

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra antropologie a genetiky člověka



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Molekulární aspekty kalcio-fosfátového metabolismu u ledvinových komplikací diabetu mellitu

Molecular aspects of calcium-phosphate metabolism in renal complications of diabetes mellitus

Vedoucí diplomové práce: Doc. MUDr. Marie Černá, CSc.

Praha 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu.

V Praze, 20. 8. 2012

.....

Eva Šimáková

### **Poděkování**

Děkuji své školitelce Doc. MUDr. Marii Černé, CSc. za odborné vedení a mnoho času, které mi věnovala. Dále děkuji Mgr. Marcele Vedralové za získání praktických zkušeností v laboratoři a Anežce Koubové za technickou pomoc v laboratoři.

## **Abstrakt**

**Úvod:** Diplomová práce se týká kalcio-fosfátového metabolismu, zabývá se kalcium sensitivním receptorem (CaSR) a jeho rolí při rozvoji diabetu a jeho chronických komplikací. CaSR je vedle svých typických cílových tkání exprimován také na beta buňkách v Langerhansových ostrůvcích pankreatu a pravděpodobně ovlivňuje inzulinovou sekreci. CaSR by se mohl dále podílet na intrabuněčné signalizaci a metabolických pochodech, které vedou k proliferaci extracelulární matrix a k počátku diabetické nefropatie. Byly zkoumány 2 SNP genu *CaSR*, v intronu 4 (rs13931899) a kodonu 990 (rs1042636).

**Materiál a Metody:** Do studie bylo zařazeno 147 diabetických pacientů bez komplikací (41 s diabetem 1. typu a 106 s diabetem 2. typu), 110 diabetiků 2. typu s diabetickou nefropatií (DN) a 56 diabetiků 2. typu s nediabetickým renálním onemocněním (NDRD). Dále bylo vyšetřeno 72 nediabetických pacientů s chronickým renálním selháním (CKD) a 96 zdravých kontrol (ZK). DNA byla izolována QIAamp DNA Blood Mini Kitu a vysolovací metodou. Pomocí PCR byly amplifikovány specifické fragmenty genu *CaSR*. Pro detekci byl použit polymorfismus délky restričních fragmentů a TaqMan sondy. Pro určení hladiny exprese mRNA byla použita metoda real-time PCR.

**Výsledky:** U polymorfismu „kodonu 990“ jsme zjistili pouze hraniční statistickou významnost ve frekvenci genotypů při porovnání diabetiků 2. typu se zdravými kontrolami ( $P=0,0408$ ). U polymorfismu „intronu 4“ jsme našli statisticky významné rozdíly, při porovnání se zdravými jedinci, ve frekvenci genotypů u diabetiků 1. typu ( $P=0,0002$ ), diabetiků 2. typu ( $P=0,0006$ ), diabetiků s NDRD ( $P=0,0001$ ) a pacientů s CKD ( $P=0,0006$ ). Dále jsme pozorovali statisticky významný rozdíl při porovnání diabetiků s DN a pacientů s CKD ( $P=0,0275$ ). Ve frekvenci alel obou polymorfismů jsme nedetekovali žádnou statisticky významnou odlišnost. Vzhledem k malému počtu analyzovaných jedinců jsme nepozorovali statistickou významnost při srovnání hladin genové exprese.

**Závěr:** Gen pro *CaSR* by mohl hrát roli v etiopatogenezi diabetu i jeho ledvinových komplikací, neboť polymorfismus intronu 4 se jeví jako rizikový faktor pro vznik diabetu 1. a 2. typu a poškození ledvin.

**Klíčová slova:** diabetes mellitus, kalcium senzitivní receptor, polymorfismus, kalcio-fosfátový metabolismus

## **Abstract**

**Introduction:** This thesis deals with the calcium-phosphate metabolism, analyzes the calcium sensing receptor (CaSR) and its role in the development of diabetes and its chronic complications. Beside its typical target tissues, the CaSR is also expressed on the beta cells in Langerhans islets of pancreas, and probably influences insulin secretion. CaSR may play a role in intracellular signaling and metabolic pathways that lead to proliferation of extracellular matrix and to initiation of diabetic nephropathy. We investigated 2 SNPs of the *CaSR* gene, in intron 4 (rs13931899) and codon 990 (rs1042636).

**Material and Methods:** The study included 147 diabetic patients without complications (41 with type 1 diabetes and 106 with type 2 diabetes), 110 type 2 diabetics with diabetic nephropathy (DN) and 56 type 2 diabetics with non-diabetic renal disease (NDRD). It was also examined 72 non-diabetic patients with chronic renal failure (CKD) and 96 healthy controls (ZK). DNA was isolated by QIAamp DNA Blood Mini Kit and salting method. The specific fragments of the *CaSR* gene were amplified by PCR. For detection, restriction fragment length polymorphism and TaqMan probes were used. The expression levels of mRNA were determined by real-time PCR.

**Results:** For the codon 990 polymorphism, we found only a small statistical significance of the genotype frequencies in comparison of type 2 diabetics with healthy controls ( $P=0.0408$ ). For the intron 4 polymorphism, we found statistically significant differences, with comparison of healthy individuals, in the genotype frequencies in type 1 diabetics ( $P=0.0002$ ), type 2 diabetics ( $P=0.0006$ ), diabetics with NDRD ( $P=0.0001$ ) and patients with CKD ( $P=0.0006$ ). We also observed a statistically significant difference in comparison between diabetics with DN and patients with CKD ( $P=0.0275$ ). We did not detect any statistically significant difference in the allele frequencies of both polymorphisms. Due to small number of analyzed individuals, we did not observe statistical significances in comparison of gene expression levels.

**Conclusion:** The *CaSR* gene could play a role in the etiopatogenesis of diabetes and its kidney complications, since the polymorphism of intron 4 appears a risk factor for development of type 1 and 2 diabetes and kidney damage.

**Keywords:** diabetes mellitus, calcium-sensing receptor, polymorphism, calcium-phosphate metabolism

## Obsah

1. ÚVOD	
1.1. Diabetes mellitus a ledvinové komplikace	7
1.1.1. Patofyziologie	18
1.1.2. Epidemiologie	19
1.1.3. Klasifikace ledvinových onemocnění u diabetiků	21
1.2. Genetická predispozice k diabetu a k diabetické nefropatii	22
1.3. Kalcio-fosfátový metabolismus	25
1.4. Regulace kalcio-fosfátového metabolismu	27
1.5. Vitamín D	27
1.6. Parathormon	28
1.7. Kalcitonin	28
1.8. Kalcium senzitivní receptor	29
1.8.1. Rodina receptorů spojená s G-proteiny	29
1.8.2. Gen pro kalcium senzitivní receptor	30
1.8.3. Mutace kalcium senzitivního receptoru	32
1.8.4. CaSR polymorfismy	33
2. CÍLE	35
2.1. Hypotéza	35
2.2. Vlastní cíle-metodika práce	35
3. MATERIÁL A METODIKA PRÁCE	36
3.1. Používané laboratorní vybavení	36
3.1.1. Laboratorní přístroje	36
3.1.2. Laboratorní pomůcky	36
3.1.3. Používané počítačové programy	36
3.2. Používaný materiál	37
3.2.1. Pufry a roztoky	37
3.2.2. Enzymy	37
3.2.3. Komerční soupravy a standardy	37
3.2.4. Chemikálie	37
3.2.5. Použité oligonukleotidy a sondy	38
3.3. Soubor pacientů	38

3.4. Metodika práce a postupů	39
3.4.1. Genotypizace polymorfizmů genu pro CaSR	39
3.4.1.1. Izolace DNA	39
3.4.1.1.a) pomocí QIA amp DNA blood Mini Kitu	39
3.4.1.1.b) izolace vysolovací metodou	40
3.4.1.2. Stanovení koncentrace a čistoty DNA	40
3.4.1.3. Polymerázová řetězová reakce	40
3.4.1.4. Polymorfizmus délky restrikčních fragmentů	42
3.4.1.5. Elektroforetická separace	43
3.4.1.6. Genotypizace pomocí TaqMan sond	43
3.4.2. Stanovení genové exprese pro CaSR	46
3.4.2.1. Izolace RNA	46
3.4.2.2. Reverzní transkriptáza	47
3.4.2.3. Real-Time PCR	48
3.4.2.4. Statistické vyhodnocení	49
4. VÝSLEDKY	50
5. DISKUSE	59
6. ZÁVĚR	61
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	62

## Seznam použitých zkratek

A	adenin
ADA	Americká diabetická asociace
ADHH	autozomálně dominantní hypokalcémie s hyperkalciurií
AGE	pokročilé produkty glykace
AGT	angiotenzinogen
AH	autoimunitní hypoparathyreóza
ALP	alkalická fosfatáza
Ang I	angiotenzin I
Ang II	angiotensin II
ANP	atriální natriuretický peptid
ApoE	apolipoprotein E
ATPasa	adenosin trifosfatáza
BMD	denzita kostního materiálu
C	cytosin
Ca <sup>2+</sup>	vápenatý kationt
cAMP	cyklický adeninmonofosfát
CaSR	kalcium senzitivní receptor
CD	centrální doména
CKD	chronické selhání ledvin
cDNA	komplementární DNA
CEL	karbonyl-ester lipáza
C	interval spolehlivosti
CML	karboxymetyl lysin
D/I polymorfismus	deleční / inzerční polymorfismus
DAG	diacylglycerol
dATP	2' - deoxyadenosin- 5' - trifosfát
db SNP	Single Nucleotide Polymorphism database
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
DM	diabetes mellitus
DN	diabetická nefropatie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTP	deoxyribonukleotid trifosfát
dTTP	2' - deoxythymidin- 5' - trifosfát



ECD	extracelulární doména
ECT	extracelulární tekutina
EDRF	endoteliální relaxační faktor
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
F-6-P	fruktóza-6-fosfát
FBHH	familiární benigní hypokalciurická hyperkalcémie
G	guanin
G-6-P	glukóza-6-fosfát
GABA <sub>B</sub>	receptory gaba-aminobutyrové kyseliny
GB <sub>3</sub>	globotriaosylceramid
GLUT 1	glukózový transportér 1
GPCRs	receptor spojený s G-proteiny
HCl	kyselina chlorovodíková
HD	hemodialýza
HLA	hlavní histokompatibilní systém člověka
HSPG	heparansulfát proteoglykan
HWE	Hardy – Weinbergův zákon
ICD	intracelulární doména
IDDM	inzulin–dependentní diabetes mellitus
ICHS	ischémie
ICHSDK	ischémie dolních končetin
IP <sub>2</sub>	inositol difosfát
IP <sub>3</sub>	inositol trifosfát
K <sup>+</sup>	draselný kationt
kb	kilobáze
LADA	Latent Autoimmune Diabetes of Adults
LH	luteinizační hormon
M	žebříček, marker
MAPK	mitogeny aktivované protein kinázy
MAU	mikroalbuminurie
MgCl <sub>2</sub>	chlorid hořečnatý
MHC	hlavní histokompatibilní systém
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina

Na <sup>+</sup>	sodný kationt
NaCl	chlorid sodný
NAD <sup>+</sup>	nikotin amid adenin dinukleotid - oxidovaný
NADP	nikotin amid adenin dinukleotid
NADPH	nikotin amid adenin dinukleotid fosfát - redukovaný
NDRD	nediabetické renální onemocnění
NIDDM	inzulin non-dependentní diabetes mellitus
NO	oxid dusnatý
NOS	oxid dusnatý syntetáza
NSHPT	novorozenecká těžká primární hyperparathyreóza
OR	odds ratio (statistický ukazatel)
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PGI <sub>2</sub>	typ prostaglandinu
PKCβ	protein kináza C, izoforma β
PKC	proteinkináza C
PPIA	peptidylprolyl isomeráza A (cyklofilin A)
PTH	parathyreoidní hormon, parathormon
PTHR	receptor pro parathyreoidní hormon
PTHrP	PTH-related peptid
RAS	system renin-angiotenzin
RCLB	Red cell lysis buffer
RE	restrikční endonukleáza
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
RPS13	ribosomální protein
RRT	transplantace ledvin
rs SNP	referenční číslo SNP
RT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
SDS	dodecylsulfát sodný
SHBG	sexuální hormon vázající globulin
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
T	thymin
T1D	diabetes mellitus 1. typu

T2D	diabetes mellitus 2. typu
TEDDY	Environmental Determinant of Diabetes in the Young
TGFβ	transformující růstový faktor beta
TK	krevní tlak
Tris	2-amino-2-hydroxymetyl - propan-1,3 - diol
UV	ultrafialové záření
ÚZIS ČR	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR
VDR	receptor pro vitamín D
VDREs	vitamin D responsibilní elementy
VRs	vomeronasální receptor
WCLB	White cell lysis buffer
WHO	Světová zdravotnická organizace
ZK	zdravé kontroly

## 1. ÚVOD

Diabetes mellitus patří mezi chronická onemocnění, která po letech trvání vedou k ireverzibilním změnám postihujícím v organismu jednotlivé tkáně, z nichž nejzávažnější abnormality se vyskytují v pojivu. Diabetická mikroangiopatie, reprezentovaná retinopatií, nefropatií či neuropatií, a dále makroangiopatie zahrnující ischemickou chorobu srdeční, ischemickou chorobu dolních končetin a cévní mozkové příhody, jsou hlavními příčinami zvýšené morbidity a mortality diabetiků v porovnání s nediabetickou populací. Patologický proces v cévní stěně, podobně jako v kloubním vazivu, šlach či kůži, je důsledkem dlouhodobého působení změněného metabolismu při diabetu, z čehož vyplývá, že uvedené komplikace jsou spíše pozdními projevy nemoci, než komplikacemi v pravém slova smyslu (Pelikánová T. et al. 2010).

Asi polovina nemocných s diabetem 2. typu má určitý stupeň funkčního postižení ledvin. Onemocnění ledvin zvyšuje riziko kardiovaskulárních komplikací a postupné progrese renální insuficience. V roce 2010 bylo diabetické onemocnění ledvin v České republice přítomno u více než 86 tisíc nemocných s diabetem, z nichž bylo 34 % již v různých fázích chronické renální insuficience. Tito nemocní tvořili 41 % pacientů zařazených v ČR do pravidelného hemodialyzačního programu (Pelikánová 2011).

### **1.1. Diabetes mellitus a ledvinové komplikace**

Hladina glukózy patří k těm biochemickým parametrům, které jsou velmi citlivě a přesně regulovány. Extrémní odchylky v obou směrech totiž představují vážné ohrožení existence lidského organismu. Glukóza je z metabolického hlediska nejsnáze dostupným zdrojem energie. Za normálních okolností kolísá glykémie mezi 4 a 5,5 mmol/l, po požití většího množství sacharidů může být přechodně vyšší. Regulace glykémie je v rozhodující míře zajišťována endokrinními mechanismy. Glykémii snižuje prakticky pouze inzulin, ke zvyšování hladiny krevního cukru je k dispozici řada hormonů, které se označují jako kontrainzulární. Obvykle působí synergicky a jejich vzájemné účinky se zesilují. Inzulin je specifický glykoprotein, který má stěžejní úlohu v udržování homeostázy. Gen pro inzulin je lokalizován na krátkém raménku 11. chromozomu a jeho expresí vzniká v  $\beta$  buňkách Langerhansových ostrůvků inzulin. Prvním krokem v syntéze inzulinu je tvorba preproinzulinu v ribosomech. Účinkem proteáz je v endoplasmatickém retikulu preproinzulin přeměňován na proinzulin, který je tvořen inzulinovými řetězci A a B spojenými spojovacím

peptidem. Proinzulin je transportován do sekrečních granul  $\beta$  buněk, kde je v Golgiho aparátu rozštěpen proteasami na C-peptid a inzulin. Inzulin má nižší rozpustnost, proto precipituje s ionty zinku a je spolu C-peptidem a proinzulinem skladován v sekrečních granulech  $\beta$  buněk. Inzulin se uvolňuje z  $\beta$  buněk procesem exocytosis, při němž sekreční granula přimknou k buněčné membráně a přes ni se vyprázdní. Ke zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v  $\beta$  buňce může dojít buď přestupem extracelulárního kalcia uvolněním voltáž-dependentních či jiných  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů, nebo vyprázdněním intracelulárního poolu v endoplasmatickém retikulu. Proces biosyntézy inzulinu trvá přibližně 30-120 minut. Podmínkou pro nastartování syntézy inzulinu je vzestup ATP. Koncentrace glukózy nutné ke stimulaci biosyntézy inzulinu jsou vyšší než hladiny potřebné k vyvolání sekreční odpovědi. Ta je za fyziologických podmínek zajištěna z pohotovostní zásoby inzulinu v granulech, které mohou být použita v prvních třiceti minutách po příjmu potravy. Inzulin se váže na specifický inzulinový receptor. Následuje kaskáda fosforylačně-defosforylačních reakcí, při níž je atakována řada intracelulárních proteinů, jejichž konečným cílem je např. syntéza a aktivace enzymů metabolických drah, aktivace transportérů glukózy či ovlivnění nukleárních transkripčních faktorů (Pelikánová 2010).

Klinicky nejzávažnější poruchu glukózové tolerance představuje diabetes mellitus. Je definován jako stav chronicky zvýšenou glykemií, která může být spojena s klinickými syndromy (žízeň, polyurie, pokles hmotnosti, poruchy vědomí) popř. může vést při nedostatečné léčbě k úmrtí. Pro diabetes je charakteristický sklon ke vzniku dlouhodobých komplikací ledvinných, očních, nervových a sklon k rozvoji aterosklerosy srdce, dolních končetin a mozku. Přesná etiopatogenetická charakteristika není dosud možná, sama definice choroby je ryze popisná.

Chronické diabetické onemocnění ledvin je provázeno obzvlášť vysokou morbiditou a mortalitou a přežívání pacientů po dosažení stadia selhání ledvin je v průběhu 5 let nižší než 35% a je zhruba poloviční než u osob bez diabetu. Nejsou-li mikro- a zejména makrovaskulární komplikace diabetu v tomto stadiu již kontraindikací, může kvalitu i délku života zásadně změnit správně indikovaná a včas provedená transplantace ledviny. To platí jak pro příjemce s diabetem 1., tak i 2. typu (Saudek 2011).

Diabetes se dělí na diabetes 1. typu (T1D), dříve označovaný jako inzulin-dependentní (IDDM) a diabetes 2. typu (T2D), dříve označovaný jako inzulin-nondependentní (NIDDM). Klasický inzulin-dependentní diabetes je na léčbě inzulinu vitálně závislý a bez inzulinu je tedy tento stav s životem neslučitelný. Naproti tomu T2D může být léčen inzulinem ke zlepšení kompenzace, ale bez inzulinu není bezprostředně vitálně ohrožen samotným

diabetem. T1D má hladinu inzulínu nebo C peptidu výrazně sniženou nebo nulovou, T2D má inzulín a C peptid v krvi přítomen, někdy i ve vyšších hodnotách. U T1D se nachází často známky autoimunitního postižení  $\beta$  buněk. Z klinického hlediska vzniká T1D obvykle v dětství nebo v mládí a nebývá spojen s obezitou, T2D vzniká v dospělém věku a obezita je u něho častá.

Termínem LADA (Latent Autoimmune Diabetes of Adults) se označuje autoimunitní diabetes, čili T1D, manifestovaný v dospělosti pozvolným nástupem, kdy pacient zůstává bez inzulínu minimálně 6 měsíců po stanovení diagnózy. Jeho výskyt se předpokládá asi u 10 % dospělých diabetiků.

Monogenní formou diabetu je MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young), tj. diabetes mellitus, který se řadí mezi metabolický diabetes, čili T2D, ale manifestuje se do 25. roku života. Je autozomálně dominantně dědičný. Dělíme ho na glukokinázový diabetes (MODY2) a diabetes transkripčních faktorů (MODY1, MODY3, MODY4, MODY5, MODY6). Obecným jmenovatelem diabetu transkripčních faktorů je genetický defekt některého transkripčního faktoru  $\beta$  buněk pankreatických ostrůvků, který ovlivňuje jeho vývoj a funkci. Funkce  $\beta$  buněk začíná selhávat v pozdním dětství, v adolescenci nebo v časně dospělosti. Nemoc se manifestuje perzistentní hyperglykemií, většinou bez ketoacidózy. Postupně dochází k rychlé progresi zhoršování funkce  $\beta$  buněk a rozvíjí se diabetes mellitus s nutností léčby inzulínem nebo perorálními antidiabetiky (PAD). Odhaduje se, že v České republice nejméně 5000 pacientů trpí diabetem transkripčních faktorů. MODY2 představuje poruchu enzymu glukokinázy, který je senzorem  $\beta$  buněk pro glukózu. Pro onemocnění je typická chronická mírná hyperglykémie, která trvá od narození do smrti, s minimální progresí během života. U žen je v těhotenství MODY2 zodpovědný za 3 % případů gestačního diabetu mellitu. MODY2 se vyskytuje asi v 65 % všech MODY. Porucha je vždy asymptomatická, MODY2 se diagnostikuje s náhodně zjištěnou hyperglykemií. Mezi dětmi a dospívajícími je prevalence MODY2 více než 50 %. MODY7 představuje mutaci v genu KLF11 (Kruppel-like transcription factor 11). KLF11 patří do rodiny transformačních růstových faktorů (TGF), které regulují buněčný růst. Hraje významnou roli v řízení exprese inzulínového genu. Mutace v genu pro karbonyl-ester lipázu (CEL) se označuje jako MODY8. Tato porucha byla prokázána u rodin s autozomálně dominantně dědičnou formou diabetu spojenou s dysfunkcí exokrinního pankreatu (Ellard et al. 2008).

Diabetes mellitus patří do skupiny onemocnění, na kterých se podílejí jak vlivy genetické, tak vlivy zevního prostředí. Etiopatogenetické mechanismy T1D a T2D se liší (viz tab. 1). U T1D je o faktory, které ovlivňují autoimunitní děje. Manifestaci často předchází

infekce nebo stres. Viry mohou měnit antigenní struktury buněk, takže se proti nim nastartuje autoimunitní reakce. U T2D se za rizikové faktory obecně považuje obezita a změna životního stylu, tzv. urbanizace. Ta zahrnuje jednak snížení fyzické aktivity, jednak zásadní změnu dietních návyků, k níž patří zvýšená konzumace tuků, zejména nasycených a volných cukrů, nedostatek vlákniny a nadbytečný energetický příjem. Stoupá rovněž výskyt a intenzita psychických stresů. (Stárka et al. 1997). V České republice došlo v posledních 3-4 letech ke zpomalení vzestupu incidence T1D u dětí. Ještě před 20-30 lety byl T1D považován za onemocnění mladých jedinců s typickou manifestací před 35. rokem věku. Dnes se ví, že se autoimunitní diabetes může manifestovat v jakémkoliv věku (Vavřínek 2008).

