotní mutací MBL2 genu. Imunodeficitní stav způsobený variantními alelami MBL vede k vyššímu poškození jaterního parenchymu hepatotoxickými viry či bakteriemi, které může nakonec vyústit až v jaterní cirhózu.

2.3.2 α_1 -antitrypsin

Chronický zánět dýchacích cest a jejich progresivní destrukce se mimo jiné připisují i proteinázám uvolněným z neutrofilů. α_1 -antitrypsin (α_1 -AT) je jeden z mála inhibitorů, který je schopen inaktivovat elastázy produkované neutrofilů. Je tvořen v játrech a vyznačuje se geneticky podmíněnými variacemi (Pi-systému), jejichž alely v genetickém lokusu se označují PiM, PiS a PiZ. Existuje i tzv. „nulová varianta“ (Pi--), kde α_1 -antitrypsin zcela chybí.

Patogenetické alely α_1 -AT byly v minulosti prokázány jako rizikové faktory pro rozvoj chronické obstruktivní plicní nemoci, zvláště pak v souvislosti s kouřením. V respiračních sekretech a v plazmě nemocných s CF prokázaly starší studie [13] normální i zvýšené hodnoty α_1 -AT, přičemž během exacerbací respiračních infekcí tito autoři prokázali jeho další vzestup.