

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Šárka Štolbová

Patofyziologické mechanismy nefropatií dětského věku

Pathophysiological mechanism of nephropaties in children

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Jakub Zieg, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 13.10.2024

MUDr. Šárka ŠTOLBOVÁ

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému školiteli doc. MUDr. Jakubu Ziegovi, Ph.D. za podporu a vedení mého postgraduálního studia. Dále prof. Ondřeji Cinkovi, Ph.D. za poskytnutí laboratoře a cenných rad v průběhu psaní publikací.

ABSTRAKT

Chronické nefropatie dětského věku patří mezi závažná onemocnění s častou progresí renální insuficience do konečného stádia chronického onemocnění ledvin s nutností zahájení dialýzy a/nebo provedení transplantace ledviny. K těm nejčastějším geneticky podmíněným chronickým nefropatiím patří steroid-rezistentní nefrotický syndrom (SRNS) a atypický hemolyticko-uremický syndrom (aHUS). Prvním cílem studie bylo vyšetřit genetickou etiologii SRNS u 74 českých a slovenských dětských pacientů s tímto onemocněním a v případě prokázané monogenní formy SRNS optimalizovat jejich léčbu. Druhým cílem bylo vyšetřit etiologii aHUS u 21 českých pacientů a zároveň určit incidenci tohoto onemocnění v české populaci. Genetická diagnóza byla stanovena u 28/74 pacientů (38 %) se SRNS na základě nálezů patogenních nebo pravděpodobně patogenních kauzálních variant. Nejčastějšími kauzálními geny byly *NPHS2* (15 %), *WT1* (9,5 %) a překvapivě *NUP93* se čtyřmi (5,4 %) nepříbuznými případy. Sangerovým sekvenováním bylo diagnostikováno 26 % pacientů, zatímco testování v druhé fázi studie pomocí cíleného panelu sekvenování nové generace (NGS) diagnostikovalo dalších 12 % nemocných. U 14/21 pacientů (67 %; 13 z nich bylo pozitivních na protilátky proti faktoru H) byly zjištěny delecce *CFHR1* a *CFHR3*, u 13/21 (62 %) varianty v genech komplementu nebo *DGKE*, u osmi pacientů (38 %) bylo zjištěno více genetických nálezů. Incidence aHUS v české dětské populaci byla za celé sledované období odhadnuta na 0,092 (CI 0,053-0,131) případů na milion obyvatel a 0,92 (CI 0,53-1,32) případů na 100 000 živě narozených dětí, což odpovídá jiným evropským populacím. Zjistili jsme neobvykle vysoký výskyt delecí *CFHR1/CFHR3* spojených s protilátkami proti faktoru H. Léčba eculizumabem vedla k lepším výsledkům, prevenci relapsů onemocnění a sníženému výskytu extrarenálních komplikací ve srovnání s plazmaferézou. Naše práce poskytuje důležité poznatky o genetických příčinách chronických nefropatií u dětí, konkrétně o SRNS a aHUS v české a slovenské populaci. Ukazuje, jaké genetické varianty jsou nejčastější a naznačuje význam cílené léčby u těchto pacientů.

Klíčová slova: SRNS, *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1*, *NUP93*, Sangerovo sekvenování, NGS, aHUS, protilátky proti faktoru H, delecce *CFHR1/CFHR3*, komplement, eculizumab

ABSTRACT

Chronic nephropathies in childhood are serious diseases with frequent progression of renal insufficiency to end-stage kidney disease requiring dialysis and/or kidney transplantation. The most common genetically determined ones include steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS) and atypical haemolytic uraemic syndrome (aHUS). The aim of the study was to analyse the genetic aetiology of SRNS in 74 Czech and Slovak paediatric patients with SRNS and in case of proven monogenic form to discontinue or optimize their treatment; and in 21 Czech patients with aHUS to determine the incidence of this disease in the Czech population and also to prove the aetiology of the disease in those patients. A genetic diagnosis was made in 28/74 patients (38%) with SRNS based on findings of pathogenic or likely pathogenic causal variants. The most frequent causative genes were *NPHS2* (15%), *WT1* (9.5%) and surprisingly *NUP93* with four (5.4%) unrelated cases. 26% of patients were diagnosed by Sanger sequencing, while testing in a phase two study using a targeted next generation sequencing (NGS) panel diagnosed a further 12%. In 14/21 patients (67%; 13 of them were positive for anti-factor H antibodies) *CFHR1* and *CFHR3* deletions were detected, in 13/21 (62%) variants in complement or *DGKE* genes were detected, in eight patients (38%) multiple genetic findings were detected. The incidence of aHUS in the Czech paediatric population was estimated to be 0.092 (CI 0.053-0.131) cases per million population and 0.92 (CI 0.53-1.32) cases per 100,000 births for the entire reporting period, which is in line with other European countries. We found an unusually high incidence of *CFHR1/CFHR3* deletions associated with anti-factor H antibodies. Treatment with eculizumab led to better outcomes, prevention of disease recurrence and lower incidence of extrarenal complications compared with plasmapheresis. Our work provides important insights into the genetic causes of chronic nephropathies in children, specifically SRNS and aHUS in the Czech and Slovak populations. It highlights the most common genetic variants and indicates the importance of targeted treatment for these patients.

Keywords: SRNS, *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1*, *NUP93*, Sanger sequencing, NGS, aHUS, anti-complement factor H antibodies, *CFHR1/CFHR3* deletion, complement, eculizumab

SEZNAM ZKRATEK

aHUS	atypický hemolyticko-uremický syndrom
C3	C3 složka komplementu
CFB	faktor B
CFH	faktor H
CHI	faktor I
CKD	chronic kidney disease (chronické onemocnění ledvin)
CMT	Charcot-Marie-Tooth
CNS	centrální nervový systém
CyA	cyklosporin A
DDS	Denys-Drashův syndrom
DGKE	diacylglycerol kináza epsilon
DMS	difusní mesangiální skleróza
ECM	extracelulární matrix
ESKD	end stage kidney disease (konečné stádium selhání ledvin)
FS	Frasierův syndrom
GBM	glomerulární bazální membrána
FGS	fokálně segmentální glomeruloskleróza
GFR	glomerulární filtrace
GLEPP1	glomerulární epiteliální protein 1
KNI	kalcineurinové inhibitory
LDH	laktátdehydrogenáza
MCP	membránový kofaktorový protein
MMF	mykofenolát mofetil
NGS	next generation sequencing (sekvenování nové generace)
NS	nefrotický syndrom
PF	plazmaferéza
PLG	plasminogen
RRT	renal replacement therapy (terapie nahrazující funkce ledvin)
RTX	rituximab
SIOD	Schimkeho imunoosseální dysplazie
SRNS	steroid-rezistentní nefrotický syndrom
THBD	trombomodulin
TMA	trombotická mikroangiopatie
TTP	trombotická trombocytopenická purpura
WT	Wilmsův tumor

OBSAH

1	ÚVOD	11
1.1	Steroid-rezistentní nefrotický syndrom	11
1.1.1	Etiologie SRNS.....	11
1.1.2	Renální biopsie	11
1.1.3	Léčba SRNS	12
1.1.3.1	Kortikosteroidy	12
1.1.3.2	Kalcineurinové inhibitory	12
1.1.3.3	Mykofenolát mofetil	13
1.1.3.4	Rituximab	13
1.1.3.5	Transplantace	14
1.1.4	Patofyziologie filtrační bariéry ledvin a vzniku nefrotického syndrom	14
1.1.5	Nejčastější geny asociované se SRNS	20
1.1.5.1	Gen <i>NPHS2</i> (podocinový gen)	21
1.1.5.2	Gen <i>NPHS1</i> (nefrinový gen)	22
1.1.5.3	Gen <i>WT1</i>	23
1.1.5.4	Gen <i>SMARCAL1</i>	24
1.1.5.5	Gen <i>PLCE1</i>	25
1.1.5.6	Gen <i>PTPRO</i>	25
1.1.5.7	Gen <i>LAMB2</i>	26
1.1.5.8	Gen <i>INF2</i>	26
1.1.5.9	Geny <i>COQ2</i> , <i>COQ6</i>	26
1.1.5.10	Gen <i>MYO1E</i>	27
1.1.5.11	Gen <i>TRPC6</i>	27
1.1.5.12	Gen <i>LMX1B</i>	28
1.1.5.13	Gen <i>ACTN4</i>	28
1.1.5.14	Gen <i>CD2AP</i>	28
1.1.5.15	Geny NUP	28
1.1.5.16	Gen <i>DGKE</i>	30
1.2	Atypický hemolyticko-uremický syndrom	30
1.2.1	Patofyziologie aHUS	31
1.2.1.1	Komplement	31
1.2.1.1.1	Klasická a lektinová cesta komplementu	31
1.2.1.1.2	Alternativní cesta komplementu	33

1.2.1.2	Patofyziologické mechanismy vzniku aHUS	34
1.2.2	Diagnostika aHUS	34
1.2.3	Poškození ledvin při aHUS	37
1.2.4	Extrarenální manifestace aHUS	37
1.2.5	Léčba aHUS	39
1.2.5.1	Eculizumab	39
1.2.5.2	Ravulizumab	41
1.2.5.3	Plazmaferéza	41
1.2.5.4	Transplantace	42
1.2.6	Geny asociované se vznikem aHUS	42
1.2.6.1	Geny pro regulátory komplementu	43
1.2.6.1.1	Gen <i>CFH</i>	43
1.2.6.1.2	Protilátky proti faktoru H	44
1.2.6.1.3	Geny asociované s faktorem H (<i>CFHR1-5</i>), hybridní geny	44
1.2.6.1.4	Gen <i>MCP</i>	44
1.2.6.1.5	Gen <i>C3</i>	45
1.2.6.1.6	Gen <i>CFI</i>	46
1.2.6.1.7	Gen <i>CFB</i>	46
1.2.6.2	Geny pro koagulační systém	47
1.2.6.3	Gen <i>DGKE</i>	47
2	CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY.....	48
2.1	Hypotéza	48
2.2	Hlavní cíle	48
2.3	Vedlejší cíle	48
2.4	Využití a přínos výsledků	49
3	METODIKA	50
3.1	Metodika SRNS	50
3.1.1	Kritéria výběru	50
3.1.2	Pacienti	51
3.1.2.1	Manifestace onemocnění	51
3.1.2.2	Léčba	51
3.1.2.3	Histopatologický nález	52
3.1.2.4	Wilmsův tumor a extrarenální příznaky	57
3.1.3	Genetická analýza	57

3.1.3.1	Sangerovo sekvenování	57
3.1.3.2	Sekvenování nové generace	59
3.1.4	Hodnocení nalezených variant	59
3.2	Metodika aHUS	60
3.2.1	Pacienti	60
3.2.2	Výpočet incidence	60
3.2.3	Kritéria výběru	63
3.2.4	Genetická analýza	63
3.2.4.1	Sekvenování nové generac	63
3.2.4.2	Technika MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification)	64
4	VÝSLEDKY	65
4.1	Výsledky SRNS	65
4.1.1	Kauzální varianty pro SRNS	65
4.1.2	Varianty nejasného významu	66
4.1.3	Pacienti a jejich fenotypy	66
4.1.3.1	Věk začátku onemocnění	66
4.1.3.2	Odpověď na farmakoterapii	67
4.1.3.3	Data ze sledování pacientů	67
4.1.3.4	Klinická data pacientů se SRNS způsobených genem <i>NUP93</i>	68
4.1.3.5	Pacient s nail-patella syndromem	69
4.2	Výsledky aHUS	70
4.2.1	Charakteristika pacientů	70
4.2.2	Genetické nálezy	72
4.2.3	Léčba a sledování pacientů	72
5	DISKUZE	73
5.1	Diskuze SRNS	73
5.1.1	Vysoký podíl pacientů s kauzální variantou v genu <i>NUP93</i>	73
5.1.2	Kauzální varianty v genech <i>NPHS2</i> a <i>WT1</i>	74
5.1.3	Modifikační účinek rs61747728, funkčního polymorfismu genu <i>NPHS2</i>	75
5.1.4	Nízký etiologický podíl genu <i>NPHS1</i>	75
5.1.5	Kauzální varianta v genu <i>INF2</i>	76
5.1.6	Kauzální varianta v genu <i>COQ2</i>	76
5.1.7	Kauzální varianta v genu <i>DGKE</i>	76
5.1.8	Kauzální varianta v genu <i>LMX1B</i> a možný podíl VUS v jiných genech	

asociovaných se SRNS	77
5.1.9 Odpověď na terapii cyklosporinem A	77
5.1.10 Síla studie a její limitace	78
5.2 Diskuze aHUS	79
5.2.1 Klinický stav pacientů	79
5.2.2 Genetická predispozice k aHUS	80
5.2.3 Relaps aHUS a vliv plazmaferézy a léčby eculizumabem	81
5.2.4 Spojení protilátek proti faktoru H a delece <i>CFHR1/CFHR3</i>	82
5.2.5 Deficit <i>DGKE</i>	83
5.2.6 Síla studie a její limitace	84
6 ZÁVĚR	86
7 SOUHRN	88
7.1 SRNS	88
7.2 aHUS	88
8 SUMMARY	89
8.1 SRNS	89
8.2 aHUS	89
9 LITERATURA	92
10 PŘÍLOHY	108

1 ÚVOD

1.1 Steroid-rezistentní nefrotický syndrom

Nefrotický syndrom (NS) je onemocnění charakterizované nefrotickou proteinurií ($> 960 \text{ mg/m}^2/\text{den}$), hypoalbuminémií ($< 25\text{-}30 \text{ g/l}$) a otoky. Incidence v západní Evropě se udává mezi 1.2 a 3.5 případů na 100 000 dětí a rok (Lee et al., 2020, Trautmann et al., 2022). Dle věku manifestace můžeme u dětí do 1 roku věku rozlišit kongenitální NS (< 3 měsíce) a infantilní NS (3 měsíce - 1 rok). Přestože většina pacientů dobře zareaguje na léčbu kortikosteroidy, 15-20 % případů je steroid-rezistentních (Kim et al., 2005, Mekahli et al., 2009). Steroid-rezistence je definovaná jako nedosažení remise po 4 týdnech terapie prednisonem v dávce $60 \text{ mg/m}^2/\text{den}$ (Trautmann et al., 2020, Tullus et al., 2018, Lombel et al., 2013). Steroid-rezistentní nefrotický syndrom (SRNS) je druhé nejčastější onemocnění ledvin způsobující chronické onemocnění ledvin v prvních 3 dekáдах života. Zhruba 50 % pacientů se SRNS dosáhne terminálního stádia selhání ledvin do 15 let věku (Lee et al., 2020).

1.1.1 Etiologie SRNS

Etiologie SRNS je ve většině případů nejasná. Za pravděpodobnou příčinu onemocnění u velké části těchto pacientů se v současné době považují solubilní cirkulující faktory, které zvyšují propustnost filtrační bariéry ledvin. Jedním z důkazů podporujících tuto teorii je fakt, že děti s negenetickou SRNS často relabují po transplantaci ledviny a následně dobře reagují na léčbu plazmaferézami nebo imunoabsorpcí (Tullus et al., 2018, Savin et al., 2017). Vzhledem k doposud neobjasněné etiologii NS hovoříme v tomto případě o idiopatickém NS. Pomocí molekulárně genetických metod se nyní daří nalézt genetickou podstatu SRNS u jedné třetiny až čtvrtiny pacientů (Tullus et al., 2018, Sadowski et al., 2015, Trautmann et al., 2015). V současné době známe více než 60 genů asociovaných se SRNS. Většina těchto genů má roli v ovlivnění diferenciaci nebo funkce podocytů.

1.1.2 Renální biopsie

Renální biopsie se rutinně provádí u každého pacienta se SRNS. Výjimkou jsou pouze případy se známou infekcí, malignitou, či pacienti s již diagnostikovanou genetickou

příčinou. Nejčastějším histologickým nálezem u jedinců se SRNS je fokálně segmentální glomeruloskleróza (FSGS) a to u 35-55 % pacientů, minimální změny nacházíme u 25-40% pacientů a mesangioproliferativní glomerulonefritidu u 10-15% nemocných. Ostatní histologické diagnózy jsou vzácné. Nález v renální biopsii nám nicméně nepomůže k odlišení genetické a negenetické formy NS. Stejně tak se neliší klinické příznaky mezi jednotlivými histologickými diagnózami (Tullus et al., 2018, Trautmann et al., 2015, Nammalwar et al., 2006).

1.1.3 Léčba SRNS

1.1.3.1 Kortikosteroidy

Počáteční léčba všech dětí s manifestací NS mimo kongenitální formy zahrnuje léčbu kortikosteroidy po dobu 6 týdnů denně, po které následuje obdenní léčba po dobu dalších 6 týdnů, celkem tedy 3 měsíce léčby (Tullus et al., 2018, Lombel et al., 2013). Mechanismus účinku kortikosteroidů u NS není zcela objasněn, nicméně vychází se z toho, že NS je imunologické onemocnění a kortikosteroidy působí prostřednictvím potlačení odpovědi zprostředkované T lymfocyty. Kromě jejich imunomodulačních účinků existují preklinické údaje, které naznačují, že kortikosteroidy mohou mít neimunologické účinky na aktinový cytoskelet podocytů. U steroid-rezistentních pacientů se používají v terapii imunomodulační léky druhé volby – kalcineurinové inhibitory, mykofenolát mofetil a rituximab (Bensimhon et al., 2019).

1.1.3.2 Kalcineurinové inhibitory

Kalcineurinové inhibitory (KNI) zahrnují dva léky běžně používané k léčbě NS – cyklosporin A (CyA) a takrolimus. Jejich imunosupresivní vlastnosti jsou důsledkem inhibice kalcineurinu, kalcium a kalmodulin-dependentní fosfatázy. Inhibice kalcineurinu vede k potlačení transkripce interleukinu-2 a následné aktivaci T-buněk. Léčbou KNI lze dosáhnout remise i u významné části pacientů se SRNS. Vedle imunosupresivních účinků mohou být antiproteinurické účinky KNI zprostředkovány také intrarenálními hemodynamickými změnami a inhibicí kalcineurinem zprostředkované degradace synaptopodinu a stabilizací aktinového cytoskeletu podocytů. Předpokládá se, že podobně jako glukokortikoidy, i neimunomodulační účinky KNI mohou zmírňovat klinické projevy

genetického SRNS, které jsou způsobeny strukturálními defekty podocytů a dalších složek glomerulární bazální membrány (Bensimhon et al., 2019). Byl prokázán i význam léčby CyA u pacientů s monogenní formou SRNS, necelých 30 % pacientů může na tuto terapii odpovědět částečnou nebo vzácněji i úplnou remisí onemocnění (Malakasioti et al., 2023).

1.1.3.3 Mykofenolát mofetil

Mykofenolát mofetil (MMF) je antiproliferativní látka, působící prostřednictvím svého aktivního metabolitu kyseliny mykofenolové jako nekompetitivní inhibitor enzymu inosinmonofosfátdehydrogenázy, který přednostně inhibuje proliferaci B a T lymfocytů. Mechanismus jeho účinku při léčbě glomerulární choroby není zcela objasněn, ale v lidských i experimentálních studiích bylo prokázáno, že MMF může působit potlačením proliferace lymfocytů a produkce protilátek. MMF také snižuje expresi interleukinu-2, interleukinu-4 a adhezních molekul v ledvinách. MMF může vyvolat úplnou nebo částečnou remisi u kortikorezistentního FSGS, aniž by působil na rozdíl od KNI nefrotoxicky. Máme k dispozici pouze málo podpůrných dat pro terapii MMF u pacientů se SRNS. V současnosti je indikace MMF u dětí se SRNS omezena na pacienty s GFR <30 ml/min/1.73m² s cílem vyhnout se nefrotoxicitě KNI. V průběhu terapie jej lze nasadit také v případě kortikosenzitivního relapsu u dítěte léčeného KNI (Trautmann et al., 2020).

1.1.3.4 Rituximab

Rituximab (RTX) je geneticky upravený chimérický lék. Jedná se o monoklonální protilátku, která obsahuje myší variabilní oblasti a lidskou konstantní doménu IgG1 namířenou proti antigenu CD20, exprimovanému na povrchu B lymfocytů (Bensimhon et al., 2019). Mechanismy účinku rituximabu u steroid-senzitivního NS i SRNS nejsou známy, nicméně bylo zjištěno, že RTX přímo moduluje a chrání podocyty před poškozením zachováním exprese sfingomyelinfosfodiesterázy acid-like 3b (SMPDL-3b), což naznačuje, že rituximab může modulovat funkci podocytů nezávisle na jeho imunomodulačním účinku. Další studie prokázaly efekt RTX na stabilizaci aktinových vláken podocytu a účasti na mechanismech zabráňujících apoptóze (Jerusche et al., 2022). Observační studie ukazují, že podání RTX je spojeno s kompletní remisí asi u 30 % pacientů se SRNS již léčených jinými imunosupresivy, proto se k jeho podání přistupuje u steroid-rezistentních až po vyčerpání jiných terapeutických možností (Gulati et al., 2010, Kamei et al., 2018).

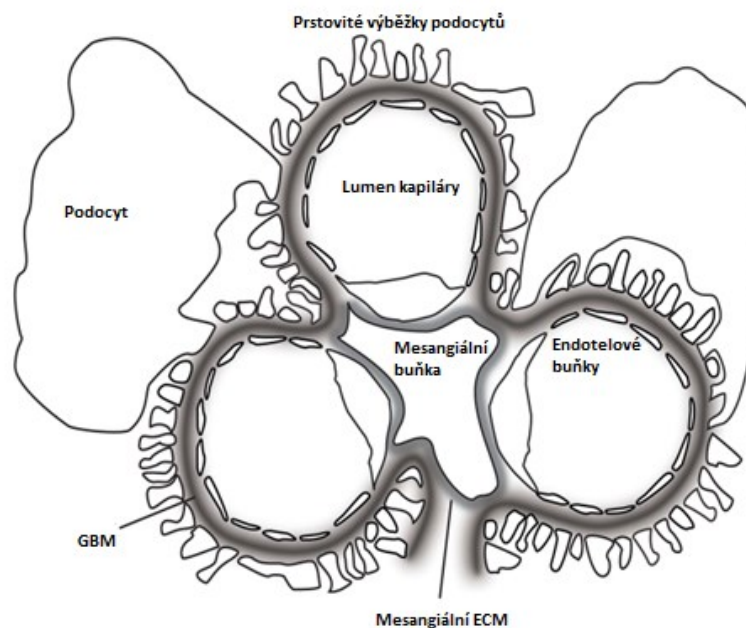
1.1.3.5 Transplantace

Pacienti s idiopatickou formou SRNS se liší od těch s monogenní formou nejen reakcí na léčbu (ti s idiopatickou formou často dosahují remise léčbou KNI, pacienti s genetickým SRNS obvykle nedosáhnou remise léčbou KNI ani jinými imunosupresivy a jejich léčba je pouze symptomatická), ale také rizikem rekurence po transplantaci ledviny. Na rozdíl od pacientů s idiopatickou formou je u těch s geneticky podmíněným SRNS riziko rekurence po transplantaci ledviny minimální. U pacientů s idiopatickým SRNS je příprava pacientů před k trasplantaci složitá, ve většině případů vyžaduje provedení bilaterální nefrektomie před transplantací. Důvodem je nutnost včasného zjištění rekurence onemocnění ve štěpu ledviny. Abychom mohli pacienty se SRNS správně léčit a vyhnout se nežádoucím účinkům imunosupresivní terapie, je nezbytné všechny testovat na přítomnost monogenních příčin (Tullus et al., 2018, Savin et al., 2017).

1.1.4 Patofyziologie filtrační bariéry ledvin a vzniku nefrotického syndromu

Ledvina každého člověk obsahuje přibližně 1 milion glomerulů. Glomerulus je vysoce sofistikovaná organela, která provádí selektivní filtraci cirkulující krve a vytváří tak u dospělého člověka neuvěřitelných 180 l filtrátu denně. Glomerulus je kulovitý svazek kapilár uzavřený buněčným Bowmanovým pouzdem s průměrem mezi 110 až 280 µm. Kapiláry jsou vystlány fenestrovanými endotelovými buňkami a pokryty vrstvou specializovaných epitelových buněk, známých jako podocyty. Mezi vrstvami buněk se nachází silná vrstva zvaná glomerulární bazální membrána (GBM), která poskytuje jakési strukturální lešení pro podporu stěn kapiláry. Endotelové buňky, GBM a podocyty společně tvoří glomerulární filtrační bariéru (obr. 1), která umožňuje volnou propustnost pro vodu a malé rozpuštěné látky, ale zabraňuje ztrátě makromolekul nebo buněk z krve do primárního ultrafiltrátu (Samuel et. al., 2007, Singh et al., 2007). O průchodu jednotlivých částic rozhoduje jejich molekulární hmotnost a elektrický náboj. Rozdíly elektrického potenciálu generovaného transglomerulárním tokem modulují tok molekul dle elektrického náboje přes stěnu glomerulární kapiláry. Z toho důvodu se negativně nabitě molekuly o větší molekulové hmotnosti filtrují v glomerulu za fyziologických podmínek obtížněji (Hausmann et al., 2010, Tojo, Kinugasa, 2012).

Bowmanův prostor

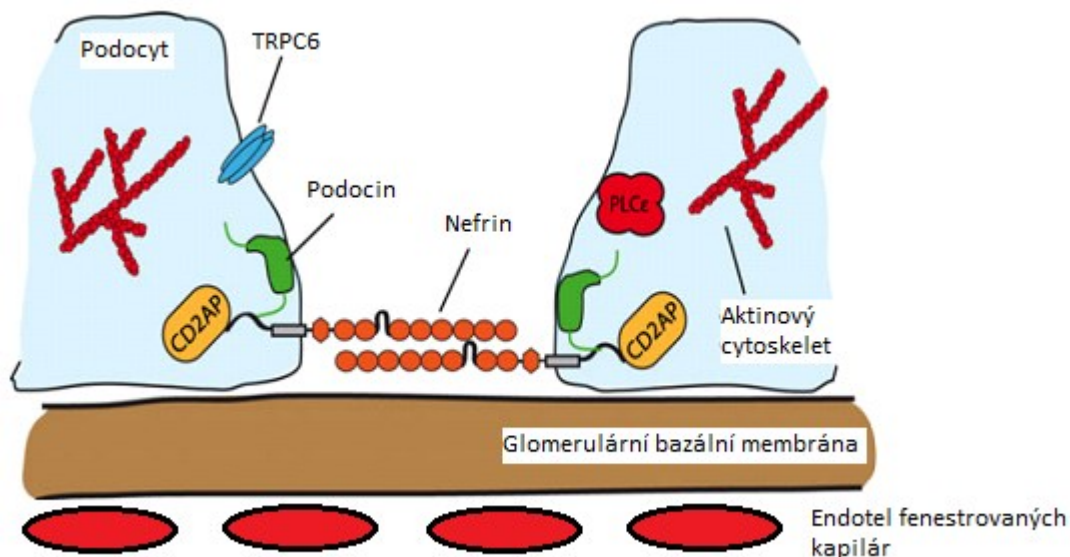


Obr. 1 Schématické znázornění glomerulu v příčném řezu. Glomerulární kapiláry jsou zevnitř vystlány fenestrovanými endotelovými buňkami, které jsou připojeny ke glomerulární bazální membráně (GBM). Podocyty pokrývají vnější stranu GBM velkými buněčnými těly a z nich vystupujícími prstovitými výběžky. Mezangiální buňky a s nimi spojená extracelulární matrix (ECM) spojují sousední kapiláry a kapilární svazek obsažený v Bowmanově pouzdře. Převzato z Lennon et al., The importance of podocyte adhesion for healthy glomerulus, Front Endocrinol, 2014.

Podocyt je terminálně diferencovaná epitelální buňka, která je základní stavební jednotkou pro fungování filtračního mechanismu ledviny. Skládá se z buněčného těla, ze kterého vybíhají četné prstovité výběžky připojené velkým množstvím adhezivních molekul ke GBM. Prstovité výběžky mezi sebou vytváří zipovitou strukturu nazývanou šterbinová membrána. Šterbinová membrána je viditelná elektronovým mikroskopem jako denzní struktura v blízkosti GBM. Předpokládá se, že tato specializovaná junkce spojuje celou délku sousedních prstovitých výběžků podocytů a vytváří základní strukturální složku filtrační bariéry ledvin. Z ultrastrukturálních studií vyplývá, že se jedná o strukturu podobné zipu, s proteinovými můstky vycházejícími z plazmatické membrány podocyty spojující centrální vlákno v mřížkovém uspořádání s póry obdélníkového tvaru (Rodewald, Karnovsky, 1974). Vypočtený průřez rozměrů těchto pórů byl 4×14 nm, což je přibližně velikost molekuly albuminu, z čehož vyplývá, proč za normálních okolností šterbinovou membránou neprochází makromolekuly. Novější ultrastrukturální studie použily skenovací elektronovou mikroskopii k popisu kruhových a elipsoidních pórů v centrální oblasti šterbinové membrány

se středním průměrem 12,1 nm (Gagliardini et al., 2010). Zajímavé je, že stejná studie prokázala zvětšení velikosti některých z těchto pórů v souvislosti s proteinurií, což možná poskytuje vysvětlení pro zvýšený průchodu makromolekul přes poškozenou filtrační bariéru. Mnoho studií také ukázalo, že architektura podocytů se při onemocnění glomerulů u lidí dramaticky mění. Dochází ke zploštění prstovitých výběžků podocytů bohatých na aktin a ztrátě štěrbinové membrány. Zatímco tyto dramatické morfologické změny jsou spojeny s hlubokým defektem této bariéry, pozoruhodné je, že tyto změny jsou kompletně reverzibilní u pacientů s NS s dobrou reakcí na léčbu kortikoidy (Bensimhon et al., 2019).

Štěrbínová membrána se skládá z četných molekul, které mají funkci důležitých strukturálních komponentů (obr. 2). Jedním z nejdůležitější proteinů je nefrin a jeho homology Neph-1, Neph-2 a Neph-3, které patří do imunoglobulinové nadrodiny buněčných adhezivních receptorů a podílejí se na vývoji speciálních spojů v nefronech a na štěrbinové membráně. Mutací genu kódujícího nefrin vzniká nejčastěji těžká forma kongenitálního NS (Ruotsalainen et al., 1999). Mezi další významné členy komplexu štěrbinové membrány patří podocin, protein z rodiny stomatinů, jehož mutace byly popsány u pacientů s časnou formou nefrotického syndromu. Podocin je důležitý pro spojování proteinů do komplexu štěrbinové membrány a slouží také k usnadnění buněčné signalizace (Huber et al. 2003). Další důležitou součástí štěrbinové membrány je CD2AP, adaptorový protein, jehož úlohou je udržování integrity filtrační bariéry (Shih et al., 1999). Spolu s proteinem CIN85 hrají roli v rovnováze signalizace podocytu přes tyrozinkinázové receptory. Proteinový komplex na štěrbinové membráně zahrnuje komponenty, které vytvářejí spojení mezi sousedními prstovitými výběžky podocytů, další ještě dynamičtější síť proteinů se ale nacházejí i intracelulárně (Lennone et al., 2014).



Obr. 2 Tento obrázek znázorňuje zjednodušené schéma štěrbinové membrány podocyty, skládající se z podocytů, glomerulární bazální membrány a endotelu fenestrováných kapilár. Na funkci štěrbinové membrány má také vliv řada proteinů, které jsou přímou součástí štěrbinové membrány (nefrin, podocin) nebo úzce interagují s jejími proteiny (CD2AP, TRPC6, PLCε). Převzato z Grahammer et al., Molecular understanding of the slit diaphragm, *Pediatr Nephrol*, 2013.

Důležitou funkcí štěrbinové membrány je buněčná signalizace. Klíčem k přenosu signálu je fosforylace nefrinu a dalších proteinů z rodiny nefrinů. Výsledkem této fosforylace je kaskáda dějů, které vedou k reorganizaci aktinu. Na tomto procesu se podílí celá řada proteinů, včetně receptoru Robo2 exprimovaného v podocytech. Bylo zjištěno, že tento receptor inhibuje reorganizaci aktinu a zdá se, že negativně reguluje signalizaci prostřednictvím nefrinu, a proto zmenšuje vyhlazení prstovitých výběžků podocytů. Regulace aktinového cytoskeletu podocytů je tedy klíčem k udržení integrity bariéry a reorganizace aktinu v podocytech pravděpodobně přímo souvisí s dramatickým vyhlazením prstovitých výběžků podocytů, které se projevuje v celém spektru onemocnění ledvin (Fan et al., 2012).

Protein alfa-aktinin-4 (ACTN4) je další protein, který hraje roli v regulaci aktinových filament podocyty. Bylo prokázáno, že mutovaný protein alfa-aktinin-4 se váže na filamentární aktin silněji než protein bez mutace, což naznačuje, že regulace aktinu je důležitá pro normální funkci podocytů (Kaplan et al., 2000). Další třídou aktinových regulátorů jsou GTPázy, a také protein z rodiny forminů INF2. Mutace v genech pro proteiny ACTN4 a INF2 byly popsány v souvislosti se vznikem NS (Sun et al., 2013). Pro správnou funkci buněčné signalizace na štěrbinové membráně je také nezbytná správná

lokalizace proteinů. Pro správnou lokalizaci nefrinu na plazmatické membráně je zásadní přítomnost endocytárního proteinu Myo1c. Podobným proteinem je myozin Myo1E (Arif et al., 2019, Krendel et al., 2009), který přispívá k endocytóze v podocytech. Důležitá je také role vápníkové signalizace na štěrbinové membráně, kde hraje roli receptor kationtového kanálu TRPC6. Mutace v genech kódujících myosin Myo1E a TRPC6 jsou opět spojeny se vznikem nefrotického syndromu (Lennone et al., 2014).