**Tabulka 1: Rozdíly v klinickém obraze diabetické nefropatie mezi T1D a T2D**

(Bouček, Bartoš, 2010)

	<b>T1D</b>	<b>T2D</b>
Vznik diabetu	klinicky manifestní	neurčitý
Albuminurie jako projev incipientní nefropatie	pravidelně přítomna	nespolehlivá, především vaskulární rizikový faktor
Proteinurie jako projev manifestní nefropatie	pozdní	častá vzhledem k delšímu latentnímu průběhu diabetu
Nefrotický syndrom	relativně častý	méně častý
Hypertenze	pozdní, sekundární	časná, často primární (esenciální)
Diabetická retinopatie	prakticky vždy progredující	méně častá, kombinované oční změny
Jiné příčiny renálních změn	méně častě	relativně časté
Průběh choroby	dobře definovaná, progredující	hůře definován, často modifikován aterosklerotickými komplikacemi

V současnosti je diabetes mellitus nejčastější příčinou chronického selhání ledvin. V roce 2008 bylo v České republice postiženo diabetem 40 % hemodialyzovaných pacientů (Rychlík 2009), u kterých byla zjištěna renální osteopatie. Renální kostní postižení je u hemodialyzovaných diabetiků závažnější než u dialyzovaných nediabetiků (Nishitani 1991). Kostní nemoc je u diabetiků v hemodialyzačním (HD) programu obvykle charakterizována nízkým kostním obrátem, jehož příčinou je zejména narušená sekrece PTH (Inaba 2002) či

dysfunkce osteoblastů. Nízký PTH a nízký kostní obrat jsou hlavními rizikovými faktory obratlových fraktur u HD pacientů vůbec. Úbytek kostní hmoty byl prokázán u diabetiků 1. typu již časně v průběhu diabetické nefropatie ve stadiu mikroalbuminurie (MAU). MAU jakožto marker poškození endotelu kapilár a následného narušení mineralizace byla asociována s nižší BMD v oblasti krčku femuru, vyšší hladinou hydroxyprolinu, ALP, kALP i v další studii (Goliat 1998). S ohledem na riziko fraktur se ukazuje, že prevalence vertebrálních fraktur je u starších HD diabetiček 2. typu přibližně 3x vyšší než u nediabetiček bez ohledu na věk, délku HD léčby, hladiny PTH, kalcia a fosfátů. Hlavní příčina je spatřována v akumulaci mikrofraktur v důsledku nízkého kostního obratu. Důležitou roli hrají AGE, jejichž sérová a tkáňová akumulace v rámci CHSL, dialyzační léčby a diabetu samotného se může v dopadu na kostní matrix sčítat (Makita et al. 1991). V uvedené studii korelovaly narůstající hladiny AGE s progresí diabetické nefropatie.

Diabetická makroangiopatie je souhrnné označení pro aterosklerotické projevy na velkých (elastických a muskulárních) tepnách diabetiků. Příčinou jsou změny průsvitu až uzávěry tepen, k nimž vedou tukové, vazivové a trombotické změny medie a intimy. Neexistují žádné specifické morfologické změny, které by odlišily makroangiopatii u nemocných trpících diabetem od aterosklerotických změn u nediabetických pacientů. Rozdíly jsou pouze kvantitativní. Ateroskleróza u diabetických pacientů se vyskytuje 4x častěji, u žen stejně často jako u mužů. Makroangiopatie vzniká u mladších jedinců a rychleji progreduje, postižení je difuznější a týká se i menších cév. U T2D se uplatňuje kumulace rizik podmíněná přítomností metabolického syndromu, inzulínové rezistence a jejich projevů, jako je hyperinzulinemie, hypertenze, dyslipidemie, subklinický zánět, nahromadění viscerálního tuku, poruchy fibrinolýzy a vyšší trombogenní potence. U pacientů s T1D se výskyt aterosklerosy urychluje v souvislosti s dyslipoproteinemií a sekundární hypertenzí při pokročilejším stadiu diabetické nefropatie. Ateroskleróza se pak klinicky manifestuje jako ischemická choroba srdeční (ICHS), ischemická choroba dolních končetin (ICHDK) a ischemická choroba nervového systému (ICHCNS) (Pelikánová 2010).

Diabetická polyneuropatie patří mezi orgánové komplikace diabetu a spolu s nefropatií a retinopatií je někdy zahrnována do tzv. diabetické triopatie. Je to porucha funkce periferních nervů, která se projevuje subjektivními nebo objektivními známkami postižení periferních nervů. Nejvýznamnějším patogenetickým činitelem vzniku diabetické neuropatie je hyperglykémie. Jde o výsledek kombinace vzájemně souvisejících patogenetických mechanismů, které poškozují nervová vlákna, a podporné buněčné elementy přímo nebo prostřednictvím účinku na endotelie vasa nervorum způsobujících hypoxii nervu. Nacházíme



poškození axonu, myelinové pochvy, Schwannových buněk, intersticia, perineuria a cév. Současně probíhají oba procesy, tj axonální degenerace a segmentální demyelinizace (Vondrová, Bouček 2010).

Počet evidovaných diabetiků se stále zvyšuje. Zatímco v roce 1975 bylo evidováno 234 071 nemocných, k 1. 1. 2009 se léčilo celkem 773561 osob, z toho T1D bylo 54 474 (7%), T2D bylo 708847 (91,6%). Ročně přibývá dalších několik desítek tisíc nemocných a od roku 1985 se počet diabetiků zdvojnásobil. Statistika registruje také 50 619 osob s porušenou glukosovou tolerancí. V roce 2008 bylo registrováno 27% léčených diabetiků se závažnějšími zdravotními problémy v podobě pozdních komplikací. Nejčastější diabetickou komplikací byla diabetická retinopatie, na druhém místě diabetická nefropatie a třetí místo patřilo syndromu diabetické nohy. Incidence T1D má svůj vrchol ve věku mezi 13 až 15 lety a pohybuje se kolem 20ti případů na 100 000 obyvatel. Česká republika spolu s dalšími státy střední Evropy patří mezi státy s nejvyšším meziročním nárůstem incidence T1D u dětí mladších 15ti let. Incidence má trvale vzestupný trend s ročním přírůstkem v průměru o 0,85 případu na 100 000 dětí za rok (Bartoš 2010). T2D se vyskytuje v různé četnosti u všech ras a národů. Nižší prevalence je u Eskymáků, nevyšší u indiánů kmene Pima v Arizoně. V Evropě je nízká prevalence ve skandinávských zemích, relativně vysoká v jižní Evropě.

Mortalita je u diabetiků vyšší než u nediabetiků, ale přesné údaje chybějí, neboť zejména u T2D jsou příčiny smrti uváděny především pod diagnózou aterosklerotických komplikací. U T1D je střední přežívání po stanovení diagnózy 36 roků a průměrný věk v době smrti je 49 let. Po 20 letech trvání diabetu převažuje jako příčina smrti diabetická nefropatie, u lidí nad 40 let úmrtí z kardiovaskulárních příčin (Pelikánová et al. 2010).

Vliv genetických faktorů se zkoumal u jednovaječných dvojčat. Konkordance ve výskytu diabetu je 50% u T1D a až 80% T2D. Častěji se také výskyt diabetu vyskytoval u blízkých pokrevních příbuzných diabetiků (Stárka et al. 1997).

### Ledvinové onemocnění u diabetiků

Diabetická nefropatie (DN) patří mezi mikrovaskulární komplikace diabetu mellitu. Vzniká po dlouhodobé expozici patogenních faktorů. Je charakterizována proteinurií, hypertenzí a postupnými zhoršením renálních funkcí (viz tab. 2). Hlavním klinickým příznakem je mikroalbuminurie.

Proteinurie znamená přítomnosti bílkoviny v moči v množství přesahujícím 150 mg/24 hodiny. Jako malou proteinurii označujeme takovou, při které vylučování bílkoviny nepřesahuje 1,5 g/24 hod. Středně velká proteinurie se pohybuje v rozmezí 1,5 – 3,5 g/24 hod.

Proteinurii nad 3,5 g/24hod označujeme jako velkou. Při některých ledvinných onemocněních (tzv. nefrotickém syndromu) proteinurie může dosáhnout 10 -20 g/24 hod., ale i vyšších hodnot. Při selektivní proteinurii se vylučuje výhradně albumin. Při neselektivní proteinurii je do moče vylučován nejen albumin, ale i další typy globulinů, transferin, fibrinogen, vazebné bílkoviny pro vitamíny, hormony apod. Albumin i zde tvoří většinou kolem 80 %.

V počínajících stádiích u diabetické hypertenzní nefropatie dochází k malému abnormálnímu zvyšování vylučování albuminu. Tento typ proteinurie se nazývá mikroalbuminurie. U normálního dospělého člověka vylučování albuminu nepřevyšuje 30 mg/24 hod. Při mikroalbuminurii se vylučování albuminu pohybuje v rozmezí 30 -300 mg/24 hod (Teplan 2003).

Nejčasnější známkou je hypertrofie ledvin, která je spojena se vznikem diabetické nefropatie, a která se různým poměrem podílí na hemodynamických a metabolických faktorech a změnách regulace růstu renálních buněk.

Mezi hemodynamické faktory patří: diabetická hyperfiltrace a následné změny renální hemodynamiky. Na patogenezi změn pojiva při diabetu se podílí změny hemodynamiky, neenzymová glykace, polyolová cesta, proteinkinasa C, hexozaminová signalizační cesta a působení reaktivních forem kyslíku. Odchytky v průtoku krve ledvinami jsou důsledkem působení lokálních regulátorů cévního fokusu. Vazodilatačně působí oxid dusnatý (NO, EDRF) či prostanoidy (prostacyklin, PGI<sub>2</sub>), vazokonstrikčně působí tromboxan, endotelin či angiotenzin II. Tonus cév je pak výsledkem rovnováhy obou systémů. V diabetické ledvině dochází v glomerulu ke zvýšené konstrikci vas efferens, a tím ke zvýšení intraglomerulárního tlaku, neboť převažuje vazokonstrikčně působící systém.

## **Tabulka 2: Klinická stadia diabetické nefropatie a období jejich vzniku u T1D**

(Bouček, Bartoš 2010)

<b>stadium</b>	<b>trvání diabetu (roky)</b>
incipientní nefropatie (mikroalbuminurie)	10 – 15
manifestní nefropatie (proteinurie)	15 – 20
renální insuficience (pokles glomerulární filtrace)	>10 – 15
chronické selhání ledvin a náhrady funkce ledvin	>15 – 20

Diabetes mellitus se vyznačuje porušenou utilizací glukózy, která vede k jejímu hromadění v extra i intracelulárním prostoru. Proteiny mohou spontánně vázat glukózu

kovalentní vazbou, a tedy ji integrovat do své molekuly. Tento proces probíhá bez katalytického působení enzymů, a toto se označuje jako neenzymová glykace proteinů. Nejdříve vzniká nestabilní Schiffova báze aldimin, která se poté přesmykuje na ketoamin, později přechází na pokročilé produkty glykace (advanced glycation endproducts = AGE). Neenzymová glykace způsobuje jak strukturální, tak funkční odchylky proteinů. Např. v případě kolagenu jde o změnu pevnosti, elasticity či odolnosti k proteázám, podmíněné příčnými vazbami mezi proteinovými řetězci zprostředkovanými AGE. Glykace strukturálních proteinů membrán, např. krvinek, vede ke změně jejich agregability a deformability. V bazálních membránách kapilár dochází k dezintegraci jejich struktury s následnou poruchou permeability. Závažná je tvorba pozdních produktů glykace. Vedle receptorů, které se podílejí na jejich odstranění a které působí tudíž protektivně, existují i receptory na mikrofázích a na dalších buňkách (tzv. RAGE), které po vazbě AGE spouštějí kaskádu aktivačních reakcí vedoucích až k funkčním i morfologickým změnám tkání či orgánů (Škrha 2010).

Nadměrná nabídka nezpracované glukózy může v buňkách nezávislých na inzulínu, akcentovat alternativní zpracování, které vede k tvorbě sorbitolů účinkem aldózoreduktázy, jejíž aktivita je u diabetu zvýšena. Nahromaděný sorbitol působí osmoticky aktivně, což může ovlivnit „nasávání“ vody do buňky. Změny osmotických gradientů mohou vést až k zániku postižených buněk. Současně byl pozorován pokles obsahu myoinozitolu a aktivity Na/K-ATPázy v buňkách. Jde o poruchu elektrochemické integrity jejich membrán. Hlavním důsledkem vystupňované polyolové cesty není hromadění sorbitolu, ale zvýšená spotřeba NAD způsobená oxidací sorbitu na fruktózu za katalýzy sorbitoldehydrogenázy. Tento děj posouvá rovnováhu NAD/NADH v neprospěch oxidované formy, nastává tzv. hyperglykemická pseudohypoxie (Škrha 2010).

Proteinkinása C (PKC) je skupinou serinových/threoninových kináz, které se účastní řady signálů přenášených do buňky. PKC zasahuje do regulací různých reakcí ovlivňujících zejména cévní permeabilitu, kontraktilitu, proliferaci buněk, syntézu bazální membrány, ale také mechanismy přenosu signálů hormonů a cytokinů. Hyperglykémie vede jednak ke zvýšené syntéze diacylglycerolu, který aktivuje PKC, jednak stimuluje genovou expresi PKC, a to zejména jejího  $\beta$ -izoenzymu. PKC zasahuje jak do enzymových a genových regulací, tak ovlivňuje také syntézu oxidu dusnatého. Aktivovaná PKC má podle současných znalostí klíčovou úlohu v patogenezi cévních změn. Je také stimulatorem NAD(P)H oxidázy, která se přímo podílí na tvorbě superoxidového anionu a tím zesiluje oxidační stres a jeho následky.

Glukóza se rychle fosforyluje po vstupu do buňky na glukóza-6-fosfát, který se konvertuje na fruktóza-6-fosfát a dále se metabolizuje cestou glykolýzy. Část fruktóza-6-fosfátu se přeměňuje za přítomnosti glutaminu (katalyzátor glutaminfruktóza-6-P=GFAT) na glukozamin-6-fosfát. Tato reakce byla označena jako hexozaminová signalizační cesta a enzym GFAT je jejím limitujícím regulátorem. Jedním z významných následků této cesty je rozvoj inzulinové rezistence a tím zhoršení transportu glukózy do buňky.

Hydroxylové skupiny glukózy se mohou účastnit přeskupení elektronů a tím se podílet na vzniku reaktivních radikálů. Podstatou oxidačního stresu je posunutí rovnováhy mezi systémem tvořícím reaktivní formy kyslíku a systémem zametačových (scavengerových) mechanismů. Molekuly monosacharidů se mohou přímo autooxidovat, což vyplývá z jejich struktury, a přítomnými náboji narušovat okolní struktury. V iniciační fázi procesu aterosogeneze se díky oxidačnímu stresu vážou monocyty na endotel cév (Škrha 2010).

Aby mohla být stanovena diagnóza diabetické nefropatie, musí být splněny určité parametry týkající se zdravotního stavu nemocného. Klinicky se projevuje morfologickými a funkčními změnami ve všech oddílech nefronu. Diagnostické postupy se v průběhu let vyvíjí. Byly vybrány 4 parametry, které nejlépe charakterizují diabetickou nefropatii: glomerulární filtrace, mikroalbuminurie, klinická proteinurie a strukturální léze.

Za významný predikční faktor diabetické nefropatie se považuje rodinná anamnéza hypertenze. Arteriální hypertenze je definována jako hodnoty systolického nebo diastolického krevního tlaku u dospělých jedinců (do 64 let) 140 mm Hg (18,7 kPa) a vyšší u tlaku systolického a 90 mm Hg (12,0 kPa) a vyšší u tlaku diastolického. Vzájemný vztah mezi hodnotou systémového tlaku a funkcí ledvin je znám dlouhou dobu. Onemocnění ledvin je často příčinou sekundární hypertenze (renovaskulární a renoparenchymatózní) a naopak primární arteriální hypertenze způsobuje závažné morfologické změny v ledvinách (vaskulární nefroskleróza). Arteriální hypertenze urychluje progresi chronických renálních onemocnění. Těžká neléčená hypertenze vede k rychlému selhání funkce ledvin (maligní nefroskleróza). Hypertenze urychluje i degenerativní změny cévní stěny a zvyšuje riziko aterosklerotických komplikací. Primární (esenciální) hypertenze představuje kolem 90 % všech případů zjištěné hypertenze. Zbývajících 10 % tvoří hypertenze sekundární. Téměř 75 % případů sekundární hypertenze má renální etiologii (Teplan 2003).

Klíčová role byla přisouzena systému renin-angiotenzin, který ovlivňuje kardiovaskulární systém a diabetickou nefropatii (viz tab. 3). Renin je glykoprotein syntetizovaný v juxtaglomerulárním aparátu ledvin. Konvertuje angiotenzinogen (AGT) na

angiotenzin I (Ang I). Angiotenzin konvertující enzym odštěpuje dipeptid na Ang I a tím vzniká angiotenzin II (Ang II). Zároveň inaktivuje vazodilatátor bradykinin. Ang II je účinný vazokonstriktor, stimulator sekrece aldosteronu a reabsorpce sodíku. U genu pro renin byly studovány čtyři polymorfizmy. Všechny čtyři se nacházejí mimo kódující oblast genu. Jedná se o dvě bodové mutace C-T (záměna thyminu za cytozin) a dva mikrosatelity, (ACAG)<sub>n</sub> mikrosatelit a CA-opakování. Jejich vztah k diabetické nefropatii však jasně prokázán nebyl (Tarnow et al. 1974).

Recesivní mutace genu pro renin způsobující úplnou ztrátu jeho syntézy, vede k poruše vývoje renálních tubulů. Dominantní mutace v signální sekvenci genu pro renin způsobuje chronické selhání ledvin doprovázené hyperurikémií a anémií. Renin je syntetizován jako preprorenin o 406 aminokyselinách s N-terminální signální sekvencí tvořenou 23 aminokyselinami, následovanou 43 aminokyselinami, které jsou součástí proreninu, ale jsou enzymaticky odštěpeny při vzniku aktivního reninu. Delece nukleotidů 45-47 vyvolává náhradu leucinu argininem v pozici 16, snižuje hydrofobicitu signální sekvence, ale neovlivňuje odštěpení signální sekvence a vznik proreninu. Exprese mutované varianty v HEK293 buňkách ukázala sníženou translokaci na membráně endoplazmatického retikula mutované varianty reninu ve srovnání s divokou variantou. Akumulace abnormálně svinutého proreninu (u pacientů s delecí v signální sekvenci) aktivuje v endoplazmatickém retikulu stresovou reakci, jejímž důsledkem může být postupná destrukce reninu syntetizujících buněk juxtaglomerulárního aparátu a abnormálně zvýšená syntéza reninu v cévní stěně arteriol a malých tepen. Postupný vývoj chronického selhání ledvin u pacientů s dlouhodobou mírnou poruchou syntézy reninu ukazuje, že příliš výrazná inhibice systému renin-angiotensin-aldosteron nemusí být výhodná (Živná et al. 2009).

Pro gen AGT bylo popsáno 15 polymorfismů, ale jen u dvou z nich dochází k záměně aminokyselin (threonin místo methioninu, methionin místo threoninu). Protein AGT se podílí na hypertenzi (Rogus & Moczulski 1998, Schmidt & Borgis 1996). Homozygoté měli naměřenou nejvyšší hladinu AGT v plazmě. Některé studie však nepotvrzují vztah polymorfismu genu reninu a genu antiotenzinogenu ke vzniku diabetické nefropatie (Mochulski et al. 1998).

Arteriální hypertenze je klíčovým faktorem, který urychluje progresi diabetické nefropatie u pacientů trpících diabetem 1. nebo 2. typu. Prevalence hypertenze je rozdílná nejen v jednotlivých stadiích diabetické nefropatie, ale liší se i obou typu diabetu. Hypertenze se vyskytuje u diabetu 1. typu jako u ostatní věkově shodné populace. Hypertenzi trpí u

diabetu 2. typu asi třetina pacientů. Zvýšená hladina inzulinu zvyšuje reabsorpci natria v ledvinných tubulech. U nefrologicky nemocných pacientů před rozvojem chronického selhání ledvin byla zjištěna 15% prevalence inzulinové rezistence (Dzúrik, Spustová 1995).

**Tabulka 3: Účinky angiotenzinu II s možným podílem na vývoji diabetické nefropatie**  
(Bouček, Bartoš 2010)

<b>HEMODYNAMICKÝ</b>
Indukce systémové vazokonstrikce
vzestup glomerulárního kapilárního tlaku
redukce glomerulární filtrační plochy
vzestup glomerulární permeability
<b>PRODUKTIVNÍ</b>
stimulace produkce trofických cytokinů
stimulace syntézy součástí extracelulární matrix a její přeměny
indukce poškození podocytů
<b>TRANSPORTNÍ</b>
stimulace reabsorpce Na a vody v tubulech

Prevalence hypertenze u věkově starších, nově diagnostikovaných diabetiků 2. typu s normoalbuminurií je podstatně vyšší než u diabetiků 1. typu s normoalbuminurií. S vývojem mikroalbuminurie a klinické albuminurie (proteinurie) se prevalence hypertenze zvyšuje současně při diabetu 1. a 2. typu, avšak stále převažuje podíl hypertenzních diabetiků 1. typu. Pro diabetika je mimořádně nebezpečná kombinace arteriální hypertenze a proteinurie. V rozsáhlé epidemiologické studii WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes byl v období 1975-1987 vyhodnocen koeficient standardní mortality v náhodně vybraném vzorku 4717 diabetiků ve věku 35 až 55 let. Pacienti s hypertenzí a proteinurií měli překvapivě vysoké riziko úmrtnosti u obou typů diabetu a obou pohlaví. Vyšší mortalita byla dokonce zjištěna u diabetiků 1. a 2. typu bez proteinurie a bez hypertenze (Wang, Head 1996).

Epidemiologické studie poukazují na přetrvávající stav neuspokojivého počtu diabetiků s proteinurií a hypertenzí, kteří jsou adekvátně léčeni antihypertenzivy. Přitom výsledky prospektivní studie jednoznačně ukázaly, že po 16 letech antihypertenzní léčby diabetiků 1. typu s nefropatií byla kumulativní úmrtnosti 45 %, tedy podstatně nižší než v jiných studiích při méně intenzivní léčbě (Parving et al. 1996).

### 1.1.1. Patofyziologie

Albuminurie neboli vylučování albuminů močí je prediktorem nejen ledvinného onemocnění a selhání ledvin, ale hlavně prediktorem aterosklerotických vaskulárních chorob a také kardiovaskulární i celkové úmrtnosti (Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium 2010). Riziko kardiovaskulárních (KV) nemocí plynule roste s množstvím vyloučeného albuminu, a to již od nižších hodnot, než udává současná definice mikroalbuminurie (Ratto E, 2006). Mikroalbuminurie je výrazem spíše zvýšené propustnosti cévní stěny (resp. glomerulů) spojené s endotelovou dysfunkcí a aterosklerózou. Makroalbuminurie je spíše výrazem poškození glomerulů při primárním renálním onemocnění. Mikroalbuminurie se objevuje v časně fázi hypertenzní nefropatie, tj. postižení ledvin vlivem vysokého krevního tlaku (TK). Nejen diastolický, ale hlavně systolický TK je nezávislým rizikovým faktorem selhání ledvin. Nejčastější renální komplikací esenciální hypertenze je benigní nefroskleróza (resp. nefroangioskleróza), která se vyskytuje asi u 15 % léčených nemocných s esenciální hypertenzí (Campo 2002). Hypertenzní nefroskleróza vzniká působením vysokého TK na glomeruly, které se zpočátku brání konstrikcí aferentních arteriol, ale později dochází k jejich vazodilataci a vysoký TK se dostává do mikrocirkulace ledvin. Dochází k hyperperfuzi a hyperfiltraci, k prostupu albuminů do intersticia a do primární moče. Jsou poškozeny malé arterie vyživující glomeruly i samotné glomeruly, v nichž se zmnožuje kolagen a vzniká hyalinóza aferentních arteriol. Vzniká fokální i segmentální glomeruloskleróza a postupně dochází k redukci glomerulární filtrace. Také v intersticiu dochází ke strukturálním a funkčním změnám: intersticiu je infiltrováno zánětlivými buňkami, dochází k fibrotizaci intersticia a atrofizaci stěn tubulů.

U každého člověka po 35. roce věku klesá filtrační funkce ledvin asi o 0,5-1 ml/min/rok. Krevní tlak nad 110 mmHg, nebo přítomnost diabetu mellitu a nejvíce současný výskyt DM a hypertenze zhoršují tento pokles až 10 krát. V současné době se sleduje, tzv. kardio-renální kontinuum, což je riziko pro KV i renální onemocnění typické pro nemocné s DM a arteriální hypertenzí. Hlavní roli v něm hraje RAS, který je hlavním regulačním systémem pro TK, ale také reguluje schopnost cév bránit se poškození vlivem TK i metabolických poruch typických pro DM (Rosolová 2012).

Neléčená diabetická nefropatie přechází do stadia chronické renální insuficience a ledvinového selhání. Chronická renální insuficience je takové onemocnění, kdy ledviny nejsou schopny udržet normální složení vnitřního prostředí, tj. dojde ke změnám extracelulární tekutiny. Snížení přibližně do 75 % hodnoty fyziologické glomerulární filtrace

nevede ke změnám ve složení vnitřního prostředí. Toto stadium nazýváme snížená renální funkční rezerva. Nejjednodušší způsob posouzení funkce ledvin je vyšetření sérového (plazmatického) kreatininu (Teplan 2003).

### 1.1.2. Epidemiologie

Epidemiologický průzkum týkající se diabetické nefropatie je velice nepřesný. Neexistuje jednotná klasifikace příznaků, které by byly dostačující k epidemiologické studii. Přesnější a rozsáhlejší průzkumy na toto téma začaly až s nástupem, resp. nárůstem počtu dialyzačních středisek. Např. v letech 1984-1994 byl pacientů trpících diabetickou nefropatií kolem 8 % (Lochmanová 2003). Diabetická nefropatie se ve vyspělých zemích stala nejčastější příčinou chronického selhání ledvin a největší mírou se podílí na chorobách a úmrtích diabetiků. Vysoká mortalita proteinurických diabetiků s hypertenzí je důsledkem nejen samotného konečného stadia selhání ledvin, ale i průvodních kardiovaskulárních cerebrovaskulárních chorob (Wang, Head 1996). Diabetická nefropatie se zřídka objevuje před 10. rokem trvání diabetu, její incidence se zvyšuje mezi 13. až 20. rokem a po 20. roce klesá (Andersen et al. 1983). Riziko vývoje diabetické nefropatie u normoalbuminurických diabetiků 1. typu s trváním diabetu delším než 30 let je nízké. Prevalence všech stadií diabetické nefropatie může po 20 letech trvání diabetu 1. typu dosáhnout 30- 40 % (Warra et al. 1996). Kumulativní incidence proteinurie po 25 letech trvání diabetu 1. typu byla 50 % při začátku diabetu před rokem 1942, klesla na 30% při začátku diabetu v 50. letech a dále se snížila na 9% při začátku diabetu ve druhé polovině 60. let (Bojesting et al. 1985) (Krolewski et al. 1994) ( Rossing et al. 1995). V celoevropské průřezové (transverzální) studii ERODIAB IDDM Complications Study se ve skupině 3250 diabetiků 1. typu s průměrným trváním diabetu 14,7 let zjistila prevalence mikroalbuminurie 20,7 % a v jednotlivých 5letých intervalech trvání diabetu se pohybovala v rozmezí 18 až 25 %. Celková prevalence makroalbuminurie byla 8,8 % a po letech trvání diabetu dosáhla 19 % ( EURODIAB IDDM Complications Study Group). Do populační studie DIANEBA se zapojilo 13 diabetologických ambulancí v Bratislavě, kde bylo evidováno 640 dospělých diabetiků 1. typu. Lékaři zjišťovali výskyt mikroalbuminurie, klinicky významné proteinurie a renální insuficience (s-kreatinin  $\geq 180 \mu\text{mol/l}$ ). V souboru bylo 412 diabetiků 1. typu, z nichž 16,7 % mělo mikroalbuminurii. Pokud trval diabetes 11-15 let, mikroalbuminurie se vyskytla ve 22 %, pokud trval 16-20 let, byla 20 %. Celých 69 % diabetiků s mikroalbuminurií užívalo ACE inhibitory. Při 21-25 let trvání diabetu byla 32 % prevalence proteinurie. Chronickou renální insuficienci mělo 9,4 % diabetiků a dialyzovaných bylo 2,3 % (Pont'uch, Hozlárová 2002).



Diabetici 2. typu mají celkovou prevalenci mikroalbuminurie kolem 30 % a proteinurie kolem 45 %. Tyto údaje se týkají diabetiků z USA nekavkazoidního původu. Indiáni Pima mají prevalenci selhání ledvin 4krát vyšší než diabetici 2. typu bílé rasy. Vysoký výskyt je u amerických černochů, hispánců a azijských. Výskyt mikroalbuminurie kolísá mezi 12-32 %, výskyt makroalbuminurie mezi 3-37 % (Bennet, Deen, Fuller 2001). I přes demografické nepřesnosti (týkající se podhodnocení nebo nadhodnocení počtu diabetiků, nesprávně zařazení typu diabetu, atd.) můžeme tvrdit, že největší výskyt diabetické nefropatie je u osob vyššího věku a nekavkazoidního etnika (Ritz, Rychlík 1999). Diabetická nefropatie ve vyspělých zemích končí buď hemodialýzou, peritoneální dialýzou nebo transplantací ledvin (renal replacement therapy = RRT). Podle U. S. Renal Data System v letech 1990-1998 zapříčinila konečné stádium selhání ledvin. Zatím co nárůst ostatních ledvinových chorob (polycystitida ledvin, glomerulonefritida a hypertenzní nefroskleróza) nebyl téměř žádný. (U. S. Renal Data System 2001). V Evropě se celková prevalence diabetické nefropatie u diabetiků 2. typu pohybuje kolem 20%. Úměrně se zvyšujícímu průměrnému věku roste také počet diabetiků s nefropatií. V německé studii z 80. let byla 27% kumulativní incidence proteinurie po 20 letech známé diagnózy diabetu 2. typu a 20% incidence po 20 letech trvání diabetu 1. typu. Rozdíl mezi oběma typy diabetiků byl jen malý (Hasslacher et al. 1989). Podle regionálních registrů došlo k výraznému počtu diabetiků léčených RRT. Jednotlivé evropské země se samozřejmě liší: v severních zemích je prevalence vyšší, v jižních relativně nízká. V roce 1998 se hodnotila dialyzační a transplantační aktivita jednotlivých států. V počtu pacientů zařazených do RRT se na prvním místě umístilo Chorvatsko, na druhém Slovinsko a na třetím Česká republika. Česká republika měla nejstarší dialyzované pacienty: 46 % pacientů bylo starších 65 let. Pouze 4 % podíl hypertenzní nefropatie se vyskytoval v České republice a Chorvatsku (Rutkowski 2000).

V České republice bylo v roce 2001 hemodialyzováno 3865 pacientů, z nichž 61 % bylo starších 60. let. Diabetici tvořili 34 % a hypertenze se vyskytovala u 64%. Peritoneální dialýzu využívalo 315 pacientů, z nichž 49 % bylo starších 60. let. Peritoneální dialýzu využilo 33 % diabetiků, hypertenzi trpělo 77 % (Demeš, Vivodová 2001).

Pro srovnání data týkající se Slovenské republiky (podle ÚZIS): v roce 2000 bylo na Slovensku 256 138 diabetiků, toho 20 169 diabetiků 1. typu a 231 356 diabetiků 2. typu. Léčbu inzulinem využívalo 16,5 %, orální antidiabetika 45,7 % a kombinovanou léčbu využívalo 3,7 %. Arteriální hypertenze se vyskytovala u 384 pacientů na 1000 diabetiků. Do hemodialyzačního programu bylo zařazeno 1993 pacientů, z nichž 45 % bylo starších 60 let.

Hemodialyzovaných diabetiků bylo 20,3 %. Peritoneální dialýzu preferovalo 215 pacientů (Demeš, Vivodová 2001).

### 1.1.3. Klasifikace ledvinových onemocnění u diabetiků

Ledvinové onemocnění u diabetiků lze rozdělit na tři hlavní skupiny:

- a) Diabetická nefropatie – nefropatie vzniklá v souvislosti s diabetem
- b) Nediabetická nefropatie – buď glomerulární, nebo neglomerulární
- c) Iatrogenní postižení ledvin

#### a) diabetická nefropatie

Diabetická nefropatie je mikroangiopatická komplikace diabetu mellitu charakterizovaná postižením glomerulů, tubulů a mezangia. Spojená se zbytněním bazální membrány, expanzí mezangia a hyalinizací interkapilárního pojiva a glomerulů. Proteinurie jako dominující znak DN je současně indikátorem generalizovaného cévního postižení a vysokého, zejména kardiovaskulárního rizika. Více než třetina pacientů je odkázána na přístrojovou očistu krve (Teplan, 2003; Bouček, Bartoš 2010).

#### b) nediabetická nefropatie

Nediabetickou nefropatii lze rozdělit na glomerulární a neglomerulární postižení ledvin. Zástupce nejčastěji se vyskytujících nediabetických nefropatií je membranózní glomerulopatie, IgA nefropatie a fokálně segmentální glomeruloskleróza. U neglomerulárního postižení dominuje ischemicko-aterosklerotické postižení a papilární nekróza (Olsen, Mogense 1996; Rychlík, Flise 1999).

#### c) iatrogenní postižení ledvin

Iatrogenní poškození ledvin vzniká hlavně jako projev nefrotoxického efektu podávaných léků nebo kontrastních látek užívaných v radiodiagnostice. Projevy poškození ledvin jsou navíc výraznější u pacientů s již přítomnou chronickou renální insuficiencí a u pacientů se sníženým efektivním krevním objemem (dehydratace, oběhové selhávání atd.). Mezi typické nefrotoxické představitelé patří nesteroidní antiflogistika, aminoglykosidová antibiotika a ACE inhibitory. Nefrotoxicita probíhá jako akutní selhání ledvin (Rychlík et al. 1999).

Diabetickou nefropatii lze rozdělit do 5-ti stádií:

1. stadium *hyperfiltračně hypertrofické* je charakterizováno albuminurií, hyperfiltrací, hyperperfuzí s postupným nárůstem kapilární permeability a následným vznikem renální hypertrofie

2. stadium *latentní* je klinicky bezpříznakové, normalizují se hemodynamické změny. Krevní tlak a albuminurie jsou v normě, glomerulární filtrace zůstává zvýšená. Po několika letech se změny stávají histopatologicky průkazné.
3. stadium *incipientní* je charakterizováno mikroalbuminurií (albuminurie 30-300 mg/24 hodin). Dochází k němu po 10-15 letech trvání diabetu.
4. stadium *manifestní* se diagnostikuje při proteinurii vyšší než 500 mg/24 hod. Krevní tlak je zvýšený. Klesá glomerulární filtrace.
5. stadium *chronického selhání ledvin* je charakterizováno hyperlipoproteinémií, makroangiopatií, autonomní polyneuropatií a hyperkalémií (Pont'uch 2003).

Diabetická nefropatie je většinou příčina nefrotického syndromu u pacientů trpících diabetem. Ale na druhé straně se primární diabetická glomerulopatie u 10 % diabetiků 1. typu a u 30 % diabetiků 2. typu neprojevuje proteinurií. Můžeme uvažovat o nediabetické glomerulopatii, pokud se proteinurie objeví u dětí v prepubertálním období nebo u dospělých s trváním diabetu kratším než 5 let, eventuálně pokud došlo k rychlé progresi proteinurie v průběhu několika měsíců. Při glomerulonefritidě se často vyskytuje mikroskopická erytrocyturie glomerulárního původu. Její přítomnost nevylučuje diagnózu diabetické nefropatie. Při chronické tubulointersticiální nefritidě bývá jen mírný stupeň tubulární proteinurie. Rizikové skupiny diabetiků mají častější relapsy infekcí močových cest, které mohou vést k chronické pyelonefritidě s rozšířením a deformací ledvinné pánvičky a kalichů. Jedním z hlavních příznaků diabetické nefropatie je snížení glomerulárního tlaku, který způsobuje hypertrofii ledvin. Ale i ve stadiu začínající renální insuficience při diabetické nefropatii mohou mít ledviny ještě normální velikost a normální tloušťku parenchymu (Pont'uch 2003).

## **1.2. Genetická predispozice k diabetu a k diabetické nefropatii**

Diabetes mellitus je heterogenní skupinou onemocnění s rozdílnou příčinou, ale podobným průběhem. Diabetes 1. a 2. typu i jejich chronické komplikace se vyvíjejí na genetickém podkladě. Jde o multifaktoriální onemocnění, na jejichž vzniku se podílejí polymorfismy více genů spolu s vlivy prostředí. Přibližně 5 % diabetických pacientů má diabetes způsobený odchylkou jediného genu, tj. monogenně podmíněný diabetes. Byly vytypovány tři geny, jejichž varianty souvisejí se vznikem diabetu 2. typu u všech testovaných populací: *PPAR $\gamma$*  je nukleární receptor, který zasahuje do řady metabolických procesů. Má důležitou roli v diferenciaci a správné metabolické funkci tukové tkáně a uplatňuje se

v procesu inzulínové rezistence. Polymorfismus P12A genu  $PPAR\gamma$  je asociovan s diabetem 2. typu. Tento polymorfismus je součástí kódující oblasti a způsobuje funkční změnu proteinu. *KCNJ11* kóduje Kir6.2 podjednotku  $K_{ATP}$  kanálu  $\beta$  buněk. Polymorfismus I23K genu *KCNJ11* je také asociovan s diabetem 2. typu. *TCF7L2* kóduje transkripční faktor 7-like 2. Varianta rs7903146 asociuje s diabetem 2. typu. V asociačních studiích má tato oblast celkově nejsilnější vazbu ke vzniku T2D, a to ve všech dosud zkoumaných populacích. Všechny testované varianty jsou v intronu, tj. nemění vlastní strukturu proteinu. Varianty *TCF7L2* se podílejí na poruše sekrece inzulínu.

Monogenní formu choroby mohou mít i diabetické komplikace. Projevy Fabryho (Andersenova) choroby se manifestují podobně jako projevy diabetické nefropatie. Mikroalbuminurie progreduje do proteinurie, dále do renální insuficience a terminálního selhání ledvin. Stejně jako u DN se zde projevují multiorgánová postižení. Prvním projevem bývají bolesti, febrilní krize, potom postižení kůže, následuje kardiomyopatie a posléze proteinurie a selhání ledvin, neurologické projevy. Pokud pacienti nejsou léčeni, zpravidla ve čtvrtém nebo pátém deceniu dochází k úmrtí. Příčinou této lyzozomální choroby je mutace genu pro enzym  $\alpha$ -galaktosidazu A. Defekt tohoto enzymu způsobuje hromadění  $GB_3$  (globotriaosylceramidu) v mnoha orgánech. Gen se nachází na chromozomu X, jde tedy o gonozomálně recesivní dědičnosti. Choroba postihuje všechny rasy a vyskytuje se ve všech zemích světa (Jílková 2012).

Změny prostředí vytvářejí druhou polovinu rizika vzniku T2D, kterou lze potenciálně ovlivnit a která se může stát cílem preventivních opatření zaměřených na snížení výskytu T2D v populaci (Průhová & Lébl 2010).

Vliv genetických faktorů se zkoumal u jednovaječných dvojčat. Konkordance ve výskytu diabetu je 50 % u T1D a až 80% T2D. Častěji se také výskyt diabetu vyskytoval u blízkých pokrevních příbuzných diabetiků.

Skutečnost, že diabetická nefropatie postihuje pouze přibližně 30% nemocných (včetně nemocných s dobrou kompenzací, zatímco jiní nemocní nedospějí k postižení ledvin ani po mnoha letech špatně kompenzovaného diabetes mellitus) naznačuje, že existuje genetická predispozice ke vzniku diabetické nefropatie.

Kumulativní riziko pro vznik diabetu mellitu v rodinách probandů s nefropatií je téměř o 50% vyšší než v rodinách diabetických probandů bez nefropatie (Quinn & Angelico 1996, Freedom & Tuttle 1995, Petit & Saad 1990).

Sestavení vícegeneračních rodokmenů brání zemřelí rodiče probandů, neexistence biochemických a genetických markerů diabetu mellitu. Proto se v současné době používají zejména asociační a vazebné studie.

Asociační studie srovnávají výskyt polymorfizmů kandidátních genů mezi skupinou nepříbuzných postižených jedinců a skupinou zdravých kontrol. Sledují, zda jsou zjištěné rozdíly statisticky významné. Vazebné studie se provádějí buď rozsáhlým testováním celého genomu pomocí kompletní sady markerů bez hypotézy kandidátního genu, nebo úzkým testováním daných oblastí DNA obsahující možné kandidátní geny pomocí specifických markerů. Transmisní disekvilibrační test vyšetřuje frekvence přenosu alely, která by mohla souviset s onemocněním, od heterozygotních rodičů k postiženým a nepostiženým potomkům.

Genetická studie je podmíněna komplexní interakcí variant řady genů. Asociační analýza testuje asociace mezi konkrétní genetickou variantou, např. polymorfizmem genu a danou poruchou. Vazebné studie předpokládají sběr dat od velkého počtu příbuzných jedinců, o nichž se předpokládá, že se liší v určitém genu nebo jeho variantách, které ovlivňují vznik dané poruchy, následovaný analýzou přenosu genetických variant v příbuzenských liniích. Hlavním smyslem hledání genetických markerů diabetické nefropatie je jejich možné přispění k časné identifikaci pacientů v riziku této poruchy. Kandidátní geny jsou voleny na základě konceptu multifaktoriální etiologie diabetické nefropatie a zahrnují tyto skupiny:

- 1) geny, které se účastní kontroly krevního tlaku,
- 2) geny, které regulují kardiovaskulární rizikové faktory,
- 3) geny, které ovlivňují glomerulární architektury, zánětlivé procesy a růst,
- 4) geny, které se účastní metabolismu glukózy,
- 5) geny náchylnosti ke vzniku diabetu.

Hypotéza předpokládá, že systémová kapilární vazodilatace vyvolaná hyperglykemií postihuje i řečiště glomerulu. Glomerulární hypertenze je způsobena nerovnováhou mezi dilatací aferentní arterioly a relativní konstrikcí eferentní arterioly. Testuje se přítomnost asociace polymorfizmu těchto genů, které vedou k rozdílné expresi proteinů ovlivňujících aktivitu těchto systémů, např. prostřednictvím ACE nebo angiotenzinogenu (Teplan & Mengerová 2011).

Výzkum, který vyhodnotil polymorfizmus inserce/delece genu ACE, demonstroval signifikantní asociaci mezi genotypem II a normoalbuminurií (Mare & Bernade 1994). Výsledky dalších prací poukázaly na vyšší asociaci genotypu DD s rizikem kardiovaskulárních chorob a diabetické nefropatie ve srovnání s genotypem II (Rujisawa &

Kawacuchi 1998). Výskyt retinopatie u diabetiků 2. typu byl významně častější při genotypu ID, zatímco vztah genotypu ID k diabetické nefropatii byl na hranici statistické významnosti (Rosochová et al. 2000).

Nejsledovanějším genem u DN byl gen pro angiotenzin konvertující enzym, protože obsahuje nejznámější asociovaný polymorfismus inzerce/delece. Tento polymorfismus zodpovídá za polovinu genotypové variance hladiny ACE v plazmě. Přítomnost D alely je spojována s vyššími hladinami ACE. Zdá se, že I/D polymorfismus ovlivňuje nejen vývoj DN, ale má vztah i k nefropatiím jiným, než diabetické etiologie (Schmidt & Ritz 1995, Schmidt & Ritz 1997, Solini & Saller 2002).