Stále existuje mnoho otázek, které je třeba vyřešit, abychom pochopili, jak se tato specializovaná struktura – štěrbinová membrána, vytváří během vývoje, jak je regulována ve zdraví a jak je narušena při onemocnění ledvin. Klíčové jsou pravděpodobně chemické a mechanické faktory v mikroprostředí a regulace bariéry růstovými faktory nebo role vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF-A) a inzulinu (Welsh et al., 2010, Lennone et al., 2014).

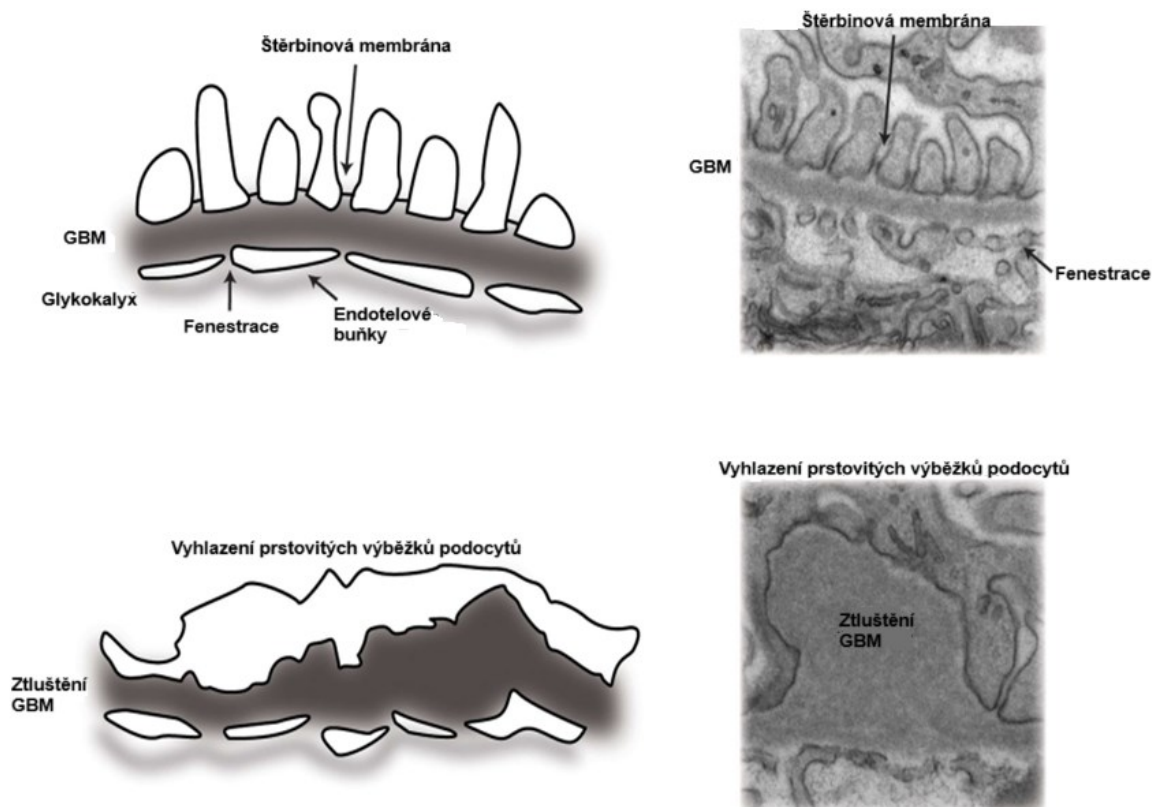
Extracelulární matrix (ECM) je pro mnohobuněčný život nezbytná a poskytuje strukturální lešení s vhodnými mechanickými vlastnostmi, které podporuje přilehlé buňky. Skládá se ze složité sítě glykosaminoglykanů a vláknitých proteinů, které jsou syntetizovány a vylučovány buňkami. Podocyty a glomerulární endotelové buňky adherují k síti ECM prostřednictvím povrchových buněčných receptorů. Toto rozhraní mezi buňkami a ECM tvoří signální platformu, která řídí všechny aspekty buněčného života, včetně tvaru, růstu, diferenciaci a přežívání (Hynes, 2009). Kromě této signální platformy ECM modifikuje mezibuněčnou signalizaci tím, že sekvestruje vylučované růstové faktory a cytokiny a vytváří zásobníky pro jejich kontrolované uvolňování (Hynes, 2009). Bazální membrány jsou kondenzované pláty ECM se supramolekulárním uspořádáním postaveným kolem dvou hlavních sítí lamininu a kolagenu IV. Uvnitř glomerulu je ECM uspořádána jako GBM kapilárních stěn a bazální membrána Bowmanova pouzdra. Další je volná mezangiální ECM mezi kapilárními kličkami (obr. 1). Zralá GBM je tlustší než většina bazálních membrán (u člověka 300-350 nm) a představuje spojení dvou membrán, jedné odvozené od podocytů a druhé od endoteliálních buněk během vývoje glomerulů (Tryggvason et al., 2006).

Lamininy jsou heterotrimerní glykoproteiny, které jsou absolutně nezbytné pro vytvoření bazální membrány (Paulsson, 1999, Miner et al., 2004). Vyvíjející se GBM obsahuje laminin $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ (laminin-511), ale zralá GBM obsahuje převážně laminin-521. Kompletní síť lamininu-521 je klíčem k funkční GBM. Důkazem je například mutace v LAMB2, genu

kódujícího $\beta 2$ řetězec lamininu. Tato mutace může způsobit vznik Pierosova syndromu, charakterizovaného kongenitálním nefrotickým syndromem, mikrokorií, svalovou hypotonií a opožděním psychomotorického vývoje (Pierson et al., 1963, Matejas et al., 2010). Na rozdíl od lamininové sítě není síť kolagenu IV pro tvorbu bazální membrány potřebná, zdá se ale, že je důležitá pro pevnost a stabilitu (Poschl et al., 2004). Kolagen IV tvoří heterotrimery sestávající ze tří kombinací alfa řetězců ($\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$, $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$). Od stadia kapilární kličky ve vývoji glomerulů se GBM skládá převážně ze sítě $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ kolagenu IV a stejně jako u lamininu je vývojový přechod kolagenu IV kritický pro zrání GBM. Mutace vedoucí k redukci nebo absenci sítě řetězců $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ způsobují Alportův syndrom, onemocnění charakterizované hematurií, proteinurií, převodní poruchou sluchu a selháním ledvin (Hudson et al., 2003).

Integrita glomerulární filtrační bariéry závisí jak na adhezi mezi buňkami, tak na adhezi mezi buňkami a ECM, které byly zkoumány převážně u podocytů, ačkoli jsou nepochybně kritické pro endotel glomerulů. Adhezivní receptory mezi buňkami a buňkami a ECM sousedních buněk se vážou k buněčnému cytoskeletu a fungují jako životně důležité kanály pro přenos signálů dovnitř a ven z buněk (Lennone et al., 2014).

Onemocnění glomerulů je charakterizováno sníženou integritou bariéry s následnou ztrátou bílkovin (proteinurie) nebo krvinek (hematurie) do moči. Dysfunkce bariéry je charakterizována zploštěním nebo vymizením prstovitých výběžků podocytů, což je patrné z elektronového mikroskopu (obr. 3). Příčiny narušení bariéry sahají od vrozených poruch spojených s genetickými mutacemi až po získané onemocnění spojené s řadou zánětlivých nebo metabolických poruch, které mohou být specificky zaměřeny na glomerulus nebo mohou být součástí širšího systémového onemocnění, jako je například diabetes mellitus. Přetrvávající glomerulární dysfunkce s proteinurií vede k chronickému onemocnění ledvin až k jeho terminálnímu stádiu. V současné době je k dispozici jen omezené množství terapií, které by zpomalily progresi glomerulárního onemocnění, a proto v současnosti probíhá výzkum k prohloubení znalostí jak o normální funkci glomerulů, tak i o dysfunkci způsobené patologickým procesem (Lennone et al., 2014).



Obr. 3 Schématické zobrazení glomerulární filtrační bariéry (Horní část) obraz elektronového mikroskopu a schéma normální architektury vícevrstvé glomerulární filtrační bariéry. (Spodní část) obraz elektronového mikroskopu a schéma defektů glomerulární filtrační bariéry, včetně ztráty štěrbinových membrán a vyhlazení prstovitých výběžků podocytů spolu se ztlustěním glomerulární bazální membrány. Převzato z Lennon et al., The importance of podocyte adhesion for healthy glomerulus, Front Endocrinol, 2014.

1.1.5 Nejčastější geny asociované se SRNS

Dosud největší studie geneticky podmíněného SRNS byla provedena v rámci registru Podonet. Projekt PodoNet byl zahájen s cílem vytvořit koordinované klinické, genetické a experimentální výzkumné aktivity v oblasti SRNS. Cílem projektu bylo vypracovat diagnostická a terapeutická doporučení pro SRNS, shromáždit dostatečné množství pacientů a biologických vzorků pro stanovení relativní četnosti genetických a negenetických forem SRNS, popsat korelace mezi genotypem a fenotypem, hledat nové geny způsobující onemocnění a vytvořit in vitro a in vivo modely zaměřené na vývoj nových molekulárních terapií nejčastější genetické formy SRNS. Byl založen webový portál poskytující diagnostická a terapeutická doporučení. Byl také vytvořen registr pacientů se SRNS (www.podonet.org). Do studie bylo zařazeno celkem 1655 pacientů se SRNS, jenž se

manifestoval v dětském věku, s kongenitálním NS a s perzistující nenefrotickou proteinurií z 67 nefrologických center z celkem 21 zemí světa. Genetická varianta způsobující onemocnění byla zjištěna u 23.6 % pacientů. Nejčastěji byly genetické abnormality nalezeny v genech *NPHS2*, *WT1* a *NPHS1* (tabulka 1). Genetická příčina onemocnění byla nalezena u 66 % pacientů s kongenitálním NS. U pacientů, kteří se manifestovali ve školním věku a v adolescenci byla genetická etiologie identifikována pouze u 16 % testovaných (Trautmann et al, 2015).

Tabulka 1 Přehled nejčastějších genů asociovaných se SRNS u dětí v Evropě

Gen	Dědičnost	Chromozom	Četnost (%) (registr Podonet)	Klinický genotyp
<i>NPHS2</i>	AR	1	12,7	NS
<i>WT1</i>	AD	11	5,3	Denys-Drashův, Frasierův a WAGR syndrom, izolovaný Wilmsův tumor
<i>NPHS1</i>	AR	19	19,7	NS
<i>SMARCAL1</i>	AR	2	17,6	Schimkeho imunooséální dysplázie
<i>PLCE1</i>	AR	10	13,3	NS
<i>PTPRO</i>	AR	12	13,3	NS
<i>LAMB2</i>	AR	3	6,0	Piersonův syndrom
<i>INF2</i>	AD	14	3,6	Charcot-Marie-Tooth syndrom
<i>COQ6</i>	AR	14	10,0	NS odpovídající na léčbu koenzymem Q10
<i>MYO1E</i>	AR	15	4,2	NS a FSGS
<i>TRPC6</i>	AD	11	1,0	AD FSGS
<i>COQ2</i>	AR	4	1,8	NS odpovídající na léčbu koenzymem Q10
<i>LMX1B</i>	AD	9	3,7	Nail-patella syndrom
<i>ACTN4</i>	AD	19	3,7	AD FSGS
<i>CD2AP</i>	AR	6	0,0	NS a FSGS

AR autozomálně recesivní, *AD* autozomálně dominantní, *NS* nefrotický syndrom, *FSGS* fokálně segmentální glomeruloskleróza

1.1.5.1 Gen *NPHS2* (podocinový gen)

Gen *NPHS2* kóduje glomerulární protein podocin, který se nachází na chromozomu 1 a je podobně jako nefrin součástí štěrbinové membrány podocyty. Mutace v tomto genu byly poprvé popsány v roce 2000 u skupiny dětí s časnou manifestací autozomálně recesivní formy SRNS (Joshi et al., 2013). Přestože gen *NPHS2* obsahuje pouze 8 exonů, bylo již popsáno 126 různých mutací v tomto genu (Bouchirem et al., 2013), z toho zhruba polovina jich je asociovaná se SRNS. Tyto mutace ovlivňují funkci, strukturu nebo expresi podocinu,

čímž způsobují poruchu prostorového uspořádání a stability podocyty (Joshi et al., 2013). Nejčastější skupinou mutací genu *NPHS2* jsou missence-mutace, tvoří 42 % z celkového počtu nalezených mutací. Ve 29 % se jedná o malé inserce a delece, třetí nejčastější skupinou jsou nonsense mutace (Bouchireem et al., 2013).

Mutace v podocinu způsobují autozomálně recesivní formu SRNS. Představují nejčastější příčinu geneticky podmíněného SRNS u dětí s manifestací onemocnění ve věku 1-18 let. U pacientů s kongenitálním NS (manifestace do 3 měsíců života) jsou častěji identifikovány pouze mutace v *NPHS1* genu. U pacientů s homozygotní nebo složenou heterozygotní mutací se SRNS projevuje nejčastěji před šestým rokem věku a velice rychle progreduje do terminální fáze chronického onemocnění ledvin. Doba klinické manifestace závisí především na typu mutace. Nejčastěji popisovanou mutací vyskytující se v severní Evropě a USA je R138Q. U homozygotů pro tuto mutaci se SRNS manifestuje před šestým rokem života (z toho 93,3 % před prvním rokem věku) a jeho klinické projevy bývají závažnější. Příčinou závažnějšího fenotypu onemocnění je zkrácení podocinu, který narušuje vazbu nefrinu do oblasti štěrbinové membrány podocyty (Joshi et al., 2013). Naproti tomu polymorfismus R229Q, který s určitými dalšími patogenními mutacemi na druhé alele genu *NPHS2* způsobuje zvýšené riziko vzniku SRNS, se vyskytuje častěji u dospělých pacientů a průběh onemocnění bývá méně závažný (Sadowski et al., 2015, Skálová et al., 2017). Na rozdíl od mutací v genu *NPHS1* je prevalence rekurence SRNS ve štěpu vzácná (Bouchireem et al., 2013).

1.1.5.2 Gen *NPHS1* (nefrinový gen)

V roce 1998 objevil Kestilä a jeho spolupracovníci, že mutace v genu *NPHS1* jsou zodpovědné za vznik kongenitálního NS (Kestilä et al., 1998). Gen *NPHS1* kóduje nefrin, který je hlavní součástí štěrbinové membrány a spojuje prstovité výběžky podocytů do zipovité struktury. Také se účastní buněčné signalizace s dalšími proteiny štěrbinové membrány. V současné době je známo více než 200 mutací tohoto genu, polovina z nich je spojena se vznikem kongenitálního NS. Říká se mu také NS finského typu, kvůli vysoké prevalenci tohoto onemocnění ve Finsku (1:10000). Ve finské populaci byly popsány dvě nejčastější mutace předčasně ukončující syntézu nefrinu (fin-minor a fin-major). Obě vedou k absenci normálního nefrinu. Výsledkem je změna struktury výběžků štěrbinové membrány. Klinický průběh bývá velmi závažný, v graviditě je obvykle zjištěn

polyhydramnion, děti se rodí předčasně a obvykle s intrauterinní růstovou retardací. Masivní proteinurie se objevuje již prenatálně s následným rozvojem SRNS po narození. Pro toto onemocnění je typická rychlá progresie do terminálního stádia selhání ledvin. Složení heterozygoté se manifestují často po 3 měsíci věku a mohou mít mírnější průběh onemocnění, způsobený tím, že funkce nefrinu zůstává částečně zachována. Extrarenální příznaky jsou u tohoto typu NS vzácné (Joshi et al., 2013, Skálová et al., 2017, Ruotsalainen et al., 1999). Rozdíly v mutacích fin-major a fin-minor jsou důležité především v riziku rekurence onemocnění po transplantaci ledviny. Zatímco u fin-minor je riziko rekurence minimální, u pacientů s homozygotní mutací fin-major se pohybuje kolem 30 % (Holmberg, Jalanko, 2014). V nedávné době byly také zjištěny protilátky proti nefrinu, které pravděpodobně poškozují štěrbinovou membránu podocyty a způsobují masivní proteinurii. Množství těchto protilátek bylo významně sníženo nebo úplně chyběly během léčebné odpovědi u podskupiny pacientů s minimálními změnami podocytů v renální biopsii (Watts et al., 2022). U většiny pacientů s rekurencí NS po transplantaci byly tyto protilátky nalezeny také, jejich titr klesal nebo úplně vymizel po léčbě plazmaferézou, kortikoidy, cyklofosfamidem nebo rituximabem (Holmberg, Jalanko, 2014).

1.1.5.3 Gen *WT1*

Gen *WT1* je tumor-supresorový gen umístěný na chromozomu 11, který kóduje transkripční faktor nezbytný pro vytváření urogenitálního traktu a glomerulární filtrační membrány ve fetální ledvině (Joshi et al., 2013). Po ukončení nefrogeneze je exprese genu *WT1* omezená pouze do oblasti podocytů. Gen *WT1* také řídí gen *SRY*, který kóduje specifický transkripční faktor stojící na počátku kaskády, jež determinuje rozvoj mužského pohlaví (Ahn et al., 2016). Mutace v genu *WT1*, kterých je více než 95 % lokalizováno v oblasti exonu 8 a 9 (Chernin et al., 2010), způsobují širokou škálu fenotypů – Denys-Drashův syndrom (DDS), Frasierův syndrom (FS), izolovaný Wilmsův tumor, nefrotický syndrom typ 4 (NPHS4), WAGR syndrom (Wilmsův tumor, aniridie, genitouretrální abnormality a mentální retardace) (Joshi et al., 2013) a extrémně vzácný Meachamův syndrom (genitouretrální abnormality, kongenitální srdeční vady) (Ahn et al., 2016).

Denys-Drashův syndrom je charakterizován časným začátkem SRNS s rychlou progresí do terminálního stádia chronického onemocnění ledvin, mužským pseudohermafroditismem, vysokým rizikem vzniku Wilmsova tumoru (WT) (Joshi et al., 2013) a nálezem difusní

mesangiální sklerózy (DMS) v renální biopsii (Chernin et al., 2010). Většina těchto pacientů má heterozygotní zárodečnou mutaci genu *WT1* (Joshi et al., 2013). Byly popsány též inkompletní formy DDS, vyznačující se časně vzniklou glomerulopatií asociovanou buď s velkou urogenitální abnormalitou, nebo s WT (Chernin et al., 2010). Frasierův syndrom je vzácné onemocnění definované jako mužský pseudohermafroditismus, SRNS a vysoké riziko vzniku gonadoblastomu. Riziko vzniku WT je nižší v porovnání s pacienty s DDS. Klinický začátek onemocnění je pozdější než u pacientů s DDS (mezi 2-6 lety života), progresse do terminálního stádia chronického onemocnění ledvin je pomalejší a typickým nálezem v renální biopsii je FSGS. Nefrotický syndrom typ 4 je charakterizován časným začátkem onemocnění (4-12 měsíců věku), izolovanou DMS, SRNS a rychlou progresí do chronického renálního selhání (Joshi et al., 2013).

Mutace v genu *WT1* se dědí autosomálně dominantně, proto se doporučuje též vyšetření rodičů postižených pacientů. Většina z prokázaných mutací nebyla u rodičů pacientů nalezena, jednalo se tedy o de novo mutace. Vzhledem k riziku nádorových onemocnění (WT, gonadoblastom) a urogenitálních malformací se doporučuje u všech pacientů s prokázanou mutací v genu *WT1* doplnit vyšetření karyotypu a onkologické sledování pacienta (Skálová et al., 2017).

1.1.5.4 Gen *SMARCAL1*

Gen *SMARCAL1* kóduje protein, který se váže k chromatinu (komplexu DNA a proteinů vytvářejících DNA). Předpokládá se, že protein SMARCAL1 ovlivňuje expresi jiných genů prostřednictvím remodelace chromatinu. Bialelická mutace v genu *SMARCAL1* způsobuje závažné autozomálně recesivně dědičné onemocnění zvané Schimkeho imunoosseální dysplázie. Schimkeho imunoosseální dysplázie (SIOD), poprvé popsána Schimkem a kolektivem v roce 1971, je multisystémové onemocnění s prevalencí 1:1-3 000 000 živě narozených dětí. Je charakterizována spondyloepifyzární dysplazií (způsobující malý vzrůst), faciálním dysmorfismem, nefropatií vedoucí k progresivnímu poškození funkce ledvin a k poškozené buněčné struktuře imunity (Schimke et al., 1971). Hlavní symptomy vedoucí k vyslovení podezření této diagnózy jsou nefrotická proteinurie u dítěte s disproporčně malým vzrůstem. U většiny dětí se konečné stadium onemocnění ledvin (ESKD) vyvine před dosažením 10 let věku. Nejčastějšími histologickými nálezy v ledvinách jsou fokální segmentální glomeruloskleróza (FSGS) nebo minimální změny glomerulů. Účinná terapie

onemocnění ledvin neexistuje. U pacientů s ESKD se zahajuje náhrada funkce ledvin, většinou peritoneální dialýza. Nejčastějšími komplikacemi u těchto pacientů jsou infekce spojené s T-buněčným deficitem, které jsou zároveň také nejčastější příčinou jejich úmrtí. SIOD může být dále komplikována postižením centrálního nervového systému (nejčastěji cévními mozkovými příhodami, způsobenými stenózami či spazmy intrakraniálních arterií), postižením plic, enteropatií, selháním kostní dřeně a autoimunitou. Klinická manifestace je velmi variabilní, od rychle progredujícího onemocnění, kdy děti umírají již v první fázi až po mírnější formy, kdy pacienti přežívají až do dospělosti. Korelace mezi genotypem a fenotypem je velmi nízká, takže klinický průběh ani výsledek nelze předpovědět (Zieg et al., 2023). Kvůli vysokému riziku infekcí v kombinaci s intenzivní imunosupresivní terapií po transplantaci, nebylo možné tyto pacienty transplantovat. Zkoušelo se také provedení transplantace ledvin u pacientů s SIOD, kteří předtím podstoupili transplantaci kostní dřeně po myeloablativní úpravě. Většina pacientů nicméně poté zemřela na komplikace spojené s transplantací kostní dřeně. Vysoká mortalita těchto pacientů se SIOD může přinejmenším částečně vysvětlit zvýšenou citlivostí SMARCA1-deficientních buněk na látky poškozující DNA, které se používají v myeloablativních úpravách. Recentně byl ve Stanfordu navržen nový léčebný postup. Třem pacientům se SIOD byly transplantovány haploidentické krvetvorné kmenové buňky a následně ledvina s deplecí $\alpha\beta$ T-buněk a s deplecí CD19 B-buněk od téhož dárce. Bylo dosaženo plného dárcovského hematopoetického chimérismu a funkční tolerance T-buněk ex vivo a pacienti měli 22 až 34 měsíců po transplantaci ledviny nadále normální funkci ledvin bez nutnosti imunosuprese (Bertaina et al., 2022).

1.1.5.5 Gen *PLCE1*

Tento gen kóduje fosfolipázu C epsilon 1, která katalyzuje hydrolýzu membránových fosfolipidů, čímž vznikají molekuly – sekundární poslové inositol 1,4,5-trifosfát a diacylglycerol mající vliv na intracelulární mechanismy růstu a diferenciaci buněk. Mutace v genu způsobuje izolovanou DMS a těžkou formu nefrotického syndromu s autozomálně recesivním přenosem (Boyer et al., 2010).

1.1.5.6 Gen *PTPRO*

Protein PTPRO, nazývaný též glomerulární epiteliální protein 1 (GLEPP1), je membránový protein nacházející se na apikální straně membrány výběžků podocytů. Bylo prokázáno, že

jednou z jeho funkcí je regulace glomerulárního tlaku a perselektivity. Mutace v genu *PTPRO* způsobuje autozomálně recesivní formu NS (Ozaltin et al., 2011).

1.1.5.7 Gen *LAMB2*

Gen *LAMB2* kóduje laminin beta 2, jeden ze 3 řetězců lamininu. Laminin hraje důležitou roli v diferenciaci, adhezi, migraci a růstu neuritů nervových buněk. Lamin beta 2 je ve velké míře exprimován v glomerulární bazální membráně, kde hraje klíčovou roli při diferenciaci a ukotvení výběžků podocytů. Mutace v genu *LAMB2* způsobuje Piersonův syndrom, autozomálně recesivně dědičné onemocnění charakterizované těžkou, nejčastěji kongenitální formou NS, psychomotorickou retardací a postižením oka s mikrokorií a slepotou (Zenker et al., 2004).

1.1.5.8 Gen *INF2*

Gen *INF2* kóduje protein inverted formin 2, který funguje jako regulační molekula při polymerizaci aktinu v podocytech. Podílí se také na základních krocích myelinizace a udržování myelinu. Jeho mutací vzniká syndrom Charcot-Marie-Tooth – jedná se o heterogenní skupinu dědičných periferních neuropatií. Projevuje se progresivní slabostí a atrofií distálních svalů, sníženými šlachovými reflexy a deformitami rukou a nohou. U části pacientů se může objevit proteinurie, která může být i kortikorezistentní. Autozomálně dominantní FSGS je nejčastější manifestací SRNS asociovaného s mutací v *INF2*. Část těchto pacientů v dospělosti dospěje do terminálního stádia chronického onemocnění ledvin (Boyer et al., 2011).

1.1.5.9 Geny *COQ2*, *COQ6*

Geny *COQ2* a *COQ6* kódují proteiny zapojené do biosyntézy koenzymu Q10. Koenzym Q10 je nezbytnou součástí dýchacího řetězce na membráně mitochondrií. Termín primární CoQ10 deficeince definuje skupinu vzácných mitochondriálních onemocnění způsobených recesivními variantami genů kódujících proteiny biosyntézy koenzymu Q10. Koenzym Q10 je lipidová složka dýchacího řetězce. Jeho nedostatek vede k bioenergetickým poruchám, nedostatku H₂S a oxidačnímu stresu v mnoha typech buněk se širokým a variabilním spektrem postižení orgánů a závažnosti onemocnění, od postižení jednoho orgánu až po

komplexní syndromové fenotypy. Jedná se o skupinu vzácných autosomálně recesivních chorob, vyznačujících se především symptomy poškození v oblasti mozku, kosterních svalů a periferního nervového systému. Defekty podocytů vedou k proteinurii a postupné ztrátě funkce glomerulů. Mezi 10 geny kódujícími proteiny podílejících se na biosyntéze CoQ10, je spojován fenotyp postižení ledvin především s bialelickými variantami v genech *COQ2*, *COQ6* a *COQ8B* (dříve označované jako *ADCK4*). Ačkoli odhad přesné prevalence deficitu CoQ10 je pro vzácnost tohoto onemocnění složité stanovit, publikované zprávy z registrů naznačují, že tyto poruchy představují přibližně 0,5% mitochondriopatií, 2% dětských SRNS/perzistentních proteinurií a až 5% molekulárně potvrzených genetických případů SRNS. Poškození podocytů se klinicky projevuje jako SRNS, s manifestací nejčastěji během prvních let života. Udává se nicméně velká variabilita spektra a závažnosti fenotypů napříč jednotlivými geny. U pacientů s mutací v genu *COQ2* byly popsány časté extrarenální manifestace. Nejčastěji se jedná o poruchy centrálního nervového systému, psychomotorickou retardaci, srdeční postižení a retinopatii. U pacientů s mutací v genu *COQ6* byla kromě častého postižení centrálního nervového systému popsána i percepční porucha sluchu (od mírných poruch s pozdním projevem onemocnění až po kongenitální hluchotu). Včasná léčba suplementací koenzymu Q10 může významně zlepšit klinické symptomy, v případě NS snižuje proteinurii a progresi chronického onemocnění ledvin (Drovandi et al., 2022, Gigante et al., 2017).

1.1.5.10 Gen *MYOIE*

Tento gen kóduje nesvalový myosin třídy I, který je exprimovaný na membráně podocytů a má roli při udržování glomerulární filtrační bariéry. Mutace v genu *MYOIE* způsobuje SRNS s manifestací v dětském věku s nálezem FSGS v renální biopsii (Mele et al., 2011).

1.1.5.11 Gen *TRPC6*

TRPC6 je gen kódující kalciový kanál exprimovaný v renálních tubulech a glomerulech, převážně v podocytech. Mutace způsobují zvýšenou aktivitu tohoto kanálu a zvýšený vstup vápníku do podocytů. Příímý mechanismus vzniku FSGS s klinickým obrazem SRNS u dospívajících a mladých dospělých, která je mutací v tomto genu popsána, však není znám (Gigante et al., 2011).

1.1.5.12 Gen *LMX1B*

Gen *LMX1B* kóduje transkripční faktory, které jsou nezbytné pro normální vývoj struktur dorzálních částí končetin obratlovců, částí glomerulární filtrační bariéry a předního segmentu oka. Jeho mutace způsobuje Nail-patella syndrom, autozomálně dominantní onemocnění charakterizované dysplazií patel, anomáliemi nehtů, limitovanou extenzí v kloubech a nefrotickým syndromem (Bezdička et al., 2018).

1.1.5.13 Gen *ACTN4*

ACTN4 je gen kódující alfa aktinin 4, protein, který je součástí aktinového cytoskeletu a váže se s f-aktinem. Jeho hlavní funkcí je stabilizace cytoskeletárních struktur podocyty. Mutace v tomto genu způsobuje autozomálně dominantní NS s obrazem FSGS vyskytující se u dospívajících a mladých dospělých (Sako et al., 2005).

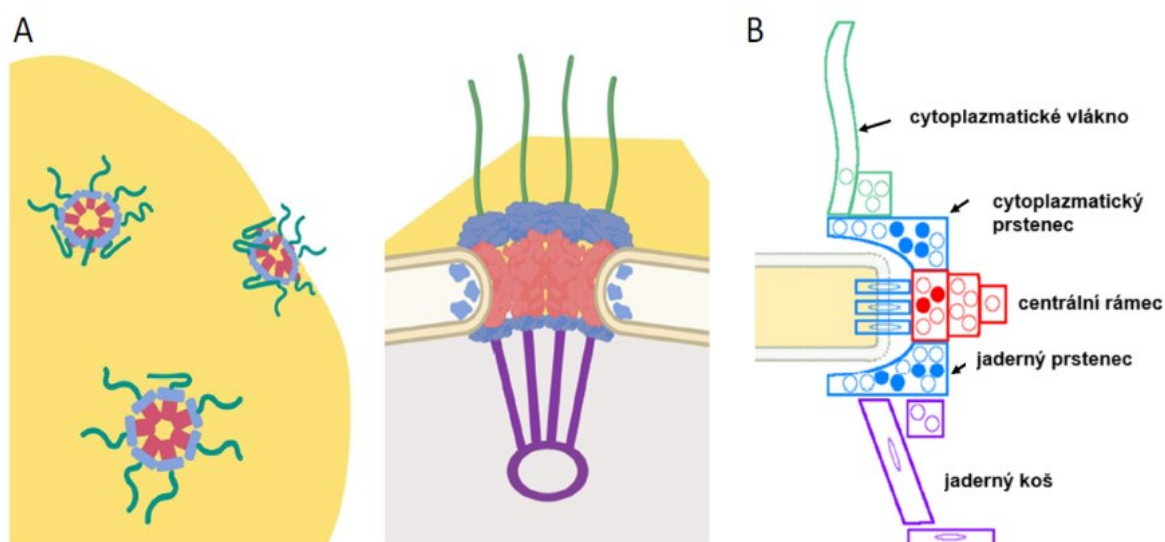
1.1.5.14 Gen *CD2AP*

Tento gen kóduje protein vážící se k cytoplazmatické části nefrinu, který je součástí štěrbinové membrány. S molekulou CD2AP také interaguje podocin vazbou na C-terminální konec CD2AP. CD2AP pomáhá ukotvit nefrin a podocin k aktinovému cytoskeletu podocytů. Jeho mutace způsobují vznik nefrotického syndromu na podkladě FSGS (Wolf, Stahl, 2003).

1.1.5.15 Geny NUP

NUP geny, nebo také nukleoporiny, jsou geny, které kódují proteiny tvořící jaderné póry. Tvoří třídu přibližně 30 proteinů, které se sdružují do komplexu jaderného póru, největších proteinových souborů vyskytujících se v eukaryotických buňkách (obr. 4). NUP jsou kanály, které překlenují jaderný obal a umožňují transport proteinů, RNA a ribonukleoproteinových částic mezi cytoplazmou a nitrem jádra. NUP tvoří velikostně selektivní difuzní bariéru pro makromolekuly přesahující 40 kDa a poskytují vazebná místa pro jaderné transportní receptory, které přes NUP přenášejí větší částice. Kromě řízení nukleocytoplazmatického transportu se NUP podílejí na mnoha dalších základních buněčných procesech, jako je organizace chromatinu a epigenetická regulace vývoje a diferenciací tkání (Lipska-

Ziętkiewicz, Schaefer, 2019). Gen *NUP93* je spojován s funkcí řasinek a regulací genové exprese specifické pro daný buněčný typ. Deplece *NUP93* narušuje správné sestavení jaderného póru (Ibarra et al., 2016). V ledvinách je *NUP93* exprimován ve všech typech ledvinových buněk. Mutace *NUP93* proto snižují intenzitu signálu jak v glomerulární, tak v extra-glomerulárních buňkách kůry ledvin (Hashimoto et al., 2019). Mutace v 7 genech spojených s jadernými póry, *NUP85*, *NUP107*, *NUP133*, *NUP160*, *NUP205*, *XP05* a *NUP93* byly v nedávné době popsány u dětských pacientů se SRNS, jako první příklad dysfunkce komplexu jaderného póru specifického pro ledviny. Nejčastěji se tyto mutace vyskytují v genu *NUP93* (Han et al., 2024, Bierzynska et al., 2021, Lipska-Ziętkiewicz, Schaefer, 2019, Bezdíčka et al., 2018, Braun et al., 2016).