Vysoce významné bylo popsání vazby diabetické nefropatie s oblastí na 18. chromozomu (Vardarli et al. 2002). Predispozičním genem, nacházejícím se v této oblasti, je CNDP1, gen kódující karnozinázu štěpící karnozin (Janssen et al. 2005).

Asi 3 % diabetických jedinců trpí poruchou funkce  $\beta$  buněk způsobenou defektem jediného genu. V České republice se to týká přibližně 20 000 nositelů monogenně podmíněného diabetu. Tato forma diabetu se dědí autozomálně dominantně (Elland et al. 2010).

### **1.3. Kalcio-fosfátový metabolismus**

Potravou, hlavně mlékem a mléčnými produkty, ovocem a zeleninou, se organismu denně dodá asi 30 mmol (1200 mg)  $\text{Ca}^{2+}$ . Z tohoto množství se však resorbuje jen 25 až 50 %. Resorpci stimuluje  $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol. Kyselina oxalová a fytinová (myoinositolhexakisfosfát) snižují resorpci vápníku tvorbou nerozpustných solí. Vylučování  $\text{Ca}^{2+}$  probíhá většinou ledvinami, malá část  $\text{Ca}^{2+}$  se také ztrácí potem a střevem. Během laktace se hodně vápníku vyloučí v mléce. V krevní plasmě existuje  $\text{Ca}^{2+}$  částečně jako volný ion, případně jako komplex s organickými kyselinami, částečně (asi 50%) je vázán na proteiny. Specifický nosný protein jako u železa ovšem neexistuje. Celková koncentrace je asi 2,5 mmol/l. Ionty vápníku se podílejí na srážlivosti krve jako faktor IV. Hladina  $\text{Ca}^{2+}$  je v krevní plasmě velmi přesně regulována hlavně hormonem příštítných tělísek – parathyrinem, částečně také jeho antagonistou kalcitoninem (Karlson 1982).

Tělo dospělého člověka by mělo obsahovat průměrně 1000 až 1600 g vápníku. Z toho se ukládá 98 až 99% v kostech jako hydroxyapatit. Minerální fáze na povrchu kostních krystalů je v rovnováze s ionizovanou frakcí extracelulární tekutiny (ECT). Pro život jedince je nejdůležitější jeho ionizovaná frakce, která ovlivňuje nervosvalovou dráždivost, excitační a vodivý systém srdeční, srážlivost krve, permeabilitu buněčné membrány, aktivitu

enzymových reakcí, energetický metabolismus i činnost vnitřně- a zevně sekretorických žláz. Protože je funkce vápníku jednou z důležitých biologických konstant, homeostáza je udržována mnoha regulačními mechanismy především pomocí kalciotropních hormonů. Hrozí-li pokles kalcémie, zajišťují různé regulační mechanismy zvýšení absorpce minerálu ve střevě, zvyšují jeho uvolňování z kostí a současně brzdí odpad kalcia močí. Naopak hrozí-li vzestup kalcémie, brzdí se kostní resorpce, zvyšuje se odpad vápníku ledvinou a snižuje se procento vstřebaného kalcia ze střeva. Spouštěcí mechanismus pro uvolnění kalciotropních hormonů je řízen zpětnovazebně v závislosti na hladině ionizované frakce kalcia v krevním séru. Hladina kalcia v krevním séru se u člověka pohybuje v rozmezí 2,32 až 2,60 mmol/l, ionizovaná frakce má nepatrné kolísání v rozmezí 1,17 až 1,29 mmol/l (Stárka et al. 1997).

Vápník vstupuje do organismu potravou, vstřebává se v orální části tenkého střeva. Absorpce kalcia je většinou aktivní proces proti koncentračnímu gradientu, jen z části jde o difúzi. Oba mechanismy absorpce jsou závislé na saturaci vitamínem D a koncentrace jeho biologicky neaktivnějšího metabolitu kalcitriolu. Podíl vstřebaného vápníku činí u dospělého člověka kolem 50 % přijatého množství. Z těla odchází nevstřebaný podíl stolicí a močí, kde je exkrece závislá na difúzibilní frakci kalcia, profiltrované glomeruly a na zpětné tubulární reabsorpci. Za fyziologických podmínek činí toto množství průměrně 100 až 200 mg denně a nemělo by překročit 250 mg za den. Mimo to je vápník vylučován z těla v malém množství potem. Do ECT vstupuje kalcium přímo po vstřebání tenkým střevem, dále výměnou z kostí a po reabsorpci z ledvinných tubulů, současně však vstupuje z ECT do kostí, do různých úseků zaživacího ústrojí jako součást trávicích šťáv a trvalá obměna je mezi ECT a ledvinou, která denně profiltruje asi 5000 až 7000 mg vápníku s vydatnou zpětnou tubulární reabsorpcí. Současně probíhá neustálá výměna mezi ECT a kostí, která je v dospělosti za fyziologických podmínek vyrovnaná a činí 500 až 600 mg denně (Stárka et al. 1997).

S metabolismem vápníku je spojen metabolismus fosforu. V organismu se ho nachází přibližně 1000 g, z čehož je asi 58 % v kostech jako anorganická složka. Organický podíl fosforu se účastní prakticky všech metabolických kroků. Fosforylace proteinů je regulujícím procesem v přenosu signálu na buněčných membránách v energetickém metabolismu, v buněčném dělení, v replikaci DNA i v biosyntéze bílkovin. Za fyziologických podmínek je hladina anorganického fosfátu v krevním séru kolem 1,0 mmol/l, vyšší je u dětí a při vystupňovaném metabolickém obratu skeletu. Asi 12 % anorganického fosfátu je vázáno na bílkoviny krevního séra. V průběhu dne u téhož jedince hladina fosfátu značně kolísá, změny dosahují až 50 %, vedle diurnálního rytmu hlavně v závislosti na jídle a pohybu. Vzestup ani pokles fosfatémie se klinicky bezprostředně nijak neprojevuje. Vstřebávání fosfátu v tenkém

střevě je velmi efektivní v závislosti na nabídce. V metabolismu fosfátu a regulaci fosfatémie se uplatňuje především ledvina. Z glomerulárního filtrátu se zpětně reabsorbuje v proximálním tubulu 85 až 90 %. Tento pochod probíhá pod kontrolou parathormonu. Hranice fyziologických ztrát močí jsou široké, a to 20-60 mmol za den (Stárka et al. 1997).

#### **1.4 Regulace kalcio-fosfátového metabolismu**

K hlavním biologickým regulátorům kalciového metabolismu patří vitamín D. Spolu s parathormonem (PTH) a kalcitoninem (CT) je odpovědný za udržování kalciové a fosfátové homeostázy. Na signalizaci hladiny vápníku v parathyreoidní žláze se podílí rovněž kalcium senzitivní receptor (CaSR) (Sotorník 2011).

#### **1.5. Vitamin D**

Vitamin D (směs vitaminu D2, ergokalciferolu a vitaminu D3, cholekalciferolu) je přijímán potravou nebo ozářením UV světlem o vlnové délce 290 až 320 nm fotochemickou reakcí ze 7-dehydrocholesterolu obsaženého v kůži. Vitamin D je rozpustný v tucích. Absorbuje se především v proximálním úseku tenkého střeva, přičemž absorpci pozitivně ovlivňují žlučové kyseliny, s nimiž tvoří komplex. Další přeměna vitaminu D, kterou vedou k látkám hormonální povahy, se odehrává v játrech a ledvinách. Z krve je vitamin D transportován do jater, kde se hydroxyluje na 25-hydroxycholecalciferol, neboli kalcidiol zkráceně označovaný 25(OH)CC nebo 25(OH)D. Již tento metabolit je biologicky účinnější než mateřská látka. V ledvině se 25(OH)CC konvertuje na nejúčinnější metabolit kalcitriol hydroxylací. Kalcitriol, neboli 1 $\alpha$ , 25-dihydroxycholecalciferol se zkráceně označuje jako 1 $\alpha$ 25(OH)2CC nebo 1 $\alpha$ 25(OH)2D má mnohonásobně vyšší biologickou účinnosti než mateřská látka nebo kalciferol. Kalcitriol ve střevní sliznici indukuje syntézu vazebného proteinu (CaBP) pro přenos vápníku z lumina střevní stěnou do krve. V ledvině reguluje kalcitriol exkreci kalcia a fosfátu (Sotorník 2011).

Receptor pro kalcitriol se mimo tři základní systémy (ledviny, kost a střevo) vyskytuje v řadě dalších tkání, zejména endokrinního a imunitního systému. Kalcitriol má vliv na fagocytární schopnost leukocytů, na aktivované B a T lymfocyty a na růst a diferenciaci buněk kostní dřeně. Syntéza aktivního metabolitu je regulována parathormonem, hladinou vápníku a fosfátů v krvi. Vitamin D se uplatňuje v regulaci buněčné diferenciaci, proliferace a apoptóze. Podílí se v usídlování T lymfocytů v tkáních a v produkci specifických izotypů protilátek (Mora et al. 2008). Dále snižuje proliferaci  $\beta$  buněk, diferenciaci plazmatických buněk a sekreci imunoglobulinu izotypu IgG mononukleárními buňkami. (Lemire et al. 1984,



Chen et al. 2007) Přímé poškození  $\beta$  buněk cytokiny a jinými zánětlivými agens je jeden z hlavních patogenetických mechanismů diabetu 1. typu. Vitamin D3 brání tomuto poškození tím, že blokuje indukci povrchových receptorů pro cytokiny (Riachy et al. 2010). Vyšší hladina vitamínu D je asociována s nižším rizikem rozvoje diabetu 2. typu. Nalezení optimální hladiny vitamínu D3 se zdá být jako jedna z možných strategií prevence onemocnění (Liu et al. 2010).

### **1.6. Parathormon**

Parathormon se skládá z 84 aminokyselinových zbytků v určité, pro daný živočišný druh specifické sekvenci. Má relativní molekulovou hmotnost kolem 9500. PTH vzniká v hlavních buňkách příštítných tělísek, kde se může skladovat v sekrečních granulích a odtud podle potřeby uvolňovat do oběhu. Parathormon (PTH) představuje kalciotropní hormon. Fyziologickou funkcí PTH je především udržení kalciofosfátové rovnováhy. Jeho sekrece je stimulována poklesem ionizované hladiny kalcia, na základě negativní zpětné vazby. Parathormon působí na úrovni ledvin, kde snížením zpětné reabsorpce fosfátů zvyšuje fosfaturii se vznikem následně hypofosfatémie. Současně zvyšuje tubulární reabsorpci kalcia. Na úrovni kosti akcentuje PTH aktivitu osteoklastů a resorpci kosti. V ledvině se mimo to uplatňuje PTH jako tropní hormon při stimulaci konverze 25-hydroxycholekalCIFerolu na kalcitriol tím, že aktivuje specifickou  $1\alpha$ -hydroxylázu v mitochondriích korových buněk. Tímto PTH nepřímou pozitivně ovlivňuje vstřebávání vápníku v tenkém střevě, a touto cestou opět zajišťuje vstup kalciových iontů do ECT. Sekrece PTH je tedy řízena aktuální hladinou ionizovaného kalcia v ECT, takže při jejím poklesu sekrece PTH ihned stoupá. Výdej PTH je ovlivňován i ionty hořčíku. Určitá hladina Mg sekreci tlumí. Sekrece PTH je stimulována i beta-adrenergní stimulací prostřednictvím cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). PTH aktivuje adenylátcyklázu cílových buněk a jako druhý posel v přenosu signálu působí cAMP a kalciové ionty (Stárka et al. 1997).

### **1.7. Kalcitonin**

Kalcitonin (CT) je proteohormon, obsahující 32 aminokyselinový zbytků s disulfidickým můstkem mezi 1. a 7. uhlíkem. Relativní molekulovou hmotnost má kolem 3500. Kalcitonin je syntetizován a secernován parafolikulárními buňkami štítné žlázy, zvanými C-buňky, které pochází z neuroektodermu a v době vývoje putují do štítné žlázy. Ve štítné žláze jsou C-buňky rozptýleny ve středních a horních partiích laloků, obvykle chybí v isthmu žlázy. Kalcitonin je ve své hypoklacemizující funkci antagonistou parathormonu.

Vedle hypokalcemizujícího efektu působí CT také hypofosfátémií a zvyšuje exkreci všech iontů z těla ledvinou. CT má podobně jako PTH tři hlavní cílové orgány, na které působí s konečným účelem snížit hladinu kalcia a dalších iontů v ECT. Hlavní biologický efekt se uplatňuje na kosti, kde CT blokuje resorpci minerálu inhibicí osteoklastické aktivity. CT ovlivňuje nejen minerální, ale i organickou komponentu skeletu. Na úrovni ledviny snižuje CT tubulární reabsorpci iontů a v GIT dalších minerálů. V centrálním nervovém systému se uplatňuje analgetický, vazodilatační a anorektický vliv celé rodiny kalcitoninů. Za fyziologických poměrů je hladina CT nejvyšší u novorozenců a kojenců. Poměrně vysoké hladiny jsou v dětském věku a v době maximálního růstu. V dospělosti hladina CT fyziologicky klesá a nejnižších hodnot dosahuje ve vysokém věku, což může být jednou z příčin involučních změn na kostech (rozvoje osteoporózy). Protože po odstranění štítné žlázy nevymizí CT zcela z krevního oběhu, je zřejmé, že je syntetizován v malém množství i v některých jiných buňkách neuroektodermálního původu. Trvalý nedostatek CT se však může projevit negativně na kosti, které nejsou chráněny před rozvojem osteoporózy. Extrémně vysoké hladiny CT však nevedou ke změnám koncentrace kalcia v ECT, ani k osteoskleróze s patologicky zvýšenou minerální složkou. Vysvětluje se to tzv. únikovým fenoménem, kdy při nadbytku hormonu klesá výrazně počet receptorových míst na buňce cílové tkáně (down-regulation (Stárka et al. 1997).

## **1.8. Kalcium senzitivní receptor**

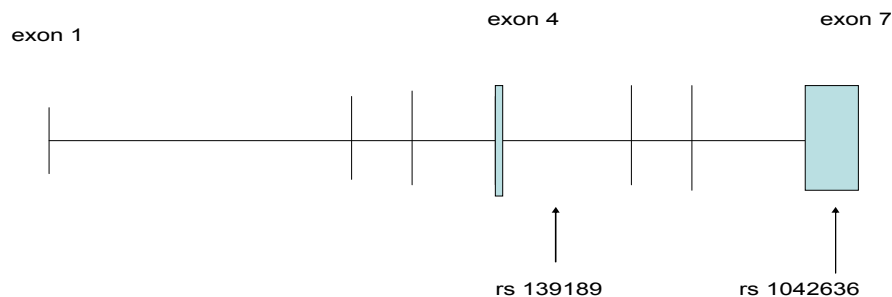
Kalcium senzitivní receptor (*CaSR*) je 1078 aminokyselin dlouhý s G proteiny spojený receptor (G-protein-coupled receptors, GPCRs) patřící do C rodiny.

### **1.8.1. Rodina receptorů spojená s G-proteiny**

GPCRs je složená ze 3 podrodin, kde je známo více než 20 % aminokyselin v jejich transmembránové doméně, která je složená ze 7 membránových oblastí. Skupina 1 se skládá z metabolotropických glutamátových receptorů, mGluR 1-8, které se nachází v CNS, kde se váží na excitační neurotransmitery, tj. glutamát. Druhá skupina obsahuje vomeronasální receptory (VRs) a dále receptory chuťové a čichové. VRs jsou vyjádřeny pouze v hlodavčím vomeronasálním senzitivním orgánu, kde reagují jako feromony pudového chování. Skupina 3 se skládá z gama-aminobutyrových kyselinových receptorů ( $GABA_B$ ), které váží a aktivují neuroinhibitory  $GABA_B$ . Receptor GPRC6A, který patří také do C-rodiny, se nejvíce podobá kalcium senzitivnímu receptoru. GPRC6A váže a aktivuje L- $\alpha$ -kyseliny a jiné ligandy včetně vápníku (Hendy et al. 2009).

### 1.8.2. Gen pro kalcium senzitivní receptor

Gen pro *CaSR* je lokalizován na dlouhém raménku třetího chromozomu (3q13.3-21), (Janicis et al. 1995). Skládá se z více než 45 kb genomické DNA. Je složen ze sedmi exonů a šesti intronů (Barety et al. 1995). První exon je nekódující, zbylých šest exonů obsahuje 3234 kódujících párů nukleotidových bází (viz obr. 1). Počáteční část sedmého exonu kóduje zbývající části *CaSR*, který se skládá ze 7 transmembránových domén spojených intracelulárními a extracelulárními kličkami a z karboxy-terminální intracelulární domény. 3'-konec sedmého exonu se nepřepisuje (Pearce et al. 1995). V obou promotorech *CaSR* genu byly zjištěny vitamín-D responsibilní elementy (VDREs). Mají za úkol regulovat expresi genu a ovlivňují alternativní sestřih jeho transkriptu. Kalcitriol se váže na oba promotory a tím zvyšuje expresi *CaSR* genu (D'Souza-Li et al. 2006, Canaff et al. 2002).



#### Obrázek 1: Gen pro kalcium senzitivní receptor

je lokalizován na dlouhém raménku třetího chromozomu (3q13.3-21). Skládá se z více než 45 kb genomické DNA. Je složen ze sedmi exonů a šesti intronů. První exon je nekódující, zbylých šest exonů obsahuje 3234 kódujících párů nukleotidových bází. Šipky ukazují lokalizaci námi studovaných polymorfizmů.

*CaSR* se skládá se ze tří částí:

1) z extracelulární domény (ECD) – začíná od aminoterminálního konce proteinu a obsahuje 612 aminokyselin. Tato část váže ligand, tj. extracelulární kationy vápníku. Koncová část ECD, která navazuje na transmembránovou doménu, je bohatá na rezidua cysteinu a zajišťuje přenos signálu. Extracelulární část obsahuje devět glykosylačních oblastí, kde dochází k dozrávání (glykosylaci) proteinu. *CaSR* se tak vyskytuje extracelulárně ve třech formách:

jako 120 kDa neglykosylované právě transplantované proteiny, dále jako 140 kDa částečně glykosylované nezralé receptory a jako 160 kDa plně glykosylované receptory (Garret et al. 1995).

2) z centrální domény (CD) – skládá se z 250 aminokyselin a tvoří 7 transmembránových domén pojených třemi intra- a extra-celulárními klíčkami. Určité oblasti druhé a třetí intracelulární klíčky jsou zapojeny do aktivace fosfolipázy C (Chány et al. 2000, Brown et al. 1997, Garret et al. 1995).

3) z intracelulární domény (ICD) - je tvořena 216 aminokyselinami a váže se na G-proteiny. Ovlivňuje úroveň exprese receptoru na cytoplazmatické membráně (Lienhardt et al. 2000).

Kalcium senzitivní receptor je exprimován převážně v příštítných těliscích a tubulárním systému ledvin. Dále je exprimován v C-buňkách štítné žlázy, tenkém střevě, kosti, kostní dřeni, mozku epidermis a v buňkách epitelu oční čočky. Podle aktuální plazmatické koncentrace kalciových iontů reguluje vylučování parathormonu a reabsorpci kalcia v ledvinných kanálcích. Malé ionty kalcia představují ligand kalcium senzitivního receptoru. Přenos signálu je zprostředkován G-proteiny. G-proteiny se skládají z několika podjednotek a jsou spojeny s aktivací nebo inhibicí několika buněčných signálních drah v cytosolu buňky. Fosfolipáza C (PLC) je aktivována přes podjednotku G<sub>q</sub>, což vede k produkci inositol-1,4-trifosfátu (IP<sub>3</sub>), který se tvoří štěpením fosfatidylinositol-4,5 bisfosfátu (IP<sub>2</sub>). Akumulace IP<sub>3</sub> uvolňuje kalciové ionty z intracelulárních zásob, což vede k inhibici hormonální sekrece v buňkách příštítných tělísek (Brown et al. 2005).

Snížení koncentrace plazmatického ionizovaného kalcia vede k inaktivaci receptoru a je bezprostředně následováno rychlou sekrecí parathormonu buňkami příštítných tělísek a zvýšením plazmatické koncentrace hormonu. Sekundární a terciární hyperparathyreóza vznikne, jestliže hypokalcémie přetrvává delší dobu. Dojde totiž k aktivaci buněčné proliferace a následné hyperplázii tkáně příštítných tělísek. V ledvinové kůře je *CaSR* exprimován na bazolaterálním povrchu buněk vzestupného raménka Henleho klíčky. Přímo reguluje exkreci vápníku a vody v ledvinných tubulech a nepřímo ovlivňuje sekreci parathormonu příštítnými tělisky. Změna koncentrace draslíku vyvolá intraluminální změnu potenciálu, která ovlivní mezibuněčný transport. Draslíkový kanál je řízen pomocí kalcium senzitivního receptoru. Aktivace *CaSR* napomáhá zvýšit vylučování vápníku močí (Chen et al. 2004, Brown et al. 1997).

*CASR* je zapojen do kontroly humorální buněčné proliferace a diferenciaci v několika tkáních (kromě parathyroidní žlázy). Změny vyjádřeny v *CaSR* expresi se uplatnily v parathyroidní neoplázii, novotvaru prsu, prostaty a rakoviny tlustého střeva (Chakravarti et al.

2008, Saidak et al. 2009). *CaSR* je exprimován v epitelu střeva a reguluje buněčnou proliferaci a diferenciaci. Buňky v kryptách tlustého střeva získaly expresí *CaSR* diferenciaci a migrují směrem k vrcholu krypty. *CaSR* exprese je slabá nebo úplně chybí v rakovině změněném tlustém střevě, a tím nepřímo souvisí s diferenciací. Extracelulární kalcium a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  nereguluje inhibitor cyklin-dependentní kinázu a *CaSR*, p21 a p27. Exprese ve střevě a chemoprotektivní aktivita kalcia a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  v tumorózním střevě může být částečně zprostředkována přes *CaSR* (Chakrabarty et al. 2005). *CaSR* je exprimován v normální a maligní prsní tkáni a jeho zvýšené hodnoty se nachází ve vysoce metastatických primárně tumorózních prsních buňkách a buněčných liniích. V normálních prsních buňkách aktivace *CaSR* inhibuje uvolňování růstového faktoru a propagátoru kostních metastáz, PTH related peptidu (PTHrP) (Mamillapalli et al. 2008). V maligních prsních buňkách *CaSR* stimuluje onkogenní produkci PTHrP. Výsledná hyperkalcémie poskytuje potencionální stimul k další aktivaci prsního *CaSR* a uvolňuje PTHrP a nastává „bludný kruh“ (Sanders 2000). Podobným způsobem rozšířené *CaSR* exprese dochází ke změně proliferace u rakovinných buněk prostaty Yano et al. 2004 (Yano et al. 2004, Sanders et al. 2001).

### 1.8.3. Mutace kalcium senzitivního receptoru

V současné době je známo více než 100 různých mutací a polymorfizmů týkající se kalcium senzitivního receptoru. Mutace v *CaSR* genu vede buď k aktivaci, nebo inaktivaci kalcium senzitivního receptoru. Inaktivační mutace způsobují familiární benigní hypokalcemickou kalcémii (FBHH) a novorozeneckou těžkou primární hyperparathyreózu (neonatal severe primary hyperparathyroidism, NSHPT). Familiární benigní hypokalcemická hyperkalcémie se přenáší autozomálně dominantně, pacienti s manifestní FBHH jsou heterozygoty pro inaktivační mutaci. Dominantní typ dědičnosti je podmíněn haploinsuficiencí *CaSR* genu, kdy wild-typ (nemutovaný receptor) produkovaný jednou „zdravou“ alelou, není schopen zajistit dostatečnou funkci, ale je dostatečný pro přežití. Chorobu charakterizuje únava, slabost a cefalea, vzácně se vyskytuje hyperkalcémie, urolitiáza, renální insuficience a hypertenze (Gunn et al. 2004). Novorozenecká těžká primární hyperparathyreóza byla definována jako symptomatická hyperkalcémie se skeletální manifestací hyperparathyreózy. Novorozenci netolerují stravu, jsou hypotoničtí a pro mnohočetné fraktury žeber trpí respirační tísní. Hladiny parathormonu bývají enormně vysoké a vedou k život ohrožující hyperkalcémii (Marx et al. 1985).

Mezi aktivační mutace patří autozomálně dominantní hypokalcémie s hyperkalciurií, ADHH a Bartterův syndrom V. typu. Autozomálně dominantní hypokalcémie s hyperkalciurií

se projevuje křečemi, parestéziemi, laryngospasmy. Hladina parathormonu je lehce snížena. Vyskytuje se hypokalcémie a hyperfosfatémie. Pokud by pacienti byli léčeni vitamínem D, může u nich dojít k nefrolitiáze nebo k renálnímu selhání. Vitamín D vede k vyšší expresi mutovaných kalcium senzitivních receptorů (VDREs v promotorech *CaSR* genu) v ledvinných tubulech (Lienhardt et al. 2001). Bartterův syndrom V. typu je heterogenní choroba podmíněná nedostatečnou absorbcí sodíku a chloridů tubulárním systémem ledvin. Projevuje se hypokalémií, metabolickou alkalózou, jsou patrné zvýšené hladiny aldosteronu a reninu. Bartterův syndrom se projevuje uvedeným fenotypem, který je podmíněn velmi heterogenním genotypem. V případě V. typu je spojen s nálezem několika aktivačních mutací v *CaSR* (Obermannová & Šumník 2009).

Mezi další onemocnění spojená s poruchou *CaSR* patří autoimunitní hypoparathyreóza (AH) a autoimunitní hypokalcicurická hyperkalcémie. Autoimunitní hypoparathyreóza se projevuje hypokalcémií a hyperfosfatémií na podkladě deficitu parathormonu daného autoimunitní destrukcí příštítných žláz. Epitop pro tvorbu protilátek je lokalizován v extracelulární doméně kalcium senzitivního receptoru. *CaSR* je klíčovým antigenem v rozvoji imunitní odpovědi proti tkáni příštítných žláz (Li et al. 1996). Autoimunitní hypokalcicurická hyperkalcémie vzniká aktivací ECD receptoru autoprotilátkami, které interferují s jeho normální aktivací. Vedou ke stejnému fenotypu jako u familiární hypokalcicurické hyperkalcémie – k hyperkalcémii, hypokalcicurii a nesuprimované hladině parathormonu. Porucha však není způsobena mutací v genu pro *CaSR*.

V současné době se u některých pacientů s autoimunitními poruchami, jako sprue nebo autoimunitní onemocnění štítné žlázy přítomné ve fenotypu FBHH takzvanou získanou hypokalcicurickou hyperkalcémií (AHH) prověřují například promotory a introny a delece/inzerce (AHH) (Cole et al. 2009, Makita et al. 2007, Pallais et al. 2004).

#### **1.8.4. CaSR polymorfismy**

Tři SNPs v sedmém exonu mají zakódovanou změnu aminokyselin v karboxylové části *CaSR* proteinu (Odelbert et al. 1996). Nejčastější záměna SNP je c.2956 G > T, výsledná serinová substituce za alanin -986. Další SNPs c.2968 A > G a c.3031 C > G, zakódované glycinovou substitucí argininem 990, resp. glutamátová substituce glutaminem 1011. Jejich role v patogenezi onemocnění se stále zkoumá. Rozsáhlá etnická rozdílnost v jejich frekvenci a existence jejich nerovnoměrných vazeb mezi nimi ztěžuje výzkum jejich účinků (Scillitani et al. 2007, Scillitani et al. 2004). Původní průzkumy naznačují vzrůst koncentrace kalcia u

986S alely. Na druhou stranu studie s negativními výsledky jsou možná zkresleny jevy životního prostředí. Některé studie ukazují na malou, ale významnou korelaci mezi genovými polymorfismy A986S a R990G a fenotypem. Zatímco varianta 986S je častější u pacientů s PHPT, varianta 990G je predispoziční k renální litiáze, neboť u idiopatické hyperkalciurie vede ke snižování kalciové exkrece a ke snížené funkci ledvin. V souladu s rozšířenou expresí *CaSR* je dokázáno, že varianty A986S, R990G, Q1011E a jiné jsou spojovány s rozmanitými fenotypy způsobujícími kostní a minerální poruchy (Tobin et al. 2008, Marz et al. 2007, Kelly et al. 2006, Vezzoli et al. 2002). Asociační studie ukázaly *CaSR* varianty jako predikátory hypertenze, kardiovaskulárních chorob, rakoviny, chronické pankreatitidy a Alzheimerovy choroby. Poskytly důkaz o roli *CaSR* genu u těchto chorob (Conley et al. 2009, Jung et al. 2009, Tobin et al. 2008).

Několik zahraničních studií se zabývalo možností vlivu mutace genu *CaSR* na vliv idiopatické generalizované epilepsie. Italští vědci naznačili možnou souvislost kalcium senzitivního receptoru na kostní denzitu. Pacienti trpěli idiopatickou hyperkalciurií. Jednalo by se o polymorfismus ALA 986 SER (Vezzoli et al. 2002). Italští vědci vyloučili účast kalcium senzitivního receptoru a receptoru pro vitamin D na patogenezi nefrolitiázy (Vezzoli et al. 2011). Naopak tým belgických vědců se domnívá, že kalcium senzitivní receptor zvyšuje riziko rozvoje Pagetovy choroby (Yan Jenny Chung et al. 2011). Bohužel se prokázala přímá souvislost mezi VDR BsmI polymorfismem a rakovinou prostaty. (Szendroi et al. 2011) Kalcium senzitivní receptor byl spojený se snížením rizika karcinomu rekta, resp. kolorektální neoplázie. Jeho přímá role v karcinogenitě však nebyla dosud objasněna (Jakobs et al. 2010).

## 2. CÍLE

### 2.1. Hypotéza

Kalcio-fosfátový metabolismus hraje roli při rozvoji chronických diabetických komplikací. Dysbalance tohoto metabolismu indukuje ledvinovou insuficienci u diabetiků, zvláště 2. typu. Klíčový význam zde může mít kalcium sensitivní receptor (*CaSR*), který ovlivňuje kalciový metabolismus, a proto se pravděpodobně podílí i na intrabuněčné signalizaci a metabolických pochodech, které vedou k proliferaci extracelulární matrix a k počátku diabetické nefropatie.

### 2.2. Vlastní cíle – metodika práce

- 1) *Vyšetření genotypu pro alelové polymorfizmy genu pro CaSR u všech skupin pacientů a kontrolní skupiny.*

Kalcium senzitivní receptor byl vybrán jako kandidátní gen pro diabetes mellitus. Protože se podílí na kalcio-fosfátovém metabolismu, který je narušený při různých typech ledvinových onemocnění, byl zkoumán především jeho vztah k diabetické nefropatii a k diabetu vůbec. Byla porovnávána skupina diabetiků 1. a 2. typu, skupina s chronickým ledvinovým onemocněním, skupina nefropatiků nediabetického typu se zdravými pacienty, tj. kontrolní skupinou. Předpokládáme vztah zkoumaných genotypů k určitým onemocněním.

- 2) *Statistické vyhodnocení zkoumaných genotypů a haplotypů CaSR a posouzení možnosti uplatnění v prediktivní diagnostice.*

Metabolismus vápníku předurčoval možnou úvahu o uplatnění kalcium senzitivního receptoru jako možného inhibitora nebo stimulátora patogeneze onemocnění.

Předpokládáme vztah mezi genotypem a chorobou, tj. měl by být rozdíl mezi homozygotem a heterozygotem.

- 3) *Určení hladiny genové exprese CaSR v plné krvi u vybraných pacientů na úrovni mRNA pomocí kvantitativní RT - PCR.*

Předpokládáme zvýšenou genovou expresi u diabetické nefropatie a diabetiků – organizmus se musí vyrovnat se ztrátami kalcia.



### **3. MATERIÁL A METODY**

#### **3.1. Používané laboratorní vybavení**

##### **3.1.1. Laboratorní přístroje**

Autokláv Systec DE-23, Systec, Germany

Chlazená centrifuga Z300 K, Hermle, Německo

Kombinovaná lednička, Whirpool, USA

Laminární box Aura Mini, BioAir, Itálie

Laminární box CleanAir, Scholler, Německo

Minicentrifuga Z 100M, Hermle, Německo

Mrazicí box Premium U410, New Brunswick Scientific, Velká Británie

Nanophotometr, Implen, Německo

Systém pro elektroforézu Thermo Scientific OWL A1, Biotech, Praha

Zdroj napětí pro elektroforézu, Major Science, USA

Termostat BT 120 M, Laboratorní přístroje Praha, Česko

ThermoCycler C1000, Bio Rad, USA

Mikrovlnná trouba, Zanussi, Itálie

Stolový vortex, Scientific Industrie, USA

Digitální váhy 40 SM - 200 A, Precisa, Švýcarsko

LabCycler SensoQuest, Scholler, Německo

7000 SDS ABI Prism, Applied Biosystem, USA

##### **3.1.2. Laboratorní pomůcky**

Automatická pipeta jednokanálová Biopette A (1000 – 5000), Labnet , Polsko

Automatické pipety jednokanálové Discovery<sup>+</sup> ( 0,1 - 2, 2 - 20, 20 - 200, 100 - 1000)

(PZ HTL), Lab Solution, Polsko

Automatická pipeta osmikanálová Discovery<sup>+</sup> (1-10), PZ HTL, Polsko

Obecný spotřební materiál: špičky, zkumavky, ependorfky, destičky, rukavice...

##### **3.1.3. Používané počítačové programy**

GeneSnap, Syngene, Velká Británie

NanoPhotometr<sup>TM</sup> PVC Software 5.2.2.2, Implen, Německo

Kodak Molecular Imaging software, verze 5.0., Kodak, USA

7000 Sequence Detection Software 1.2.3., Applied Biosystem, USA

GraphPad Prism 3.0 (volně dostupná verze)

### **3.2. Používaný materiál**

#### **3.2.1. Pufry a roztoky**

##### **Agarózová gelová elektroforéza**

TBE pufr:	890 mM TRIS báze
	890 mM kys. boritá
	20mM EDTA pH=8
Loading Dye 6×, Fermentas, Kanada	0,25 % bromfenolová modř
	0,25 % xylencylonová modř, 30 % glycerol

#### **3.2.2. Enzymy**

##### **Restrikční enzymy**

<i>BseRI</i>	TaKaRa , Japonsko
MultiScribe Reverse Transcriptase	Applied Biosystém, USA

##### **Modifikační enzymy**

<i>Taq</i> DNA polymeráza	Fermentas, Kanada
---------------------------	-------------------

#### **3.2.3. Komerční soupravy a standardy**

PCR reakční kit, Fermentas, Kanada	<i>Taq</i> DNA Polymeráza 500u / $\mu$ l
	10 × <i>Taq</i> Buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	10 × <i>Taq</i> Buffer with KCl
	25 mM $\text{MgCl}_2$

QIAamp RNA Blood Mini Kit

QIAamp DNA Blood Mini Kit

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits

#### **3.2.4. Chemikálie**

Agaróza	Serva, Německo
Dodecylsulfát sodný	Sigma Aldrich, USA
Etanol (96%, 70%)	FNKV, ČR
GelRed	Biotium, USA
Chlorid sodný	Serva, Německo

### 3.2.5. Použité oligonukleotidy a sondy

#### Gen *CASR*: genová typizace

SNP1 rs13931899 – intron 4 - testován pomocí RFLP:

Primer 1: 5-CAGAAGGTCATCTTTGGCAGCGGCA-3

Primer 2: 5-TCTTCCTCAGAGGAAAGGAGTCTGG-3

Restrikční enzym: *BseRI*

Fragmenty o velikosti:

homozygot TT	320 bp
homozygot CC	260 + 60 bp
heterozygot TC	320 + 260 + 60 bp

SNP2 rs1042636 – kodon 990 – testován pomocí Taqman sond (Applied Biosystem, USA):

Primer 1: F5-CAAGGACCTCTGGACCTCCCTTTGC-3

Primer 2: R5-GACCAAGCCCTGCACAGTGCCCAAG-3

Próba:

TAATTGGCTGCATAATCGGGCGCCA[A/G]GGCGCCAACATTAATGAGATCCGCC

#### Gen *CASR*: genová exprese

- testována pomocí Taqman sond (Applied Biosystem, USA) - *Hs01047793*

Endogenní kontroly: - testovány  $\beta$  aktin, cyklofilin, HuTBP, RPS 13

- vybrán RPS 13 - výrobce Applied Biosystem, USA, *Hs01011487 g1*

### 3.3. Soubor pacientů

Soubor pacientů představují jedinci evidovaní ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady v Praze. Část souboru je tvořena německými pacienty, kteří jsou evidováni ve Fakultní nemocnici v Mannheimu. Kontrolní soubor, který postihuje průřez populace, představují zdraví dárce krve a zaměstnanci 3. Lékařské fakulty v Praze. Do studia byli zařazeni pacienti, kteří splňují určitá vstupní kritéria (viz tab. 4). Skupina T1D a T2D je tvořena diabetiky 1. a 2. typu bez komplikací ledvin. Skupina NDRD je tvořena diabetiky 2. typu s nediabetickým renálním onemocněním. Skupina DN je tvořena diabetiky 2. typu s diabetickou nefropatií. Skupina CKD zahrnuje nediabetické pacienty s chronickým renálním onemocněním.

**Tabulka 4: Charakteristika pacientů – rozdělení podle věku a pohlaví**

skupina	T1D	T2D	DN	NDRD	CKD	ZK
<i>n</i> pacientů ve skupině	41	106	110	52	72	96
průměrný věk	45 / 20	64 / 89	70/70	79/86	65/65	40/40
věkový rozptyl	24-68	45-85	41-80	51-89	45-72	21-70
pohlaví	28 žen	14 žen	40 žen	28 žen	28 žen	57 žen
	13 mužů	92 mužů	70 mužů	28 mužů	44 mužů	39 mužů

NDRD = nefropatie nediabetického typu, DN = diabetická nefropatie, T1D = diabetes 1. typu, T2D = diabetes 2. typu, CKD = chronická renální insuficience, n = počet pacientů, ZK = zdravé kontroly. Položka průměrný věk: průměrný věk žen / mužů.

### **3.4. Metodika práce a postupy**

#### **3.4.1. Genotypizace polymorfizmů genu CaSR**

##### **3.4.1.1. Izolace DNA**

Na izolaci DNA byla použita plná nesrážlivá periferní krev s EDTA, buď čersvá nebo zmrazená na -20 °C. K samotné izolaci byl využit QIA amp DNA blood Mini Kit nebo vysolovací metoda dle Millera (MILLER *et al.* 1988).

##### **3.4.1.1.a) izolace pomocí QIA amp DNA blood Mini Kitu dle pokynů výrobce:**

1. Bylo nepipetováno 20μl QIA GEN Protease do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky, bylo přidáno 200μl vzorku plné krve a po té přidáno 200μl lyzačního roztoku Buffer AL. Pak byl vzorek krátce zvortexován a inkubován v termostatu 10 minut při 56<sup>0</sup>C.
2. Poté bylo přidáno 200μl 96% etanolu a opět byl vzorek krátce zvortexován. Následovala centrifugace 1 min 6000 g, QIA amp kolonka byla umístěna do nové sběrné zkumavky, zkumavka obsahující filtrát byla odstraněna.
3. Na QIAamp kolonku bylo přidáno 500μl AW1 pufru, po té byla provedena centrifugace 1 min při 6000 g. Opět byla přemístěna kolonka do čisté sběrné zkumavky. Zkumavka s filtrátem byla odstraněna.
4. Do kolonky bylo přidáno 500 μl AW2 pufru, po té byl vzorek centrifugován 3 min 180000 g. Kolonka byla přemístěna do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky. Byla odstraněna sběrná zkumavka s filtrátem.

5. Do kolonky bylo přidáno 200  $\mu$ l AE pufru, po té následovala 1 minutová inkubace při pokojové teplotě. Vzorek byl centrifugován 1 min 6000 g

#### 3.4.1.1.b) izolace vysolovací metodou

Postup:

1. K 0,5 ml krve s roztokem EDTA bylo přidáno 1 ml RCLB, promícháno v ruce po dobu 30s, stočeno 3 min při 16 000 x g otáček, byl slit supernatant. K sedimentu bylo přidáno 234  $\mu$ l WCLB, nesuspendován sediment a přidáno 40  $\mu$ l 10% SDS a 15  $\mu$ l Proteinase K
2. Byl přidán 1 ml H<sub>2</sub>O k sedimentu, opakovaně promytý, ependorfka byla zbavena zbytků supernatantu, na otáčecím rotátoru byla provedena inkubace 30 min při 55 0C, poté zchlazena na pokojovou teplotu. Bylo přidáno 100  $\mu$ l 6M NaCl, 15s promícháno v ruce, následně stočeno 6 min na centrifuze, nepipetován supernatant do nové ependorfky
3. Supernatant byl smíchán s 1 ml čistého etanolu, lehkým obracením ependorfky bylo dosaženo vysrážení DNA, následně stočeno 3 min na centrifuze, poté byl slit supernatant. K sedimentu bylo přidáno 1 ml 70% etanolu, poté 3 min byla DNA promyta na kolotoči, stočena 3 min na centrifuze a následně byl slit supernatant
4. Byla vysušena DNA a poté rozpuštěna ve 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

#### 3.4.1.2. Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistota DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí nanometru. Absorpční maximum pro nukleové kyseliny je 260 nm, pro proteiny 280 nm. Čistota DNA se stanovuje poměrem absorbance  $A_{260}/A_{280}$  a  $A_{260}/A_{240}$ .

Parametry čistoty DNA:

$$A_{260} / A_{280} \geq 1,7$$

$$A_{260} / A_{240} \geq 1,5$$

#### 3.4.1.3. Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda amplifikace určitého úseku DNA. Úseky, které se mají namnožit, musí být ohraničeny primery. K syntéze nového vlákna DNA se používá termostabilní Taq polymeráza bakterie *Thermus aquaticus*.

Komponenty PCR reakce:

- Templátová DNA – studovaná DNA nebo její část, kterou chceme namnožit
- DNA polymeráza – enzym, která buduje nový řetězec DNA podle vzoru templátu
- PCR pufr – udržuje stabilní pH a obsahuje chemikálie pro optimální aktivitu a stabilitu DNA polymerázy

- $MgCl_2$  –  $Mg^{2+}$  ionty slouží jako kofaktor DNA polymerázy
- dNTP (nukleotidy) – směs deoxynukleosid trifosfátů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), základních stavebních jednotek DNA
- primery- oligonukleotidy (krátké úseky jednořetězové DNA), zpravidla o délce 10-15 bází párující se s komplementární sekvencí v templátové DNA a sloužící jako počáteční místo replikace DNA, bez kterého by se DNA polymeráza nemohla začít syntézu nového řetězce. K extenzi primeru dochází ve směru 5' → 3' nově vznikajícího vlákna.

Složení reakce pro jednu PCR ( $\mu$ l):

Taq polymeráza (5U/ $\mu$ l).....	0,2
Reverse Primer (100 $\mu$ M).....	0,2
Forward Primer (100 $\mu$ M).....	0,2
MgCl (25mM).....	2
dNTP (2mM).....	1,25
Taq Buffer (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (10x).....	2,5
Vod .....	17,25

K celkovému objemu 23,5  $\mu$ l reakční směsi bylo přidáno 1,5  $\mu$ l DNA.

Směs byla připravena na ledu, jako poslední byla napipetována *Taq polymeráza*.

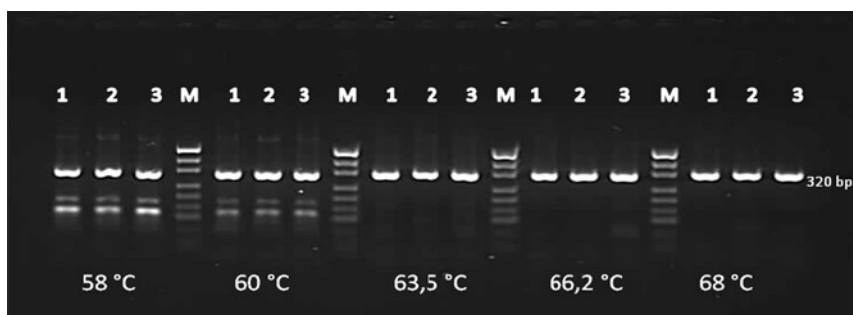
Kroky PCR:

- počáteční denaturace: 94 °C, 5 min
- následná denaturace: 94 °C, 30s
- nasednutí primerů: 68 °C, 30s
- syntéza DNA (elongace): 72 °C, 30s
- konečná elongace: 72 °C, 5 min
- zchlazení PCR reakce: 4 °C.