Obr. 4 Komplexy jaderných pórů. (A) Schéma komplexu jaderného póru, což jsou velké kanály napříč jaderným obalem, jimiž dochází k nukleocytoplasmatickému transportu, rozmístěného na jádře (levý obrázek); ve skutečnosti je v jádře více než 500 jaderných pórů. Komplexy nukleárních pórů se skládají z několika podkomplexů (každý z nich je zde označen odlišnou barvou; pravý obrázek): cytoplazmatické vlákno, cytoplazmatický prstenec, centrální rámec (vnitřní prstenec), jaderný prstenec a jaderný košík. (B) Architektura komplexu jaderného póru. Komplex jaderného póru se skládá z více než 30 nukleoporinových (NUP) proteinů. Kroužky označují jednotlivé NUP přítomné v každé substruktuře. Vystínované kroužky odpovídají NUP, které se podílejí na steroid-rezistentním nefrotickém syndromu: NUP93, NUP205 (ve vnitřním kruhu) a NUP85, NUP107, NUP133 a NUP160 (tvořící komplex Y, strukturální prvek vnějšího prstence s cytosolickými i jadernými prvky). Převzato z Lipska-Ziętkiewicz, Schaefer, NUP Nephropathy: when defective pores cause leaky glomeruli, Am J Kidney Dis, 2019.

1.1.5.16 Gen DGKE

Tento gen kóduje diacylglycerol kinázu epsilon (DGKE), důležitý intracelulární enzym, který se pravděpodobně podílí na regulaci diacylglycerolu obsahujícího kyselinu arachidonovou (AAGAG) (Ozaltin et al., 2013). Ztráta funkce DGKE vede ke zvýšené signalizaci AAGAG, která aktivuje protein kinázu c, což může vyvolat hyperkoagulační stav s aktivací destiček a vznikem trombózy. Zvýšené hladiny AAGAG mohou také vyvolat aktivaci vápníkových kanálů v podocytech nezávislou na proteinkináze c, což vede k přestavbě aktinového cytoskeletu (Lemaire et al., 2013, Ozaltin et al., 2013, Noris et al., 2016). Mutace v tomto genu byly nejen vzácně popsány u SRNS, ale také jsou asociovány se vznikem atypického hemolyticko-uremického syndromu (Bezdička et al., 2020).

1.2 Atypický hemolyticko-uremický syndrom

Atypický hemolyticko-uremický syndrom (aHUS) je velmi vzácné, život ohrožující onemocnění, které je charakterizované triádou příznaků: trombocytopenie, neimunitní hemolytická anémie a akutní poškození ledvin. Řadí se mezi trombotické mikroangiopatie, u kterých dochází k poškození ledvinových kapilár a arteriál tvorbou mikrotrombů. V některých vzácnějších případech se může aHUS projevit jako hypertenze nebo poškození ledvin s mírnou nebo žádnou trombocytopenií a mikroangiopatickou hemolytickou anémií. Při závažném průběhu onemocnění se také mohou vyskytovat život ohrožující extrarenální příznaky, jako jsou křeče, porucha vědomí, edém/krvácení do mozku, perforace střeva, pankreatitida nebo ischemická kardiomyopatie.

Incidence se odhaduje mezi 0,23 a 2 případy na 1 milion obyvatel, přesné číslo nicméně známo není. Jedná se o onemocnění s neúplnou penetrancí (cca 56-64 %) (Noris et al., 2016). Začátek onemocnění je proto často vyvolaný nějakým spouštěčem, může to být infekce (nejčastěji gastrointestinální a respirační), nádorové onemocnění, těhotenství, autoimunitní onemocnění, drogy nebo léky (Štolbová et al., 2020).

Etiologicky je aHUS až v 70 % případů způsoben protilátkami proti faktoru H nebo mutacemi genů kódujících regulátory alternativní cesty komplementu jako je C3 složka komplementu (C3), faktor B (CFB), faktor H (CFH), faktor I (CFI) a membránový

kofaktorový protein (MCP). Mezi další příčiny aHUS patří mutace genů pro proteiny mající důležitou roli v koagulačním systému jako je trombomodulin (THBD) a plasminogen (PLG) a dále mutace genu *DGKE* kódující diacylglycerol kinázu epsilon, působící jako inhibitor signalizace diacylglycerolu (Štolbová et al., 2020).

1.2.1 Patofyziologie aHUS

1.2.1.1 Komplement

Komplement představuje jednu z hlavních součástí nespecifické imunity. Skládá se z téměř 60 plazmatických a membránových proteinů, které vytvářejí 3 odlišné, ale zároveň se překrývající aktivační cesty, společnou terminální lytickou kaskádu a síť regulátorů a receptorů.

Komplement má 3 hlavní funkce. Je schopný identifikovat cizí a vlastní poškozený materiál, označit jej pomocí opsonizace. Tyto označené cíle dále ničí pomocí fagocytózy nebo osmotickou lýzou. Dále má prozánětlivou funkci – uvolňuje anafylatoxiny k vyvolání degranulace žírných buněk a buněčné chemotaxe. Prozánětlivé procesy vyžadují přísnou kontrolu, aby nedošlo k poškození organismu vlastních buněk a tkání. Proto téměř polovina složek komplementu slouží jako regulátory celého systému.

Hlavními složkami komplementu je 9 sérových proteinů (C1 – C9), faktory B a D, properdin a inaktivátory a inhibitory (faktor I a H). Jednotlivé komponenty komplementu jsou produkovány v parenchymu jater, v makrofázích, monocytech a neutrofilech a dále v buňkách gastrointestinálního a uropoetického systému (Holers, 2014).

Známe 3 hlavní cesty aktivace komplementu: klasickou, lektinovu a alternativní. Všechny cesty komplementu jsou schématicky znázorněny na obrázku 5.

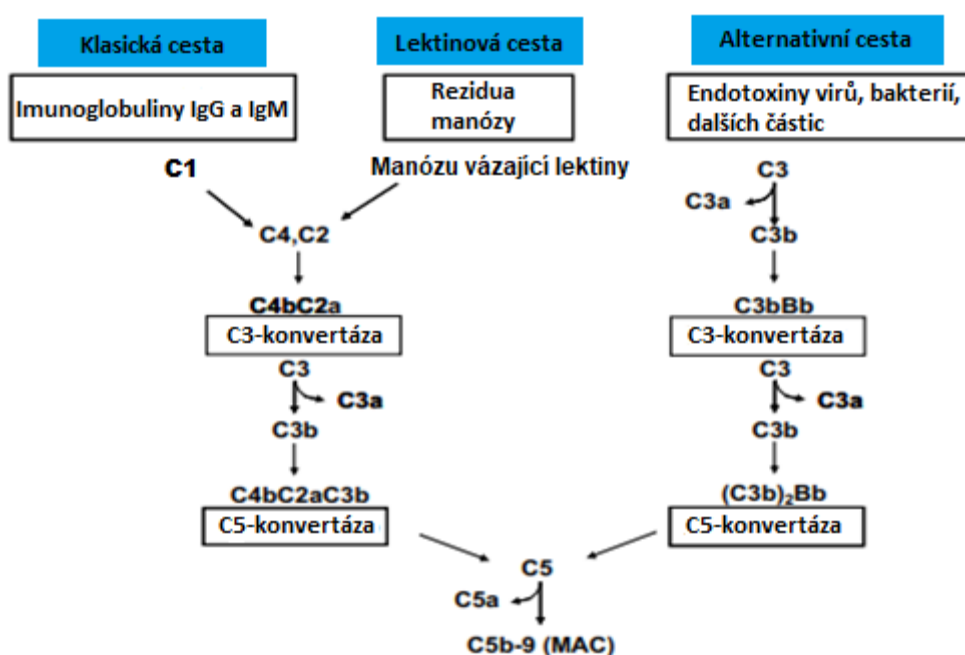
1.2.1.1.1 Klasická a lektinová cesta komplementu

Klasická cesta komplementu je aktivovaná protilátkami. Imunoglobulin G a M se naváží přes antigeny na povrchy buněk (např. virů nebo bakterií), změni konformaci protilátkové molekuly a tím odhalí vazebné místo pro C1, na které se naváže Fc fragment

imunoglobulinu. C1 po vazbě na protilátku také mění svůj tvar, začne štěpit proteiny C2 a C4. Vytvořené produkty C4b a C2a se naváží na povrch napadeného mikroorganismu, kde vytvoří enzym – klasickou C3-konvertázu. Tento enzym dále štěpí C3 na C3a a C3b a vytváří klasickou C5-konvertázu – enzym, který štěpí C5 na C5a a C5b. Klasickou cestu mohou zahájit i reaktanty akutní fáze (C-reaktivní protein a sérový amyloid A).

Následuje terminální (lytická) fáze komplementové kaskády, která je společná pro všechny 3 cesty. C5b vytváří spolu s C6, C7 a C8 komplex, který se zanoří do lipidové membrány napadené buňky a k němu se připojí 13-18 molekul složky C9. V membráně napadené buňky se vytvoří póry, kterými unikají cytoplazmatické komponenty, dojde k poruše osmotické rovnováhy a k lýze buňky.

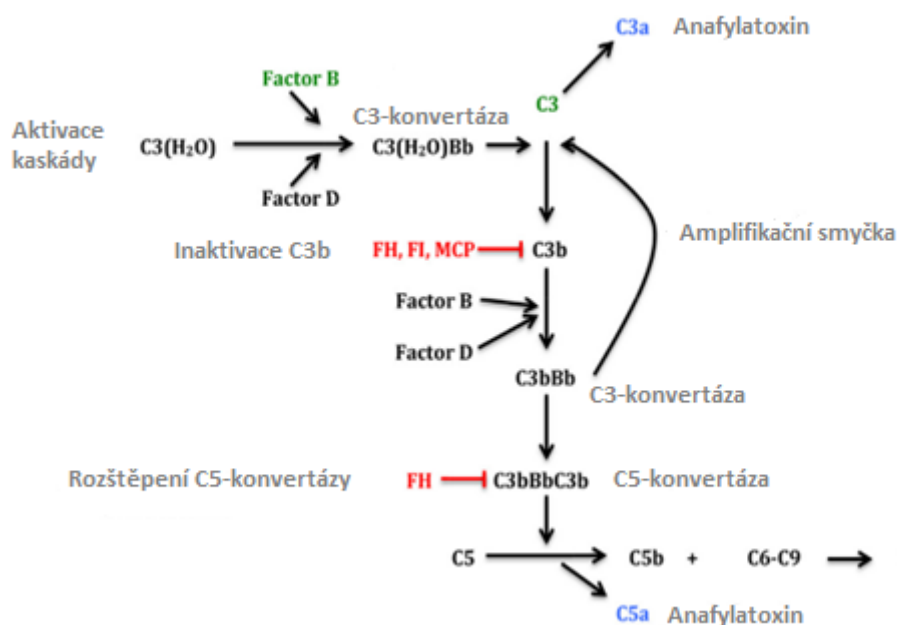
Lektinová cesta aktivace komplementu je velmi podobná té klasické. Jediný rozdíl je v tom, že na začátku není aktivována protilátkou, ale sérovým lektinem vázajícím manózu. Ten se přímo naváže na sacharidové struktury některého z mikrobů. Po vazbě na povrch začíná štěpit C4 a C2 (Hořejší, Bartůňková, 2008).



Obr. 5 Obrázek znázorňuje stručné schéma všech 3 cest aktivace komplementu: klasická, lektinová a alternativní; a jejich společnou terminální (lytickou) fázi komplementové kaskády končící vytvořením terminálního produktu komplementové kaskády označovaného jako MAC (membrane attack complex), jehož vytvoření vede k lýze buňky. Převzato z Noris, Remuzzi, Overview of complement activation and regulation, Semin Nephrol, 2013.

1.2.1.1.2 Alternativní cesta komplementu

Alternativní cesta komplementu je nejstarší součástí imunitního systému, který ke svojí aktivaci nevyžaduje přítomnost protilátky ani lektinu. Cesta začíná přímým kontaktem C3 s endotoxiny ve stěnách virů, bakterií a dalších částic. Složka C3 se samovolně štěpí na fragmenty C3b a C3a. C3b po navázání na povrch částic zahájí sérií reakcí. Může být nicméně i inaktivován faktory H a I. K C3b se připojí sérový protein faktor B, který je štěpen proteázou (faktor D) na Ba a Bb. Vytváří se komplex C3bBb, který působí jako alternativní C3-konvertáza, schopná účinně štěpit C3 na C3a a C3b. Komplex C3bBb je stabilizován faktorem P (properdin). Zbylé fragmenty C3b se zachycují na povrchu kolem enzymaticky aktivního komplexu a slouží jako opsoniny. C3a působí chemotakticky na fagocyty buňky. Z některých molekul C3-konvertázy vznikají složitější komplexy vytvářející alternativní C5-konvertázu, schopnou štěpit C5 na C5a a C5b. Vznikem C5b opět začíná lytická fáze komplementové kaskády (Hořejší, Bartůňková, 2008). Schéma aktivace alternativní cesty komplementu je znázorněná na obrázku 6.



Obr. 6 Schéma aktivace alternativní složky komplementu, která začíná spontánním rozštěpením C3 složky komplementu, pokračuje vytvořením C3-konvertázy, která dalším vytvářením konvertáz aktivuje amplifikační smyčku, jejímž důsledkem je exponenciální produkce dalších C3-konvertáz. Proces pokračuje vytvořením C5-konvertázy a terminální lytickou fází, která končí vytvořením MAC a lýzou buňky. Vedlejšími produkty procesu jsou anafylatoxiny C3a a C5a, mediátory zánětu, schopné způsobit degranulaci endoteliálních buněk, mastocytů a fagocytů. Celý proces je ovlivněn aktivátory komplementu (faktor B a C3, označených zeleně) a regulátory komplementu (faktor H, faktor I, MCP, označených červeně). Převzato z Nester et al., Atypical aHUS: State of the art, Mol Immunol, 2015.

1.2.1.2 Patofyziologické mechanismy vzniku aHUS

Atypický hemolyticko-uremický syndrom je způsoben genetickým nebo jiným (často neznámým) inzultem, který vede k dysfunkci kaskády komplementu, jejímž výsledkem je ukládání složek komplementu na endoteliální buňky, ztlustění arteriol a kapilár a k otoku a odlučování endotelu (Stuhlinger et al., 1974). V důsledku toho se proteiny a některé buňky, jako jsou neutrofily, makrofágy a trombocyty, shromažďují na buněčném povrchu, což vyvolává protrombotický stav. To způsobuje tvorbu obstrukčních trombů v lumen cévy a dochází k mechanickému namáhání a změně tvaru erytrocytů, čímž vznikají schistocyty, fragmenty erytrocytů, které mají za následek vznik triády příznaků typických pro aHUS: Coombs negativní hemolytická anémie, poškození ledvin a trombocytopenie (Ruggenenti et al., 2001). Ačkoli aHUS postihuje více orgánových systémů, nejrozsáhleji je studováno poškození ledvin. Renální endotelová buňka, která je častou oblastí aktivace komplementu a ukládání imunokomplexů, hraje významnou roli při vzniku renálního poškození. Mikrotromby uvnitř cév spotřebovávají krevní destičky a způsobují trombocytopenii, brání průtoku krve a poškozují erytrocyty, což způsobuje hemolytickou anémii. Předpokládá se, že poškození ledvin u aHUS je rovněž sekundární v důsledku tvorby mikrotrombů v cévách ledvin; poškození endotelu dále zhoršují anafylotoxiny (C3a a C5a) vznikající při aktivaci komplementu (Ruggenenti et al., 2001, McCullough et al., 2013).

1.2.2 Diagnostika aHUS

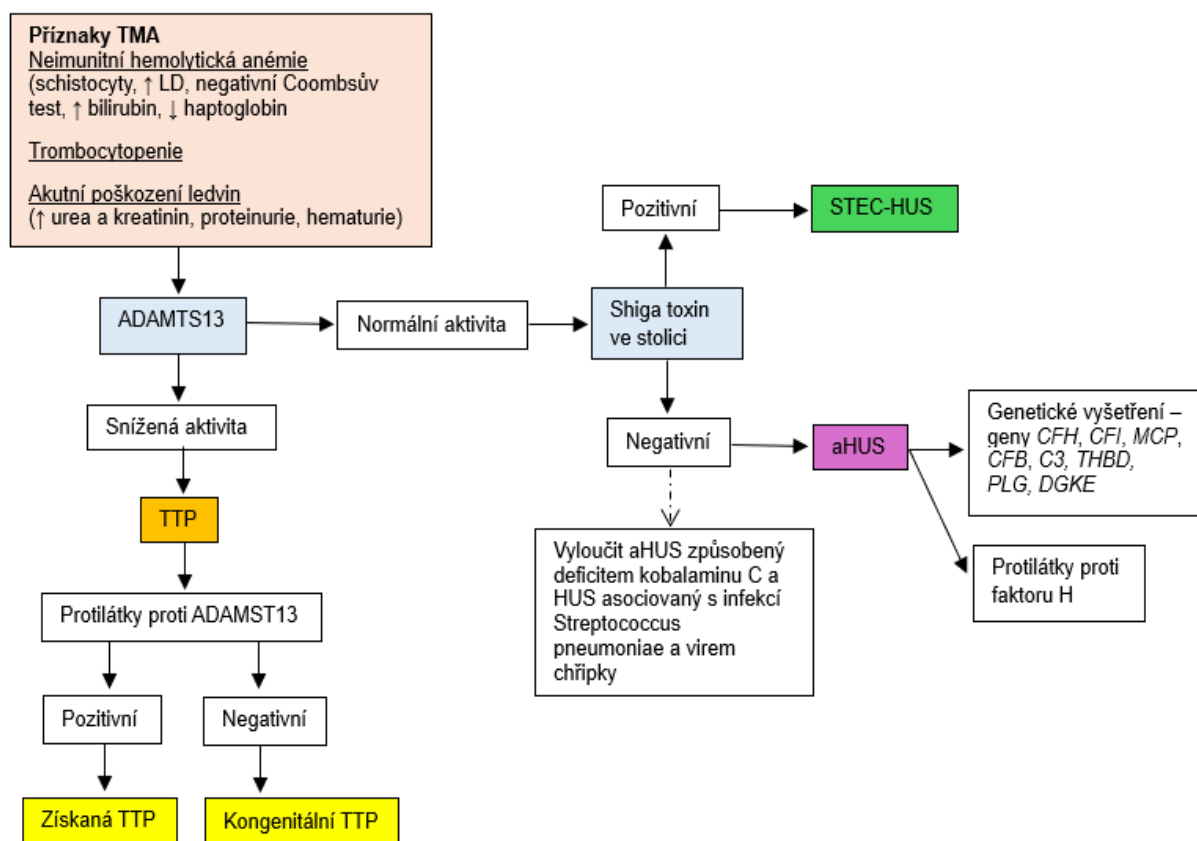
Atypický hemolyticko-uremický syndrom patří do skupiny onemocnění zvaných trombotické mikroangiopatie (TMA). TMA se dělí na 3 podjednotky – trombotická trombocytopenická purpura (TTP), hemolyticko-uremický syndrom (HUS) a HELLP syndrom, který se ale vyskytuje pouze u žen v těhotenství. Mezi hlavní příznaky TMA patří neimunitní hemolytická anémie, trombocytopenie a akutní poškození ledvin. Klinické i laboratorní příznaky jsou na začátku onemocnění stejné a neumožňují tedy odlišit jednotlivá onemocnění. Na prvním místě v diagnostice je proto nezbytné odlišit TTP od HUS (Loirat et al., 2016). TTP je onemocnění způsobené deficitem štěpící proteázy von Willebrandova faktoru ADAMTS13. ADAMTS13 štěpí v krevním řečišti velké multimery von Willebrandova faktoru na méně reaktivní fragmenty. Při nedostatku této proteázy nebo její nedostatečné funkci dochází k hromadění multimerů vWF a vzniku trombotické mikroangiopatie. TTP se dle etiologie dělí na geneticky podmíněnou a získanou formu.

Získaná (autoimunitní) forma je způsobena protilátkami proti ADAMTS13, které se váží na tuto proteázu a blokují její aktivitu. Příčinou vzniku onemocnění bývá nejčastěji infekční onemocnění nebo léčba clopidogrelem. Vyskytuje se nejčastěji u dospělých pacientů a léčí se pomocí kortikoidů a plazmaferézy. V dětském věku je mnohem častější geneticky podmíněná forma TTP (kongenitální TTP), která je autozomálně recesivní. Onemocnění vzniká na podkladě mutace genu pro ADAMTS13, jež způsobuje těžký deficit této proteázy. Onemocnění má začátek v časném kojeneckém věku. V terapii se používá pravidelná aplikace plazmy a tím dodávání ADAMTS13, který je v plazmě obsažený. Nově se v terapii TTP používá caplacizumab, humanizovaný imunoglobulin proti von Willebrandovu faktoru, který působí tak, že blokuje agregaci krevních destiček a snižuje tak poškození orgánů způsobené ischemií (Sukumar et al., 2021).

V diferenciální diagnostice je tedy na prvním místě vyšetření aktivity ADAMTS13. V případě její nízké aktivity je nutné také vyšetření protilátek proti ADAMTS13. Tím odlišíme TTP od HUS. Po vyloučení TTP je dalším krokem rozlišení mezi typickým HUS (STEC-HUS) a aHUS, popřípadě dalšími vzácným podskupinami HUS. STEC-HUS (HUS způsobený shiga toxin produkující *E. Coli*) tvoří až 60 % všech případů HUS u dětí do 16 let věku, jeho incidence je 0.71 případů na 100 tisíc dětí. Člověk se touto infekcí nakazí nejčastěji nedostatečně upravenou stravou nebo kontaminovanou vodou. *E. Coli* nejdříve kolonizuje a adheruje na enterocyty v tenkém a tlustém střevě, kde začne produkovat shiga toxin. Ten poté přechází přes střevní sliznici do systémové cirkulace, váže se na polymorfonukleáry, erytrocyty, monocyty a trombocyty, které ho transportují k cílovým orgánům (ledviny, mozek, myokard, pankreas). Zde se naváže na specifické receptory endotelových buněk kapilár, dojde k jejich poškození, vzniku mikrotrombů a obrazu typického pro TMA. Hlavními klinickými příznaky jsou těžké hemoragické průjmy se zvracením a bolestí břicha. Léčba je pouze symptomatická, zahrnuje management tekutin, antihypertenziva, v nejtěžších případech i dialýzu (Liu et al., 2022). U pacienta s HUS je proto nezbytné co nejdříve provést vyšetření stolice na přítomnost *E. Coli* produkující shiga toxin. V případě, že je kultivace stolice negativní, můžeme říct, že má pacient velmi pravděpodobně aHUS a je nezbytné co nejdříve zahájit specifickou léčbu aHUS (eculizumab) (Loirat et al., 2016). Ke vzniku aHUS je nezbytný spouštěč onemocnění, nejčastěji to bývají infekce gastrointestinálního nebo respiračního traktu. Nelze se proto spoléhat pouze na klinické projevy infekce gastrointestinálního traktu k odlišení STEC-HUS od aHUS. Diferenciálně diagnosticky je potřeba myslet i na vzácné podskupiny HUS – HUS

na podkladě infekce *Streptococcus pneumoniae* a viru chřipky, kterým předchází závažné respirační příznaky vedoucí někdy až k respiračnímu selhání, a HUS způsobeným defektem kobalaminu C. HUS asociovaný s defektem kobalaminu C je vzácné onemocnění, kde nedostatek kobalaminu, který je nezbytný ke správné funkci krevních buněk, způsobuje abnormální tvorbu krevních buněk, poškození cév a vznik TMA (Sharma et al., 2007). Hladinu kobalaminu je potřeba vždy u pacientů se suspektním aHUS otestovat. Léčba spočívá v suplementaci kobalaminu. Při podezření na aHUS je dále nezbytné genetické vyšetření na přítomnosti mutací v genech kódující komplement, genech pro koagulační systém a *DGKE* (Loirat et al., 2016).

Rychlá diferenciální diagnostika u pacientů s TMA je důležitá především pro rychlé zahájení adekvátní terapie, která se u jednotlivých typů TMA v dětském věku výrazně liší. Diagnostické schéma je zobrazeno na obrázku 7.



Obr. 7 Schéma vyšetřovacího postupu u pacienta s TMA

1.2.3 Poškození ledvin při aHUS

Klinický obraz aHUS závisí na rozsahu mikrovaskulárního poškození a následném ischemickém poškození orgánů. Diagnóza závisí na laboratorních hodnotách prokazujících hemolytickou anémii, trombocytopenii a akutní poškození ledvin (AKI). Navzdory významu proteinů komplementu (C3, C4) v patogenezi aHUS nejsou tyto spolehlivými diagnostickými markery. U pacientů se obvykle objevují nespecifické příznaky včetně únavy, bledosti a somnolence. Kromě AKI může být vyšetřením moči zjištěna hematurie a proteinurie. Oligurie/anurie a urémie se mohou vyvinout s tím, jak u pacientů progreduje AKI. Až padesát procent případů aHUS dříve dospělo do konečného stadia onemocnění ledvin (ESKD), vyžadujícího chronickou dialýzu. Celková mortalita byla kolem 25%. Rozdíly v průběhu onemocnění se lišily na základě genetického podkladu onemocnění. U mutací v genech *C3*, *CFH*, *CFB* a *CFI* bylo riziko progresu do ESKD 60-80%, u mutací v genu *MCP* 30-40 % (Nester et al., 2015). Prognóza onemocnění, mortalita i míra extrarenálních komplikací se významně snížila zahájením podáváním protilátek blokujících alternativní cestu komplementu (eculizumab, ravulizumab) (Loirat et al., 2016, Dixon et al., 2024).

1.2.4 Extrarenální manifestace aHUS

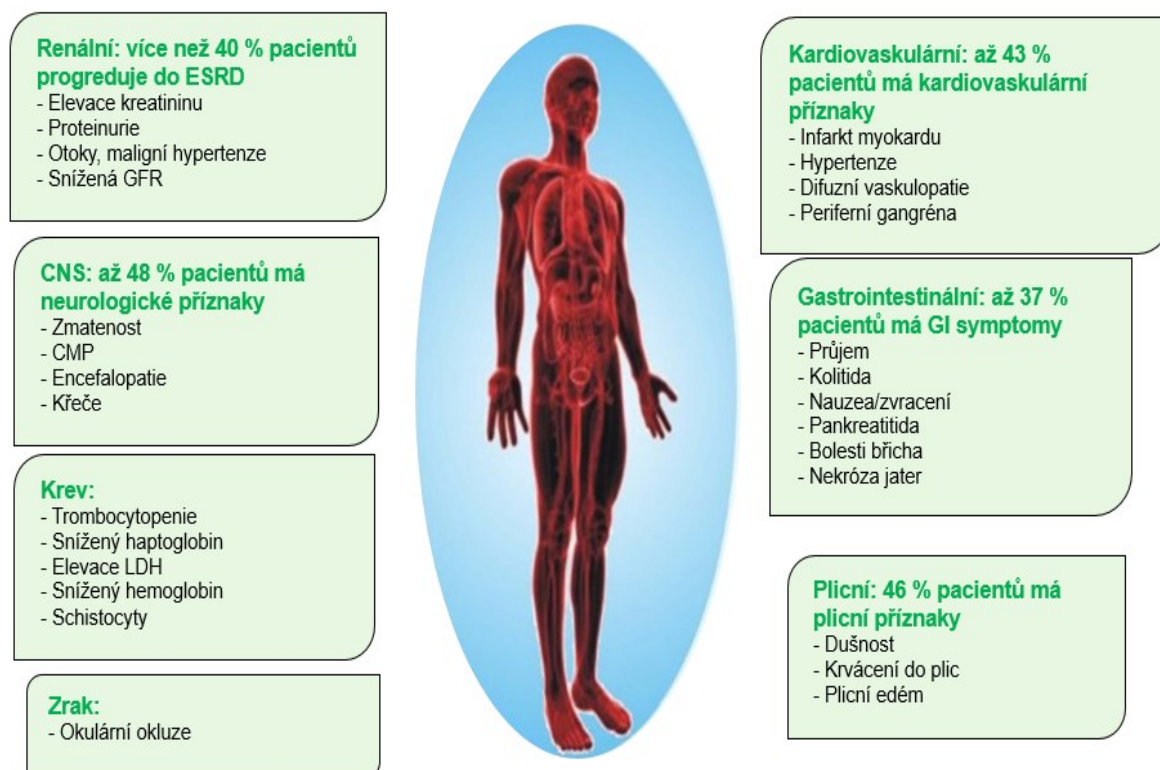
Mezi extrarenální orgánové systémy, které mohou být při aHUS poškozené, patří kardiovaskulární systém, centrální nervový systém, kůže, viscerální orgány a reprodukční orgány. Úplné spektrum projevů je uvedeno na obrázku 8.

Mezi nejčastěji postižené systémy patří centrální nervový systém (CNS). Vazookluzivní léze způsobené abnormální aktivací komplementu se mohou ukládat v mozkových, krčních a vertebrálních tepnách a vést k ischemickému poškození mozku (Loirat et al., 2011). Mezi nejobvyklejší neurologické příznaky u aHUS patří encefalopatie, kóma, křeče, hemiparéza a kortikální slepota. K diagnostice se používá magnetická rezonance, která nejčastěji zobrazí hyperintenzivní léze v bazálních gangliích a/ nebo mozkovém kmeni (Yerigeri et al., 2023).

Jako druhý nejčastější bývá u aHUS poškozen kardiovaskulární systém. Mezi život ohrožující důsledky mikroangiopatie patří dilatační kardiomyopatie, městnavé srdeční selhání a infarkt myokardu (Loirat et al. 2011). Nástup příznaků může být náhlý a terminální.

Jak u kardiálních, tak i u neurologických komplikací se riziko jejich vzniku liší v závislosti na typu mutovaného genu (Yerigeri et al., 2023).

aHUS je systémová TMA, která postihuje více orgánů a tkání



Obr. 8 Extrarenální manifestace aHUS. aHUS může mít multisystémové projevy postihující ledviny, kardiovaskulární, gastrointestinální, plicní, oční a centrální nervový systém. *CMP* cévní mozková příhoda, *CNS* centrální nervový systém, *ESRD* end stage renal disease (konečné stádium selhání ledvin), *GFR* glomerulární filtrace, *GI* gastrointestinální, *LDH* laktátdehydrogenáza. Převzato z Yerigeri et al., Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome: Genetic Basis, Clinical Manifestations, and a Multidisciplinary Approach to Management, J Multidiscip Healthc, 2023.

Mezi nejčastější projevy plicního postižení u aHUS patří plicní hypertenze a krvácení do plic. Edém se může objevit také sekundárně v důsledku kardiální dysfunkce a objemového přetížení. Akutní respirační selhání vyžadující mechanickou plicní ventilaci je závažnou komplikací s vyšším výskytem u pediatrických pacientů (až 21 %). Proto je pro snížení rizika plicních komplikací u pacientů s aHUS nezbytná pečlivá bilance tekutin a monitorování respiračních funkcí (Formeck, Swiatecka-Urban, 2019).

Průjem je klasickým prodromálním symptomem a je pozorován asi u poloviny pacientů s aHUS. Dalšími častými gastrointestinálními příznaky asociovanými s aHUS jsou zvracení, krvácení z gastrointestinálního traktu, cholelitiáza a pankreatitida. Bylo prokázáno, že gastrointestinální komplikace u aHUS jsou často spojeny s přítomností protilátek proti faktoru H (Formeck, Swiatecka-Urban, 2019, Yerigeri et al., 2023).

Vzácně může abnormální aktivace komplementu vést i periferní gangréně (obr. 9).