Střídáním teplot dochází k exponenciálnímu množení požadovaného úseku DNA vymezeného dvojicí použitých primerů. Počet cyklů u PCR byl 35.

Optimalizace PCR

Abychom vytvořili nejvhodnější podmínky pro PCR reakci, bylo třeba stanovit anylační teplotu primerů. Byla vyzkoušena teplota při 58°C, 60°C, 63,5°C, 66,2°C a 68°C. Nejlépe se osvědčilo nasednutí primerů při 68°C (viz obr. 2).



**Obrázek 2: Výsledek optimalizace PCR.** Vybrané vzorky pacientů byly očíslovány 1- 4. Zkratkou M byl označen žebříček. Bylo testováno 5 anulačních teplot. Nejlépe se osvědčila teplota při 68°C, kde je patrný pouze žádaný PCR produkt o velikosti 320 bp. Při nižších teplotách byly viditelné nežádoucí nespecifické produkty.

#### 3.4.1.4. Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) využívá bakteriálních endonukleáz (restriktáz), které dokáží štěpit DNA, pokud obsahuje určitou přesně definovanou sekvenci nukleotidů. Bakterie se pomocí těchto enzymů brání před infekcí viry. Virová DNA může být snadno rozštěpena, na rozdíl od vlastní nukleové kyseliny, která je před degradací chráněna metylací.

Vlastní postup se skládá z PCR amplifikace určitého úseku DNA a jeho štěpení vybranou restriktázou. Pokud jedna alela určitého genu obsahuje rozpoznávací sekvenci a jiná ne, bude DNA první alely rozštěpena, zatímco DNA druhé alely zůstane v celku. Při elektroforéze fragmentů pak pro rozštěpenou sekvenci nalezneme dva kratší úseky, zatímco nerozštěpená DNA vytvoří v gelu jen jeden proužek odpovídající delší sekvenci o původní délce. U homozygotů budou na obou homologních chromozomech stejné sekvence pro restriktázu, tzn. získané fragmenty DNA budou mít stejnou délku. U heterozygotů bude na jednom z chromozomů modifikované restriktční místo, tzn. získané fragmenty budou různě dlouhé. Pokud v rozpoznávací sekvenci dojde k mutaci, restriktční enzym ho nerozezná a molekulu DNA v tomto místě nerozštěpí, takže na gelu bude 1 dlouhý (pomalý) fragment (místo 2 krátkých, tj. rychlých). Ve štěpných místech hledáme polymorfismus a ten pak interpretujeme jako genetickou podobnost studovaných organismů. Jednotlivé endonukleázy se liší podmínkami, za nichž optimálně pracují.

Složení reakční směsi ( $\mu\text{l}$ ):

Pufr..... 2,5

H<sub>2</sub>O..... 14,2

PCR produkt... 8

*BseRI*..... 0,3

Směs byla připravovaná na ledu, jako poslední byl opět pipetován enzym. Celkový objem směsi byl 25 $\mu\text{l}$ . Štěpení probíhalo při 37 °C po dobu 14 hodin.

#### 3.4.1.5. Elektroforetická separace

Pro identifikaci a separaci jednotlivých fragmentů DNA byla použita horizontální gelová elektroforéza. Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli ve směru od záporné ke kladné elektrodě. Elektronegativita je dána zbytky kyseliny fosforečné. Nukleové kyseliny obsahují negativně nabitě fosfátové skupiny. Zapojení stejnosměrného proudu putují nukleové kyseliny k anodě. Vizualizace DNA fragmentů se provádí GelRed. Přibližná velikost DNA fragmentů se určuje porovnáním jejich pohyblivosti s pohyblivostí tzv. velikostních standardů dostupných komerčně (Zadák, Květina, 2011).

Postup: Byl připraven 2% gel, tj. 2 g agarózy do 100 ml 1 % TBE pufru (agaróza od firmy SERVA), gel musel projít varem (cca 3 min), do zchlazeného gelu bylo přidáno několik kapek (cca 5  $\mu\text{l}$ ) interkalačního barviva GelRed. Ochlazený gel byl nalit do připravené PCR nádoby, kde se nechal cca 30 minut, aby ztuhnul. Gel byl zalit 1% TBE puftrem a byly naneseny PCR produkty (resp. produkty restrikčního štěpení) spolu s 6x koncentrovaným vzorkovým puftrem. Elektroforetická separace probíhala při konstantním napětí 5 V/cm.

#### 3.4.1.6. Genotypizace pomocí TaqMan sond

Pro genotypizaci SNP (rs1042636) byla použita jedna z modifikací kvantitativní polymerázové řetězové reakce (PCR), tzv. „real-time PCR“ (kvantitativní PCR v reálném čase).

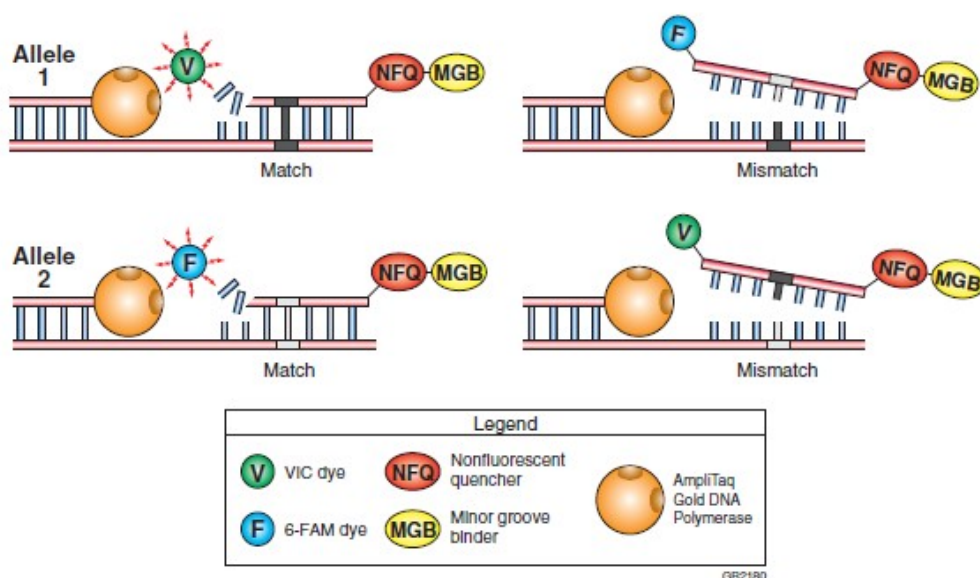
##### Princip

Pro detekci produktů kvantitativní PCR byly použity sondy TaqMan. Jedná se o oligonukleotidy s navázanou fluorescenční značkou na 5'-konci. Na 3'-konci se nachází nefluorescenční zhášec a molekula vázající se do malého žlábků DNA, tzv. MBP (minor groove binder). Pokud se zhášec nalézá v blízkosti značky na 5'-konci, tlumí její fluorescenci.



Naopak pokud se fluorescenční značka nachází dostatečně daleko od zhášedce, dojde k emisi fluorescence (viz obr. 3).

V reakci se používají dvě fluorescenčně značené sondy (VIC<sup>®</sup> a FAM<sup>™</sup>). Sondy se váží na vnitřní část amplifikované sekvence, a pokud vytvoří homoduplex, exonukleázová aktivita Taq DNA-polymerázy způsobí oddálení fluorescenční značky od zhášedce a dojde k emisi odpovídající fluorescence. Detekovaná fluorescence určuje jaký SNP je v amplifikovaném úseku (pokud detekujeme fluorescenci pouze fluorochromu VIC<sup>®</sup>, jedná se o homozygota jednoho typu, pokud detekujeme pouze FAM<sup>™</sup>, jedná se o homozygota druhého typu, a pokud detekujeme oba fluorochromy, jedná se o heterozygota).



**Obrázek 3: Průběh PCR reakce s použitím TaqMan<sup>®</sup> sond (dle návodu pro TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assay-Applied Biosystems).**

### Postup

Směs pro TaqMan genotypizaci obsahovala tyto komponenty:

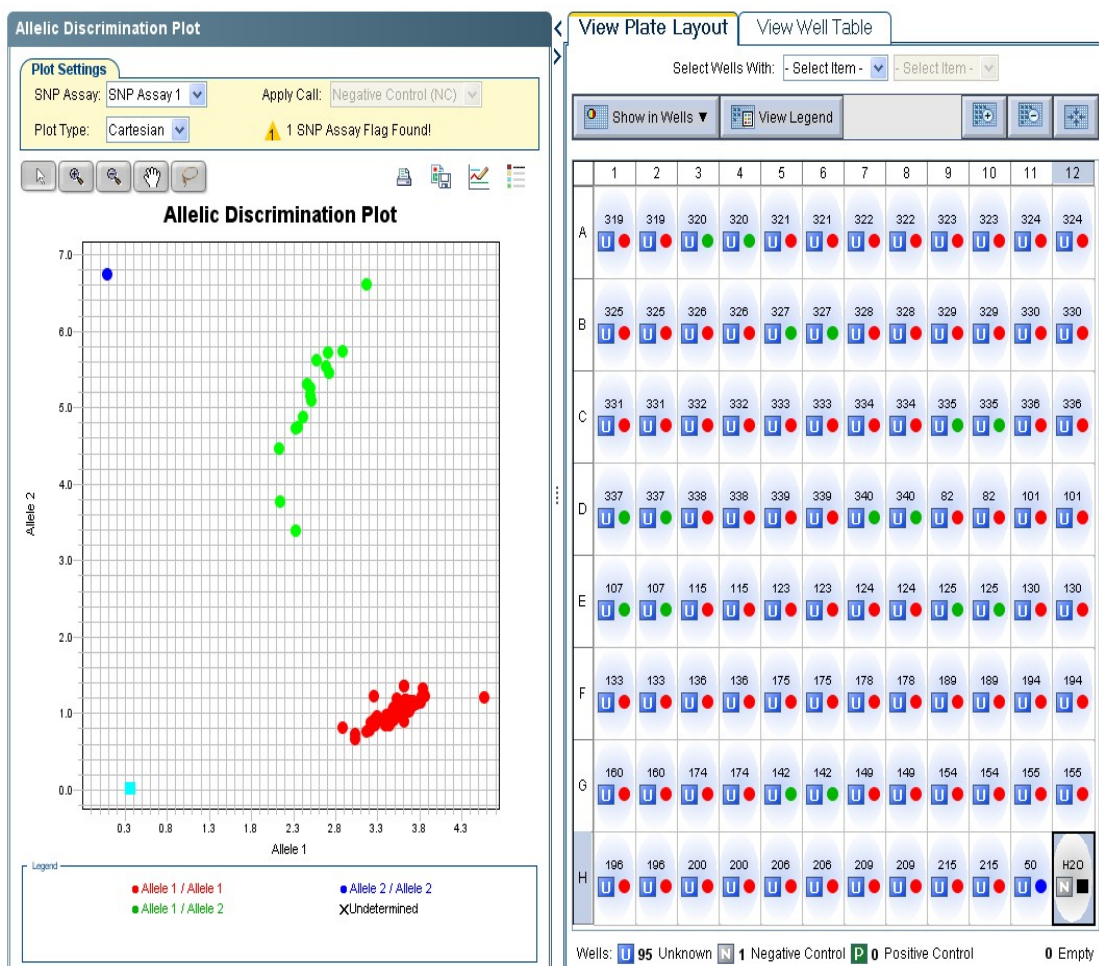
RNase free water.....	2,5 µl
2x TagMan Universal PCR Master mix.....	15 µl
Sonda.....	0,5 µl
DNA (c =20 ng/µl).....	2 µl

Reakční směs byla pipetována po 8µl do jamek obsahující DNA. 96 – jamkové destičky byla uzavřena optickou folií, centrifugována 2 min při 900 x g a následně proběhla reakce na přístroji 7500 Fast Real Time system Applied Biosystéme (viz obr. 4).

Reakční podmínky genotypizace:

1. 2 min..... 50<sup>0</sup>C
2. denaturace..... 10 min při 95<sup>0</sup>C
3. nasednutí primerů..... 15 s při 95<sup>0</sup>C
4. hybridizace, extenze..... 1 min při 60<sup>0</sup>C

Amplifikace probíhala při 40 cyklech.



**Obrázek 4: Vyhodnocení genotypizace**

Přiřazení alel k jednotlivým vzorkům DNA na základě srovnání fluorescence naměřené naměřené ve fázích pre-read a post-read.

### **3.4.2. Stanovení genové exprese pro CaSR**

#### 3.4.2.1. Izolace RNA

RNA byla izolována z plné krve metodou pomocí QIA amp Blood Mini Kitu.

Bylo postupováno dle pokynů výrobce.

Postup:

1. Byl smíchán 1 ml čerstvé krve s 5 ml pufru (Buffer EL) a vše bylo inkubováno 15 min na ledu, po té byl vzorek krátce zvortexován, následovala centrifugace 440 g 10 min při 4<sup>0</sup>C, supernatant byl odstraněn. Byl přidán Buffer EL, opět bylo zvortexováno, následovala centrifugace 400 g 10 min při 4<sup>0</sup>C, supernatant byl odstraněn. Dále byl přidán Buffer RLT, napipetoval se lyzát do 2 ml QIA zkumavky a následovala centrifugace na 18000 g, QIA zkumavka byla odstraněna a homogenát byl uchován.
2. Byl přidán Buffer EL, opět bylo zvortexováno, následovala centrifugace 400 g 10 min při 4<sup>0</sup>C, supernatant byl odstraněn. Dále byl přidán Buffer RLT, napipetoval se lyzát do 2 ml QIA zkumavky a následovala centrifugace na 18000 g, QIA zkumavka byla odstraněna a homogenát byl uchován.
3. Vzorek byl přepipetován do 1,5 ml zkumavky a bylo přidáno 600 µl 70% etanolu.
4. 600 µl směsi bylo nanášeno na filtrační kolonku a centrifugováno 30 s při 8000 g.
5. Byla vyměněna sběrná zkumavka a na filtrační kolonku bylo nanášeno zbylých 600 µl směsi z kroku 3. Následovala centrifugace 30 s při 8000 g.
6. Byla vyměněna sběrná zkumavka a filtrační kolonku bylo nanášeno 700 µl RW1 pufru. Následovala centrifugace 30s při 8000 g.
7. Byla vyměněna sběrná zkumavka na filtrační kolonku bylo nanášeno 500 µl RPE pufru. Následovala 2 minutová centrifugace při 8000 g.
8. Byla vyměněna sběrná zkumavka a následovala 1 minutová centrifugace 8000 g
9. Byla vyměněna sběrná zkumavka na filtrační kolonku bylo nanášeno 100 µl H<sub>2</sub>O zbavené RNáz (RNA-free water obsažená v RNEeasy Mini Kitu). Zkumavka byla inkubována 2 minuty při pokojové teplotě. Následovala 1 minutová centrifugace při 8000 g.
10. Byl odstraněn filtr a ponechaná sběrná část zkumavky s izolovanou RNA.
11. Ke vzorku bylo přidáno 300 µl RLT pufru a 300 µl 96% etanolu. Směs byla přenesena na novou filtrační kolonku. Následovala centrifugace 30s při 8000 g.
12. Byla vyměněna sběrná zkumavka na filtrační kolonku bylo nanášeno 700 µl RW1 pufru. Následovala centrifugace 30s při 8000 g.

13. Byla vyměněna sběrná zkumavka na filtrační kolonku bylo nanášeno 700  $\mu$ l RPE pufru. Následovala centrifugace 30s při 8000 g.
14. Byla vyměněna sběrná zkumavka na filtrační kolonku bylo nanášeno dalších 500  $\mu$ l RPE pufru. Následovala 2 minutová centrifugace při 8000 g.
15. Byla vyměněna sběrná zkumavka a následovala 1 minutová centrifugace 8000 g
16. Byla vyměněna sběrná zkumavka na filtrační kolonku bylo nanášeno 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O zbavené RNáz. Zkumavka byla inkubována 2 minuty při pokojové teplotě. Následovala 1 minutová centrifugace při 10000 g.
17. Byl odstraněn filtr a ponechána sběrná část zkumavky se 40  $\mu$ l izolované RNA.
18. RNA byla přepipetována do čisté zkumavky a skladována při -80°C.

#### 3.4.2.2. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces, při kterém dochází k přepisu genetické informace z ribonukleové kyseliny do deoxyribonukleové kyseliny. Jde o obrácený postup, než jaký probíhá v naprosté většině případů přenosu genetického kódu – při transkripci, kdy se genetická informace přepisuje z DNA do RNA. Tato reakce je katalyzována enzymem reverzní transkriptázou, která se vyskytuje u mnoha typů retrovirů. Reverzní transkripce se využívá při přípravě cDNA. Je využívána v řadě molekulárně biologických aplikací, zejména pak v izolacích sestřižených genových variant a průkazu tkáňově specifické transkripce jednotlivých genů. Reverzní transkripcí získáme molekulu DNA, která je označována jako cDNA (z *angl.* complementary DNA). Vzhledem k tomu, že produktem je hybrid RNA-DNA, který není vhodný k další práci, je nutné gen pomnožit pomocí PCR. Pro účely reverzní transkripce je nutné nejdříve izolovat RNA z příslušného biologického vzorku. V buňkách se nachází celkem tři druhy RNA (tRNA, rRNA a mRNA) a výše popsanými postupy obdržíme jejich směs. Většinou je pro účely reverzní transkripce žádoucí pouze mRNA, která kóduje dané geny. Molekuly mRNA se podílejí pouze 1 – 2 % na celkovém množství izolované RNA (převážnou část tvoří rRNA). Vlastní RNA se v genomu inženýrství nepoužívá z důvodu, že je snadno degradována všudypřítomnými RNázami.

Pro selektivní izolaci mRNA se využívá zejména její polyadenylace (sekvence An n ~ 10 – 200, ozn. polyA) na jejím 3' konci. Nejjednodušší způsob je použití pevného nosiče, na který je kovalentně navázán oligonukleotid polyT, jehož délka se pohybuje v rozmezí 10 – 20 nukleotidů. Přidáním takového nosiče ke směsi různých typů RNA dojde k hybridizaci mRNA k polyT na nosiči pomocí sekvence polyA. Po odmytí nenavázaných RNA jsou hybridizačně navázané molekuly mRNA eluovány pomocí zvýšení teploty nebo iontové síly.

Reverzní transkripce izolované RNA byla provedena pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits dle pokynů výrobce. Reakční směs byla připravována v laminárním boxu a obsahovala tyto komponenty:

RNA (100 ng/10 $\mu$ l).....	dle naměřené koncentrace
Nuclease free water.....	4,2 nebo 5,2 $\mu$ l
10 x RT Buffer.....	2 $\mu$ l
25x dDTP.....	0,8 $\mu$ l
Multi Scribe Reverse Transcriptase.....	1 $\mu$ l

Reakční směs byla připravována a udržována na ledu.

Reverzní transkripce probíhala v těchto krocích:

1. hybridizace s primery..... 10 min při 25<sup>0</sup>C
2. extenze..... 120 min při 37<sup>0</sup>C
3. denaturace enzymu..... 5 min při 85<sup>0</sup>C

Získaná cDNA byla skladována při – 20<sup>0</sup>C.

### 3.4.2.3. Real-Time PCR

Real-time je metoda založena sledování průběhu polymerázové řetězové reakce přímo během reakce tzv. v reálném čase. Pomocí fluorescenčních sond či barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Kvantitativní PCR dokáže přesně stanovit výchozí počet kopií cílové templátové sekvence DNA. Fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a je přímo či nepřímo úměrná množství amplifikátu přítomného v reakční směsi.

Směs pro Real-Time PCR obsahovala tyto komponenty:

RNase free water.....	3,125 $\mu$ l
2x TagMan Gene Expression Master mix.....	6,25 $\mu$ l
Assays-on Demand Gene Expression Assay Mix.....	0,625 $\mu$ l
cDNA.....	2,5 $\mu$ l

Reakční směs byla 10x naředěna vodou a pipetována po 10 $\mu$ l do jamek na 96-jamkové destičky. Kvůli kontrole kvality byl každý vzorek pipetován dvakrát. Poslední čtyři jamky vždy obsahovaly vodu, která sloužila jako negativní kontrola. Reakční směs byla centrifugována 2 min při 500 x g.

Kvantifikace mRNA byla měřena za těchto reakčních podmínek:

1. 2 min..... při 50<sup>0</sup>C
2. denaturace..... 10 min při 95<sup>0</sup>C
3. nasednutí primerů..... 15 s při 95<sup>0</sup>C
4. hybridizace, extenze..... 1 min při 60<sup>0</sup>C

Amplifikace probíhala při 50 cyklech.

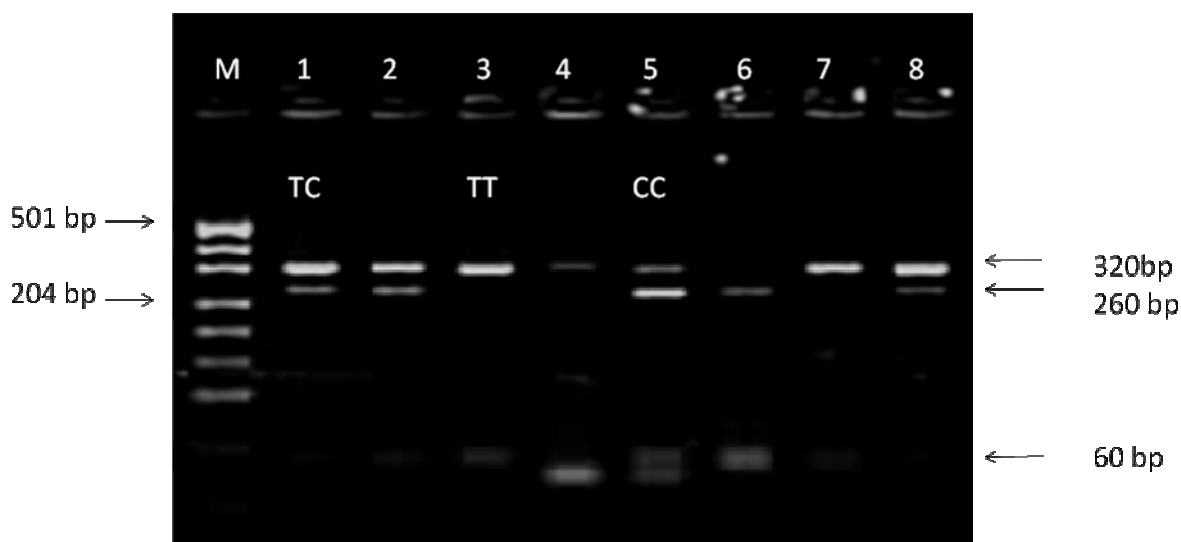
#### 3.4.2.4. Statistické vyhodnocení

Výsledky byly zpracovány v programu GraphPad-Prism verze 3.0. K vyhodnocení byl využit Fischerův oboustranný test na 5 % hladině významnosti ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4. VÝSLEDKY

V naší studii zabývající se rolí genu *CaSR* v predispozici k diabetu a jeho komplikacím bylo vyšetřeno celkem 481 pacientů, z toho 28 žen a 28 mužů (prům. věku 46 a 86 let) s NDRD, 40 žen a 70 mužů (oba prům. věku 70 let) s DN, 28 žen a 13 mužů (prům. věku 45 a 20 let) s T1D, 14 žen a 92 mužů (prům. věku 64 a 89 let) s T2D. Výše uvedené skupiny byly porovnány se zdravými kontrolami, 57 žen a 39 mužů (oba prům. věku 40 let) a s nediabetickými pacienty s chronickým renálním selháním (CKD), 28 žen a 44 mužů (oba prům. věku 65 let). Kalcium sensitivní receptor při vyhodnocení byl vždy vztažen k tzv. endogenní kontrole. Výhodou endogenních kontrol je fakt, že se exprimuje u všech skupin pacientů stejně. V průběhu pokusu byly testovány 4 proteiny:  $\beta$  aktin, Hu TBP, RPS 13 a Cyklofilin. Jako nejvhodnější byl vybrán RPS 13.

Genotypizace se testovala u dvou polymorfizmů genu *CaSR* – kodonu 990 a intronu 4 (viz obr. 5). Jednak se testoval polymorfizmus v kódující sekvenci, jednak v nekódující. Dále se testovala jeho genová exprese na úrovni mRNA.



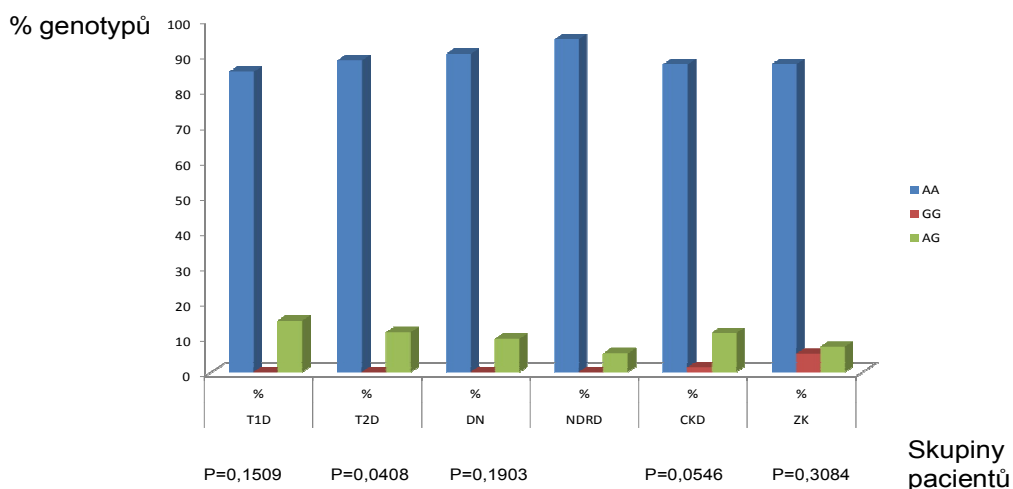
**Obrázek 5:** Výsledek restričního štěpení náhodně vybraných pacientů (očíslovaných 1-8). Jako M byl označen žebříček. Homozygot TT byl detekován přítomností fragmentu o velikosti 320 bp (vzorky v dráze 3, 4 a 7). Heterozygot TC byl detekován přítomností fregmentů o velikosti 320, 260 a 60 bp (vzorky v dráze 1, 2, 8). Homozygot CC byl detekován přítomností fragmentů o velikosti 260 a 60 bp (vzorky v dráze 5 a 6).

Analýza kodonu 990: Při porovnání skupin mezi sebou jsme nezjistili žádnou statisticky významnou odlišnost ve frekvenci alel (major alela A, minor alela G) či frekvenci genotypů (AA, AG, GG), kromě jediné výjimky, a tou bylo porovnání mezi skupina diabetiků 2. typu (88,6%, 11,3%, 0%) a zdravých kontrol (87,5%, 7,2%, 5,2%). Genotyp GG se jevil jako ochranný faktor vůči rozvoji diabetu, protože byl nalezen pouze ve skupině zdravých kontrol (ZK) a nediabetiků s chronickým renálním selháním (CKD). Statistická významnost pro porovnání T2D/ZK byla hraniční  $P = 0,0408$  (viz tab. 5,6,7 a viz grafy 1,2).

**Tabulka 5: Gen *CaSR*, codon 990 - frekvence genotypů**

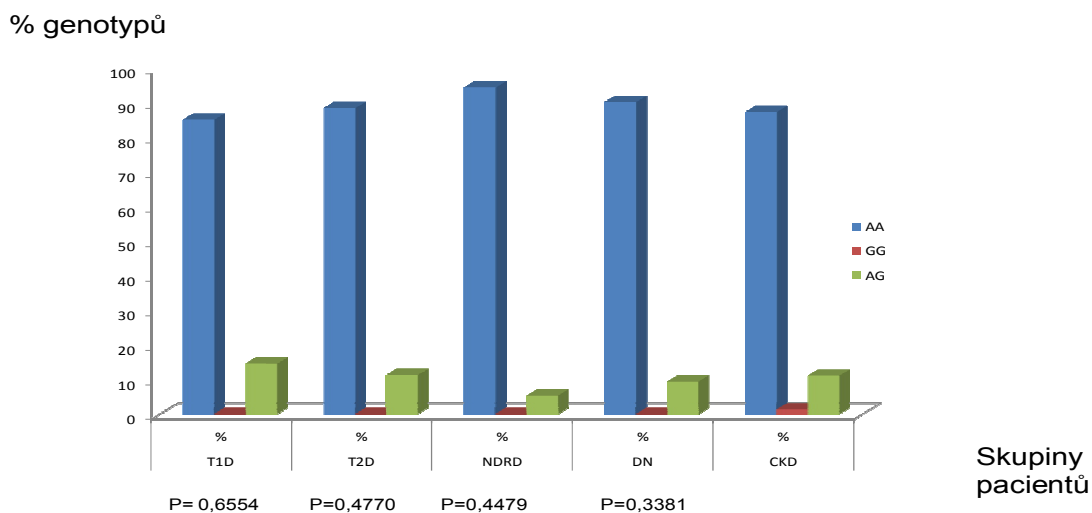
SKUPINA	T1D		T2D		DN		NDRD		CKD		ZK	
GENOTYP	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
AA	35	85,3	94	88,6	95	90,4	53	94,6	63	87,5	84	87,5
GG	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,3	5	5,2
AG	6	14,6	12	11,3	10	9,4	3	5,3	8	11,1	7	7,2
Celkem	41		106		105		56		72		96	

**Graf 1: Gen *CaSR*, codon 990 – porovnání diabetiků se zdravými kontrolami**





**Graf 2: Gen *CaSR*, codon 990 – porovnání diabetiků s nediabetiky s poškozením ledvin**



**Tabulka 6: Gen *CaSR*, codon 990 - frekvence alelového polymorfismu**

Skupiny pac.	signif.	P-value	OR	95%
T1D/ZK	N	0,8139	0,8127	0,3084 - 2,1420
T2D/ZK	N	0,2491	0,6176	0,2870 - 1,3290
DN/ZK	N	0,1135	0,5147	0,2296 - 1,1540
NDRD/ZK	N	0,0525	0,2833	0,0811 - 0,9897
CKD/ZK	N	0,5512	0,7682	0,3407 - 1,7320
T1D/CKD	N	1,0000	1,0580	0,3699 - 3,0250
T2D/CKD	N	0,6578	0,8040	0,3377 - 1,9140
DN/CKD	N	0,4830	0,6700	0,2714 - 1,6540
NDRD/CKD	N	0,0648	0,1197	0,0068 - 2,0810

**Tabulka 7: Gen *CaSR*, codon 990 - frekvence genotypů**

GENOTYP	P value	Signif.
T1D/ZK	0,1509	N
T2D/ZK	<b>0,0408</b>	<b>Y</b>
DN/ZK	0,0546	N
NDRD/ZK	0,1903	N
CKD/ZK	0,3084	N
T1D/CKD	0,6554	N
T2D/CKD	0,4770	N
DN/CKD	0,4471	N
NDRD/CKD	0,3381	N

OR-odds ratio (míra relativního rizika), 95%CI – konfidenční interval (interval spolehlivosti),  $P < 0.05$  (statistická významnost) jsou tučně zobrazeny. Genotypy a frekvence alelového polymorfizmu kodonu 990 byly porovnány v každé skupině diabetických pacientů se skupinou 1) zdravých kontrol a 2) nediabetických pacientů s CKD. AA, GG, AG = jednotlivé genotypy.

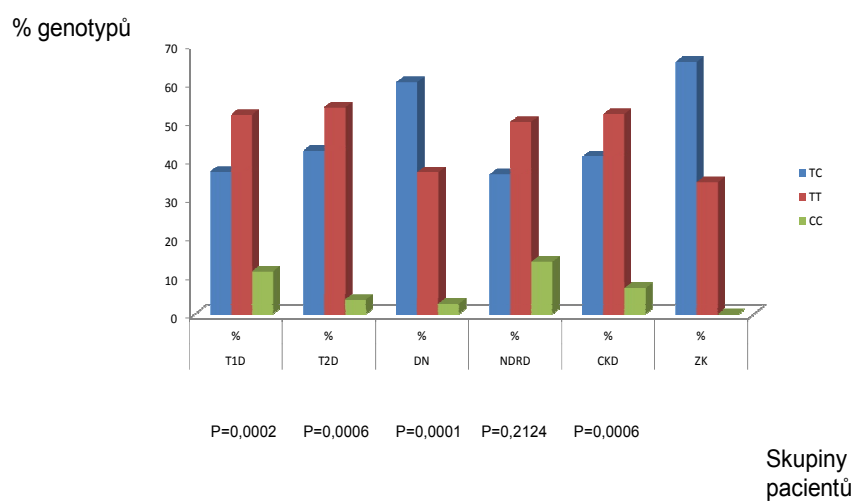
NDRD = nefropatie nediabetického typu, T1D = diabetes 1. typu, T2D = diabetes 2. typu, DN = diabetická nefropatie, CKD = chronická renální insuficience, ZK = zdravé kontroly

Analýza intronu 4: Při porovnání skupin mezi sebou jsme nezjistili žádnou statisticky významnou odlišnost ve frekvenci alel (major alela T, minor alela C), ale našli jsme statisticky významné rozdíly u frekvence genotypů (TT, TC, CC). Všechny skupiny, kromě DN, se lišily statisticky velmi významně od skupiny zdravých kontrol (T1D/ZK  $P=0,0002$ , T2D/ZK  $P=0,0006$ , NDRD/ZK  $P=0,0001$ , CKD/ZK  $P=0,0006$ ). Heterozygotní genotyp TC se jevil jako ochranný faktor vůči rozvoji diabetu a nespecifických ledvinných komplikací (T1D 37,7%, T2D 42,3%, NDRD 36,0%, CKD 41,0% vůči ZK 65,6%) a naopak homozygotní genotyp CC by mohl být predispozičním faktorem (T1D 9,4%, T2D 9,4%, NDRD 13,1%, CKD 6,8% vůči ZK 0%). Při porovnání diabetiků s pacienty nediabetiky s poškozením ledvin jsme našli jedinou statistickou významnost mezi CKD a DN ( $P=0,02750$ ), která svědčí o jejich odlišné etiologii. Podrobnosti jsou uvedené v tabulkách 8,9,10 a grafech 3,4.

**Tabulka 8: Gen *CaSR*, intron 4 - frekvence genotypů**

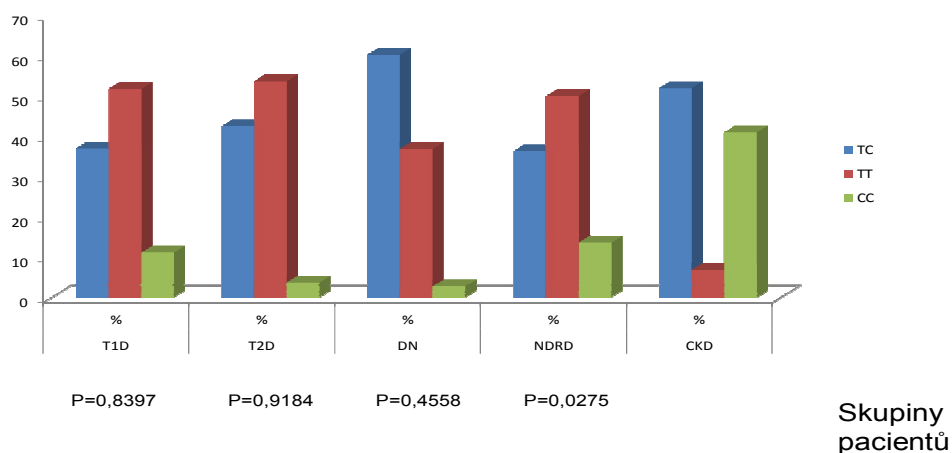
SKUPINA	T1D		T2D		DN		NDRD		CKD		ZK	
GENOTYP	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
TC	20	37	46	42,5	67	60,3	16	36,3	30	41	67	65,6
TT	28	51,8	58	53,7	41	36,9	22	50	38	52	35	34,3
CC	6	11,1	4	3,7	3	2,7	6	13,6	6	6,8	0	0
Celkem	54		108		111		44		74		102	

**Graf 3: Gen *CaSR*, intron 4 - porovnání diabetiků se zdravými kontrolami**



**Graf 4: Gen *CaSR*, intron 4 - porovnání diabetiků s nediabetiky s poškozením ledvin**

% genotypů



**Tabulka 9: Gen *CaSR*, intron 4 - frekvence alelového polymorfismu**

Skupiny pac.	signif.	P-value	OR	95%
T1D/ZK	N	0,7514	1,057	0,6044 – 2,1030
T2D/ZK	N	1	1,047	0,5565 – 1,9690
DN/ZK	N	0,41	1,026	0,6185 – 1,7010
NDRD/ZK	N	1	0,9545	0,5247 – 1,7060
CKD/ZK	N	0,5345	0,7852	0,4262 – 1,4460
T1D/CKD	N	0,0669	0,5727	0,3192 – 1,0270
T2D/CKD	N	0,3284	1,0436	0,7887 – 2,7170
DN/CKD	N	0,4116	1,333	0,6988 – 2,5440
NDRD/CKD	N	0,6397	1,216	0,6583 – 2,2450

**Tabulka 10: Gen *CaSR*, intron 4 - frekvence genotypů**

<b>GENOTYP</b>	<b>P value</b>	<b>Signif.</b>
T1D/ZK	<b>0,0002</b>	<b>Y</b>
T2D/ZK	<b>0,0006</b>	<b>Y</b>
DN/ZK	0,2124	N
NDRD/ZK	<b>0,0001</b>	<b>Y</b>
CKD/ZK	<b>0,0006</b>	<b>Y</b>
T1D/CKD	0,8397	N
T2D/CKD	0,9184	N
DN/CKD	<b>0,0275</b>	<b>Y</b>
DN/CKD	0,4558	N

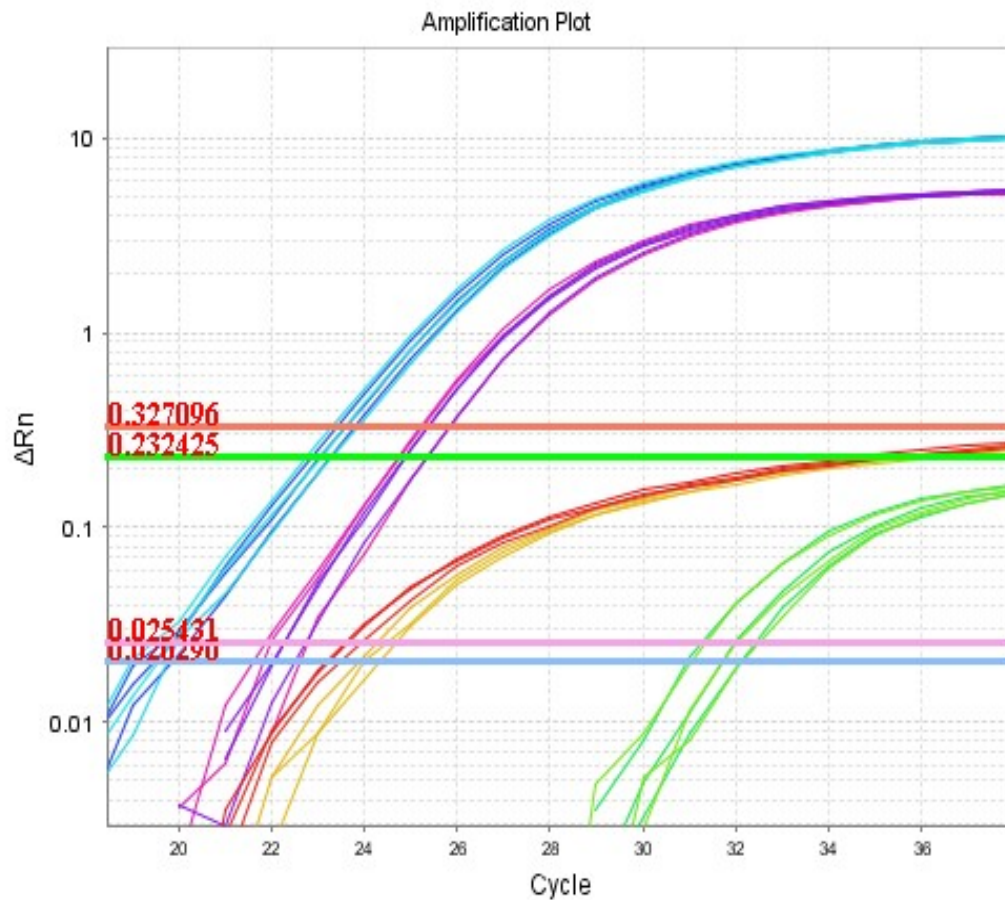
OR-odds ratio (míra relativního rizika), 95%CI – konfidenční interval (interval spolehlivosti),  $P < 0.05$  (statistická významnost) jsou tučně zobrazeny. Genotypy a frekvence alelového polymorfizmu intronu 4 byly porovnány v každé skupině diabetických pacientů se skupinou 1) zdravých kontrol a 2) nediatetických pacientů s CKD.

NDRD = nefropatie nediatetického typu, T1D = diabetes 1. typu, T2D = diabetes 2. typu, DN = diabetická nefropatie, CKD = chronická renální insuficience, ZK = zdravé kontroly

Dále byla stanovena genová exprese genu *CaSR* na úrovni mRNA v leukocytech periferní krve (viz obr. 6 a tab. 11). Optimalizovali jsme podmínky RT-PCR reakce:

- koncentrace DNA jsem zvýšili z původní 2,5 $\mu$ l na 5  $\mu$ l,
- zvýšili jsme počet cyklů ze 40 na 50,
- testovali jsme 4 endogenní kontroly: RPS13, B-aktin, cylofilin A, TBP a vybrali jsme z nich tu, která se nejvíce konstantně amplifikovala - RPS13.

U vybrané skupiny 24 pacientů s T2D, 23 pacientů s T1D a 23 zdravých kontrol byla izolována RNA. Kalcium sensitivní receptor při vyhodnocení byl vztažen k endogenní kontrole RPS 13. Měření genové exprese však nemohlo být statisticky optimálně zpracováno a vyhodnoceno kvůli malému počtu vzorku.



**Obrázek 6: Grafické vyhodnocení endogenních kontrol.** Modrá křivka představuje RPS 13, fialová křivka patří  $\beta$  aktinu, oranžovo-žlutá znázorňuje cyklofilin A a zelená křivka patří TBP.

**Tabulka 11: Gen *CaSR* - genová exprese**

pacient	skupina	dCT
10	T1D	19,96
12	T1D	12,99
2	T1D	14,42
21	T1D	11,95
25	T1D	14,26
27	T1D	24,66
29	ZK	12,68
4	ZK	15,03
54	ZK	14,33

7	ZK	15,36
kol	ZK	11,67
5	T2D	15,00
5	T2D	6,00
7	T2D	15,00
13	T2D	5,00
16	T2D	8,00
17	T2D	10,00
19	T2D	3,00
20	T2D	6,00

Parametr  $C_T$  („*threshold cycle*“) je hodnota cyklu, při kterém fluorescence vzorku přesáhne prahovou hodnotu. Delta CT (dCT) udává střední hodnotu naměřených cyklů.

## 5. DISKUSE

Vyšetřili jsme celkem 313 diabetických pacientů, 72 nediabetiků s chronickým renálním selháním a 96 zdravých kontrol na dva polymorfismy genu *CaSR*. Dále jsme analyzovali genovou expresi na úrovni mRNA tohoto genu u celkem 70 jedinců. Heterozygotní genotyp TC polymorfismu v intronu 4 a homozygotní genotyp GG polymorfismu v kodonu 990 se jevily jako ochranné genetické faktory v etiopatogenezi diabetu mellitus. Naopak predispoziční by mohl být homozygotní genotyp CC polymorfismu v intronu 4.

Různé práce detekovaly v genu *CaSR* řadu variant, které vedly nejen k monogenním poruchám sérových hladin kalcia, ale byly predispoziční i pro řadu multifaktoriálních chorob. Zřejmě rozsáhlé genetické riziko pro řadu nemocí je projevem exprese tohoto genu na řadě tkání. To vše odráží jeho obecnou roli v regulaci extracelulárního i intracelulárního kalciového metabolismu.

Četné polymorfismy genu *CaSR*, které byly detekovány, mají i funkční korelát. Např., američtí vědci identifikovali novou mutaci R465Q genu *CaSR*. Nachází se v 5. exonu a vzniká záměnou argininu za glutamin v kodonu 465. Funkční mutační analýza potvrdila inaktivační charakter mutace díky výraznému posunu stimulační křivky vpravo pro EC50 (Leech et al. 2006).