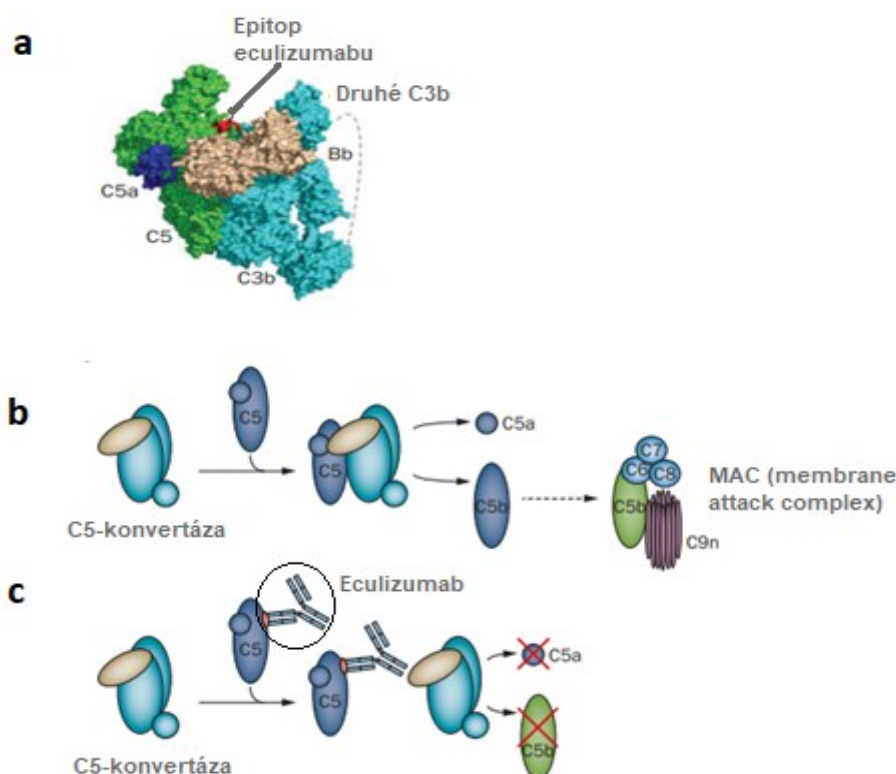
Obr. 9 Periferní gangréna rukou 4měsíční dívky. Těžký edém, cyanóza prstů pravé ruky se začínající nekrózou koncových článků prstů IV a V (C1, C2). Progrese do gangrény distálního falangu III. prstu a částí středních článků prstů (D1, D2). Postupná demarkace a hojení defektů postgangrenózních prstů pravé ruky po podání eculizumabu (E1, E2, F1, F2, G1, G2). Převzato z Malina et al., Peripheral Gangrene in Children With Atypical Hemolytic Uremic Syndrome, Pediatrics, 2013.

1.2.5 Léčba aHUS

1.2.5.1 Eculizumab

Lékem první volby pro léčbu aHUS u dětí je v současné době eculizumab, monoklonální humanizovaná protilátka proti terminální složce komplementu C5, způsobující blokádu komplementové kaskády (obr. 10). Eculizumab tak přímo oslabuje hlavní mechanismus vzniku aHUS, snižuje zánět, poškození endotelu a poškození ledvin. Čím dříve je léčba zahájena, o to větší je šance na zachování funkce ledvin. Na rozdíl od dříve používaných

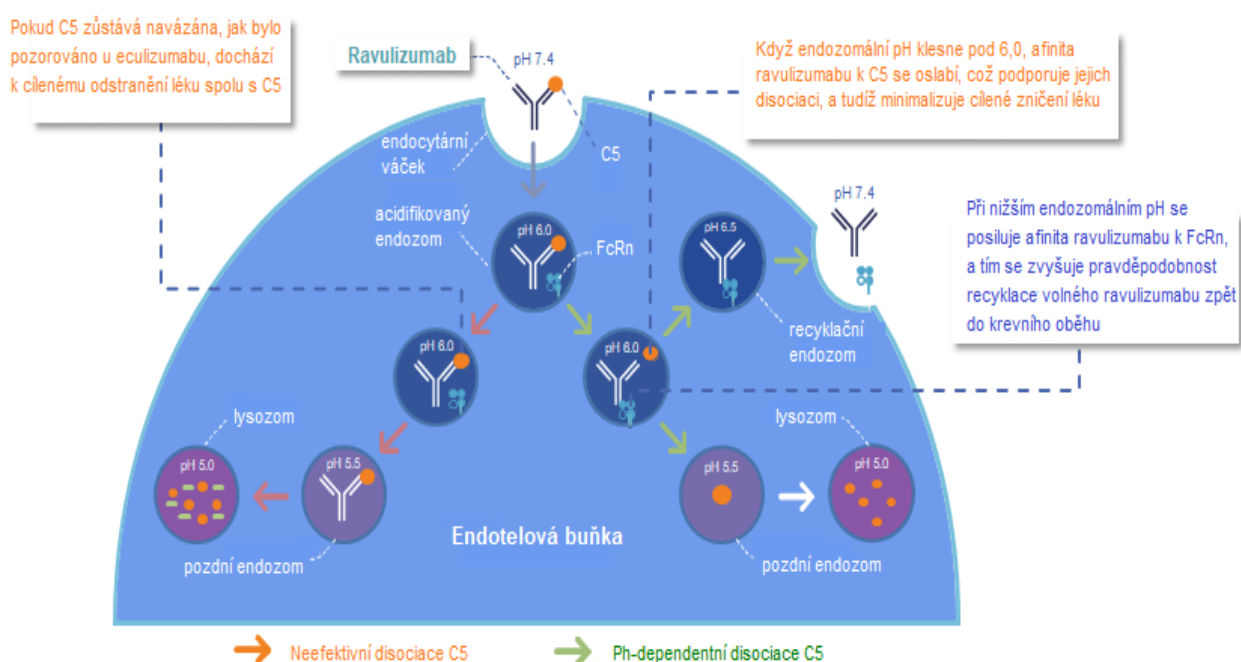
modalit jako je plazmaferéza, která je pouze léčbou symptomatickou, se jedná o kauzální terapii tohoto onemocnění (Loirat et al., 2016). Léčba eculizumabem významným způsobem změnila prognózu a zásadně snížila riziko dosažení terminální fáze chronického onemocnění ledvin (Loirat et al., 2016). Aplikace eculizumabu probíhá intravenózně každé 2 týdny. Nejčastějším nežádoucím účinkem léčby je riziko infekcí, zejména meningokokových. Proto musí být pacienti ihned po zahájení léčby zajištěni profylaktickou antibiotickou terapií a co nejdříve proti meningokokům naočkováni. Ideální délka léčby eculizumabem je předmětem probíhajícího výzkumu; je třeba zvážit nežádoucí účinky léčby a riziko relapsu. Délka léčby je u pacientů s prokázanými genetickými variantami v genech pro komplement obvykle delší kvůli zvýšenému riziku relapsu. Za obzvláště rizikové se považuje vysazení léčby u pacientů s mutacemi v genech *CFH*, *CFB* a *C3* a s vysokým titrem protilátek proti faktoru H (Menne et al., 2019, Fakhouri et al., 2021).



Obr. 4 Struktura molekuly a způsob účinku eculizumabu. **a)** Molekulární model C5-konvertázy C3bBb v komplexu s molekulou C5. Červeně je vyznačený epitop eculizumabu, přes který se molekula eculizumabu váže na C5 a tím zabráňuje vstupu molekuly C5 do C5-konvertázy. **b)** Schéma zobrazuje vstup molekuly C5 do C5-konvertázy a vytvoření MAC (membrane attack komplex). **c)** Schématická reprezentace molekulárního mechanismu působení eculizumabu, který se naváže s vysokou afinitou na C5 a znemožňuje tak vstup C5 do C5-konvertázy, nedojde k vytvoření MAC (C5b-9) a tím eculizumab znemožňuje aktivaci terminální (lytické) cesty komplementu. Převzato z Zuber et al., Use of eculizumab for atypical haemolytic uraemic syndrome and C3 glomerulopathies, Nat Rev Nephrol, 2012.

1.2.5.2 Ravulizumab

Ravulizumab je nový inhibitor C5 složky komplementu s okamžitým a trvalým účinkem v prodlouženém osmitýdenním dávkovacím intervalu. V léčbě aHUS se v Evropě začal používat od roku 2020. Ravulizumab vykazuje podobnou účinnost jako eculizumab při zachování čtyřikrát delšího terminálního poločasu. Podobně jako eculizumab se i ravulizumab váže na C5 a zabraňuje jeho disociaci na C5a a C5b, čímž přerušuje komplementovou kaskádu. (Dixon et al., 2024, Menne et al., 2019). Rozdíl v mechanismu účinku mezi eculizumabem a ravulizumabem je na obrázku 11.



Obr. 11 Rozdíl v mezi eculizumabem (vlevo) a ravulizumabem uvnitř endotelové buňky. Ravulizumab se po poklesu pH uvolní z vazby na C5 složku komplementu a je vyloučen zpět do krevního oběhu, kde opět navazuje na svůj povrch další C5. Díky tomu trvá účinek léčby ravulizumabem 8 týdnů. Převzato z Yang et al., Maximizing in vivo target clearance by design of pH-dependent target binding antibodies with altered affinity to FcRn, MAbs, 2017.

1.2.5.3 Plazmaferéza

Před érou léčby eculizumabem byla jedinou možností léčby pacientů s aHUS plazmaferéza. Ta dodnes zůstává lékem druhé volby, dosud se používá v zemích, kde není dostupná léčba

blokátory komplementu. Jedná se o léčbu s četnou řadou nežádoucích účinků: reakce na podání plazmy, včetně alergických, febrilních a anafylaktických reakcí, akutního poškození plic souvisejícího s transfuzí, přetížení krevního oběhu a infekce.

1.2.5.4 Transplantace

Transplantace ledviny měla dříve velmi špatnou prognózu. Navzdory transplantaci přetrvával defekt v regulaci komplementu vedoucí k rekurenci onemocnění ve štěpu. Přibližně 50 % pacientů po transplantaci progredovalo do ESRD. Rekurence byla častější u pacientů s mutacemi v genech *CFH*, *CFI* a *C3*. Bylo prokázáno, že potransplantační profylaxe pomocí eculizumabu snižuje míru rekurence u této vysoce rizikové populace a celkově významně zlepšuje prognózu pacientů s aHUS to transplantaci (Zuber et al., 2012).

1.2.6 Geny asociované se vznikem aHUS

V současné době existuje řada publikací, které se zabývají genetickou analýzou pacientů s aHUS v dané zemi. Četnost nálezů mutací v jednotlivých genech publikovaných u velkých kohort pacientů je shrnuta v tabulce 2 (Noris et al., 2010, Fremeaux-Bacchi et al., 2013, Maga et al., 2010, Geedink et al., 2012, Jokiranta, 2017).

Tabulka 2 Přehled genů asociovaných s aHUS

Gen	Dědičnost	Chromozom	Četnost (%)	Klinický genotyp
<i>CFH</i>	AR, AD	1	21-28	aHUS, deficit faktoru H, membranoproliferativní GN
<i>MCP</i>	AR, AD	1	5-9	aHUS
<i>C3</i>	AR, AD	19	2-8	aHUS, deficit C3, membranoproliferativní GN
<i>CFI</i>	AR, AD	4	4-8	aHUS, deficit faktoru I, membranoproliferativní GN
<i>CFB</i>	AR, AD	6	1-4	aHUS, deficit faktoru B
<i>THBD</i>	AD	20	0-5	aHUS, trombofilie způsobená defektem trombomodulinu
<i>PLG</i>	AR, AD	6	nejsou data	aHUS, angioedém, deficit PLG, dysplasminogémie
<i>DGKE</i>	AR	17	<1	aHUS, SRNS, membranoproliferativní GN

AR autozomálně recesivní, *AD* autozomálně dominantní, *aHUS* atypický hemolyticko-uremický syndrom, *GN* glomerulonefritida, *SRNS* steroid-rezistentní nefrotický syndrom

Všechny níže zmíněné fenotypy pacientů s jednotlivými typy mutací se týkají doby před zahájením podání eculizumabu. Pacienti léčení eculizumabem mají v současné době mnohem lepší prognózu, při pokračující terapii minimální množství relapsů a nízké riziko progrese onemocnění do terminálního stádia selhání ledvin (Loirat et al., 2016).

1.2.6.1 Geny pro regulátory komplementu

Defekty v genech pro regulátory komplementu predisponují k nekontrolovatelné aktivaci komplementu. Další genetická varianta může poškodit regulační schopnost komplementu jiným způsobem. Abnormální protein vzniklý genetickou mutací může zasahovat do funkce svého normálně fungujícího protějšku, zatímco některé varianty mohou mít pozitivní dopad na zmírnění vlivu negativních variant (ochranné varianty). Výsledná aktivita komplementu je tedy vlastně určena součtem všech negativních a pozitivních variant. Středně velký defekt v regulaci alternativní cesty komplementu se může prezentovat manifestací aHUS po vystavení významnému spouštěči (např. infekce), naopak velký defekt v regulaci komplementu se může projevit onemocněním i po velmi malém vystavení spouštěči (Štolbová et al., 2020).

1.2.6.1.1 Gen *CFH*

Gen *CFH* kóduje sérový glykoprotein se schopností navázat se na složku C3b a urychlit rozpad C3-konvertázy. Dále slouží jako kofaktor faktoru I, dalšího inhibitoru C3b.

Abnormální genový produkt vzniklý mutací má zhoršenou schopnost interakce s C3b, výsledkem je snížené množství těchto změněných CFH molekul na povrchu endoteliálních buněk a snížení schopnosti regulace alternativní složky komplementu na buněčné membráně (Frémeaux-Bacchi et al., 2008).

Atypický HUS asociovaný s mutací v genu *CHF* se až v 70 % manifestuje v raném dětství. Pacienti s tímto typem aHUS mívají velmi těžký průběh onemocnění, větší množství relapsů a 60-80 % jich dospěje do terminálního stádia selhání ledvin nebo zemře (Frémeaux-Bacchi et al., 2008).

Dalším onemocněním spojeným s mutacemi v genu pro faktor H je membranoproliferativní glomerulonefritida (Noris et al., 2016). Jedná se o skupinu vzácných onemocnění ledvin

způsobenou dysregulací komplementu, jejímž výsledkem je ukládání C3 depozit do glomerulů ledvin. Dle nálezu v elektronovém mikroskopu ji lze rozdělit na 2 diagnostické jednotky: C3 glomerulonefritidu a nemoc denzních deposit.

1.2.6.1.2 Protilátky proti faktoru H

Zvláštním podtypem aHUS je aHUS spojený s přítomností protilátek proti faktoru H. Dle různých studií se udává přítomnost těchto protilátek u 6-25 % pacientů s aHUS (Moore et al., 2010, Dragon-Durey et al., 2005). Jedná se o IgG protilátky, které blokují C-terminální doménu faktoru H, což je oblast genu asociovaná s mutacemi genu *CFH*. Protilátky interferují se schopností faktoru navázat se na C3-konvertázu, mají tedy velmi podobný účinek jako mutace v *CFH* (Moore et al., 2010).

Pacienti s aHUS asociovaným s přítomností protilátek proti faktoru H mají obecně lepší prognózu než ti s mutací v genu *CFH*. Dobře reagují na léčbu plasmou, až 75 % po ní dosáhne částečné (parciální) nebo úplně remise (Noris et al., 2016).

1.2.6.1.3 Geny asociované s faktorem H (*CFHR1-5*), hybridní geny

Geny *CFHR1-5* jsou skupinou genů s velmi těsnou návazností na gen *CFH* na chromozomu 1. Jedná se o blok genů s extrémně vysokou sekvenční podobností, která může vyústit v různé množství genetických přestaveb. Jedná se o proces zvaný non-alelická homologní rekombinace. Výsledkem tohoto procesu může být vznik nových proteinů, interferujících s normální funkcí komplementu. Nejčastěji je možné nalézt homozygotní delece genů *CFHR1* a *CFHR3*, které se vyskytují až u 90 % pacientů s protilátkami proti faktoru H. Stejným procesem mohou také vzniknout hybridní proteiny asociované s aHUS (FH+*FHR1*, *FHR1*+FH a FH+*FHR3*) (Nester et al., 2015).

1.2.6.1.4 Gen *MCP*

Gen *MCP* kóduje membránový proteinový kofaktor, transmembránový glykoprotein, který je exprimovaný na povrchu většiny buněk, nejvíce v buňkách ledvin, kde hraje hlavní roli v regulaci C3 složky komplementu. Působí jako kofaktor pro faktor I a váže se na C3b a C4b.

Výsledným efektem jeho působení je inaktivace těchto složek komplementové kaskády a zabránění další aktivace komplementu (Richard et al., 2007).

Mutace v genu *MCP* jsou po genu *CFH* druhou nejčastější genetickou příčinou aHUS. V současné době je známo více než 70 patogenních variant tohoto genu u pacientů s aHUS. Následkem mutace vzniká abnormální genový produkt, jehož důsledkem je snížená exprese MCP na povrchu buněk nebo porucha jeho vazebné kapacity na C3b, které vyúsťují v nedostatečnou regulaci komplementu (Noris et al., 2016).

aHUS asociovaný s *MCP* se manifestuje nejčastěji v dětství a často má lehčí průběh. Až 80 % nemocných se dostane do úplné remise. Téměř 70 % těchto pacientů má časté relapsy, které ale nemají vliv na dlouhodobou prognózu. Pouze necelá třetina pacientů vyžaduje dialyzační léčbu v průběhu relapsu (Noris et al., 2016, Nester et al., 2015). Méně než 20 % pacientů dospěje do terminálního stádia selhání ledvin (Jokiranta, 2017, Nester et al. 2015). Na rozdíl od ostatních geneticky podmíněných forem aHUS je riziko rekurence po transplantaci ledviny nízké. Důvodem je normální exprese/funkce MCP ve štěpu (Jokiranta, 2017, Nester et al., 2015).

U pacientů s aHUS s mutací v genu *MCP* je velice účinnou terapií podání plazmy nebo plazmaferéza. Až 90 % nemocných dosáhne pomocí této léčby remise. Vzhledem k tomu, že MCP je transmembránový protein, důvod, proč po podání plazmy/plazmaferéze dochází k remisi, je stále nejasný (Jokiranta, 2017, Nester et al., 2015). Vzhledem k vysokému riziku relapsů je i u těchto pacientů vhodné podávání blokátorů komplementu.

1.2.6.1.5 Gen C3

Gen *C3* kóduje C3 složku komplementu, stěžejní část komplementové kaskády. C3 je štěpen C3-konvertázou na C3a, který má funkci anafylatoxinu a fragment C3b, který po připojení na povrch buněk spouští komplementovou kaskádu. Při mutaci tohoto genu vzniká abnormální genový produkt se sníženou vazbou na faktor H a MCP (kofaktor faktoru I se schopností inhibice komplementu), která vede k závažné poruše degradace fragmentu C3b (Frémeaux-Bacchi et al., 2008).

Mutace v genu *C3* způsobuje aHUS nejčastěji manifestovaný v dětství, jeho průběh bývá závažnější (až 60 % dospěje do terminální fáze selhání ledvin). Pacienti s tímto genovým defektem obecně dobře odpovídají na léčbu plazmaferézou, pravděpodobně proto, že dojde k odstranění mutovaného C3 a zároveň jsou dodány do krve regulátory komplementu, které tlumí kaskádu navozenou mutovaným C3.

Dalším onemocněním spojovaným s tímto genem je deficit C3 složky komplementu. Jedná se o velmi vzácný primární imunodeficit spojený s velmi nízkými hladinami C3, asociovaný s častými infekty respiračního traktu a kůže, z kterého se mohou dále vyvinout autoimunitní onemocnění jako systémový lupus erytematodes nebo membranoproliferativní glomerulonefritida (Noris et al., 2016).

1.2.6.1.6 Gen *CFI*

Gen *CFI* kóduje faktor I komplementu, sérovou proteinázu zodpovědnou za štěpení a inaktivaci C4b a C3b. Mutace v tomto genu způsobuje nízkou hladinu faktoru I nebo vznik faktoru I s nízkou aktivitou (Frémeaux-Bacchi et al., 2008).

Začátek onemocnění u pacientů s mutací v genu *CFI* je až v 50% v dětském věku a více než 50% postižených dospěje do terminálního stádia selhání ledvin. U těchto pacientů je vysoké riziko rekurence onemocnění po transplantaci ledviny.

Deficit faktoru I je také spojený s mutací ve faktoru I. Jedná se o poruchu imunitního systému spojenou s četnými respiračními a uropoetickými infekcemi a rizikem rozvoje autoimunitních onemocnění, jako revmatoidní artritida a systémový lupus erytematodes. Je také popsána asociace s vyšším výskytem membranoproliferativní glomerulonefritidy (Noris et al., 2016).

1.2.6.1.7 Gen *CFB*

Tento gen kóduje faktor B, který se v komplementové kaskádě významně podílí na vzniku C3-konvertázy. Vznikem patologického produktu dochází k posílení tvorby C3-konvertázy, která je více rezistentní k dalším regulátorům komplementu (Frémeaux-Bacchi et al., 2008).

Pacienti s aHUS s mutací v genu *CFB* mají variabilní začátek onemocnění od dětství po dospělost, popisuje se u nich i velká intrafamiliární variabilita onemocnění. Až 70% pacientů dospěje do terminálního stádia selhání ledvin (Noris et al., 2016).

1.2.6.2 Geny pro koagulační systém

Geny pro koagulační systém s prokázanou asociací se vznikem aHUS jsou *THBD* a *PLG*.

THBD je endoteliální glykoprotein, který je nezbytný k aktivaci proteinu C. Jedná se o reakci, která je mediována trombinem. Protein C má antikoagulační a cytoprotektivní vlastnosti, dále je schopný degradovat produkty C3a a C5a, podílí se také na inaktivaci komplementu faktorem I. THBD má tedy i vliv na regulaci alternativní cesty komplementu. Abnormální genový produkt způsobený mutací má vliv na méně efektivní degradaci C3b. Tento typ aHUS se vyskytuje v podstatě pouze u dětí (Noris et al., 2016, Frémeaux-Bacchi et al., 2008).

Plasminogen je zymogen, který svou schopností měnit se na plasmin, hraje důležitou roli při fibrinolýze. Deficit plasminogenu způsobený mutací může mít vliv na degradaci trombu u aHUS. Přesná patogeneze nicméně není dosud známá (Nester et al., 2015).

1.2.6.3 Gen *DGKE*

Gen *DGKE* kóduje dialyglycerol kinázu epsilon, intracelulární kinázu nacházející se v endotelu, podocytech a trombocytech se schopností fosforylace diacylglycerolu, která se podílí na zvýšené produkci různých protrombotických faktorů endoteliálních buněk. Ztráta funkce DGKE pravděpodobně vede k protrombofilnímu stavu, specifickému pro aHUS. Dále také může způsobit poškození podocytů a funkce štěrbinové membrány vedoucí k těžké proteinurii. Přesná patogeneze vzniku aHUS nicméně zatím není známa (Richard et al., 2007).

2 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

2.1 Hypotéza

Z literatury víme, že u 14-64 % dětí se SRNS lze identifikovat kauzální mutace. Nemáme k dispozici data o zastoupení genetického SRNS v populaci dětí v České republice. Neznáme ani etiologii genetického SRNS na našem území. Předpokládáme nález genetické příčiny podmiňující SRNS u významné části pacientů z naší pediatrické kohorty. Dále předpokládáme, že na základě výsledků našich vyšetření budeme moci upravit terapii dětem se SRNS. Jiné výzkumné týmy již popsaly genetické i získané příčiny aHUS. Vyšetřením kohorty pacientů s touto diagnózou chceme objasnit etiologii aHUS u dětí v České republice. Předpokládáme, že u většiny pacientů identifikujeme příčinu aHUS, což nám umožní optimalizovat léčbu těchto pacientů.

2.2 Hlavní cíle

- Vyšetřit kohortu dětí z České a Slovenské republiky se SRNS molekulárně genetickými metodami: Sangerovou metodou na průkaz mutací v genech nejčastěji spojených se SRNS (*WT1*, *NPHS2* a *NPHS1*) a dále pomocí sekvenování nové generace testovat pacienty na přítomnost dalších 48 genů asociovaných s touto nemocí. Popsat spektrum mutací genů asociovaných se SRNS a určit jejich vztah k fenotypovým projevům a průběhu onemocnění.
- Vyšetřit kohortu dětí s aHUS z České republiky molekulárně genetickými metodami: MLPA na přítomnost strukturálních aberací a variant v počtu kopií v genech *CFH*, *CFHR1*, *CFHR2*, *CFHR3* and *CFHR5* a sekvenování nové generace na průkaz mutací v 15 genech asociovaných s aHUS. Analyzovat genetické a získané příčiny atypického aHUS v dětské populaci v České republice.

2.3 Vedlejší cíle

- Optimalizovat léčbu dětí se SRNS na základě výsledků genetického vyšetření.
- Porovnat zastoupení jednotlivých genetických příčin s výsledky obdobných studií provedených u dětí se SRNS a aHUS.
- Posoudit efekt podávání kalcineurinových inhibitorů ve skupině pacientů se SRNS.
- Srovnat průběh klinického onemocnění u dětí se SRNS a aHUS v závislosti na nálezu genetické příčiny.

- Určit prognózu a zajistit genetické poradenství u dětí se SRNS a aHUS.
- Určit incidenci aHUS v České republice.

2.4. Využití a přínos výsledků

V případě prokázání geneticky podmíněné formy SRNS je možné pacientům vysadit imunosupresivní léčbu, která má velké množství nežádoucích účinků a její léčebný přínos je u těchto pacientů minimální. Vzhledem k tomu, že se jednotlivé geny asociované s aHUS mohou lišit průběhem a prognózou tohoto onemocnění, prokázání genetické podstaty aHUS u každého pacienta nám pomůže určit závažnost nemoci, riziko vzniku dalších relapsů a rozhodnout o formě a trvání jejich léčby.

3 METODIKA

3.1 Metodika SRNS

3.1.1 Kritéria výběru

Pacienti do studie byli vybíráni prospektivně z center dětské nefrologie České republiky a Slovenska v období mezi lety 2000-2017 (celkem 18 let). Pacienti z České republiky byli vybíráni ze všech sedmi dětských nefrologických center, můžeme jej proto označit za výběr pacientů z celé populace. Výběr slovenských pacientů probíhal ze dvou největších terciálních center dětské nefrologie.

Steroid-rezistentní nefrotický syndrom byl definován jako nedosažení kompletní remise nefrotického syndromu během 6 týdnů adekvátní terapie (prednison 60mg/m²/den). U všech pacientů byly zároveň vyloučeny sekundární příčiny NS (infekční onemocnění – syfilis, hepatitida B, hepatitida C a systémová onemocnění). Kompletní remise nefrotického syndromu byla definována jako protein-kreatininový index v moči <20mg/mmol. Částečná (parciální) remise byla definována jako snížení proteinurie o 50 % nebo vyšší než tato hodnota s tím, že protein-kreatininový index v moči je 20-200 mg/mmol (KDIGO 2012).

Nefrotická proteinurie byla definována jako ztráta bílkoviny do moči > 960 mg/m²/24 hodin nebo protein-kreatininový index > 200mg/mmol ve vzorku moči. Hematurie byla definována jako více než 10 erytrocytů v 1 µl moči. Glomerulární filtrace (GFR) byla vypočítána podle Schwarzsova vzorce (Stamples et al., 2010). Normální funkce ledvin byla definována jako $GFR \geq 90 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Snížená funkce ledvin byla klasifikována podle klasifikace chronického onemocnění ledvin ([https:// guideline.gov/summaries/summary/46510/kdigo-2012-clinical-practice-guideline-for-the-evaluation-and-management-of-chronic-kidney-disease](https://guideline.gov/summaries/summary/46510/kdigo-2012-clinical-practice-guideline-for-the-evaluation-and-management-of-chronic-kidney-disease)). NS s manifestací do 3 měsíců věku byl definován jako kongenitální, NS s manifestací mezi 4 a 12 měsíci věku jako infantilní a NS s manifestací od 1 do 18 let věku jako nefrotický syndrom dětského věku (Andolino, Reid-Adam, 2015).

Ve studii byla shromažďována následující data: věk manifestace NS, pohlaví, počáteční příznaky, funkce ledvin, analýza moči, datum a popis renální biopsie, extrarenální příznaky, doba dosažení terminální fáze selhání ledvin, data lékařských prohlídek, typ náhrady funkce

ledvin a odpověď na imunosupresivní terapii. U většiny pacientů jsme také byli schopni získat informace o jejich současném klinickém stavu a laboratorních výsledcích (funkce ledvin, náhrada funkce ledvin, průběh po transplantaci ledviny).

Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Motole a pacienti nebo jejich opatrovníci podepsali informovaný souhlas se studií.

3.1.2 Pacienti

Celkem se nám podařilo získat skupinu 74 pacientů (38 chlapců a 36 dívek). Věk manifestace NS byl 0-17 let věku. Pacienti pocházeli celkem ze 70 rodin (ve čtyřech rodinách se jednalo o pár sourozenců se SRNS). Podrobná charakteristika pacientů je uvedena v tabulce 3. Ve skupině našich pacientů byla i jedna dívka z konsanguinní rodiny – její rodiče byly bratranec a sestřenice (rodina 2182). Průměrný věk manifestace onemocnění byl 5,1 roku. Jedenáct (15 %) pacientů se manifestovalo jako kongetinální NS, deset (14%) jako infantilní NS a padesát dva (71%) pacientů jako NS dětského věku.

3.1.2.1 Manifestace onemocnění

Nejčastějším symptomem při manifestaci onemocnění u 36 pacientů (49 %) byly otoky, hematurii mělo 29 pacientů (39 %) a hypertenze byla zjištěna u 35 dětí (47%). U jednoho pacienta byl jako první příznak onemocnění diagnostikován Wilmsův tumor.

3.1.2.2 Léčba

Pacienti s NS rezistentním na léčbu perorálními kortikoidy byli dále léčeni antiproteinurickou terapií (ACE inhibitory) a intravenózním podáváním kortikosteroidů spolu s cyklosporinem A dokud nebyla geneticky potvrzena diagnóza SRNS v rámci naší studie. U všech pacientů byla terapie zahájena před dokončením genetického testování. Pacienti byli dále sledováni svým pediatrem/dětským nefrologem až do dovršení 19 let života, kdy byli předáni do péče pro dospělé.

3.1.2.3 Histopatologický nález

Renální biopsie byla provedena u 56 (76 %) pacientů. Nejčastějším nálezem byla fokálně segmentální glomeruloskleróza (FSGS) u 42 pacientů (57 %), minimální změny byly zjištěny u 10 pacientů (13.5 %) a difuzní masangiální glomeruloskleróza u 4 dětí (5,4 %)

Tabulka 3 Pacienti ve studii SRNS: genetická diagnóza, nalezené varianty, klinická charakteristika

Číslo rodiny	Stanovení genetické diagnózy	Varianta(y) nalezené v genu	Změny v nukleotidu	Změny v aminokyselině	Zygota	Exon/intron	Pohlaví	Věk manifestace (roky)	Renální biopsie	Léčba CyA
1755	Ano	<i>NPHS1</i>	c.397-3A>G; 1103C>T	?; Pro368Leu	Slož. heterozyg.	Int3, ex9	F	7 týdnů	FSGS	CyA-REZ
*2030a	Ano	<i>NPHS2</i>	c.413G>A	p.Arg138Gln	Homozyg.	Ex3	F	10 dní	Nejsou data	Bez léčby
*2030b	Ano	<i>NPHS2</i>	c.413G>A	p.Arg138Gln	Homozyg.	Ex3	F	5 dní	Nejsou data	Bez léčby
*2028a	Ano	<i>NPHS2</i>	c.413G>A; 419delG	p.Arg138Gln; G140Dfs*41	Slož. heterozyg.	Ex3	F	11 dní	Nejsou data	CyA-REZ
*2028b	Ano	<i>NPHS2</i>	c.413G>A; 419delG	p.Arg138Gln; G140Dfs*41	Slož. heterozyg.	Ex3	M	8 dní	Nejsou data	CyA-REZ
1992	Ano	<i>NPHS2</i>	c.413G>A; 868G>A	p.Arg138Gln; Val290Met	Slož. heterozyg.	Ex3, Ex7	M	3 měsíce	FSGS	CyA-REZ
*1975	Ano	<i>NPHS2</i>	c.413G>A	p.Arg138Gln	Homozyg.	Ex3	M	5 měsíců	FSGS	CyA-REZ
1973	Ano	<i>NPHS2</i>	c.413G>A; 1150T>C	p.Arg138Gln; Term384Gln	Slož. heterozyg.	Ex3, Ex8	F	1	MCD	CyA-PR
1991	Ano	<i>NPHS2</i>	c.413G>A	p.Arg138Gln	Homozyg.	Ex3	M	1,5	MCD	CyA-REZ
2014	Ano	<i>NPHS2</i>	c.413G>A	p.Arg138Gln	Homozyg.	Ex3	F	2	FSGS	CyA-REZ
1988	Ano	<i>NPHS2</i>	c.952G>A; 686G>A	p.Ala318Thr; Arg229Gln	Slož. heterozyg.	Ex8, Ex5	M	2,3	FSGS	CyA-REZ
1985	Ano	<i>NPHS2</i>	c.413G>A	p.Arg138Gln	Homozyg.	Ex3	M	2,5	MCD	CyA-REZ
*2008	Ano	<i>WT1</i>	c.1372C>T	p.Arg458Term	Heterozyg.	Ex9	M	5 měsíců	Nejsou data	CyA-REZ
1993	Ano	<i>WT1</i>	c.1406A>G	p.His469Arg	Heterozyg.	Ex9	F	8 měsíců	FSGS	Bez léčby
*2010	Ano	<i>WT1</i>	c.1283G>A	p.Cys428Tyr	Heterozyg.	Ex8	F	8 měsíců	DMS	Bez léčby
2185	Ano	<i>WT1</i>	c.1390G>A	p.Asp464Asn	Heterozyg.	Ex9	M	10 měsíců	Nejsou data	Bez léčby
2048	Ano	<i>WT1</i>	c.1325A>C	p.Gln442Pro	Heterozyg.	Ex8	F	1,6	FSGS	CyA-REZ
2025	Ano	<i>WT1</i>	c.1384C>T	p.Arg462Trp	Heterozyg.	Ex9	M	4,2	Nejsou data	Bez léčby
1681	Ano	<i>WT1</i>	c.1432+4C>T	?	Heterozyg.	Int9	F	11,1	FSGS	CyA-REZ
1996	Ano	<i>NUP93</i>	c.1772G>T; 1916T>C	p.Gly591Val; Leu639Pro	Slož. heterozyg.	Ex16, Ex18	M	1,8	FSGS	CyA-REZ
2002	Ano	<i>NUP93</i>	c.1772G>T; 1537+1G>A	p.Gly591Val; ?	Slož. heterozyg.	Ex16, Int13	F	3	MCD	Nejsou data
2015	Ano	<i>NUP93</i>	c.1772G>T; 1298delA	p.Gly591Val; D433Afs*23	Slož. heterozyg.	Ex16, Int12	F	3,9	FSGS	CyA-REZ
2151	Ano	<i>NUP93</i>	c.1772G>T; c.1772G>T	p.Gly591Val; Gly591Val	Slož. heterozyg.	Ex16	M	7	FSGS	CyA-PR
2184a	Ano	<i>COQ2</i>	c.683A>G	p.Asn228Ser	Homozyg.	Ex3	F	3	FSGS	Nejsou data
2184b	Ano	<i>COQ2</i>	c.683A>G	p.Asn228Ser	Homozyg.	Ex3	F	3	FSGS	Nejsou data
1963	Ano	<i>INF2</i>	c.653G>A	p.Arg218Gln	Heterozyg.	Ex4	M	14	FSGS	Bez léčby
2182	Ano	<i>DGKE</i>	c.966G>A	p.Trp322Term	Homozyg.	Ex6	F	8 měsíců	FSGS	Bez léčby
2231	Ano	<i>LMNX1B</i>	c.668G>A	p.Arg223Gln	Heterozyg.	Ex4	M	5	FSGS	CyA-REZ
2026	Ne, VUS	<i>ACTN4</i>	c.1279G>A	p.Ala427Thr	Heterozyg.	Ex11	F	8 měsíců	FSGS	CyA-REZ
2110	Ne, VUS	<i>ACTN4</i>	c.734-26C>G	?	Heterozyg.	Int8	M	1,7	FSGS	CyA-PR
2206	Ne, VUS	<i>ACTN4</i>	c.475T>C	p.Ser159Pro	Heterozyg.	Ex4	F	15,1	Nejsou data	CyA-REZ
1736	Ne, VUS	<i>ADCK4</i>	c.232C>T	p.Arg78Cys	Homozyg.	Ex4	F	5,7	Nejsou data	CyA-PR
1999	Ne, VUS	<i>ANLN</i>	c.31C>T	p.Arg11Term	Heterozyg.	Ex2	M	1	MCD	CyA-KR
2196	Ne, VUS	<i>ANLN</i>	c.31C>T	p.Arg11Term	Heterozyg.	Ex2	M	10,7	FSGS	CyA-PR
2024	Ne, VUS	<i>ANLN</i>	c.1334G>A	p.Gly445Asp	Heterozyg.	Ex7	F	6	FSGS	Bez léčby
1490	Ne, VUS	<i>ARHGAP24</i>	c.1922A>G	p.His641Arg	Heterozyg.	Ex9	M	13,5	FSGS	CyA-PR
2033	Ne, VUS	<i>INF2</i>	c.1864C>T	p.Arg622Trp	Heterozyg.	Ex9	F	4,7	Nejsou data	Bez léčby
2019	Ne, VUS	<i>INF2</i>	c.1582C>A	p.Pro528Thr	Heterozyg.	Ex8	M	16,2	FSGS	CyA-KR
2017	Ne, VUS	<i>INF2</i>	c.1049C>T	p.Pro350Leu	Heterozyg.	Ex8	M	17	FSGS	CyA-KR
2012	Ne, VUS	<i>PLCE1</i>	c.1495C>T; 1207-47T>C	p.Arg499Cys; ?	Slož. heterozyg.	Ex4, Int2	M	3,1	FSGS	CyA-PR

Tabulka 3 (pokračování)

Číslo rodiny	Stanovení genetické diagnózy	Varianta(y) nalezené v genu	Změny v nukleotidu	Změny v aminokyselině	Zygota	Exon/intron	Pohlaví	Věk manifestace (roky)	Renální biopsie	Léčba CyA
1754	Ne, VUS	<i>PTPRO</i>	c.1578T>C; 3497G>C	p.Phe526Phe; Gly1166Ala	Slož. heterozyg.	Ex8, Ex25	M	6 týdnů	Neprovedena	Bez léčby
2021	Ne, VUS	<i>TRPC6</i>	c.2074G>A	p.Val69Ile	Heterozyg.	Ex8	M	8,3	MCD	Bez léčby
2004a	Ne, VUS	<i>WT1</i>	c.1301G>C	p.Arg434Pro	Heterozyg	Ex8	F	8 dní	DMS	Bez léčby
2004b	Ne, VUS	<i>WT1</i>	c.1301G>C	p.Arg434Pro	Heterozyg	Ex	F	3 týdny	DMS	Bez léčby
2016	Ne, VUS	<i>WT1</i>	c.1340-28C>T	?	Heterozyg	Int8	M	16	Nejsou data	CyA-REZ
2027	Ne						F	3 měsíce	DMS	CyA-REZ
1638	Ne						M	4 měsíce	Neprovedena	CyA-KR
1603	Ne						F	7 měsíců	MCD	CyA-PR
1986	Ne						M	1,4	MCD	CyA-KR
1982	Ne						M	1,8	MCD	CyA-KR
1976	Ne						M	2	FSGS	CyA-KR
7987	Ne						M	2,2	FSGS	CyA-PR
1497	Ne						F	2,3	FSGS	CyA-PR
1978	Ne						F	2,5	FSGS	CyA-REZ
1602	Ne						M	2,5	Nejsou data	Nejsou data
1998	Ne						F	2,7	FSGS	CyA-KR
1635	Ne						M	3,1	Nejsou data	CyA-REZ
2018	Ne						M	4,5	FSGS	CyA-REZ
1705	Ne						M	4,5	FSGS	CyA-REZ
1984	Ne						M	5,2	MCD	CyA-PR
1997	Ne						F	7,8	FSGS	CyA-KR
1981	Ne						F	8	Nejsou data	CyA-PR
1994	Ne						F	8,3	FSGS	CyA-REZ
1965	Ne						F	9	FSGS	CyA-REZ
1972	Ne						M	10	FSGS	Nejsou data
2000	Ne						M	11,1	FSGS	CyA-KR
1979	Ne						M	11,2	Nejsou data	Bez léčby
2013	Ne						F	13,8	FSGS	CyA-REZ
2034	Ne						F	14	FSGS	CyA-REZ
2023	Ne						F	14	FSGS	CyA-REZ
1720	Ne						M	14,5	FSGS	CyA-PR
2186	Ne						F	15,4	FSGS	Nejsou data
2091	Ne						M	16	FSGS	Bez léčby
1974	Ne						F	Nejsou data	Nejsou data	Nejsou data

Tabulka 3 (pokračování)

Číslo rodiny	Extrarenální manifestace/Wilmsův tumor	Stádium CKD/ESRD (vlastní ledviny)	Doba do dosažení ESRD (roky)	Transplantace/RRT	Rekurence NS	Náživu v roce 2017	Délka sledování (roky)	Počáteční proteinurie (protein-kreatininový index (mg/mmol))
1755	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	2.2	2123
*2030a	Vrozená srdeční vada	ESRD	4.7	Tx	Ne	Ano	15.2	2000
*2030b	Vrozená srdeční vada	ESRD	4.2	Tx	Ne	Ano	18.9	2350
*2028a	Ne	ESRD	13.6	Tx	Ne	Ano	18.9	1950
*2028b	Ne	ESRD	6.7	Tx	Ne	Ano	18.8	1485
1992	Psychomotorická retardace	ESRD	Nejsou data	Tx	Ne	Ano	18.6	Nejsou data
*1975	Ne	ESRD	8.4	Tx	Ne	Ano	14	437
1973	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	14.8	250
1991	Ne	CKD3	-	Ne	-	Ano	11.8	290
2014	Ne	ESRD	6.9	Tx	Ne	Ano	13.5	3180
1988	Ne	CKD4	-	Ne	-	Ano	12.6	420
1985	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	7.3	Nejsou data
*2008	WT, DDS, kryptorchismus	ESRD	7.8	Tx	Ne	Ano	13.8	720
1993	WT, DDS	ESRD	1.1	Tx (2x)	Ne	Ano	18.3	Anurie
*2010	Ne	ESRD	1.9	Tx	Ne	Ano	14.8	515
2185	Ne	CKD2	-	Ne	-	Ano	8 měsíců	Nejsou data
2048	Ne	ESRD	0	PD	-	Ne(1)	8 měsíců	2121
2025	WT, DDS, kryptorchismus	ESRD	0	HD	-	Ne(2)	1	1374
1681	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	5.5	3270
1996	Ne	ESRD	1.1	Tx	Ano	Ano	8.3	400
2002	Ne	ESRD	5 měsíců	Tx	Ne	Ano	13.9	20000
2015	Ne	ESRD	1.2	Tx	Ne	Ano	8.6	6200
2151	Ne	CKD3	-	Ne	-	Ano	1.3	514
2184a	Nizký vzrůst	ESRD	5 měsíců	HD	-	Ano	3	1900
2184b	Nizký vzrůst	CKD2	-	Ne	-	Ano	4.5 měsíce	400
1963	Nejsou data	CKD2	-	Ne	-	Ano	1.5	120
2182	Ne	ESRD	3 týdny	PD	-	Ano	8 měsíců	2850
2231	Patelární dysplázie, svalové kontrakce, svalová hypotonie, hypermobilita kloubů	ESRD	12.7	HD	-	Ano	12.9	680
2026	Ne	ESRD	7.5	PD	-	Ano	8.6	1990
2110	Ne	CKD2	-	Ne	-	Ano	1	1050
2206	Ne	CKD2	-	Ne	-	Ano	4,5 měsíce	Nejsou data
1736	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	1.8	210
1999	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	5.4	1200
2196	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	1.9	250
2024	Ne	CKD3	-	Ne	-	Ne(3)	6.6	200
1490	Nizký vzrůst, hypotyreóza	ESRD	3.2	PD	-	Ano	5.4	Nejsou data
2033	Ne	CKD1	Nejsou data	Ne	-	Ano	6.8	Nejsou data
2019	Hypotyreóza	CKD1	-	Ne	-	Ano	2.8	230
2017	Katarakta	CKD3	-	Ne	-	Ano	1.9	Nejsou data
2012	Psychomotorická retardace	Nejsou data	-	Ne	-	Ano	2	Nejsou data

Tabulka 3 (pokračování)

Číslo rodiny	Extrarenální manifestace/Wilmsův tumor	Stádium CKD/ESRD (vlastní ledviny)	Doba do dosažení ESRD (rok)	Transplantace	Rekurence NS	Náživu v roce 2017	Délka sledování (roky)	Počáteční proteinurie (protein-kreatininový index (mg/mmol))
1754	Pontocerebelární dysplázie	CKD1	-	Ne	-	Ne(4)	5 měsíců	4055
2021	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	8,6	917
2004a	Stenóza a. pulmonaris	ESRD	8 dní	HD	-	Ne(1)	5 měsíců	Anurie
2004b	Stenóza a. pulmonaris	ESRD	2 týdny	HD	-	Ne(1)	11 měsíců	>5000
2016	Ne	CKD2	-	Ne	-	Ano	2,8	200
2027	Ne	ESRD	2,4	Tx	Ne	Ano	5,2	463
1638	Anorektální atresie, solitární ledvina	CKD1	-	Ne	-	Ano	2,9	6800
1603	Nejsou data	CKD2	-	Ne	-	Ano	4,3	>300
1986	Ne	CKD2	-	Ne	-	Ano	14,7	Nejsou data
1982	Nízký vzrůst	CKD1	-	Ne	-	Ano	5,3	6423
1976	Ne	Nejsou data	-	Ne	-	Ne	16,7	Nejsou data
7987	Ne	ESRD	Nejsou data	Tx	Ne	Ano	7,8	Nejsou data
1497	Nízký vzrůst	CKD1	-	Ne	-	Ano	11,2	Nejsou data
1978	Ne	ESRD	3	Tx	Ano	Ano	10,5	720
1602	Nejsou data	Nejsou data	-	Ne	-	Nejsou data	3,4	Nejsou data
1998	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	8	680
1635	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	3,3	Nejsou data
2018	Ne	ESRD	7,5	HD	-	Ano	12	4011
1705	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	2,5	1263
1984	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	7,9	Nejsou data
1997	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	1,9	306
1981	Ne	CKD2	-	Ne	-	Ano	9	Nejsou data
1994	Ne	ESRD	2,4	Tx	Ne	Ano	6,6	2000
1965	Ne	ESRD	3,5	Tx	Ano	Ano	8	500
1972	Nízký vzrůst, katarakta	CKD1	-	Ne	-	Ano	9	Nejsou data
2000	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	4,8	210
1979	Hypotyreóza	CKD1	-	Ne	-	Nejsou data	5,8	Nejsou data
2013	Psychomotorická retardace	CKD2	Nejsou data	Ne	-	Ano	5,2	Nejsou data
2034	Psychomotorická retardace	CKD1	Nejsou data	HD	-	Ano	4,8	270
2023	Psychomotorická retardace	CKD1	-	Ne	-	Ano	6,9	670
1720	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	4,5	230
2186	Ne	CKD3	-	Ne	-	Ano	10 měsíců	Nejsou data
2091	Ne	CKD1	-	Ne	-	Ano	1	Nejsou data
1974	Nejsou data	CKD1	Nejsou data	Nejsou data	-	Ano	16,2	Nejsou data

(*) Tento pacient je v registru Podonetu (Sadowaki et al., 2015)

Pacienti byli seřazeni podle (a) jestli byla stanovena genetická diagnóza nebo byla nalezena varianta nejistého významu a (b) podle nalezených genů

Genetická diagnóza "ne, varianta nejistého významu (VUS)": genetická diagnóza nebyla zjištěna, byla nalezena pouze VUS, která je popsána v následujících sloupcích

Příčina úmrtí: (1) sepse s multiorgánovým selháním; (2) metastázy Wilmsova tumoru v plicích; (3) edém plic spojený s akutní respirační insuficiencí; (4) centrální apnoe v kombinaci s opožděným zahájením náhrady funkce

CyA cyklosporin A, CyA-PR cyklosporin A-parciální remise, CyA-REZ cyklosporin A-rezistence, CyA-KR cyklosporin A-kompletní remise, DDS Denys-Drashův syndrom, DMS difúzní mesangiální skleróza, Ex exon, ESRD konečné stadium selhání ledvin, F žena, FSGS fokální segmentální glomeruloskleróza, HD hemodialýza, Ivt intron, M muž, MDC minimal change disease, NS nefrotický syndrom, PD peritoneální dialýza, RRT náhrada funkce ledvin, Tx transplantace, WT Wilmsův tumor

3.1.2.4 Wilmsův tumor a extrarenální příznaky

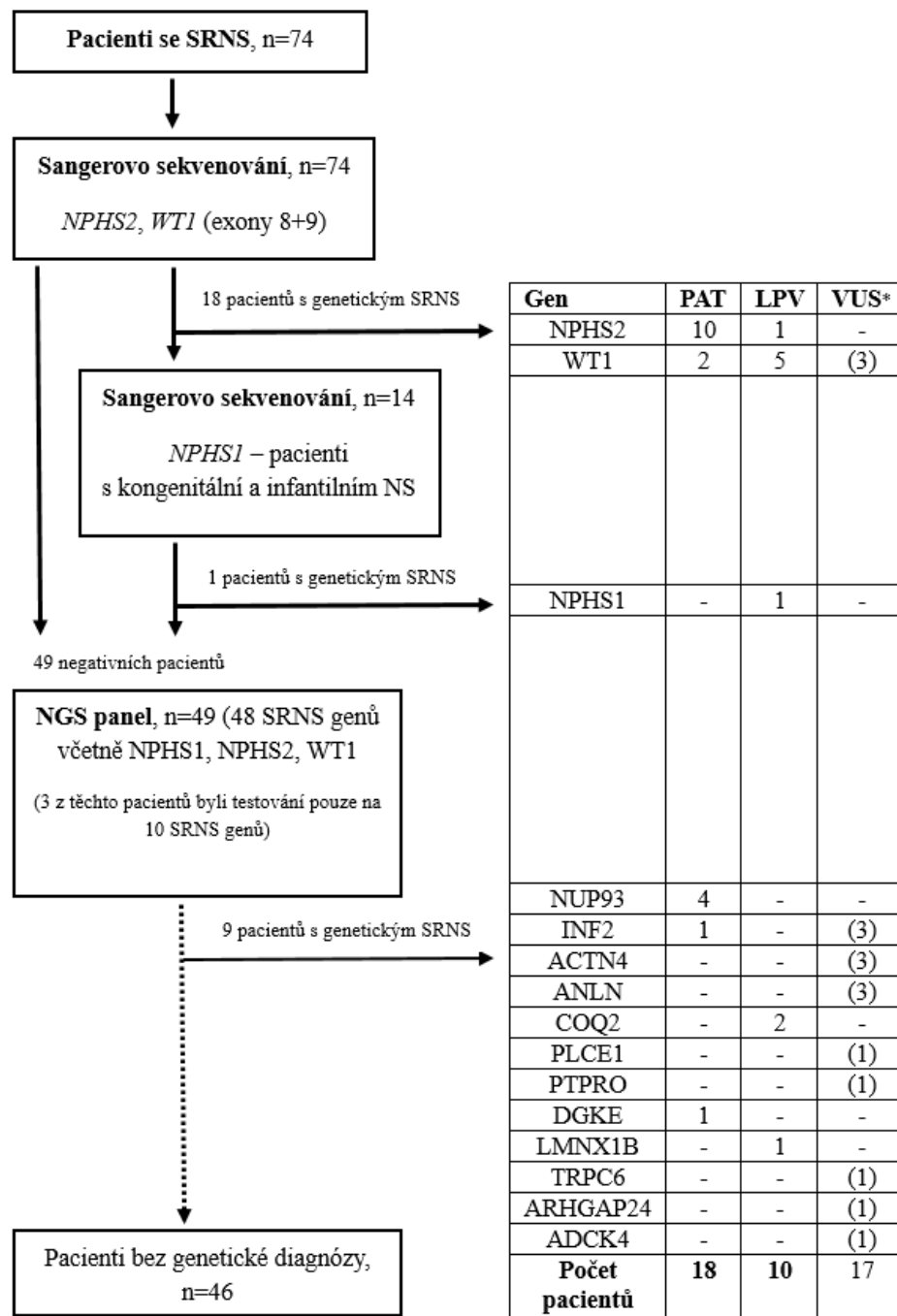
Wilmsův tumor byl diagnostikován u 3 dětí (u jednoho při manifestaci NS, u dvou v průběhu sledování). Všichni 3 pacienti měli známky Denys-Drashova syndromu. Extrarenální příznaky byly diagnostikovány u 24 pacientů (32%) a zahrnovaly: vrozené srdeční vady, psychomotorickou retardaci, stenózu pulmonální arterie, hypotyreózu, nízký vzrůst, kataraktu, pontocerebelární hypoplazii, dystrofii pately a kryptorchismus.

3.1.3 Genetická analýza

V naší studii byla provedena dvoustupňová genetická analýza. Jako první jsme použili přímou Sangerovu metodu k určení přítomnosti nejčastějších genů způsobujících SRNS (*NPHS2* a *WT1* u všech pacientů, doplněné o *NPHS1* u pacientů s kongenitálním a infantilním NS). Ve druhé fázi testování byl pomocí sekvenování nové generace (NGS) testován rozsáhlý panel známých a potencionálních kandidátních genů spojených se SRNS (příloha 1). Kauzální varianty genů zjištěných pomocí NGS jsme poté ještě potvrdili Sangerovou metodou. Celý průběh studie je zobrazen na obrázku 12.

3.1.3.1 Sangerovo sekvenování

Analyzovali jsme všech 8 a 29 exonů a hraniční oblasti sousedících intronů genů *NPHS2* a *NPHS1*. U genu *WT1* byly analyzovány pouze exony 8 a 9 s jejich hranicí mezi exonem a intronem, protože většina variant asociovaných se SRNS se nachází právě v těchto 2 exonech (Mucha et al., 2006). Celý gen *WT1* byl poté pomocí NGS analyzován ve druhé fázi studie.



Obr. 12 Průběh studie

Počet pacientů s PAT (patogenní varianta); LPV (likely pathogenic variant = pravděpodobně patogenní varianta; VUS (varianta nejasného významu).

(*) Pacienti, u kterých byla nalezena VUS, ale ne kauzální mutace. VUS není klasifikována jako genetická příčina onemocnění. Přestože tito pacienti jsou klasifikováni jako negenetická forma SRNS, možná patogenní role těchto variant si zaslouží pozornost.

3.1.3.2 Sekvenování nové generace

Všechny vzorky, ve kterých nebyla nalezena žádná varianta genu pomocí Sangerova testování, byly analyzovány ve druhé fázi studie. Zde jsme pomocí genových panelů Haloplex Cusom Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) analyzovali 48 genů asociovaných se SRNS. Celý panel obsahoval 12 169 ampliconů. Každý exon byl sekvenován s okrajem 50 bp (bázových párů) uvnitř sousedících intronů. Celkové cílové pokrytí bylo 99,43 % (příloha 1). Knihovny byly připravovány podle výrobního protokolu a sekvenovány pomocí soupravy MiSeq Reagent kit v2 na přístroji Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, SA). Sekvenační data byla vyhodnocena pomocí softwaru SureCall (technologie Agilent) s doporučeným pracovním postupem pro panel Haloplex. Nezpracovaná sekvenační data (fastq soubory) spolu se všemi ukázkovými charakteristikami z tabulky 3 byla uložena v Národním centru pro Čtení sekvence biotechnologických informací (NCBI). Archiv (SRA) pod projektovým ID PRJNA419610.

3.1.4 Hodnocení nalezených variant

Klinický význam identifikovaných variant byl hodnocen pomocí analyzátoru variant Ingenuity (Qiagen, Hilden, Německo). Filtry pro varianty byly nastaveny následovně. Vyloučili jsme běžné varianty s frekvencí 1 % nebo více ve zdravé populaci (1000 Genomes, ExAC, NHLBI ESP Genomes) a ponechali jsme pouze varianty predikované jako patogenní, pravděpodobně patogenní a nejistého významu podle skórovacích systému Sift, Polyphen-2 a CADD. Filtrování bylo také aplikováno podle známého vzoru dědičnosti konkrétních genů.

Poté jsme vyhledali v Databázi mutací lidských genů (Human gene mutation database) (Stenson et al., 2017) předchozí popisy variant a v databázi NCBI dbSNP globální frekvence minoritních alel. Při hodnocení patogenicity variant jsme postupovali podle platných standardů American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (Richards et al., 2015). Dle standardů byly vymezeny následující hlavní skupiny pro hodnocení variant: patogenní, pravděpodobně patogenní, pravděpodobně benigní, benigní a varianty nejistého významu (VUS, varianty, jejichž patogenitu nelze potvrdit ani vyvrátit). Pro hodnocení byl použit online software založený na těchto standardech (Kleiberger et al., 2016).

Všechny patogenní nebo pravděpodobně patogenní varianty zjištěné pomocí NGS byly následně potvrzeny pomocí Sangerova sekvenování, a pokud to bylo možné, byla stanovena jejich segregace v rodinách. Nepřítomnost vybraných variant na ~ 380 chromozomech jsme ověřili také pomocí naší vlastní sbírky genetického materiálu zdravých českých dětí. Varianta byla považována za kauzální pro geneticky podmíněný SRNS, pokud patřila do kategorie patogenních nebo pravděpodobně patogenních a pokud genotyp odpovídal očekávanému způsobu dědičnosti. VUS se neklasifikovala jako genetická příčina onemocnění.

3.2 Metodika aHUS

3.2.1 Pacienti

Během let 1996 až 2017 jsme nasbírali vzorky krve a provedli genetické testování na přítomnost kauzální variant genů asociovaných s aHUS u 21 dětí (13 chlapců a 8 dívek), které byly diagnostikovány na Nefrologickém oddělení Pediatrické kliniky Fakultní nemocnice v Motole (terciální nefrologickém centru). Věkové rozmezí pacientů bylo od 0 do 16,3 roku, průměrný věk 5,8 roku (tabulky 4 a 5).

3.2.2 Výpočet incidence

Incidence aHUS byla vypočtena jako průměr incidencí za první a druhou polovinu období a také za celé období studie. Každá incidence byla vypočtena z populace v každém roce (incidence na 1 milion obyvatel) a z počtu živě narozených dětí v každém roce (incidence na 100 000 narozených dětí). Odhad incidence byl proveden pomocí odhadu maximální věrohodnosti pro exponenciální rozdělení. 95% konfidenční interval (CI) je asymptotický konfidenční interval založený na aproximaci Poissonova rozdělení normálním rozdělením. Všechny výpočty byly provedeny ve statistickém programu R. Zdroj dat o populaci byl získán z Českého statistického úřadu (<https://www.czso.cz>).

Tabulka 4 Klinická charakteristika pacientů s aHUS

ID pacienta	Pohlaví	Věk začátku onemocnění (roky)	Věk při poslední kontrole (roky)	Délka sledování (roky)	Extrarenální komplikace	Iniciální léčba	Relaps aHUS/věk při relapsu (roky)	Léčba relapsu	Dialýza	Transplantace	Rekurence aHUS po transplantaci	Poslední kontrola – naživu	Poslední kontrola – stádium CKD	Poslední kontrola – léčba
2066	F	5,9	15	9,2	Ne	S	7,9; 8,8; 11,4; 12,7; 15,2	PF	Ne	Ne	-	Ano	2	Žádná
2070	M	3,2	10	6,3	Ne	S	Ne	-	Ne	Ne	-	Ano	1	Žádná
2099	M	5,9	10	4,6	Zvracení, bolest břicha	S	Ne	-	Ne	Ne	-	Ano	1	Žádná
2046	M	6,5	18	11,7	Zvracení	PF	Ne	-	Ne	Ne	-	Ano	2	AHT, Ecu
2060a	F	14 m	13	12,5	Ne	PF, S	Ne	-	Ne	Ne	-	Ano	2	AHT
2060b	F	4 m	8 m	5	Sepse s multiorgánovým selháním	PF, RTX, P, CyA	8 m	ATB, S	Ano (HD)	Ne	-	Ne	5	PD, AHT
2061	F	6,6	16	8,8	Zvracení	PF	Ne	-	Ne	Ne	-	Ano	2	Žádná
2062	M	6,9	18	11,5	Zvracení, respirační infekce	PF	7	PF	Ne	Ne	-	Ano	2	AHT
2063	F	5,0	19	13,7	Zvracení	PF	6,2	PF, HD	Ano (HD)	Ne	-	Ano	1	AHT, Ecu, KS, tac, MMF
2064	M	6,9	18	11,2	Zvracení, bolest břicha	PF	Ne	-	Ne	Ne	-	Ano	1	AHT
2067	M	4,5	14	9,2	Zvracení	PF	Ne	-	Ne	Ne	-	Ano	2	Žádná
2068	M	8,0	19	11,1	Zvracení, bolest břicha, záchvat křečí, somnolence	PF	10,4	PF	Ano (PD)	Ano	Ano	Ano	1	AHT, Ecu, KS, tac
2069	M	7,8	17	9,3	Zvracení, průjem	PF	Ne	-	Ne	Ne	-	Ano	2	Žádná
2072	F	16,3	18	2,6	Ne	PF + Ecu	Ne	-	Ne	Ne	-	Ano	2	Žádná
2074	M	10,1	13	2,9	Zvracení, bolest břicha	PF + Ecu	Ne	-	Ne	Ne	-	Ano	1	AHT, Ecu
2075	F	5,2	7	2,3	Zvracení, bolest břicha	PF + Ecu	Ne	-	Ne	Ne	-	Ano	1	Žádná
2078	M	7,5	12	4,7	Nausea, bolest břicha, respirační infekce	PF + Ecu	Ne	-	Ne	Ne	-	Ano	1	Žádná
2073a	M	4,9	8	3,2	Zvracení, respirační infekce	Ecu	Ne	-	Ne	Ne	-	Ano	1	AHT, Ecu
2073b	M	5 m	1	4 m	Ne	Ecu	Ne	-	Ne	Ne	-	Ano	1	Žádná
2098	M	3 t	1,5	1,1	Paréza nervus facialis	Ecu	Ne	-	Ano (PD)	Ano	Ne	Ano	1	AHT, Ecu
2111	F	7,7	10	2,0	Zvracení, bolest břicha	Ecu	Ne	-	Ne	Ne	-	Ano	1	Žádná

Tučná čára označuje dostupnost léčby ecilizumabem na začátku onemocnění.

AHT antihypertenzní terapie, *ATB* antibiotika, *CyA* cyklosporin A, *Ecu* ecilizumab, *HD* hemodialýza, *m* měsíc, *KS* kortikosteroidy, *P* Prednison, *PD* peritoneální dialýza, *PF* plazmaferéza, *RTX* rituximab, *S* symptomatická léčba, *t* týden, *tac* tacrolimus

Tabulka 5 Protilátky proti faktoru H a genetické nálezy

ID pacienta	Protilátky proti faktoru H detekovány	Protilátky proti faktoru H nedetekovány	Delece <i>CFHR1/CFHR3</i> , zygota	Gen, exon	Nukleotid + změna v aminokyselině	Interpretační kategorie	Zygota nalezené varianty
2046	Detekovány	-	Homozygot	-	-	-	-
2061	Detekovány	-	Heterozygot	C3, Ex33	c.414C>A, p.Thr1383Asn	VUS	Heterozygot
2062	Detekovány	-	<i>CFHR1</i> homozygot	-	-	-	-
2063	Detekovány	-	<i>CFHR3</i> homozygot	<i>CFH</i> , Ex20	c.3214A>G, p.Arg1072Gly	VUS	Heterozygot
2064	Detekovány	-	Homozygot	-	-	-	-
2067	Detekovány	-	Homozygot	<i>MCP</i> , Ex11	c.1058C>T, p.Ala353Val	P	Heterozygot
2069	Detekovány	-	Homozygot	-	-	-	-
2072	Detekovány	-	Homozygot	-	-	-	-
2073a	Detekovány	-	Homozygot	<i>CFH</i> , Ex18, 22	c.2850G>T, p.Gln950His; c.3644G>T, p.Arg1215Leu	LPV	-
2074	Detekovány	-	Homozygot	<i>CFH</i> , Ex18; <i>MCP</i> Ex11	c.2850G>T, p.Gln950His; c.1058C>T, p.Ala353Val	LPV, P	Heterozygot
2075	Detekovány	-	Homozygot	-	-	-	-
2078	Detekovány	-	Homozygot	<i>CFI</i> , Ex13	c.1705A>C, p.Ile569Leu	VUS	Heterozygot
2111	Detekovány	-	Homozygot	-	-	-	-
2060a	-	Nedetekovány	Ne	<i>DGKE</i> , Ex6, 2	c.966G>A, p.Trp322Ter; c.171delG, p.Ser58Alafs*111	P, LPV	Složený Heterozygot
2060b	-	Nedetekovány	Ne	<i>DGKE</i> , Ex6, 2	c.966G>A, p.Trp322Ter; c.171delG, p.Ser58Alafs*111	P, LPV	Složený Heterozygot
2066	-	Nedetekovány	Ne	<i>MCP</i> , Ex4	c.404G>A, p.Gly135Asp	LPV	Heterozygot
2068	-	Nedetekovány	<i>CFH/CFHR1</i> hydridní gen	-	-	-	-
2070	-	Nedetekovány	Ne	<i>MCP</i> , Ex6	c.828G>A, p.Trp276Ter	LPV	Heterozygot
2073b	-	Nedetekovány	Netestováno	<i>CFH</i> , Ex18, 22	c.2850G>T, p.Gln950His; c.3644G>T, p.Arg1215Leu	LPV, LPV	Heterozygot
2098	-	Nedetekovány	Homozygot	<i>CFB</i> , Ex13	c.1697A>C, p.Glu566Ala	VUS	Heterozygot
2099	-	Nedetekovány	Ne	<i>MCP</i> , Ex6	c.828G>A, p.Trp276Ter	LPV	Heterozygot

Shrnutí 13 pozitivní pacientů 8 negativních pacientů

nálezů

LPV likely pathogenic (pravděpodobně patogenní), *P* pathogenic, *VUS* variant of unknown significance (variance nejasného významu)

3.2.3 Kritéria výběru

Diagnóza aHUS byla stanovena dle následujících kritérií: trombocytopenie (množství krevních destiček $<150 \times 10^9/l$), anémie (hemoglobin $< 100 \text{ g/l}$), přítomnost schistocytů v krevním nátěru, negativní Coombsův test, negativní test na přítomnost Shiga toxinu ve stolici, aktivita enzymu ADAMTS13 $> 10\%$, zvýšená laktátdehydrogenáza (LDH) a známky akutního poškození ledvin (AKI), které je definováno dle modifikovaných p-RIFLE kritérií jako pokles GFR (Akcan-Arican et al., 2007).

U našich pacientů jsme sbírali následující data: věk začátku onemocnění, pohlaví, krevní obraz, renální parametry, vyšetření moči, léčba, délka sledování, typ náhrady funkce ledvin (RRT), extrarenální komplikace, počet relapsů, rekurence po transplantaci a současný klinický stav a laboratorní parametry.

3.2.4 Genetická analýza

3.2.4.1 Sekvenování nové generace (NGS)

Genomová DNA byla extrahována z periferní krve pomocí systému QIAamp DNA Blood Mini (QIAGEN, Hilden, Německo). DNA byla analyzována pomocí sekvenování nové generace (NGS) pro 15 genů souvisejících s aHUS pomocí sady Haloplex Custom Kit pro všechny vzorky (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). DNA byla analyzována pomocí NGS na přítomnost 15 genů souvisejících s aHUS pomocí sady Haloplex Custom Kit pro všechny vzorky (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Celý panel obsahoval 6731 ampliconů s celkovým počtem 98,83 cílového pokrytí (příloha 2). Každý exon byl sekvenován s okrajem 50 bp (bázových párů) uvnitř sousedících intronů. Knihovny byly připraveny podle pokynů výrobce a sekvenovány pomocí soupravy MiSeq Reagent kit v2 na přístroji Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA). Sekvenovaná data byla vyhodnocena pomocí softwaru SureCall (Agilent technologies) s doporučeným pracovním postupem pro panel Haloplex.

3.2.4.2 Technika MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification)

Všechny vzorky byly analyzovány na přítomnost strukturních aberací a variant počtu kopií v genech *CFH*, *CFHR1*, *CFHR2*, *CFHR3* a *CFHR5* pomocí metody MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). Sekvenovaná data byla vyhodnocena pomocí softwaru GeneMarker (SoftGenetics, State College, PA), panelem genových sond doporučených společností MRC-Holland.

4 VÝSLEDKY

4.1 Výsledky SRNS

4.1.1 Kauzální varianty pro SRNS

Genetická diagnóza byla stanovena u 28 ze 74 pacientů (38 %) na základě nálezu patogenních nebo pravděpodobně patogenních variant v genotypích odpovídajících předpokládanému způsobu dědičnosti. V první fázi genetického testování Sangerovou metodou byla diagnostikována genetická příčina SRNS u 19 (26 %) pacientů. Jedenáct (15 %) pacientů byli homozygoti nebo složení heterozygoti pro kauzální varianty v genu *NPHS2*, sedm (9,5%) dětí mělo kauzální variantu v genu *WT1* a jeden pacient (1,4 %) byl složený heterozygot pro kauzální variantu v genu *NPHS1*. Tyto 3 geny byly také zahrnuty v panelu genů pro NGS, jehož testování probíhalo v druhé části studie. Pomocí NGS nebyla objevena žádná další kauzální varianta genů *NPHS2*, *WT1* a *NPHS1*. Během druhé fáze genetického testování pomocí NGS panelu byla zjištěna genetická příčina SRNS u dalších 9 (12 %) pacientů. Mezi nimi byli 4 nepříbuzní pacienti s kauzální variantou v genu *NUP93*, 2 příbuzní pacienti s kauzální variantou v genu *COQ2* a dále jednotlivé případy pacientů s kauzální variantou v genech *INF2*, *DGKE* a *LMX1B*. Průměrná doba od klinické diagnózy ke genetické analýze byla 9 let.

Všechny zjištěné kauzální varianty spolu s popisem klinického fenotypu pacientů jsou uvedeny v tabulce 3.

Ze 23 kauzálních variant v našem souboru pacientů jich bylo 18 již popsáno dříve v souvislosti se SRNS. Zbývajících pět variant bylo nových. Nejčastěji zjištěnou patogenní variantou genu *NPHS2* byla c.413G>A (p.Arg138Gln), buď v homozygotním stavu nebo jako součást složené varianty heterozygotních genotypů. Druhou nejčastější kauzální variantou byla varianta v genu *NUP93* c.1772G>T (p.Gly591Val), která byla přítomna ve všech čtyřech rodinách s kauzálními variantami v tomto genu, jednou v homozygotním stavu a třikrát ve složeném heterozygotním stavu. Nepřítomnost těchto variant genu *NUP93* v české populaci jsme ověřili sekvenováním vzorku 380 chromozomů zdravých kontrolních osob.

4.1.2 Varianty nejasného významu

Sedmnáct pacientů (23 %) neslo VUS v genotypech, které by mohly potenciálně vysvětlovat fenotyp SRNS (v genech *WT1*, *ACTN4*, *INF2*, *ANLN*, *PLCE1*, *PTPRO*, *TRPC6*, *ARHGAP24* a *ADCK4*). Ačkoli tito pacienti jsou v naší studii klasifikováni jako negenetické formy SRNS, možnost patogenní role těchto VUS si zasluhuje pozornost.

4.1.3 Pacienti a jejich fenotypy

4.1.3.1 Věk začátku onemocnění

Genetická diagnóza byla stanovena u 6 z 11 (55 %) kongenitálních forem SRNS, v 7 z 10 (70 %) infantilního SRNS a u 15 z 52 (29 %) SRNS dětského věku. U kongenitálních forem SRNS mělo 1 dítě (pacient 1755) kauzální variantu v genu *NPHS1*, u 5 pacientů byla zjištěna i kauzální varianta genu *NPHS2* (dvojice sourozenců z rodin 2030 a 2028 a proband číslo 1992). U SRNS s počátkem onemocnění v dětském věku bylo spektrum nalezených genů mnohem širší. Rozdělení kauzálních genů podle věku při začátku onemocnění je uvedeno v tabulce 6.

Tabulka 6 Věk začátku onemocnění a kauzální geny

Věk začátku onemocnění Kauzální gen	Kongenitální NS (0-3 měsíce) n = 11	Infantilní NS (4-12 měsíců) n = 10	NS dětského věku (1-17 let) n = 52	Pacientů celkem n = 73 ^a
<i>NPHS1</i>	1	-	-	1
<i>NPHS2</i>	5	2	4	11
<i>WT1</i>	-	4	3	7
<i>NUP93</i>	-	-	4	4
<i>DGKE</i>	-	1	-	1
<i>COQ2</i>	-	-	2	2
<i>LMX1B</i>	-	-	1	1
<i>INF2</i>	-	-	1	1
Pacienti s kauzální variantou	6 (55%)	7 (70%)	15 (29%)	28 (38%)

NS nefrotický syndrom

^aPacient číslo 1974 byl z této analýzy vyloučen kvůli chybějícímu věku začátku onemocnění

4.1.3.2 Odpověď na farmakoterapii

Léčbu cyklosporinem A (CyA) dostalo celkem 51 pacientů, 34 pacientů s negenetickou formou SRNS a 17 pacientů, u kterých byla genetická forma SRNS diagnostikována později (tab. 3). Ze všech pacientů s genetickou formou SRNS pouze 2 (12 %) dosáhli parciální remise na léčbě CyA. Byl to pacient číslo 2151 s kauzální variantou v genu *NUP93* a pacient číslo 1973 s kauzální variantou v genu *NPHS2*. Naproti tomu ve skupině pacientů s negenetickou formou SRNS bylo úplné nebo parciální remise léčbou CyA dosaženo u 21 (62 %) pacientů. 10 pacientů se dostalo do úplné remise, 11 pacientů do remise parciální.

U jednoho pacienta byl k léčbě použit koenzym Q10. Jednalo se o probanda 2184b, mladší ze dvou sester s prokázanou kauzální homozygotní variantou genu *COQ2*. Tato pacientka (před stanovením genetické diagnózy) byla nejprve léčena prednisonem. Tato léčba vedla ke snížení proteinurie ze 4 na 1,2 g/den. Vzhledem k tomu, že u dívky na prednisonu nedošlo ke kompletní remisi, byl do terapie přidán CyA. Kombinovaná imunosupresivní terapie (prednison + CyA) vedla k dalšímu poklesu proteinurie na 0,35 g/den. Poté, co byla u obou sester stanovena genetická diagnóza, byla u mladší sestry (2184b) změněna terapie na monoterapii perorálně podávaným koenzymem Q10 v dávce 15mg/kg/den. Po tomto terapeutickém pokusu došlo k dalšímu významnému poklesu proteinurie během 4 měsíců terapie. Proteinurie klesla na hodnotu 0,17 g/den, zároveň došlo k výraznému zlepšení renální funkce z CKD4 na pouze lehce sníženou funkci ledvin (CKD2). Tuto terapii bohužel nebylo možné použít u její sestry (2184a). V době stanovení genetické diagnózy u ní již došlo k terminální fázi selhání ledvin, byla léčena dialýzou a zařazená na čekací listinu k transplantaci ledviny.

4.1.3.3 Data ze sledování pacientů

Průměrná doba sledování pacientů se SRNS byla 6,8 roku. U celkem 28 dětí došlo k progresi do terminálního stádia selhání ledvin (ESKD). Z těchto pacientů mělo 18 genetickou formu SRNS a 10 formu negenetickou. Ve srovnání s pacienty s negenetickou formou onemocnění, měli pacienti s genetickou formou signifikantně vyšší riziko progresu do ESKD (hazard ration = 2,2, CI 95% 1.2.-3.8, P = 0,0063). U zbylých pacientů byla během poslední dostupné kontroly zjištěna různá stádia CKD: 27 pacientů mělo CKD1, 10 CKD2, 5 CKD3 a 1 CKD4 (tabulka 3).

U 3 ze 7 pacientů s nalezenou kauzální variantou v genu *WT1* byl diagnostikován Wilmsův tumor. U jednoho z těchto pacientů byl nádor zjištěn již před genetickou diagnózou, u zbylých dvou až po stanovení genetické diagnózy SRNS.

U celkem 18 pacientů byla provedena transplantace ledviny. Rekurence SRNS po transplantaci byla zjištěna u tří z nich. Jednalo se o dva pacienty s negenetickou formou SRNS, u kterých byla rekurence diagnostikována ihned po transplantaci a o jednoho pacienta s kauzální variantou v genu *NUP93*, u kterého se rekurence objevila až 1 rok po transplantaci. U všech pacientů byla rekurence potvrzena biopsií štěpu.

Sedm pacientů během sledování zemřelo, 4 z nich měli genetickou formu SRNS. Příčiny úmrtí byly následující: sepse s multiorgánovým selháním, metastázy Wilmsova tumoru v plicích, edém plic s akutním respiračním selháním a centrální apnoe u pacienta s pontocerebelární hypoplázií typu 1B.

4.1.3.4 Klinická data pacientů se SRNS způsobených genem *NUP93*

Detailní klinická data všech 4 pacientů s kauzálními variantami v genu *NUP93* jsou shrnuta v tabulce 7. Všichni tito pacienti měli masivní proteinurii. Tři pacienti velmi rychle progredovali do ESKD. Doba progresu do ESKD byla 0,3-1,2 roku. Čtvrtý pacient měl středně zhoršenou funkci odpovídající CKD3 za 15 měsíců od stanovení diagnózy. V histologii z renální biopsie byla u 3 pacientů nalezena FSGS a u jednoho minimální změny glomerulů. U 3 pacientů (pacienti číslo 1996, 2015 a 2151) byla zahájena léčba CyA. Pouze u pacienta číslo 2151 bylo na této léčbě dosaženo parciální remise. Čtvrtý pacient (číslo 2015) byl kromě CyA léčen i MMF a rituximabem. I přes tuto intenzivní terapii došlo k dalšímu zhoršení proteinurie a progresi do ESKD.

Tabulka 7 Detailní klinická data pacientů s kauzální variantou v genu NUP93

Rodina, porod a základní informace o onemocnění	Číslo rodiny	1996	22002	2015	2151
	Pohlaví	M	Ž	Ž	M
	Konsanguinita	Ne	Ne	Ne	Ne
	Gestační věk při porodu (týdny)	40	40	41	39
	Oligohydramnion	Ne	Ne	Ne	Ne
	SRNS v RA	Ne	Ne	Ne	Ne
Klinická data na začátku onemocnění	Věk (roky)	1,8	3	3,9	7
	GFR (ml/min/1,73m ²)	25	7	25	52
	Proteinurie (protein-kreatininový index) (mg/mmol)	400	20000	6200	514
	Sérový albumin (g/l)	25,1	28,5	31,5	26,4
	Hypertenze	Ano	Ano	Ano	Ne
	Hematurie	Ano	Ne	Ne	Ne
	Otoky	Ne	Ne	Ne	Ne
	Další symptomy	Laryngitida	Ne	OMA	Ne
	Renální biopsie	FSGS	MCD	FSGS	FSGS
	Léčba CyA	CyA-REZ	Nejsou data	CyA-REZ	CyA-PR
	Další léčba	ACEi, BKK	ACEi	Cf-REZ, Rtx, MMF, ACEi, diuretika	ACEi, diuretika
Progrese onemocnění	Extrarenální manifestace	Ne	Ne	Ne	Ne
	Počáteční stádium CKD	CKD4	CKD5	CKD4	CKD3
	Progrese CKD	CKD5	CKD5	CKD5	CKD3
	Čas do ESRD (roky)	1,1	5 měsíců	1,2	-
	RRT	PD	PD	PD	Ne
	Transplantace	Ano	Ano	Ano	-
Data z poslední kontroly	Rekurence NS	Ano	Ne	Ne	-
	Datum kontroly	6.12.2017	8.12.2017	8.12.2017	15.12.2017
	Aktuální věk (roky)	10,5	14,3	12,9	8,7
	GFR (ml/min/1,73m ²)	60	69	95	49
	Proteinurie (protein-kreatininový index) (mg/mmol)	31	15	9	820
	Sérový albumin (g/l)	47	49,2	48,2	28,3
	Stádium CKD	CKD2	CKD1	Normální funkce ledvin	CKD3
	Naživu	Ano	Ano	Ano	Ano
	Délka sledování (roky)	8,3	13,9	8,6	1,3

ACEi ACE inhibitory, *Cf* cyklofosfamid, *Cf-REZ* cyklofosfamid-rezistence, *CKD* chronické onemocnění ledvin, *CyA* cyklosporin A, *CyA-REZ* Cyclosporin A-rezistence, *CyA-PR* cyklosporin A – partiální remise, *BKK* blokátory kalciových kanálů, *FSGS* fokální-segmentální glomeruloskleróza, *GFR* glomerulární filtrace, *M* muž, *CDM* minimul change disease, *MMF* mykofenolát mofetil, *PD* peritoneální dialýza, *OMA* otitis media acuta, *RA* rodinná anamnéza, *RTX* rituximab, *Ž* žena

4.1.3.5 Pacient s nail-patella syndromem

U pacienta číslo 2231 byla nalezena již dříve popsaná heterozygotní pravděpodobně patogenní varianta c.668G>A (p.Arg223Gln) v genu *LMX1B*. Tato varianta je asociovaná se syndromem nail-patella (hereditární osteonychodysplázie) (McIntosh et al., 1998).

Syndrom se projevuje dysplázií pately, svalovými kontrakturami, svalovou hypotonií a hypermobilitou kloubů. Stejný fenotyp onemocnění měl i náš pacient. Pacient byl také nositelem zdánlivě irelevantní VUS p.Arg950Trp v genu *INF2* (kandidátním genu pro autozomálně dominantní formu NS, ale tato varianta byla mimo obvykle postiženou oblast genu) a dvou dalších VUS v genu *COL4A3*; z těchto VUS byla c.346C>A dříve spojována s Alportovým syndromem (Morinière et al., 2014). U našeho pacienta začal nefrotický syndrom v 5 letech života. Histologický nálezn v renální biopsii prokázal FSGS. Jeho psychomotorický vývoj byl opožděný. Byl vyšetřen pro suspektní myopatii, definitivní diagnóza ale v tomto smyslu nakonec nebyla stanovena. Jeho sluch byl v normě. Byl léčen CyA, MMF a cyklofosfamidem, léčba byla bez efektu na průběh NS. Progrese renálního postižení byla pozvolná, ESKD dosáhl až v 18 letech života.

4.2 Výsledky aHUS

4.2.1 Charakteristika pacientů

V průběhu námi sledovaného období jsme identifikovali 21 dětí (13 chlapců a 8 dívek) z 19 rodin s diagnózou aHUS. Ve 2 rodinách byla dvojce postižených sourozenců. Celková incidence aHUS v české pediatrické populaci ve sledovaném období byla stanovena na 0,092 případů na 1 milion obyvatel a 0,92 případů na 100 000 živě narozených dětí.

Nikdo z pacientů nepocházel z konsanguinní rodiny. Věk začátku onemocnění se pohyboval mezi 3 týdny a 16,3 roky věku. Průměrný věk začátku onemocnění byl 5,8 let. U 3 pacientů (2073b, 2060b a 2098) se aHUS manifestoval před prvním rokem života. Průměrná doba sledování pacientů s aHUS byla 6,6 let. Extrarenální komplikace se objevily u 16 (76 % pacientů) (tabulka 4). Snížená hladina C3 složky komplementu v séru byla zjištěna u 15 (71 %) pacientů. Tři pacienti (14 %) měli normální počet trombocytů na začátku onemocnění. Všichni pacienti měli na začátku onemocnění proteinurii a hematurii, s výjimkou jednoho anurického pacienta a jednoho dítěte, u kterého nebyla moč testovaná (tabulka 8).

Tabulka 8 Laboratorní nálezy v době diagnózy aHUS

ID pacienta	S-kreatinin (μmol/l)	GFR (ml/min/1,73m ²)	Trombocyty (10 ⁹ /l)	Hemoglobin (g/l)	Schistocyty (%)	Laktátdehydrogenáza (μkat/l)	C3 v séru (g/l)	Proteinurie	Hematurie	Hypertenze
2063	151	47	75	64	32	43	1,2	Ano	Ano	Ne
2066	93	44	19	62	58	34	0,79	Ano	Ano	Ne
2060b	204	10	234	47	5	7	0,65	Ano	Ano	Ano
2062	97	42	15	52	4	110	0,64	Ano	Ano	Ano
2061	121	38	59	51	85	9	1,06	Netestováno	Netestováno	Netestováno
2064	227	20	26	68	76	12	0,55	Ano	Ano	Ano
2067	63	62	30	85	11	7	1,0	Ano	Ano	Ano
2060a	212	36	208	71	10	11	1,2	Ano	Ano	Ano
2046	220	20	40	91	44	36	0,59	Ano	Ano	Ano
2068	250	18	82	80	12	21	0,56	Ano	Ano	Ano
2069	187	27	21	114	20	50	0,59	Ano	Ano	Ano
2070	80	49	18	88	28	54	1,03	Ano	Ano	Ne
2099	108	41	15	100	30	80	0,63	Ano	Ano	Ne
2072	160	39	52	97	8	9	0,74	Ano	Ano	Ano
2078	88	53	27	79	46	34	1,03	Ano	Ano	Ano
2073a	104	39	342	82	40	15	0,81	Ano	Ano	Ano
2098	195	9	57	72	6	27	0,43	Anurie	Anurie	Ano
2074	438	11	111	77	28	34	0,44	Ano	Ano	Ano
2075	205	19	68	63	28	41	0,37	Ano	Ano	Ne
2111	59	70	131	72	59	14	0,61	Ano	Ano	Ne
2073b	53	46	33	71	59	30	0,72	Ano	Ano	Ne

Shrnutí patologický výsledků:

Zhoršení renálních funkcí 100%

Trombocytopenie 86%

Anémie 100%

Zvýšené schistocyty 100%

Zvýšená laktátdehydrogenáza 100%

Snížené C3 76%

Proteinurie: všichni pacienti s výjimkou 1 s anurií a, 1 u kterého se neprovedl test

Hematurie: všichni pacienti s výjimkou 1 s anurií a, 1 u kterého se neprovedl test

Hypertenze 62%

S-kreatinin sérový kreatinin

4.2.2 Genetické nálezy

Všechny genetické nálezy včetně průkazu přítomnosti protilátek proti faktoru H, jsou detailně shrnuty v tabulce 4. Protilátky proti faktoru H jsme našli pouze u pacientů, kteří měli zároveň prokázanou delecí v genech *CFHRI* a *CFHR3*. Metoda NGS nám pomohla odhalit 11 vzácných variant v šesti různých genech. Z tohoto počtu byly 2 varianty patogenní, 5 pravděpodobně patogenních a 4 varianty nejasného významu (VUS). 5 vzácných variant bylo nových. Nejčastěji byly mutace nalezeny v genech *CFH* a *MCP*, zároveň se jednalo o jediné geny s kombinovanými mutacemi nebo dvojitou mutací u jednoho pacienta.

4.2.3 Léčba a sledování pacientů

Deset pacientů (48 %) bylo léčeno plazmaferézou (PF), čtyři (19%) kombinací PF (7-10 výkonů během 2 týdnů) s následným podáním eculizumabu. Tři pacienti (14 %) potřebovali také symptomatickou léčbu (antihypertenziva, diuretika a dialýzu). Sedmnáct pacientů (81 %) dosáhlo remise. Z tohoto počtu bylo sedm léčeno PF následovanou podáním eculizumabu, u dalších sedmi byla použita pouze PF a tři děti byly léčené pouze symptomaticky.

Celkem 18 pacientů bylo léčeno eculizumabem, včetně těch, u kterých byla na počátku onemocnění zahájena PF. Ze všech pacientů léčeným eculizumabem mělo šest z nich (75 %) mírný průběh onemocnění a normální renální funkci během poslední kontroly. Jeden pacient (2072) měl na poslední kontrole nižší GFR odpovídající CKD2 a jeden (2098) byl od začátku onemocnění až do transplantace léčen chronickou peritoneální dialýzou.

Pět pacientů (24 %) ze skupiny, která nebyla léčena eculizumabem, mělo alespoň 1 relaps aHUS. Čtyři pacienti (19 %) progredovali do ESKD. Pacienti číslo 2068, 2063 a 2098 podstoupili transplantaci ledviny. U pacienta 2068 se objevila rekurence aHUS po transplantaci. Jako záchranná léčba u něj byl podán eculizumab s příznivým efektem. Osm (38 %) pacientů dospělo do CKD2 (1 z nich byl léčen eculizumabem). Pacient 2060b zemřel při relapsu aHUS na sepsi s multiorgánovým selháním. Ostatní pacienti (57 %) měli normální funkci ledvin (tabulka 4).

5 DISKUSE

5.1 Diskuse SRNS

V naší studii jsme využili kombinovaný dvoustupňový diagnostický přístup, abychom maximalizovali diagnostickou výtěžnost a zefektivnění procesu, což vedlo k včasné genetické diagnostice SRNS. V první fázi se nám pomocí rychlého a méně nákladného Sangerova sekvenování podařilo diagnostikovat 26 % pacientů. Druhá fáze testování 48 kandidátních genů pomocí NGS umožnila diagnostiku dalších 12% pacientů, což vedlo k celkové diagnostické výtěžnosti kombinovaného přístupu 38 % (28/74). Celková diagnostická výtěžnost je obecně v souladu s předchozími publikovanými studiemi (14-64 %) (Sadowski et al., 2015, Hinkes et al., 2007, McIntosh et al., 1998). V následujícím textu se budeme zabývat případy genetického SRNS (tj. nesoucí patogenní a/nebo pravděpodobně patogenní varianty v genotypech odpovídajících očekávanému způsobu dědičnosti).

5.1.1 Vysoký podíl pacientů s kauzální variantou v genu *NUP93*

Čtyři pacienti byli složení heterozygoti nebo homozygoti pro kauzální varianty v genu *NUP93* (podrobná klinická charakteristika je uvedena v tabulce 7). *NUP93* je nový kauzální gen pro autozomálně recesivní formu SRNS a jeho role byla poprvé prokázána v šesti rodinách srbského, německého a tureckého původu (Braun et al., 2016). Autoři přesvědčivě prokázali zcela novou cestu k poškození podocytů. Patogenní varianty v genu *NUP93* poškozuji kostní morfogenetický protein 7 (BMP7) závislý SMAD signalizaci. Narušení této signalizace může následně vést k fibróze a zánětu ledvin (Meng et al., 2012).

Se čtyřmi nepříbuznými případy zjištěnými v naší studii je tento gen třetí nejčastější příčinou genetické formy SRNS v naší populaci po genech *NPHS2* a *WT1*. Braun a kolektiv identifikovali kauzální varianty v genu *NUP93* ve třech ze 160 rodin v jejich souboru SRNS pacientů a pouze ve třech dalších rodinách z 1800 v celosvětové studijní kohortě (Braun et al., 2016). Dalšího pacienta se SRNS způsobeným genem *NUP93* publikovala Bierzynska a kolektiv (Bierzynska et al., 2017). Mutace genu *NUP93* tak představovaly jednu z hlavních příčin geneticky podmíněného SRNS v naší československé kohortě. Domníváme se, že by se analýza *NUP93* genu měla stát součástí standardního genetického vyšetření u pacientů se SRNS.

Jasně patogenní evropská zakladatelská varianta v genu *NUP93* c.1772G>T (p.Gly591Val) (Braun et al., 2016) byla přítomna u všech našich 4 pacientů. Další patogenní variantou pravděpodobně acestrálního původu je substituce c.1537+1G>A (rodina 2002), kterou poprvé publikovali Braun a kolektiv v německé rodině (Braun et al., 2016). Tato varianta byla nalezena i v naší populaci, která je geneticky příbuzná s populací německou. Za zmínku stojí, že další dva pacienti nesli jednu heterozygotní kauzální variantu genu *NUP93*, c.1162C>T (p.Arg388Trp) a c.1772G >T (p.Gly591Val) bez indikace jiné kauzální varianty, po pečlivé kontrole 50 bází lemuujících introny a bez nepřímých indikací strukturních aberací v genu na základě testování pomocí NGS.

Klinický průběh onemocnění ledvin (tabulka 7) byl podobně závažný jako u sedmi pacientů popsanych Braunem. I u těchto pacientů se SRNS projevil časně, věk začátku onemocnění byl mezi 1,8 až 7 lety života. V naší studii tři ze čtyř pacientů velmi rychle progredovali do ESKD. Doba dosažení ESKD byla 0,3-1,2 roku, věk pacientů byl 2,9-3,3 roku. V Braunově studii pět ze sedmi dětí progredovalo do ESKD ve věku 1-11 let (Braun et al., 2016).

Tři děti se SRNS asociovaným s genem *NUP93* podstoupili transplantaci ledviny. Zajímavé je, že u pacienta z rodiny číslo 1996 došlo 20 měsíců po transplantaci ledviny k rekurenci SRNS. Jedná se o jev u genetické formy SRNS velmi neobvyklý. Je pravděpodobné, že mechanismus poškození ledvin způsobený genem *NUP93* (pravděpodobně nedostatečnou ochranou před zánětem) se liší od strukturálních defektů způsobených patogenními variantami mnoha jiných genů souvisejících se SRNS. Klinický průběh onemocnění nebo dříve zmíněná odpověď na léčbu CyA mohou být také odlišné.

5.1.2 Kauzální varianty v genech *NPHS2* a *WT1*

Podíl pacientů s kauzálními variantami v genech *NPHS2* a *WT1* (15 a 12 %) je v souladu s jinými studiemi v evropských populacích, (například Santín et al., 2011, Büscher et al., 2010, Bińczak-Kuleta et al., 2014). Pozoruhodné je, že věk manifestace onemocnění pacientů v naší studii byl nižší než ve většině ostatních kohortových studiích (Santín et al., 2011, Büscher et al., 2010, Bińczak-Kuleta et al., 2014). Šest z jedenácti pacientů se manifestovalo již během prvního roku života. Důvodem této diskrepance by mohly být národnostní rozdíly nebo dřívější odhalení obvykle asymptomatické proteinurie u malých dětí, díky vynikající

pediatrické preventivní zdravotní péči v našich zemích (tj. devět preventivních prohlídek u praktického lékaře pro děti a dorost během prvního roku života).

Neevropské populace poskytly podstatně odlišné zastoupení kauzálních genů. Některé rozdíly lze přičíst odlišnému genetickému pozadí populací, jako je například nepřítomnost kauzálních genů *NPHS2* nebo *WT1* v některých neevropských studiích (Wang et al., 2017, Siji et al., 2017). Dalším důležitým zdrojem rozdílů mezi populacemi je také míra konsanguinity, která zvyšuje výskyt homozygotních kauzálních variant v autozomálně recesivních genech asociovaných se SRNS (Sadowski et al., 2015, Al-Hamed et al., 2013, Mbarek et al., 2011). V naší studii byla konsanguinita výjimkou, vyskytla se pouze v jedné rodině (č. 2182).

5.1.3 Modifikační účinek rs61747728, funkčního polymorfismu genu *NPHS2*

V rámci genetického vyšetření byla nalezena zajímavá heterozygotní kombinace pravděpodobně patogenní varianty v exonu 8 genu *NPHS2* c. 952G>A, p.Ala318Thr a funkčního polymorfismu rs61747728 c.686G>A, p.Arg229Gln (rodina číslo 1988, tabulka 3). Tento polymorfismus byl spojen s mírnou patogenitou, a to pouze v případě, že je přenášen *in trans* spolu s patogenní variantou umístěnou konkrétně v exonu 7 nebo 8 genu *NPHS2* (Tory et al., 2014). V tomto specifickém hotspotu se vyskytuje p.Ala318Thr. Podle metodiky Tory a kolektivu (Tory et al., 2014) jsme p.Ala318Thr hodnotili jako pravděpodobnou patogenní variantu, nikoli jako VUS. Mírný aditivní účinek těchto dvou variant je v souladu s klinickým průběhem našeho pacienta, jehož poškození ledvin progredovalo pomalu (po 12,6 letech sledování byl ve stadiu CKD4, v renální biopsii byl nález FSGS).

5.1.4 Nízký etiologický podíl genu *NPHS1*

Pouze u jednoho pacienta (1,4 %) byly nalezeny kauzální varianty v genu *NPHS1* (rodina 1755). U europidů to není výjimečné. Ačkoli mutace v tomto genu rozhodně nejsou omezeny na NS finského typu s vysokým výskytem ve Finsku (1:8000) (Jalanko et al., 2009), etiologická frakce *NPHS1* se mezi jednotlivými studiemi značně liší, což je způsobeno jak kritérii pro sběr pacientů, tak rozdíly v genetickém pozadí populací (Sadowski et al., 2015, Trautmann et al., 2015, Heeringa et al., 2008, Tan et al., 2017). Naše pacientka se

manifestovala kongenitálním nefrotickým syndromem, s progresí do ESKD. U pacientky byla zjištěna mutace typu fin-minor, po transplantaci u ní nedošlo k rekurenci NS ve štěpu.

5.1.5 Kauzální varianta v genu *INF2*

U dvou členů rodiny číslo 1963 byla nalezena dříve popsaná patogenní varianta c.653G>A (p.Arg218Gln) v genu *INF2*. Jednalo se o probanda s náhodným nálezem nefrotické proteinurie ve věku 14 let a jeho matky s anamnézou FSGS (Brown et al., 2010). Funkce ledvin probanda byla normální, ale pozdější biopsie ledvin odhalila FSGS. Gen *INF2* kóduje invertovaný formin 2, protein podílející se na syntéze i depolymerizaci aktinových filament. Varianty genu *INF2* jsou nejčastější autozomálně dominantní příčinou FSGS (OMIM #613237). Ačkoli varianty jinde v genu *INF2* mohou způsobovat také neuropatii Charcot-Marie-Tooth (CMT) s FSGS (OMIM #614455) (Boyer et al., 2011), tato mutace nebyla v literatuře spojována s CMT a ani jeden z nositelů mutace v rodině neměl neurologický fenotyp.

5.1.6 Kauzální varianta v genu *COQ2*

Dva sourozenci s NS se začátkem v dětském věku (číslo rodiny 2184) byli homozygotní pro kauzální variantu c.683A>G (p.Asn228Ser) v genu *COQ2*, která byla již dříve publikována. Gen *COQ2* kóduje protein podílející se na biosyntéze koenzymu Q10 a změny v tomto genu mohou vést k nedostatku koenzymu Q10 (McCarthy et al., 2013). U mladší sestry byla včas stanovena genetická diagnóza a bylo u ní možné zahájit kauzální terapii koenzymem Q10. Na rozdíl od její sestry (v době diagnózy již ve stádiu ESKD) se podařilo zlepšit funkci ledvin a udržení parciální remise. V tomto případě genetická diagnóza umožnila rychlé zahájení substituční léčby koenzymem Q10, u které se předpokládá, že by mohla potenciálně zlepšit onemocnění ledvin (Diomedì-Camassei et al., 2007).

5.1.7 Kauzální varianta v genu *DGKE*

U pacienta číslo 2081 byla nalezena kauzální homozygotní patogenní varianta c.966G>A (p.Trp322Term) v genu *DGKE*. Jedná se o pacienta z konsanguinní rodiny s NS dětského věku. Gen *DGKE* kóduje diacylglycerol kinázu epsilon, intracelulární regulátor protrombotických faktorů. Poprvé byla popsána souvislost mutací *DGKE* a NS s

histologickými známkami membranoproliferativní glomerulonefritidy Ozaltinem (Ozaltin et al., 2013). Na rozdíl od čtyř pacientů popsaných Ozaltinem byla u našeho pacienta při biopsii ledviny zjištěna FSGS, stejně jako u pacienta popsaného Bierzynskou a kolektivem (Bierzynska et al., 2017), který byl složeným heterozygotem pro dvě terminační varianty, p.Trp322Term a p.Arg435Term. Zajímavé je, že p.Trp322Term byl původně identifikován u pacientů s atypickým hemolyticko-uremickým syndromem bez abnormální aktivace komplementového systému (Lemaire et al., 2013).

5.1.8 Kauzální varianta v genu *LMX1B* a možný podíl VUS v jiných genech asociovaných se SRNS

Gen *LMX1B* kóduje transkripční faktor pro časný embryonálního vývoj končetin, očí a ledvin. Proband s číslem rodiny 2231 nesl kauzální variantu p.Arg223Gln, která byla publikována v souvislosti s autozomálně dominantním nail-pattela syndromem (McIntosh et al., 1998). Tento nález je v souladu s klinickými příznaky u pacienta – patelární dysplazií a omezenou extenzí loktů (tabulka 3). Náš pacient dosáhl ESKD příliš brzy na to, aby mohl mít typický průběh SRNS způsobený *LMX1B*. Předpokládáme proto, že tento závažný renální fenotyp byl urychlen přispěním dvou dalších variant nalezených v genech *INF2* a *COL4A3* (Moriere et al., 2014). VUS v posledně jmenovaném genu může být obzvláště důležitá, podobné pozorování provedli Bullich a kolektiv u dvou familiárních případů SRNS. Dle autorů by mohla varianta v genu *COL4A3* zhoršovat průběh onemocnění SRNS způsobený mutací v jiném genu (Bullich et al., 2015).

5.1.9 Odpověď na terapii cyklosporinem A

Ačkoli imunosupresivní léčba u NS na podkladě genetické etiologie je v současné době kontroverzní a není všeobecně doporučována, několik našich pacientů bylo imunosupresivní terapií léčeno ještě před obdržení výsledků genetického testování. Odpověď na léčbu CyA jsme zaznamenali u 2 pacientů s geneticky podmíněným SRNS (12 % léčených pacientů s genetickou formou SRNS). Jednalo se o pacienta s číslem 2051 s kauzální variantou v genu *NUP93* a pacienta číslo 1973 s kauzální variantou v genu *NPHS2*. Ačkoli analýza série případů, která zahrnovala genetickou formu SRNS, naznačila účinnost CyA (Klaassen et al., 2015), jiná nedávná studie ukázala, že terapeutický účinek CyA u dědičné formy SRNS není častý, pouze 17 % léčených pacientů dosáhlo parciální nebo úplné remise (Büscher et al.,

2015). Navíc dosažení remise nesnížilo pravděpodobnost progresu do ESKD během následného sledování. Četnost dosažení remise byla v naší kohortě obdobná. Na základě aktuálních znalostí lze tedy u pacientů s genetickou formou SRNS tedy terapii CyA zvážit; v současné době nicméně neexistuje žádná prospektivní intervenční studie, která by určila, zda léčba CyA oddálí progresi CKD do ESKD.

Pokud jde o mechanismus účinku CyA, antiproteinurické účinky byly přisuzovány stabilizaci aktinového cytoskeletu v podocytech prostřednictvím blokování kalcineurinem zprostředkované defosforylace synaptopodinu (Faul et al., 2008). Tento potenciální mechanismus je možný u genů kódujících cytoskeletální proteiny, ale příčina námi pozorované odpovědi na léčbu CyA u pacientů se SRNS na podkladě *NUP93* nebo *NPHS2* zůstává nejasná.

5.1.10 Síla studie a její limitace

Síla naší studie spočívá ve dvoustupňovém testování se systematickým využíváním rychlého a levného Sangerova sekvenování pro tři nejčastější geny asociované je SRNS (*NPHS2*, *NPHS1* a *WT1*). Náš přístup nabízí diagnózu ve čtvrtině případů do 2 pracovních dnů za pouhý zlomek nákladů v porovnání testováním NGS. Testování NGS je metodou volby pouze v případě negativních výsledků v prvním fázi testování. Získání konečných výsledků z testování druhé fáze trvá podstatně déle, protože NGS panel vyžaduje současnou analýzu relativně velkého množství vzorků, aby byly náklady za cenu efektivní. Zjednodušená analýza nákladů ukazuje, že použití Sangerova sekvenování jako první úrovně testování zůstává nákladově efektivní, a to dokud poměr mezi cenou Sangerova testování a cenou NGS nepřesáhne podíl pacientů diagnostikovaných v první (Sangerově) úrovni. Vzhledem k současným cenám materiálu a mzdovým nákladům je stupňovitá strategie stále nepatrně levnější než přímé použití NGS panelu.

Hlavním limitací studie je nedostatek údajů o genech mimo předem definovaný cílový panel. Ačkoli pouze několik nových známých genů SRNS zůstalo nevyšetřeno, nemohou naše výsledky pomoci při objevování dalších genů asociovaných se SRNS. Pro SRNS se v současné době používají dvě strategie testování pomocí NGS. Jedna využívá předem definovaný panel genů, což je rychlejší a podstatně méně nákladná možnost (Sadowski et al., 2015, Wang et al., 2017, McCarthy et al., 2013). Důležitým aspektem z klinického

hlediska je však doba čekání na výsledky. Další nákladnější NGS strategií je celoexomové sekvenování. Celoexomové sekvenování bylo použito při systematickém hledání genetických příčin ve Velké Británii v Registru vzácných onemocnění ledvin (Bierzynska et al., 2017), v menší japonské kohortě (Ogino et al., 2016) nebo pro účely identifikace nových kauzálních genů v jednotlivých rodinách nebo menších skupinách pacientů (Ebarasi et al., 2015, Ashraf et al., 2013, Gee et al., 2013, Sanna-Cherchi et al., 2011). Vzhledem ke snižujícím se nákladům exomového sekvenování je však zřejmé, že bude postupně nahrazovat genové panely. Předdefinované genové panely jsou však v současné důležité možnosti pro studium archivních vzorků, u nichž není doba na čekání na výsledky klíčová.

Tato studie byla podpořena Ministerstvem zdravotnictví České republiky pod grantem číslo 15-31586A.

5.2 Diskuze aHUS

Stanovili jsme incidenci aHUS v české populaci. Na základě výsledků naší studie můžeme konstatovat, že incidence tohoto onemocnění činí 0,092 (CI 0,053-0,131) případů na milion obyvatel a 0,92 (CI 0,53-1,32) případů na 100 000 živě narozených dětí za celé období studie. Naše zjištění odpovídají publikované incidenci dětských pacientů s aHUS v Evropě, která je 0,11 případů na milion obyvatel (Johnson et al., 2014). Malá norská studie však uvádí incidenci významně nižší (Jenssen et al., 2014). Všichni dětské pacienti s aHUS byli sledováni v našem centru, jakožto jediném terciárním dětském nefrologickém centru v České republice.

5.2.1 Klinický stav pacientů

Tři pacienti (14 %) měli v době stanovení diagnózy aHUS normální počet trombocytů. Jedná se o pacienty číslo 2060a, 2060b a 2073a. Tito pacienti nesplňovali počtem trombocytů zcela kritéria pro toto onemocnění. Dva z nich nesli patogenní varianty v genu *DGKE* (rodina 2060) a jeden nesl dvě pravděpodobně patogenní varianty v genu *CFH* (rodina 2073a). Také ve studii Selliera-Leclerc byl u patnácti procent pacientů s aHUS počet trombocytů v normě (Sellier-Leclerc et al., 2007).

Na rozdíl od jiných studií, kde nízká sérová hodnota C3 komplementu byla zjištěna u malého množství pacientů (35,9-49 %) (Geernink et al., 2012, Noris et al., 2010), jsme v našem souboru zjistili nízkou hladinu C3 komplementu v séru významně častěji (71 %). Snížená sérová hladina C3 byla identifikována u 69 % pacientů s protilátkami proti faktoru H. Tato četnost je srovnatelná s četností publikované Dragon-Durey a kolektivem (58 %) (Dragon-Durey et al., 2010). Nižší hladina C3 nebyla spojena se závažnějším průběhem onemocnění našich pacientů.

5.2.2 Genetická predispozice k aHUS

Jasnou genetickou predispozici k aHUS se podařilo identifikovat u 9 našich 21 pacientů. U dalších 9 pacientů byla zjištěna kombinace přítomnosti protilátek proti faktoru H a homozygotní delece genů *CFHR1/CFHR3*. U jednoho pacienta byl nalezen hybridní patogenní gen *CFH/CFHR1* a zbývající 2 měli variantu nejasného významu (tabulka 4). Celkem 13 pacientů (62 %) mělo vysoký titr protilátek proti faktoru H zjištěný na začátku onemocnění aHUS spolu s delecí v genech *CFHR1/CFHR3*. Tři z nich měli také patogenní nebo pravděpodobně patogenní variantu v jednom nebo dvou genech pro faktory komplementu. Jiné studie však prokázaly přítomnost protilátek proti faktoru H u významně nižšího počtu pacientů s aHUS (6-25 %) (Moore et al., 2010, Dragon-Durey et al., 2005). Obdobně vysoký počet pacientů s pozitivitou protilátek proti faktoru H byl zjištěn pouze v indické populační studii, kde byla identifikována pozitivita protilátek proti faktoru H u 56 % pacientů s aHUS (Sinha et al., 2014). Počet pacientů, kteří nesli rizikové varianty pro rozvoj aHUS v naší studii (42%), byl v souladu s dříve publikovanými studiemi, kde se jejich počet pohybuje mezi 40 a ? % (Loirat et al., 2016, Geerdink et al., 2012, Noris et al., 2010, Bresin et al., 2013).

Nejčastěji mutovanými geny byly *CFH* (30 %) a *MCP* (23 %). Varianty v genu *CFH* byly nalezeny u 11-30 % pacientů s aHUS i v jiných populacích (Geerdink et al., 2012, Noris et al., 2010, Bresin et al., 2013, Caprioli et al., 2006) a varianty v genu *MCP* u 4-15 % pacientů, což je o něco méně ve srovnání s nálezy v naší studii (Noris et al., 2010, Bresin et al., 2013, Sellier-Leclerc et al., 2007). Na rozdíl od jiných populací, kde se vzácné varianty v genu *CFI* obvykle vyskytují jako třetí nejčastější genetická příčina (Geerdink et al., 2012, Noris et al., 2010, Bresin et al., 2013, Caprioli et al., 2006), jsme v naší kohortě našli pouze jednoho pacienta s VUS genu *CFI* (pacient číslo 2078).

V našem souboru jsme neidentifikovali žádné pacienty s kombinací mutace v jiných genech bez současného nálezu mutace genu *CFH*. V roce 2013 Bresin a kolektiv publikovali zjištění, že několik variant genů *MCP* a *CFI* bylo nalezeno pouze v kombinaci s další variantou v jiném genu komplementu, nejspíše kvůli možnému nižšímu patogennímu potenciálu těchto variant genů *MCP* a *CFI* pro rozvoj aHUS (Bresin et al., 2013). Identifikovali jsme tři pacienty (2066, 2070 a 2099) s mutací pouze v genu *MCP*. Jednalo se o pravděpodobně patogenní varianty p.Gly135Asp a p.Trp276Ter. Pacient 2078 nesl jednu VUS v genu *CFI* (p.Ile569Leu). Na rozdíl od nositelů variant v genu *MCP*, měl pacient 2078 také homozygotní delecii v genech *CFHR1/CFHR3* spolu s pozitivitou protilátek proti faktoru H. Tato delece a pozitivita protilátek proti faktoru H by mohla být druhou genetickou predispozicí k rozvoji aHUS vedle nalezené neznámé mutace v genu *CFI*. Předpokládáme, že některé vzácné varianty v genu *MCP* představují pravděpodobně významnou genetickou predispozici pro manifestaci aHUS. Průběh onemocnění u pacientů se vzácnými variantami *MCP* byl mírnější ve srovnání s ostatními pacienty v naší kohortě.

Nedostatek identifikovatelných genetických variant u ostatních pacientů bez nalezeného genetického podkladu neznamena, že nemají genetické varianty, interagující s regulací alternativní cesty komplementu. Současné sekvenační návrhy mohou přehlédnout některé patogenní varianty, které ovlivňují regulaci genové transkripce.

5.2.3 Relaps aHUS a vliv plazmaferézy a léčby eculizumabem

V době před zavedením léčby eculizumabem se jako iniciální léčba aHUS používala plazmaferéza (PF). Poté, co se tato antikomplementová léčba stala dostupnou, se významně zlepšila prognóza pacientů s aHUS. I naše studie potvrzuje, že výsledky pacientů léčených eculizumabem časně po manifestaci onemocnění, jsou významně příznivější než u těch, kteří byli léčeni pouze PF.

Sedm z osmi pacientů léčených eculizumabem (88 %) na začátku onemocnění nemělo relaps, neprogredovalo do ESKD a žádný z nich nezemřel. Ve srovnání s tím pouze 62 % pacientů léčených na počátku pomocí PF nebo symptomatickou léčbou nemělo výše popsané komplikace. Toto zjištění ukazuje na výbornou efektivitu léčby eculizumabem, který je od roku 2016 doporučován jako léčba první linie u dětských pacientů s aHUS. Nevýhodou této

léčby je její vysoká cena a omezená dostupnost v některých zemích. Další nevýhodou je také riziko život ohrožující invazivní meningokokové infekce po léčbě eculizumabem. Proto pacienti léčení eculizumabem užívají antibiotickou profylaxi a dostávají očkování v prevenci meningokokové infekce.

Před zahájením používání eculizumabu v léčbě bylo vysoké riziko rekurence aHUS po transplantaci ledviny, a to v závislosti na typu kauzálních variant v genech pro komplementu. Například riziko u pacientů s mutací v genu *CFH* bylo téměř 90 %. Na druhou stranu pravděpodobnost rekurence u pacientů s variantou v genu *MCP* byla mnohem nižší. Eculizumab je také úspěšně používán u dětí při transplantaci ledviny jako prevence rizika rekurence aHUS nebo k léčbě probíhající rekurence (Noris et al., 2010, Sellier-Seclerc et al., 2007, Grenda et al., 2017). U pacienta číslo 2068 s nálezem vzácného hybridního genu *CFH/CFHR1* došlo po transplantaci rozvoji rekurence aHUS. Byla u něj včas zahájena léčba eculizumabem, což vedlo k dlouhotrvající remisi (Vondrák, Seeman, 2018).

5.2.4 Spojení protilátek proti faktoru H a delece *CFHR1/CFHR3*

U 14 pacientů (včetně těch bez dalších variant) byla zjištěna heterozygotní (pouze u pacienta 2061) nebo homozygotní delece genů *CFHR1/CFHR3*. V roce 2007 popsali Zipfel a kolektiv, že absence heterozygotního nebo homozygotního genu *CFHR1* a/nebo *CFHR3* zvyšuje riziko dysregulace aktivace komplementu (Zipfel et al., 2007). Zdá se nicméně, že tyto delece mohou být rizikovým faktorem pouze ve spojení s protilátkami proti faktoru H nebo variantami v genu *CFI*. Homozygotní delece se vyskytuje také u 2-5,7% běžné populace (Dragon-Durey et al., 2009). Protilátky proti faktoru H byly nalezeny u 13 ze 14 pacientů s touto delecí (62 % z celé kohorty). Tento nález podtrhuje silnou korelaci těchto delecí (zejména homozygotní delece v genu *CFHR1*) se vznikem protilátek proti faktoru H. V roce 2010 Moore a kolektiv popsali, že u pouze 4,7 % pacientů s homozygotní delecí genů *CFHR1/CFHR3* nebyly nalezeny protilátky proti faktoru H, a že pouze několik pacientů bez prokázané delece mělo protilátky pozitivní (Moore et al., 2010). Toto zjištění jsme potvrdili i v naší studii, kdy pouze pacient číslo 2098 měl homozygotní deleci v genech *CFHR1/CFHR3* bez detekce protilátek proti faktoru H. Tento pacient měl ale zároveň nález VUS v genu *CFB*, což může být další rizikový faktor rozvoje aHUS. V naší kohortě jsme nenalezli žádného pacienta s pozitivními protilátkami proti faktoru H, který by zároveň neměl deleci v genech *CFHR1/CFHR3*. Souhrnně řečeno, naše studie zdůrazňuje silnou

asociaci homozygotní delece *CFHR1/CFHR3* s protilátkami proti faktoru H, kterou jsme našli u 12 ze 13 pacientů (92 %), kteří byli nositeli homozygotní delece (tabulka 5).

5.2.5 Deficit *DGKE*

Dva sourozenci (rodina 2060, podrobné klinické údaje jsou uvedeny v tabulce číslo 9) byli složeni heterozygoti pro c.966G>A a c.171delG (nová varianta) v genu *DGKE*. Varianta c.966G>A (p.Trp322Ter) byla již dříve popsána ve spojení s aHUS Lemairem a kolektivem (Lemaire et al., 2013). Autoři předpokládali, že recesivní varianty v genu *DGKE* mohou být silně asociovány se vznikem aHUS nezávislým na aktivaci alternativní cesty komplementu. Tyto varianty nejčastěji způsobují vznik aHUS v prvním roce života, s vysokým rizikem relapsu před dosažením 5 let věku (Lemaire et al., 2013). Mechanismus, kterým aHUS na podkladě mutace v genu *DGKE* začíná, může být založen na vzniku protrombotického stavu organismu, bez dysregulace alternativní cesty komplementu. Tímto mechanismem může dojít ke vzniku aHUS ale i dalších nefropatií (Ozaltin et al., 2013, Lemaire et al., 2013, Bezdička et al., 2018).

Jeden z našich pacientů se manifestoval s aHUS až ve věku 14 měsíců (pacient 2060a), na rozdíl od obvykle dřívejší manifestace aHUS asociovaného s mutací v genu *DGKE*, které je obvykle pod 1 rok věku (Lemaire et al., 2013). Hladina C3 složky komplementu bývá v publikovaných studiích variabilní (Lemaire et al., 2013, Westland et al., 2014). U našich 2 sourozenců byla hladina C3 při manifestaci odlišná. Pacientka 2060a měl normální sérovou hladinu C3 a její sestra 2060b měla sníženou sérovou hladinu C3, ale normální počet trombocytů (tabulka 9). Zaznamenali jsme pouze jeden relaps aHUS. Pacientka 2060b při něm náhle zemřela na následky sepse s multiorgánovým selháním, a to i navzdory imunosupresivní léčbě a terapií PF. Její sestra (2060a) měla těžký průběh onemocnění. Byla léčena PF s následnou symptomatickou terapií. Její renální funkce jsou nyní pouze mírně snížené a nedošlo u ní k žádnému relapsu. V souladu s jinými studiemi aHUS na podkladě *DGKE* měla i naše pacientka (2060a) perzistující proteinurii a hypertenzi (Lemaire et al., 2013).

Tabulka 9 Detailní klinická data pacientů s mutací v genu *DGKE*

Rodina, narození	Číslo pacienta	2060a	2060b
	Pohlaví	Ž	Ž
	Konsanguinita	Ne	Ne
	Gestační věk při narození (týdny)	40	41
Klinická data na počátku onemocnění	Věk	14 měsíců	4 měsíce
	Spouštěč	Ne	Ne
	Extrarenální komplikace	Ne	Ne
	GFR (ml/min/1,73m ²)	36	10
	Hemoglobin (g/l)	71	47
	Schistocyty (%)	10	5
	Trombocyty (10 ⁹ /l)	208	234
	Latkátdehydrogenáza	11	7
	C3 v séru (g/l)	1,2	0,65
	Proteinurie (protein-kreatininový index) (mg/mmol)	2000	2160
	Hematurie (erytrocyty/μl)	33	40
	Hypertenze	Ano	Ano
	Léčba	PLEX, S	PLEX, RTX, Prednison, CyA
Poslední kontrola	Datum	22.12.2017	11.7.2002
	Aktuální věk	13 let	8 měsíců
	Relaps (počet)	Ne	Ano (1)
	GFR (ml/min/1,73m ²)	56	8
	Stádium CKD	2	5
	Proteinurie	Intermitentní mírná	Ano
	Hematurie	Ne	Ano
	Hypertenze	Ano	Ano
	Léčba	AHT	ATB, S, AHT
	RRT	Ne	Ano (PD, HD)
	Transplantace	Ne	Ne
	Naživu v roce 2017	Ano	Ne
	Příčina úmrtí	-	Seps s multiorgánovým selháním
	Délka sledování	12,5 roku	5 měsíců

ATB antibiotika, *AHT* antihypertenzní terapie, *CyA* cyklosporin A, *GFR* glomerulární filtrace, *HD* hemodialýza, *PD* peritoneální dialýza, *PLEX* výměna plazmy, *RTX* rituximab, *S* symptomatická terapie, *Ž* žena

5.2.6 Síla studie a její limitace

Sílou naší studie je dlouhá doba sledování souboru českých dětských pacientů s aHUS v našem terciárním centru dětské nefrologie. Díky tomu jsme mohli na všech vzorcích studovat incidenci aHUS v České republice a analyzovat genetickou predispozici k aHUS celé naší dětské populace. Jedním z našich hlavních zjištění byl vysoký výskyt delecí v genech *CFHR1/CFHR3* spolu s pozitivitou protilátek proti faktoru H. Toto zjištění nelze zcela aplikovat, protože nemáme k dispozici prevalenci protilátek a delecí u naší populace. Omezením je také fakt, že aHUS patří mezi velmi vzácná onemocnění. Při malém počtu pacientů shromážděných v průběhu let nemůžeme statisticky významně porovnávat výsledky pacientů léčených eculizumabem a těch pacientů léčených pouze PF. Jedno z

omezení je navíc různá léčba v průběhu let, protože u některých našich pacientů se projevila aHUS ještě před dostupností eculizumabu.

6 ZÁVĚR

Naše studie přinesla cenné poznatky o SRNS u českých a slovenských dětí. Prokázali jsme vysoký podíl kauzálních variant v genech *NPHS2* a *WT1* a také neočekávaně častou příčinnou souvislost SRNS s omezeným výskytem pravděpodobně ancestrálních kauzálních variant v genu *NUP93*. Jedná se o gen, který byl nedávno identifikován jako součást nové patogenetické dráhy vedoucí k poškození ledvin. Tyto výsledky mohou pomoci při volbě strategie genetického testování naší populace a ovlivnit léčbu pacientů s genetickou formou SRNS. Doporučujeme prioritní testování genů *NPHS2*, *WT1* a *NUP93* pro identifikaci patogenních mutací ve střeoevropských populacích, které jsou si podobné. Genetické testování hraje klíčovou roli především pro určení vhodné terapie pacientů se SRNS. Potvrzení genetické diagnózy umožňuje ukončit kortikoterapii, která má četné nežádoucí účinky, a zároveň zvážit terapii cyklosporinem A, která u některých pacientů vedla k poklesu proteinurie a dosažení parciální remise onemocnění. Navíc u těchto dětí nedošlo k progresi do ESKD během doby našeho sledování. U pacientů s kauzálními variantami v genu *COQ2* lze zahájit kauzální terapii koenzymem Q10, která i na základě naší zkušenosti může při včasné nasazení přispět k dosažení remise onemocnění.

V rámci naší studie aHUS jsme stanovili incidenci tohoto onemocnění na 0,092 (CI 0,053-0,131) případů na milion obyvatel a 0,92 (CI 0,53-1,32) případů na 100 000 živě narozených dětí v české dětské populaci za celé sledované období. Efektivní kombinace metod MLPA, NGS a analýzy protilátek proti faktoru H odhalila genetickou a získanou predispozici k aHUS u většiny našich pacientů. Zjistili jsme velmi vysokou prevalenci positivity protilátek proti faktoru H (62 %) a delecí *CFHR1/CFHR3* u českých dětí, což pravděpodobně přispělo k vysoké míře zachytu v našem souboru. Naše zjištění rovněž potvrzují příznivý účinek léčby eculizumabem, která vedla k významnému klinickému a laboratornímu zlepšení, nižšímu výskytu extrarenálních komplikací aHUS, prevenci relapsů a udržení remise u 88 % léčených pacientů, ve srovnání s 62 % pacientů léčených PF nebo symptomatickou léčbou. Naše zjištění jsou v souladu se závěry publikovaných studií, které podporují předpoklad, že aHUS je polygenní a multifaktoriální onemocnění. Na základě současných znalostí nelze genetické varianty považovat za absolutně kauzální vzhledem k jejich variabilní penetranci, která může vyžadovat spouštěcí faktor pro rozvoj onemocnění. Naše studie přispívá k porozumění patogenezi, klinickému průběhu i léčebným strategiím u dětských pacientů s aHUS. Výsledky naší práce mohou pomoci lépe pochopit polygenní

povahu aHUS jako onemocnění, které vzniká výsledkem kombinace různých rizikových faktorů.

V současnosti se stále více dostává do popředí genetické testování pomocí celoexomového sekvenování jako vysoce efektivní metody pro cílené a přesné vyhledávání kauzálních variant genů u jednotlivých geneticky podmíněných onemocnění. Do budoucna lze očekávat, že se stane hlavní metodou genetického testování většiny geneticky podmíněných onemocnění, včetně SRNS a aHUS.

7 SOUHRN

7.1. SRNS

V této studii jsme analyzovali klinická data 74 pacientů (38 chlapců a 36 dívek) s kongenitálním (15 %), infantilním (14 %) a SRNS dětského věku (71 %). Tato data byla získána v České republice a na Slovensku v letech 2000-2017 (včetně). Vzorky DNA byly nejprve analyzovány pomocí Sangerova sekvenování (geny *NPHS2*, *NPHS1* a *WT1*) a následně pomocí sekvenování nové generace (NGS) s využitím cíleného panelu 48 genů asociovaných se SRNS. Rodinná segregace kauzálních variant byla potvrzena Sangerovým sekvenováním, pokud byly vzorky rodinných příslušníků dostupné. Genetická diagnóza byla stanovena u 28/74 pacientů (38 %) na základě nálezů patogenních nebo pravděpodobně patogenních kauzálních variant v genotypech odpovídajících očekávanému způsobu dědičnosti. Sangerovo sekvenování diagnostikovalo 26 % pacientů, zatímco testování v druhé fázi studie pomocí cíleného panelu NGS diagnostikovalo dalších 12 %. Nejčastějšími nalezenými kauzálními geny byly *NPHS2* (15 %), *WT1* (9,5 %) a překvapivě *NUP93* se čtyřmi (5,4 %) nepříbuznými případy. Mezi další kauzální geny patřily *COQ2* (dva pacienti), *NPHS1*, *INF2*, *DGKE* a *LMX1B* (po jednom pacientovi). Ve srovnání s přímým použitím NGS byla naše strategie víceúrovňového genetického testování podstatně rychlejší a zároveň méně nákladná. Naše studie prokázala vysoký podíl genů *NPHS2* a *WT1* jako etiologických faktorů a odhalila překvapivě vysokou četnost pravděpodobně kauzálních mutací v genu *NUP93* v omezeném souboru pacientů. Naše výsledky mohou pomoci k optimalizaci strategií testování u středoevropských populací. Na základě našich výsledků jsme mohli u pacientů s prokázanou monogenní formou SRNS ukončit neefektivní léčbu kortikosteroidy a u pacientky s prokázanou kauzální variantou v genu *COQ2* jsme zahájili účinnou kauzální terapii koenzymem Q10. Podařilo se nám také prokázat, že část pacientů s monogenní formou SRNS dosáhne remise na terapii cyklosporinem A. Naše studie potvrzuje, že přechodné podávání kalcineurinových inhibitorů může být přínosné i u monogenně podmíněného NS.

7.2. aHUS

Ve studii aHUS jsme se zaměřili na analýzu klinických dat a genetickou analýzu 21 českých dětí (13 chlapců a 8 dívek) s atypickým hemolyticko-uremickým syndromem. U většiny

našich pacientů byla zjištěna genetická nebo získaná predispozice k tomuto onemocnění: u 14/21 pacientů (67 %; 13 z nich bylo pozitivních na protilátky proti faktoru H) byly zjištěny delece *CFHR1* a *CFHR3*, u 13/21 (62 %) varianty v genech kódujících komplement nebo *DGKE*, u osmi pacientů (38 %) bylo identifikováno více genetických nálezů. Incidence atypického hemolyticko-uremického syndromu v české dětské populaci byla za celé sledované období odhadnuta na 0,092 (CI 0,053-0,131) případů na milion obyvatel a 0,92 (CI 0,53-1,32) případů na 100 000 živě narozených dětí. Deset pacientů bylo zpočátku léčeno plazmaferézou a osm pacientů eculizumabem nebo kombinací eculizumabu a plazmaferézy. Při poslední kontrole bylo naživu 20 pacientů a jeden pacient již dosáhl terminálního stadia selhání ledvin. Námi zjištěná incidence aHUS v české dětské populaci odpovídá uváděné incidenci v Evropě. U našich dětských pacientů jsme zjistili neobvykle vysoký výskyt delecí *CFHR1/CFHR3* spojených s protilátkami proti faktoru H. Léčba eculizumabem vedla k významně lepším výsledkům, prevenci relapsů onemocnění a snížení množství extrarenálních komplikací ve srovnání s léčbou plazmaferézou. Naše výsledky potvrzují polygenní povahu aHUS jako onemocnění, které je výsledkem kombinace různých rizikových faktorů.

8 SUMMARY

8.1 SRNS

In our study we analysed clinical data from 74 patients (38 boys) with congenital (15%), infant (14%), and childhood-onset (71%) SRNS collected from the Czech Republic and Slovakia from 2000 to 2017 (inclusive). The DNA samples were first analysed by Sanger sequencing (genes *NPHS2*, *NPHS1*, and *WT1*) and then by next generation sequencing (NGS) using a targeted panel of 48 genes previously associated with SRNS. Family segregation of the causative variants was confirmed by Sanger sequencing when possible. Genetic diagnosis was established in 28/74 patients (38%) based on findings of pathogenic or likely pathogenic causative variants in genotypes conforming to the expected mode of inheritance. Sanger sequencing diagnosed 26% of patients, whereas second-tier testing by a targeted NGS panel diagnosed a further 12%. Frequent causative genes were *NPHS2* (15%), *WT1* (9.5%), and surprisingly *NUP93* with four (5.4%) unrelated cases. Additional causative genes included *COQ2* (two patients), *NPHS1*, *INF2*, *DGKE*, and *LMX1B* (one patient each). Compared with outright use of NGS, our tiered genetic testing strategy was considerably more rapid and marginally less expensive. Apart from a high aetiological fraction of *NPHS2* and *WT1* genes, our study has identified an unexpectedly high frequency of a limited set of presumably ancestral causative mutations in *NUP93*. The results may aid in tailoring testing strategies in Central European populations. Furthermore, the results helped us with the treatment strategy in patients with proven monogenic form of SRNS, we could discontinue corticosteroids, in patients with proven causal variant in *COQ2* gene we could start causal therapy with coenzyme Q10. We were also able to show that some patients with monogenic form of SRNS achieve remission on cyclosporine A therapy. Our study confirms that the temporary administration of calcineurin inhibitors may be beneficial even in monogenic forms of nephrotic syndrome

8.2 aHUS

In our aHUS study we analysed clinical data and performed genetic analysis of 21 Czech children with atypical haemolytic uraemic syndrome (13 girls and 8 boys). Genetic or acquired predisposition to the disease was identified in the majority of our patients: *CFHR1* and *CFHR3* deletions in 14/21 (67%; 13 of them were positive for anti-complement factor

H antibodies), variants in complement genes or *DGKE* in 13/21 (62%). Multiple genetic findings were identified in eight patients (38%). The incidence of atypical haemolytic uraemic syndrome in the Czech paediatric population was estimated to be 0.092 (CI 0.053–0.131) cases per million inhabitants and 0.92 (CI 0.53–1.32) cases per 100,000 births for the entire reporting period. Ten patients were initially treated with plasma exchange and eight with eculizumab or with a combination of eculizumab and plasma exchange. At the last follow-up, 20 patients were alive and one patient had end-stage renal disease. The incidence of aHUS in the Czech paediatric population corresponds to the reported incidence in Europe. We detected the unusually high rate of *CFHRI/CFHR3* deletions associated with anti-complement factor H antibodies in Czech paediatric patients. Treatment by eculizumab led to superior outcomes, prevention of the disease relapses and lower incidence of extrarenal complications compared with plasma exchange therapy. Our results may help to understand the polygenic nature of atypical haemolytic uraemic syndrome as a disease that results from a combination of various risk factors.

9 LITERATURA

1. Ahn YH, Park EJ, Kanget HG et al. Genotype-phenotype analysis of pediatric patients with WT1 glomerulopathy. *Pediatr Nephrol* 2016; 32: 81-89
2. Al-Hamed MH, Al-Sabban E, Al-Mojalli H et al. A molecular genetic analysis of childhood nephrotic syndrome in a cohort of Saudi Arabian families. *J Hum Genet* 2013;58:480-9
3. Akcan-Arikan A, Zappitelli M, Loftis LL et al. Modified RIFLE criteria in critically ill children with acute kidney injury. *Kidney Int* 2007;71:1028-35
4. Andolino TP, Reid-Adam J. Nephrotic syndrome. *Pediatr Rev* 2015;36:117-25
5. Arif E, Solanki AK, Srivastava P et al. The motor protein Myo1c regulates transforming growth factor- β -signaling and fibrosis in podocytes. *Kidney Int* 2019;96:139-158
6. Ashraf S, Gee HY, Woerner S et al. ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *J Clin Invest* 2013;123:5179-89
7. Bensimhon AR, Williams AE, Gbadegesin RA. Treatment of steroid-resistant nephrotic syndrome in the genomic era. *Pediatr Nephrol* 2019;34:2279-2293
8. Bertaina A, Grimm PC, Weinberg K. Sequential stem cell-kidney transplantation in Schimke immuno-osseous dysplasia. *N Engl J Med* 2022;386:2295-2302
9. Bezdička M, Štolbová Š, Seeman T et al. Genetic diagnosis of steroid-resistant nephrotic syndrome in a longitudinal collection of Czech and Slovak patients: a high proportion of causative variants in NUP93. *Pediatr Nephrol* 2018;33:1347-1363
10. Bezdička M, Pavlíček P, Bláhová K et al. Various phenotypes of disease associated with mutated DGKE gene. *Eur J Med Genet* 2020;63:103953

11. Bierzynska A, McCarthy HJ, Soderquest K et al. Genomic and clinical profiling of a national nephrotic syndrome cohort advocates a precision medicine approach to disease management. *Kidney Int* 2017;91:937-947
12. Bierzynska A, Bull K, Miellet S et al. Exploring the relevance of NUP93 variants in steroid-resistant nephrotic syndrome using next generation sequencing and a fly kidney model. *Pediatr Nephrol* 2022;37: 2643–2656
13. Bińczak-Kuleta A, Rubik J, Litwin M et al. Retrospective mutational analysis of NPHS1, NPHS2, WT1 and LAMB2 in children with steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis - a single-centre experience. *Bosn J Basic Med Sci* 2014;14:89-93
14. Bouchirem K, Boyer O, Gribouval O et al. NPHS2 mutations in steroid-resistant nephrotic syndrome: A Mutation update and the associated phenotypic spectrum. *Hum mutat* 2013; 35: 178-186
15. Boyer O , Benoit G, Gribouval O et al. Mutational analysis of the PLCE1 gene in steroid resistant nephrotic syndrome. *J Med Genet* 2010;47:445-52
16. Boyer O, Nevo F, Plaisier E. INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease with glomerulopathy. *N Engl J Med* 2011;365:2377-88
17. Braun DA, Sadowski CE, Kohl S et al. Mutations in nuclear pore genes NUP93, NUP205 and XPO5 cause steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2016;48:457-65
18. Bresin E, Rurali E, Caprioli J et al. Combined complement gene mutations in atypical hemolytic uremic syndrome influence clinical phenotype. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:475-86
19. Brown EJ, Schlondorff JS, Becker DJ et al. Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2010;42:72-6

20. Bullich G, Trujillano D, Santin S et al. Targeted next-generation sequencing in steroid-resistant nephrotic syndrome: mutations in multiple glomerular genes may influence disease severity. *Eur J Hum Genet* 2015;23:1192-9
21. Büscher AK, Kranz B, Büscher R et al. Immunosuppression and renal outcome in congenital and pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:2075-84
22. Büscher AK, Beck BB, Melk A et al. Rapid response to cyclosporin A and favorable renal outcome in nongenetic versus genetic steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016;11:245-53
23. Caprioli J, Noris M, Brioschi S et al. Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood* 2006;108:1267-79
24. Diomedi-Camassei F, Di Giandomenico S, Santorelli FM et al. COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2773-80
25. Dixon BP, Kavanagh D, Aris AD et al. Ravulizumab in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: An Analysis of 2-Year Efficacy and Safety Outcomes in 2 Phase 3 Trials. *Kidney Med* 2024;6:100855
26. Dragon-Durey MA, Loirat C, Cloarec S et al. Anti-factor H autoantibodies associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:555–563
27. Dragon-Durey MA, Blanc C, Marliot F et al. The high frequency of complement factor H related CFHR1 gene deletion is restricted to specific subgroups of patients with atypical haemolytic uraemic syndrome. *J Med Genet* 2009;46:447-50
28. Dragon-Durey MA, Sethi SK, Bagga A et al. V. Clinical features of anti-factor H autoantibody-associated hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:2180-

29. Drovandi S, Lipska-Ziętkiewicz BS, Ozaltin F et al. Variation of the clinical spectrum and genotype-phenotype associations in Coenzyme Q10 deficiency associated glomerulopathy. *Kidney Int* 2022;102:592-603
30. Ebarasi L, Ashraf S, Bierzynska A et al. Defects of CRB2 cause steroid-resistant nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet* 2015;96:153-61
31. Elizondo LI, Cho KS, Zhang W. Schimke immuno-osseous dysplasia: SMARCAL1 loss-of-function and phenotypic correlation, *J Med Genet* 2009;46:49-59
32. Fakhouri F, Fila M, Hummel A et al. Eculizumab discontinuation in children and adults with atypical hemolytic-uremic syndrome: a prospective multicenter study. *Blood* 2021;137:2438-2449
33. Fan X, Li Q, Pisarek-Horowitz A et. al. Inhibitory effects of Robo2 on nephrin: a crosstalk between positive and negative signals regulating podocyte structure. *Cell Rep* 2012;2:52-61
34. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S et al. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med* 2008;14:931-8
35. Formeck C, Swiatecka-Urban A. Extra-renal manifestations of atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2019;34:1337-1348
36. Frémeaux-Bacchi V, Miller EC, Liszewski MK et al. Mutations in complement C3 predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2008;112:4948-52
37. Fremeaux-Bacchi V, Fakhouri F, Garnier A et al. Genetics and outcome of atypical hemolytic uremic syndrome: a nationwide French series comparing children and adults. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013;8:554-62

38. Gagliardini E, Conti S, Benigni A et al. Imaging of the porous ultrastructure of the glomerular epithelial filtration slit. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:2081-9
39. Gee HY, Saisawat P, Ashraf S et al. ARHGDI1 mutations cause nephrotic syndrome via defective RHO GTPase signaling. *J Clin Invest* 2013;123:3243-53
40. Geerdink LM, Westra D, van Wijk JAE et al. Atypical hemolytic uremic syndrome in children: complement mutations and clinical characteristics. *Pediatr Nephrol* 2012;27:1283-91
41. Gigante M, Caridi G, Montemurno E et al. TRPC6 mutations in children with steroid-resistant nephrotic syndrome and atypical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:1626-34
42. Gigante M, Diella S, Santangelo L et al. Further phenotypic heterogeneity of CoQ10 deficiency associated with steroid resistant nephrotic syndrome and novel COQ2 and COQ6 variants. *Clin Genet* 2017;92:224-226
43. Grenda R, Durlak M. Eculizumab in Renal Transplantation: a 2017 update. *Ann Transplant* 2017;12:22:550-554
44. Gulati A, Sinha A, Jordan SC et al. Efficacy and safety of treatment with rituximab for difficult steroid-resistant and -dependent nephrotic syndrome: multicentric report. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:2207-12
45. Han Y, Sha H, Yang Y et al. Mutations in the NUP93, NUP107 and NUP160 genes cause steroid-resistant nephrotic syndrome in Chinese children. *Ital J Pediatr* 2024;50:81
46. Hashimoto T, Harita Y, Takizawa K et al. In Vivo Expression of NUP93 and Its Alteration by NUP93 Mutations Causing Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Kidney Int Rep* 2019;4:1312-1322
47. Hausmann R, Kuppe C, Egger H, et al. Electrical forces determine glomerular permeability. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21:2053

48. Heeringa SF, Vlangos CN, Chernin G et al. Thirteen novel NPHS1 mutations in a large cohort of children with congenital nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:3527-33
49. Hinkes BG, Mucha B, Vlangos CN et al. Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2). *Pediatrics* 2007;119:e907-19
50. Holers VM. Complement and its receptors: new insights into human disease. *Annu Rev Immunol* 2014;32:433-59
51. Holmberg C, Jalanko H. Congenital nephrotic syndrome and recurrence of proteinuria after renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 2014;29:2309-17
52. Hořejší V, Barůňková J. *Základy imunologie*. 3. vydání. Praha : Triton, 2008. s. 45-49
53. Huber TB, Simons M, Hartleben B et al. Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet* 2003;12:3397-405
54. Huber TB, Benzing T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14:211-6
55. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009;326:1216–9
56. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M et al. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 2003;348:2543–56
57. Chernin G, Vega-Warner V, Schoeb DS et al. Genotype/phenotype correlation in nephrotic syndrome caused by WT1 mutations. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;1655-1662

58. Ibarra A, Benner C, Tyagi S et al. Nucleoporin-mediated regulation of cell identity genes. *Genes Dev* 2016; 30: 2253–2258
59. Jalanko H (2009) Congenital nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2009;24:2121-8
60. Jenssen GR, Hovland E, Bjerre A et al. Incidence and etiology of hemolytic-uremic syndrome in children in Norway, 1999-2008—a retrospective study of hospital records to assess the sensitivity of surveillance. *BMC Infect Dis* 2014;16:14:265
61. Jeruschke S, Alex D, Hoyer PF et al. Protective effects of rituximab on puromycin-induced apoptosis, loss of adhesion and cytoskeletal alterations in human podocytes. *Sci Rep* 2022;12:12297
62. Jokiranta TS. HUS and atypical HUS. *Blood* 2017;129:2847-2856
63. Johnson S, Stojanovic J, Ariceta G et al. An audit analysis of a guideline for the investigation and initial therapy of diarrhea negative (atypical) hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2014;29:1967-78
64. Joshi S, Andersen R, Jespersen B, Rittig S. Genetics of steroid-resistant nephrotic syndrome: a review of mutation spectrum and suggested approach for genetic testing. *Acta Paediatr.* 2013;102:844-56
65. Kamei K, Ishikura K, Sako M et al. Rituximab therapy for refractory steroid-resistant nephrotic syndrome in children. *Pediatr Nephrol* 2020;35:17-24
66. Kaplan JM, Kim SH, North KN et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000;24:251-6
67. KDIGO. Kidney disease: improving global outcomes (KGIGO) glomerulonephritis work group. KDIGO clinical practice guidelines for glomerulonephritis. *Kidney int Suppl* 2012; 2:139-274

68. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein nephrin is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 575-82
69. Kim JS, Bellew CA, Silverstein DM et al. High incidence of initial and late steroid resistance in childhood nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2005; 68:1275-1281
70. Klaassen I, Ozgoren B, Sadowski CE et al. Response to cyclosporine in steroid-resistant nephrotic syndrome: discontinuation is possible. *Pediatr Nephrol* 2015;30:1477-83
71. Kleinberger J, Maloney KA, Pollin TI, Jeng LJ. An openly available online tool for implementing the ACMG/AMP standards and guidelines for the interpretation of sequence variants. *Genet Med* 2016;18:1165
72. Krendel M, Kim AV, Willinger T et al. Disruption of Myosin 1e promotes podocyte injury. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:86-94
73. Lee JM, Kronbichler A, Shin JI, Oh J. Current understandings in treating children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2021; 36:747-761
74. Lemaire M, Fremeaux-Bacchi V, Schaefer F et al. Recessive mutations in DGKE cause atypical hemolytic-uremic syndrome. *Nat Genet* 2013;45:531-6
75. Lennon R, Randles MJ, Humphries MJ. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front Endocrinol* 2014;14:160
76. Lipska-Ziętkiewicz BS, Schaefer F. NUP Nephropathy: When Defective Pores Cause Leaky Glomeruli. *Am J Kidney Dis* 2019;73:890-892
77. Liu Y, Thaker H, Wang C et al., Diagnosis and Treatment for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Toxins (Basel)* 2022;15:10
78. Loirat C, Frémeaux-Bacchi V. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2011; 8:6:60

79. Loirat C, Fakhouri F, Ariceta G et al. An international consensus approach to the management of atypical hemolytic uremic syndrome in children. *Pediatr Nephrol* 2016;31:15-39
80. Lombel RM, Hodson EM, Gipson DS. Treatment of steroid-resistant nephrotic syndrome in children: new guidelines from KDIGO. *Pediatr Nephrol*. 2013;28(3):409-14
81. Maga TK, Nishimura CJ, Weaver AE et al. Mutations in alternative pathway complement proteins in American patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Hum Mutat* 2010;31:E1445-60
82. Malakasioti G, Iancu D, Milovanova A et al. A multicenter retrospective study of calcineurin inhibitors in nephrotic syndrome secondary to podocyte gene variants. *Kidney Int* 2023;103:962-972
83. Malina M, Gulati A, Bagga A et al. Peripheral gangrene in children with atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatric* 2013;131:331-5
84. Matejas V, Hinkes B, Alkandari F et al. Mutations in the human laminin beta2 (LAMB2) gene and the associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat* 2010;31:992–1002
85. Mbarek IB, Abroug S, Omezzine A et al. Novel mutations in steroid-resistant nephrotic syndrome diagnosed in Tunisian children. *Pediatr Nephrol* 2011;26:241-9
86. McCarthy HJ, Bierzynska A, Wherlock M et al. Simultaneous sequencing of 24 genes associated with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013;8:637-48
87. McCullough JW, Renner B, Thurman JM. The role of the complement system in acute kidney injury. *Semin Nephrol* 2013;33:543–56

88. McIntosh I, Dreyer SD, Clough MV et al. Mutation analysis of LMX1B gene in nail-patella syndrome patients. *Am J Hum Genet* 1998;63:1651-8
89. Mekahli D, Liutkus A, Ranchin B et al. Long-term outcome of idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome: a multicenter study. *Pediatr Nephrol* 2009; 24:1525–1532
90. Mele C, Iatropoulos P, Donadelli R et al. MYO1E mutations and childhood familial focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 2011;365:295-306
91. Meng XM, Huang YR, Xiao J et al. Disruption of Smad4 impairs TGF- β /Smad3 and Smad7 transcriptional regulation during renal inflammation and fibrosis in vivo and in vitro. *Kidney Int* 2012;81:266-79
92. Menne J, Delmas Y, Fakhouri F et al. Outcomes in patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated with eculizumab in a long-term observational study *BMC Nephrol* 2019;20:125
93. Miner JH, Li C, Mudd JL et al. Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* 2004;131:2247-56
94. Moore I, Strain L, Pappworth I et al. Association of factor H auto-antibodies with deletions of CFHR1, CFHR3, CFHR4, and with mutations in CFH, CFI, CD46, and C3 in patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2010; 115:379–387
95. Morinière V, Dahan K, Hilbert P et al. Improving mutation screening in familial hematuric nephropathies through next generation sequencing. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25:2740-51
96. Mucha B, Ozaltin F, Hinkes BG et al. Mutations in the Wilms' tumor 1 gene cause isolated steroid resistant nephrotic syndrome and occur in exons 8 and 9. *Pediatr Res* 2006;59:325-31

97. Nammalwar BR, Vijayakumar M, Prahlad N. Experience of renal biopsy in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2006; 21:286-8
98. Nester CM, Barbour T, Rodriguez de Cordoba S. Atypical aHUS: State of the art. *Mol Immunol* 2015;67:31-42
99. Noris M, Caprioli J, Bresin E et al. Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1844-59
100. Noris M, Bresin E, Mele C et al. Genetic Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome. *Gene reviews* 2016
101. Ogino D, Hashimoto T, Hattori M et al. Analysis of the genes responsible for steroid-resistant nephrotic syndrome and/ or focal segmental glomerulosclerosis in Japanese patients by whole-exome sequencing analysis. *J Hum Genet* 2016;61:137-41
102. Ozaltin F, Ibsirlioglu T, Taskiran EZ. Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet.* 2011 Jul 15;89:139-47
103. Ozaltin F, Li B, Rauhauser A et al. DGKE variants cause a glomerular microangiopathy that mimics membranoproliferative GN. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:377-84
104. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* 2003;83:253-307
105. Paulsson M. The role of Ca²⁺ binding in the self-aggregation of laminin- nidogen complexes. *J Biol* 1988;263:5425–30
106. Pierson M, Cordier J, Hervouuet F et al. An unusual congenital and familial congenital malformative combination involving the eye and kidney. *J Genet Hum* 1963;12:184–213

107. Poschl E, Schlotzer-Schrehardt U, Brachvogel B et al. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 2004;131:1619–28
108. Preston R, Stuart HM, Lennon R. Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: why, who, when and how? *Pediatr Nephrol*. 2019;34:195-210
109. Richard A, Liszewski KM, Kavanagh D et al. Implications of the initial mutations in membrane cofactor protein (MCP; CD46) leading atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol* 2007;44:111-22
110. Richards S, Aziz N, Bale S et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-24
111. Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 1974;60:423-33
112. Ruggenti P, Noris M, Remuzzi G. Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int* 2001;60:831–46
113. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J et al. Nephric is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Nat Acad Sci USA* 1999;96:7962–7967
114. Sadowski CE, Lovric S, Ashraf S et al. A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 1279-1289
115. Sako M, Nakanishi K, Obana M et al. Analysis of NPHS1, NPHS2, ACTN4, and WT1 in Japanese patients with congenital nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2005;67:1248-55

116. Samuel T, Hoy WE, Douglas-Denton R et. al. Applicability of the glomerular size distribution coefficient in assessing human glomerular volume: the Weibel and Gomez method revisited. *J Anat* 2007;210:578-82
117. Santín S, Bullich G, Tazón-Vega B et al. Clinical utility of genetic testing in children and adults with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:1139-4
118. Savin VJ, Sharma M, Zhou J et al. Targets for novel therapy of FSGS associated with circulating permeability factor. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 6232616
119. Sellier-Leclerc AL, Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA et al. Differential impact of complement mutations on clinical characteristics in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2392-400
120. Shih NY, Li J, Karpitskii V et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999;286:312-5
121. Schimke RN, Horton WA, King CR. Chondroitin-6-sulphaturia, defective cellular immunity, and nephrotic syndrome. *Lancet* 1971;2:1088-9
122. Sharma AP, Greenberg CR, Prasad AN et al., Hemolytic uremic syndrome (HUS) secondary to cobalamin C (cblC) disorder. *Pediatr Nephrol* 2007;22:2097-103
123. Siji A, Pardeshi VC, Ravindran S et al. Screening of WT1 mutations in exon 8 and 9 in children with steroid resistant nephrotic syndrome from a single centre and establishment of a rapid screening assay using high-resolution melting analysis in a clinical setting. *BMC Med Genet* 2017;18:3
124. Singh A, Satchell SC, Neal CR et al. Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2885-93
125. Sinha A, Gulati A, Saini S et al. Prompt plasma exchanges and immunosuppressive treatment improves the outcomes of anti-factor H autoantibody-associated hemolytic uremic syndrome in children. *Kidney Int* 2014;85:1151-60

126. Skálová S, Seeman T, Štolbová Š, Zieg J. Nefrotický syndrom v dětské věku. Čes-slov Pediat 2017; 72: 88-98
127. Staples A, LeBlond R, Watkins S et al. Validation of the revised Schwartz estimating equation in a predominantly non-CKD population. Pediatr Nephrol 2010;25:2321-6
128. Stenson PD, Mort M, Ball EV et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. Hum Genet 2017;136:665-677
129. Stuhlinger W, Kourilsky O, Kanfer A et al. Haemolytic-uraemic syndrome: evidence for intravascular C3 activation. Lancet 1974;2:788-9
130. Sukumar S, Lämmle B, Cataland SR. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. J Clin Med 2021;10:536
131. Sun H, Schlondorff J, Higgs HN et al. Inverted formin 2 regulates actin dynamics by antagonizing Rho/diaphanous-related formin signaling. J Am Soc Nephrol 2013;24:917-29
132. Štolbová Š, Bezdíčka M, Prohászka Z et al. Molecular basis and outcomes of atypical haemolytic uraemic syndrome in Czech children. Eur J Pediatr 2020;179:1739-1750
133. Tan W, Lovric S, Ashraf S et al. Analysis of 24 genes reveals a monogenic cause in 11.1% of cases with steroid-resistant nephrotic syndrome at a single center. Pediatr Nephrol 2018;30:305-314
134. Trautmann A, Bodria M, Ozaltin F et al. Spectrum of steroid-resistant and congenital nephrotic syndrome in children: the PodoNet registry cohort. Clin J Am Soc Nephrol. 2015; 10:592-600

135. Trautmann A, Vivarelli M, Samuel S et al. IPNA clinical practice recommendations for the diagnosis and management of children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2020;35:1529-1561
136. Trautmann A, Boyer O, Hodson E. IPNA clinical practice recommendations for the diagnosis and management of children with steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2022;38:877-919
137. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 2006;354:1387–401
138. Tullus K, Webb H, Bagga A. Management of steroid-resistant nephrotic syndrome in children and adolescence. *Lancet Child Adolesc Health* 2018; 2:880-890
139. Tojo A, Kinugasa S. Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. *Int J Nephrol* 2012;2012:481520
140. Tory K, Menyhard DK, Woerner S et al. Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2014; 46:299-304
141. Vondrak K, Seeman T. Successful 7-year eculizumab treatment of plasmapheresis-resistant recurrent atypical hemolytic-uremic syndrome due to complement factor H hybrid gene: a case report. *Transplant Proc* 2018;50:967-970
142. Wang Y, Dang X, He Q et al. Mutation spectrum of genes associated with steroid-resistant nephrotic syndrome in Chinese children. *Gene* 2017; 20:625:15-20
143. Watts A, Keller KH, Lerner G et al. Discovery of Autoantibodies Targeting Nephricin in Minimal Change Disease Supports a Novel Autoimmune Etiology. *J Am Soc Nephrol* 2022; 33: 238–252
144. Welsh GI, Hale LJ, Eremina V et al. Insulin signaling to the glomerular podocyte is critical for normal kidney function. *Cell Metab* 2010;12:329-340

145. Westland R, Bodria M, Carrea A et al. Phenotypic expansion of DGKE associated diseases. *J Am Soc Nephrol* 2014;25:1408-14
146. Wolf G, Stahl RAK. CD2-associated protein and glomerular disease. *Lancet* 2003;362:1746-8
147. Yerigeri K, Kadatane S, Mongan K et al. Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome: Genetic Basis, Clinical Manifestations, and a Multidisciplinary Approach to Management. *J Multidiscip Healthc* 2023;4:16:2233-2249
148. Zieg J, Bezdička M, Němčíková M et al., Schimke immunoosseous dysplasia: an ultra-rare disease. a 20-year case series from the tertiary hospital in the Czech Republic. *Ital J Pediatr* 2023;49:11
149. Zenker M , Aigner T, Wendler O et al. Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet.* 2004;13:2625-32
150. Zipfel PF, Edey M, Heinen S et al. Deletion of complement factor H-related genes CFHR1 and CFHR3 is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *PLoS Genet* 2007;3:e41
151. Zuber J, Le Quintrec M, Krid S et al. Eculizumab for atypical hemolytic uremic syndrome recurrence in renal transplantation. *Am J Transplant* 2012;12:3337-54

10 PŘÍLOHY

Příloha 1 Seznam genů vyšetřovaných ve studii

Gen	Název bílkoviny a další označení	Dědičnost ¹	RefSeq DNA	Referenční transkript	Pokrytí ² (%)
<i>NPHS1</i> ³	<i>Nephrin, CNF, NPHN</i>	AR	NG_013356.2	NM_004646.3	99,85
<i>NPHS2</i> ³	<i>Podocin, PDCN, SRN1</i>	AR	NG_007535.1	NM_014625.3	99,64
<i>WT1</i> ³	<i>Wilms tumor protein, AWT1, EWS-WT1, GUD, NHS4, WAGR, WIT-2, WT33</i>	AD	NG_009272.1	NM_024426.4	100
<i>NUP93</i>	<i>Nuclear pore complex protein Nup93, NIC96</i>	AR	NG_052904.1	NM_014669.4	100
<i>ACTN4</i>	<i>Alpha-actinin-4, ACTININ-4, FSGS, FSGS1</i>	AD	NG_007082.2	NM_004924.4	99,94
<i>ADCK4</i>	<i>Atypical kinase COQ8B, COQ8B, NPHS9</i>	AR	NG_027800.1	NM_024876.3	100
<i>ALG1</i>	<i>Chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase, CDG1K, hMat-1, HMAT1, HMT-1, HMT1, Mat-1, MT-1</i>	AR	NG_009202.1	NM_019109.4	78,92
<i>ANLN</i>	<i>Anillin, FSGS8, scra, Scraps</i>	AD	NG_041770.1	NM_018685.4	100
<i>APOL1</i>	<i>Apolipoprotein L1, APO-L, APOL-1, FSGS4</i>	AR?	NG_023228.1	NM_003661.3	97,21
<i>ARHGAP24</i>	<i>Rho GTPase-activating protein 24, FILGAP,p73, p73RhoGAP, RC-GAP72, RCGAP72</i>	AD?	NG_051627.1	NM_001025616.2	100
<i>ARHGDI1</i>	<i>Rho GDP-dissociation inhibitor 1, GDIA1, HEL-S-47e, NPHS8, RHOGDI, RHOGDI-1</i>	AR	NG_034210.1	NM_001185077.2	100
<i>CD151</i>	<i>GP27, MER2, PETA-3, RAPH, SFA1, TSPAN24</i>	AR?	NG_007478.1	NM_004357.4	100
<i>CD2AP</i>	<i>CD2-associated protein, CMS</i>	AR	NG_008878.1	NM_012120.2	99,46
<i>CFH</i>	<i>Complement factor H, AHUS1, AMBP1, ARMD4, ARMS1, CFHL3, FH, FHL1, HF, HF2, HUS</i>	AR, AD	NG_007259.1	NM_000186.3	99,28
<i>COL4A3</i>	<i>Collagen alpha-3 (IV) chain</i>	AR, AD?	NG_011591.1	NM_000091.4	99,23
<i>COQ2</i>	<i>4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase, CL640, COQ10D1, MSA1, PHB:PPT</i>	AR, AD?	NG_015825.1	NM_015697.7	98,43
<i>COQ6</i>	<i>Ubiquinone biosynthesis monooxygenase 6, CGI-10, CGI10, COQ10D6</i>	AR?	NG_032805.1	NM_182476.2	99,89
<i>COQ7</i>	<i>5-demethoxyubiquinone hydroxylase, CAT5, CLK-1, COQ10D8</i>	AR?	NG_046596.1	NM_016138.4	100
<i>COQ9</i>	<i>Ubiquinone biosynthesis protein 9, C16orf49, COQ10D5</i>	AR?	NG_027696.1	NM_020312.3	100
<i>CRB2</i>	<i>Protein crumbs homologue 2, FSGS9, VMCKD</i>	AR	NG_051311.1	NM_173689.6	100
<i>CUBN</i>	<i>Culubin, gp280, IFCR, MGA</i>	AR?	NG_008967.1	NM_001081.3	99,79
<i>DGKE</i>	<i>Dialcylglycerol kinase epsilon, AHUS7, DAGK5, DAGK6, DGK, NPHS7</i>	AR	NG_033888.1	NM_003647.2	100
<i>EMP2</i>	<i>Epithelial membrane protein 2, XMP</i>	AR	NG_042058.1	NM_001424.4	100
<i>FAT1</i>	<i>Protocadherin Fat1, CDHR8, FAT, hFAT1, ME5</i>	AR?	NG_046994.1	NM_005245.3	99,75
<i>INF2</i>	<i>Inverted formin-2, C14orf151, C14orf173, CMTDIE</i>	AD	NG_027684.1	NM_022489.3	100
<i>ITGA3</i>	<i>Integrin alpha-3, CD49C, FRP-2, GAP-B3, GAPB3, ILNEB, MSK18, VCA-2, VL3A, VLA3a</i>	AR	NG_029107.1	NM_002204.2	99,68
<i>ITGB4</i>	<i>Integrin beta-4, CD104, GP150</i>	AR, AD?	NG_007372.1	NM_001005731.1	99,41
<i>KANK1</i>	<i>KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1, ANKRD15, CPSO2, KANK</i>	AR?	NG_016331.2	NM_015158.3	98,01
<i>KANK2</i>	<i>KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2, ANKRD25, MXRA3, PPKWH, SIP</i>	AR?	NG_051186.1	NM_001136191.2	100
<i>KANK4</i>	<i>KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 4, ANKDRD38, dJ1078M7.1</i>	AR?	?	NM_181712.4	100
<i>LAMB2</i>	<i>Laminin subunit beta-2, LAMS, NPHS5</i>	AR?	NG_008094.1	NM_002292.3	100
<i>LMNA</i>	<i>Prelamin-A/C, CDCD1, CDDC, CMD1A, CMT2B1, EMD2, FPL, FPLD, DPLD2, HGPS, IDC, LDPI, LFP, LFMD1B, LMNI, LMNC, LMNL1, MADA, PRO1</i>	AR, AD?	NG_008692.2	NM_170707.3	99,61
<i>LMX1B</i>	<i>LIM homeobox transcription factor 1-beta, LMX1.2, NPS1</i>	AD?	NG_017039.1	NM_002316.3	100
<i>MYO1E</i>	<i>Unconventional myosin-1e, FSGS6, HuncM-1C, MYO1C</i>	AR	NG_031999.1	NM_004998.3	100
<i>NEIL1</i>	<i>Endonuclease 8-like 1, FPG1, hFPG1, NEIL</i>	?	?	NM_024608.3	100
<i>NPHP1</i>	<i>Nephrocystin-1, JBTS4, NPH1, SLSN1</i>	AR?	NG_008287.1	NM_000272.3	100
<i>NUP107</i>	<i>Nuclear pore complex protein Nup107, NPHS11, NUP84</i>	AR	NG_046600.2	NM_020401.2	99,30
<i>NUP205</i>	<i>Nuclear pore complex protein Nup205, C7orf14, NPHS13</i>	AR?	NG_055118.1	NM_015135.2	99,74
<i>PAX2</i>	<i>Paired box protein Pax-2, FSGS7, PAPRS</i>	AD	NG_008680.1	NM_003987.3	100
<i>PDSS2</i>	<i>Decaprenyl-diphosphate synthase subunit 2, bA5919.3, C6orf210, COQ10D3, DLPI, hDLPI</i>	AR?	NG_013033.1	NM_020381.3	100
<i>PLCE1</i>	<i>1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase epsilon-1, NPHS3, PLCE, PPLC</i>	AR	NG_015799.1	NM_016341.3	99,64
<i>PMM2</i>	<i>Phosphomannomutase 2, CDG1, CDG1a, CDGS, PMI, PMII, PMM 2</i>	AR?	NG_009209.1	NM_000303.2	100
<i>PTPRO</i>	<i>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase O, GLEPP1, NPHS6, PTP-OC, PTP-U2, PTPROT, PTPU2, R-PTP-O</i>	AR	NG_031857.1	NM_030667.2	99,81
<i>SCARB2</i>	<i>Lysosome membrane protein 2, AMRF, CD36L2, EPM4, HLGP85, LGP85, LIMP-2, LIMP11, SR-B11</i>	AR?	NG_012054.1	NM_005506.3	99,35
<i>SMARCA1</i>	<i>SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1, HARP, HHARP</i>	AR?	NG_009771.1	NM_014140.3	99,78

<i>TRPC6</i>	<i>Short transient receptor potential channel 6, FSGS2, TRP6</i>	AD	NG_011476.1	NM_004621.5	99,07
<i>WDR73</i>	<i>WD repeat-containing protein 73, GAMOS, HSPC264</i>	AR?	NG_042034.1	NM_032856.3	97,70
<i>XPO5</i>	<i>Exportin 5, exp 5</i>	AR?	NG_051658.1	NM_020750.2	99,86

¹ Dědičnost: AR autozomální recesivní, AD autozomálně dominantní, ? není pevně stanoveno

² Pokrytí pomocí NGS panelu Haloplex

³ Geny analyzované Sangerovou metodou v první fázi studie

Příloha 2 Seznam vyšetřovaných genů v NGS panelu

Gen	Název bílkoviny a další označení	Dědičnost	RefSeq DNA	Referenční transkript	Pokrytí * (%)
<i>C3</i>	<i>Complement component 3, AHUS5, ARMD9, ASP, C3a, C3b, CPAMS1, HEL-s-62p</i>	AR, AD	NG_009557.1	NM_000064.3	96,51
<i>C5</i>	<i>Complement component 5, C5a, C5b, C5D, CPAMD4, ECLZB</i>	AD	NG_007364.1	NM_001735.2	99,42
<i>CD46</i>	<i>Complement membrane cofactor protein, AHUS2, MCP, MIC10, TLX, TRA2.10</i>	AR, AD	NG_009296.1	NM_002389.4	98,89%
<i>CFB</i>	<i>Complement factor B, AHUS4, ARMD14, BF, BFD, CFAB, FB, FBII2, GBG, H2-Bf, PBF2</i>	AD	NG_008191.1	NM_001710.5	100
<i>CFD</i>	<i>Complement factor D, ADIPSIN, ADN, DF, PFD</i>	AR	NG_007274.1	NM_001928.2	99,15
<i>CFH</i>	<i>Complement factor H, AHUS1, AMBP1, ARMD4, ARMS1, CFHL3, FH, FHL1, HF, HF1, HF2, HUS</i>	AR, AD	NG_007259.1	NM_000186.3	99,35
<i>CFHR1</i>	<i>Complement factor H-related 1, CFHL, CFHL1, CFHL1P, CFHR1P, FHR1, H36-1, H36-2, HFL1, HFL2</i>	AR, AD	NG_013060.1	NM_002113.2	99,59
<i>CFHR2</i>	<i>Complement factor H-related 2, CFHL2, FHR2, HFL3</i>	?	NG_042816.1	NM_005666.2	100
<i>CFHR3</i>	<i>Complement factor H-related 3, CFHL3, DOWN16, FHR-3, FHR3, HLF4</i>	AR, AD	NG_015993.1	NM_021023.5	96,95
<i>CFHR4</i>	<i>Complement factor H-related 4, CFHL4, FHR-4, FHR4</i>	?	NG_028159.1	NM_001201550.2	93,57
<i>CFHR5</i>	<i>Complement factor H-related 5, CFHL5, CFHR5D, FHR-5, FHR5</i>	AD	NG_016365.1	NM_030787.3	100
<i>CFI</i>	<i>Complement factor I, AHUS3, ARMD13, C3b-INA, C3BINA, FI, IF, KAF</i>	AR, AD	NG_007569.1	NM_000204.3	98,79
<i>DGKE</i>	<i>Diacylglycerol kinase epsilon, AHUS7, DAGK5, DAGK6, DGK, NPHS7</i>	AR	NG_033888.1	NM_003647.2	99,29
<i>THBD</i>	<i>Thrombomodulin, AHUS6, BDCA3, CD141, THPH12, THRM, TM</i>	AD	NG_012027.1	NM_000361.2	99,90
<i>PLG</i>	<i>Plasminogen</i>	AR	NG_016200.1	NM_000301.3	95,76

Dědičnost: AR autozomální recesivní, AD autozomálně dominantní, ? není pevně stanoveno

* Pokrytí pomocí NGS panelu Haloplex