U pacientů s primární hyperparathyreózou se zkoumala frekvence polymorfismů genu *CaSR*. Do studie bylo zařazeno 50 hyperparathyroidních pacientů a 102 zdravých dárců krve. Pacienti s heterozygotní variantou Q1011E měli signifikantně zvýšené hladiny sérového vápníku a parathyroidních hormonů než pacienti s wild-type variantou. Heterozygotní varianta A986S se nacházela u 40 % pacientů s primární hyperparathyreózou a byla méně frekventovaná u mužské populace. Tato varianta představuje rizikový faktor pro rozvoj parathyroidální neoplasie u mužů (Miedlich et al. 2001).

Další studie si všimla pankreatitidy jako komplikace primární hyperparathyreózy a zkoumala ji ve vztahu k *CaSR*. Primární hyperparathyreóza (pPTH) způsobuje hyperkalcémii, která představuje rizikový faktor pro vývoj pankreatitidy. Analyzovali 25 pacientů (13 žen a 12 mužů). Autoři neprokázali asociaci pankreatitidy s mutací R990G v genu *CaSR* (Felderbauer et al. 2007).

Z Kanady pochází studie zabývající se nefrolitiázou a *CaSR*. Fenotypová heterogenita znesnadňuje identifikaci kandidátních genů. Bylo vyšetřeno 223 pacientů s nefrolitiázou a 676



kontrol na polymorfismus R990G. Prokázali 8x zvýšené riziko nefrolitiázy pro homozygoty GG ve srovnání „wild-type“ genotypem (Hamilton et al. 2009).

Další studie sledovala vliv *CaSR* na krevní tlak. Výzkum se týkal 2037 dospělých. Zkoumané varianty genů (*CaSR*, *NR3C2*, *SCNN1B* a *SCNN1G*) jsou odpovědné za hypo- nebo hypertenzní poruchu (Tobin et al. 2008).

U české populace 95 postmenopauzálních žen byla popsána asociace polymorfismu (C/T) v intronu 5 genu *CaSR* se sérovými hladinami FSH a LH (Žofková et al. 2005).

Íránští vědci zkoumali vliv kalcio-fosfátového metabolismu na biochemické hodnoty pacientek trpících syndromem polycystických ovárií. Do studie bylo zařazeno 56 žen. *VDR* a *CaSR* se přes účinky na LH, SHBG a inzulinovou rezistenci podílí na patogenezi syndromu polycystických ovárií (Ranizad et al. 2011).

Tým vědců z německého Heidelbergu zkoumal možnou spojitost mezi kalcium senzitivním receptorem a Hirschsprungovou chorobou. Zkoumali 63 pacientů s HD spolu se 100 zdravými pacienty. Vyšetřili 3 polymorfismy (A986S, G990R, Q1011E), které se nacházejí na sedmém exonu, a 1 polymorfismus (C/T) v intronu 5 genu *CaSR*. Výskyt polymorfismu G990R byl 2x vyšší než v kontrolní skupině. Mimoto byl ověřen 4x vyšší výskyt Q1011E ve srovnání s kontrolní skupinou (Romero et al. 2012).

Velmi rozsáhlá studie z Lyonu si dala za úkol najít možnou spojitost mezi vitamínem D, *CaSR* a kolorektálním karcinomem u evropské populace. Studie se zúčastnilo 1248 případů trpících kolorektálním karcinomem a 1248 zdravých kontrol. Genotypy bb („wild-type“) a BB polymorfismu *BsmI* genu *VDR* byly spojeny se sníženým rizikem pro kolorektální karcinom. Tato asociace byla pozorována u karcinomu tlustého střeva, nikoliv u karcinomu rekta. Nebyly zaznamenány interakce se sérovou hladinou 25OH vitamínu D nebo dietním příjmem vápníku (Jenab et al. 2009).

V Maďarsku byla sledována incidence a léčba kolorektálního karcinomu vzhledem k výskytu polymorfismu laktázy 13910 a *CaSR* A986S. Studie se zúčastnilo 278 pacientů s kolorektálním karcinomem a 260 zdravých kontrol. V případě *CaSR* A986S homozygot SS má vyšší frekvenci než kontroly. Oba polymorfismy, tj. LCT C a *CaSR* mají přímý vliv na progresi nebo incidenci kolorektálního karcinomu (Bácsi et al. 2008).

Naše výsledky odpovídají nálezům, že gen *CaSR* je exprimován v  $\beta$  buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu a podílí se na regulaci sekrece insulínu, a tedy by měl hrát roli v etiopatogenezi T1D a T2D. Protein *CaSR* je rovněž přítomen na perivaskulárních nervech, v buňkách hladkého svalstva cév a endoteliích, což ho zase spojuje s regulací systémového tlaku, hypertenzí, a tedy nabízí jeho možnou roli při vzniku diabetické triády.

## 6. ZÁVĚR

V diplomové práci jsme studovali roli kalcium senzitivního receptoru (*CaSR*) v etiopatogenezi diabetu a jeho chronických komplikací.

Vyšetřili jsme 313 diabetických pacientů:

41 pacientů s T1D

106 pacientů s T2D

110 pacientů s DN

56 pacientů s nediabetickým renálním selháním (NDRD).

Dále bylo vyšetřeno:

72 nediabetických pacientů s chronickým renálním selháním (CKD)

96 zdravých dárců krve, kteří odpovídali věkem i pohlavím vyšetřovaným pacientům.

Analyzovali jsme dva polymorfismy genu pro kalcium senzitivní receptor *CaSR*, jeden v kódující části – kodon 990 a druhý v nekódující části – intron 4. U obou polymorfismů jsme porovnali genotypy a frekvence alel u všech skupin pacientů se skupinou zdravých kontrol a skupinou nediabetiků s chronickým renálním selháním. Heterozygotní genotyp TC v intronu 4 a homozygotní genotyp GG v kodonu 990 se jevily jako ochranné faktory, kdežto homozygotní genotyp CC v intron 4 přinášel predispozici k diabetu a poškození ledvin.

Dále jsme analyzovali genovou expresi genu *CaSR* na úrovni stanovení množství mRNA v leukocytech periferní krve.

Z našich analýz polymorfismu genu *CaSR* vyplývá:

- našli jsme vztah mezi diabetem a frekvencí genotypů intronu 4
- role polymorfismu v kodonu 990 nebyla jednoznačně prokázána
- frekvence alel u obou studovaných polymorfismů nebyly statisticky významné

Naše výsledky svědčí o tom, že gen pro kalcium senzitivní receptor by mohl hrát roli v etiopatogenezi diabetu i jeho komplikací, neboť jsme našli statisticky významné rozdíly v genotypizaci mezi nemocnými a zdravými. Pro posouzení genové exprese bude nutné otestovat větší vzorek pacientů.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Andersen AR, Christiansen JS, Kreiner S, Decckert T.(1983): Diabetic nephropathy in type I diabetes nad epidemiological study. *Diabetologia*, 25: 496-501.
2. Autier P, Gandini S.(2007): Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized scotrolled trials. *Arch Ingterm Med* 1 :1730-1737.
3. Bácsi K, Hitre E, Kósa JP, Horváth H, Lazáry A, Lakatos PL, Ball B, Budai B, Lakatos P, Speer G.(2008): Effects of the laktase 13910C/T and kalcium-sensing receptor A986S G/T gene polymorphisms on the incidence and recurrence of colorectal cancer in Hungarian population. *BMC Cancer*, Nov3, 8:317.
4. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp T, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Pike JW, Shine J, O'Malley BW. (1988): Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Biochemistry* 85: 3294 – 3298.
5. Bennet PH, Lee et LU M, Deen H., Fuller JH. (2001): WHO Group, Increased urinary albumin excretion and its associations in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologie*, 44: 37- 45.
6. Blum M, Yachnin T, Wollman Y, Chernihovsky T, Peer G, Grosskopf I, Kaplan E, Silverberg D, Cabili S, Iaina A. (1998): Low Nitric Oxide Production in Patients with Chronic Renal Failure. *Nephron* 79: 265 - 268.
7. Bojestig M, Arnwvist HJ.(1985): Hermansson g, et al. Diclining incidence of nephropathy in inzulin-dependent diabetes mellitus, *N.Engl. J.Med.*, 78:785-794.
8. Brenner BM, Chertow GM.(1994): Congenital oligonephropathy and the etiology of adult hypertension and progressive renal injury. *AmJ Kidnex Dis*, 23:171-175.
9. Brown EM.(2009): Anti-parahyroid nad anti-calcium-sensing receptor antibodies in autoimmune hypoparathyroidism. *Endocrinol Metab Clin N Am* 38:437-45.
10. Brown EM.(1991): Extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca<sup>2+</sup> and other ions as extracellular (first) messengers, *Physiol.Re* 71:371-411.
11. Brown Em, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R.,Kifor O, Sun A, Hdediger MA, Lytton J, Hebert SC.(1993): Cloning and chracterization of an extracellular Casensing receptor from bonine parathyroid. *Nagture* 366:575-580.
12. Brown EM, Hebert SC.(1997): Calcium-receptor-regulated parathyroid and renal function, *Bone* 20:303-309.

13. Bultas J, Osa renin-angiotensin-aldosteron-půl století od objasnění funkce a stále nová překvapení, REMEDIA online
14. Burcklé C, Bader M.(2006): Prorenin and its ancienit receptor. Hypertension 48:549-551.
15. Carling T, Rastad J, Åkerström G, Westin G. (1998): Vitamin D Receptor (VDR) and Parathyroid Hormone Messenger Ribonucleic Acid Levels Correspond to Polymorphic VDR Alleles in Human Parathyroid Tumors. J Clin Endocrin & Metabol 83: 2255 - 2259.
16. Clausen P, Feldt-Rasmussen B, Jacobsen P et al.(1997): Microalbuminuria as an early endicator of osteopenia in male inzulin-dependent diabetic patiens. Diabet Med 14:1038-1043.
17. Cole DEC, Yun FHJ, Wong BYL, Shuen AY, Booth RA, Scillitani A et al.(2009): Kalcium-sensing receptor (CASR) mutations and denturing high performance liquid chromatography (dhplc). J Mol Endocrinol 42:331-9.
18. Collado-mesa F, Colhoun H, Stevens L, and the EURODIAB IDDM Complications Study Group(1999): Prevalence and management of hypertension in type 1 diabetes mellitus in Europe: the UERODIAB IDDM Complications Study Diabet Med 19:41-48.
19. Conely YP, Mukherjee A, Kammerer C, Remosky ST, Kambiu MI, Finegold DN, et al.(2009): Evidence supporting a role for the calcium-sensisng receptor in Alzheimer disease. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 150B: 703-9.
20. Deinum J, Tarnow L, van Gool JM et al.( 1999): Plasma renin and prorenin and renin gene variation in patiens wiht inzulin-dependent diabetes mellitus and nephropathy. Nephrol Dial Transplant 14: 1904-1911.
21. Demeš M, Vývodová E.(2001):Aktuálny stav dialyzačnej liečby na Slovensku. In: XXIX. Kongres Sloveskej nefrologickej spoločnosti, Košice
22. Drueke TB. (2001): Genetic Aspect of Secondary Hyperparathyroidism in Uremia. Am J Kidney Dis 38: 143 - 146.
23. D'Souza-Li L.(2006):The calcium-sensing receptor and related diseases. Arg Bras Endocrinol Metanol 50:628-39.
24. Džúrik R, Spustová V, Janeková K.(1995):The prevalence of inzulin resistance in kidney disease patients before the development of renal failure. Nephron 69:281-285.
25. Ellard S. et al.(2008):Best praktice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the zouny. Diabetologia 51:546-553.

26. EURODIAB IDDM Complications Study Group (1994): Microvascular and acute complications in IDDM patients: the EURODIAB IDDM Complications Study, *Diabetologia*, 37: 278-285.
27. Evenepoel P, Van den Bergh B, Naesens M, de Jonge H, Mammens B, Clara K, Kuypers D, Vanrenteghem Y. (2009): Calcium metabolism in the early posttransplantation period. *Clin J Am Soc Nephrol* 4:665-672.
28. Felderbauer P, Karakas E, Fendrich V, Bulut K, Werner I, Dekomien G, Klein W, Bartasch D, Schmidt WE. (2007): Pancreatitis in primary hyperparathyroidism-related hypercalcaemia is not associated with mutations in the CASR gene, *Exp Clin Endocrinol Diabetes* Sep 115(8):527-9.
29. Freedman BI, Tuttle AB, Spray BJ. (1995): Familial predisposition to nephropathy in African Americans with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis*, 25: 710-713.
30. Fujisawa T, Ideami H, Kawacuchi I. et al. (1998): Meta-analysis of association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene with diabetic nephropathy and retinopathy. *Diabetologia* 41:47-53.
31. Garnero P, Munoz F, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas PD. (2005): Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with the Risk of Fractures in Postmenopausal Women. Independently of Bone Mineral Density. *J Clin Endocrinol & Metabol* 90: 4829 - 4835.
32. Garrett IR, Capuano IV, Hammerland LG, Hung BC, Brown EM, Hebert SC, Nemeth EF, Fuller F (1995): Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNA. *J Biol Chem* 270: 12919-12925.
33. Gohda T, Shou I, Fukui M, Funabiki K, Horikoshi S, Shirato S, Tomino Y. (2002): Parathyroid Hormone, Gene Polymorphism and Secondary Hyperparathyroidism in Hemodialysis Patients. *Am J Kidney Dis* 39: 1255-1260.
34. Gunn IR, Gaffney D. (2004): Clinical and laboratory features of calcium-sensing receptor disorders: a systematic review. *Ann Clin Biochem* 41: 441-458.
35. Guo H, Kalra PA et al. (2007): Atherosclerotic renovascular disease in older US patients starting dialysis, 1996 to 2001. *Circulation* 115: 443-451.
36. Ha SK, Park HC, Park HS, Kang BS, Lee TH, Hwang HJ, Kim SJ, Kim DH, Kang SW, Choi KH, Lee HY, Han DS. (2003): ACE Gene Polymorphism and Progression of Diabetic Nephropathy in Korean Type 2 Diabetic Patients: Effect of ACE Gene DD on the Progression of Diabetic Nephropathy. *Am J Kidney Dis* 41: 943-949.

37. Haddad JG, Matsuoka LY, Hollis BW, Hu YZ, Wortsman J. (1993): Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J Clin Invest* 91: 2552–2555.
38. Hadjadj S, Belloum R, Bouhanick B et al.(2001): Prognostic value of antiotensin-I converting enzyme I/D polymorphism for nephropathy in type 1 diabetes mellitus: a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 12:541-549.
39. Hamilton DC, Grove VK, Smith CA, Cole DE(2009): Heterogeneous dinase modeling for Hardy-Weinbert disequilibrium in cas-control studies: application to renal stones and calcium-sensing receptor polymorphisms. *Ann Hum Genet Mar* 73(2):176-83.
40. Hansen KJ, Edward MS. et al.(2002): Prevalence of renovascular disease in the elderly: a population-based study. *J BASF.Surg* 36: 443-451.
41. Harden PH, Geddes C, Rowe PA, Mcllroy JH, Boulton-Jones M, Rodger RSC, Junor BJR, Briggs JD, Connell JMC, Jardine AG. (1995): Polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene and progressionof IgA nephropathy. *The Lancet* 345: 1540 - 1542.
42. Hasslacher C, Ritz E, Wahl P, Michael C.(1989): Similar risks of nephropathy in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus. *Nephrol. Dial. Transplant* 4: 859-863.
43. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW. (1998): The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Mineral Research* 13: 325 - 49.
44. Health III H, Odelbertg S, Jackson CE, Teh BT, Hayward N, Larsson C. et al.(1996): Clustered inactivation mutations and benign polymorphisms of the kalcium receptor gene in familial benign hypocalciuric hypercalcemia suggest receptor functional domains. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1312-7
45. Hendy NG, Guarnieri V, Canaff L.(2009): Kalcium-Sensing Receptor and associated Diseases, *Prog in Mol Biol and Trans Science* 89:31-95.
46. Hoare SRJ. (2005): Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug Discovery Today* 10: 417 - 427.
47. Holick MF. (1996): Vitamin D and Bone Health. *Journal of Nutrition* 126: 1159 - 1164.
48. Holick MF. (2004): Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 80: 1678 - 1688.
49. Houston LA, Grant SFA, Reid DM, Ralston SH. (1996): Vitamin D receptor polymorphism, bone mineral density, and osteoporotic vertebral fracture: Studies in a UK population. *Bone* 18: 249 – 252.

50. Chakrabarty S, Wang H, Canaff L, Hendy GN, Appelman H, Varani J.(2005): Calcium-sensing receptor in human colon carcinoma: interaction with  $Ca^{2+}$  and 1,25-dihydroxyvitamin D. *Cancer Res* 65:493-8.
51. Chakravarti B, Dwivedi SKD, Michal A.(2008): Chattopadhyay N. Calcium-sensing receptor in cancer : good cop or bad cop? *Endocrine* 35:271-84.
52. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. (2007): Modulator effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on human B cell differentiation. *J Immun* 179: 1634 – 1647.
53. Christensen EI, Brn H. (2001): Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol* 280: F562-F573.
54. IFOR O, Moore Jr FD, Delaney M, Gerber J, Hendy GN, Butters R, et al.(2003): A syndrome of hypocalciuric hypercalcemia cause by autoantibodies directed at the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 88:60-72.
55. Jakobs ET, Martinez ME, Campbel PT, Conti DV, Duggan D, Figueiredo JC, Haile RW, LeRoy EC, Poynter JN, Thompson PA, Baron JA.(2010): Genetic variation in the retinoid X receptor and calcium-sensing receptor and risk of colorectal cancer in the Colon Cancer Family Registry. *Carcinogenesis* 31(8):1412-6.
56. Jannsen B, Hohenadel D, Brinkkoetter P. et al.(2005): Carnosine as a protective factor in diabetic nephropathy: Association with a leucine repeat of the carnosinase gene *Chrpa*. *Diabetes* 54 (8)
57. Jenab M, McKay J, Bueno-de-Mesquita HB, van Buijnhoven FJ, Ferrari P et al.(2009): Vitamin D receptor and calcium sensing receptor polymorphisms and the risk of colorectal cancer in European populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* Sep 18(9):248-91.
58. Jílková J (2012): Fabryho (Andersenova) choroba, *Lékařské listy* 4: 20-23.
59. Jung J, Foround TM, Eckert GJ, Flury-Weherill L, Edenbert HL, Xuei X. et al.(2009): Association of the calcium-sensing receptor gene with blood pressure and urinary calcium in African-Americans. *J Clin Endocrinol Metab* 94:1042-8.
60. Juppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, LF Kolakowski, Hock J, Potts JT, Kronenberg HM. (1991): A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 254: 1024 - 1026.
61. Kaneshiro Y, Ichihara A, Sakoda M. et al.(2007): Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats. *J Am Soc Nephrol* 18:1789-1795.

62. Kang JJ, Toma I, Sipos A et al.(2008): The collecting duct is the major source of prorenin in diabetes. *Hypertension* 51:1597-1604
63. Karlson P, Gerok W, Gross W.(1987): *Pathobiochemie*, Academia, Praha, ISBN 21-041-87.
64. Karnevale V, Romagnoli E, D'Emasmo, E. (2004): Skeletal involvement in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 20:196-204.
65. Kelly C, Guán IR, Gaffney D, Devgun MS(2006): Serum calcium, uric acid and polymorphisms of the calcium-sensing receptor gene. *Ann Clin Biochem* 43:503-6
66. Kopecká M, Gabriel M. et. al.(2001): *Lékařská biologie – část druhá – genetika*, Masarykova universita v Brně, ISBN 80-210-2670-7.
67. Koren W, Koldanov R, Pronin VS. et al.(1998): Enhanced erythrocyte Na/H exchange predicts diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia* 41:201-205.
68. Krolewski AS, Warram, KJ, Cjrostuoeb AR, Busick EJ, Kahn CR.(1994): The changing natural history of nephropathy in type 1 diabetes. *Am J Med* 4: 15-18.
69. Krop M, de Bruyn JHB, Xerox FHM et al.(2008): Renin and prorenin disappearance in humans postnephrectomy: evidence for binding? *Front Biosci* 13: 3931-3939.
70. Krop M, Sander AHJ. (2008): Circulating versus tissue renin-angiotensin system: on the origin of (pro)renin. *Curr Hyp Rep* 10:112-118.
71. Leech C, Lohse P, Stanojevic V, Lechner A, Goke B, Spitzweg C.(2006): Identification of a novel inactivating R465Q mutation of the calcium-sensing receptor, *Biochem Biophys Res Commun*, Apr 14: 342(3):996-1002.
72. Lemire J. M, Adams JS, Saka R, Jordan SC. (1984): 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 74: 657 – 661.
73. Levin A, Bakris GL, Molitch M. et al.(2007): Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int* 71:31-38.
74. Li Y, Song YH, Rais N, Connor E, Schatz D, Muir A, Maclaren N.(1996): Autoantibodies to the extracellular domain of the calcium sensing receptor in patients with acquired hypoparathyroidism. *J Clin Invest*, 97: 910-914.
75. Lienhardt A, Bai M, Lagarde JP, Rigaud M, Zhang Z, Jiang Y, Kottler ML, Brown EM, Garabédian M. (2001): Activating mutations of the calcium-sensing receptor: management of hypocalcemia, *J Clin Endocrinol Metab.* 86:5313-23.



76. Lienhardt A, Garabédian M, Bai M, Sinding C, Zhang Z, Lagarde JP, Boulesteix J, Rigaud M, Brown WM, Kotler ML.(2000): A large homozygous or heterozygous in-frame deletion within the calcium-sensing receptor's carboxylterminal cytoplasmic tail that causes autosomal dominant hypocalcemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 85:1695-1702.
77. Lips MA, Syddall HE, Gaunt TR, Fodriquez S, Day IN, Cooper C. et al.(2007):Interaction between birthweight and polymorphism in the calcium-sensing receptor gene indetermination of adult bone mass: the Hertfordshire cohort study. *J Rheumatol* 34:769-75
78. Liu E, Meigs JB, Pittas AG, Economos ChD, McKeown NM, Booth SL, Jacques PF. (2010): Predicted 25 – hydroxyvitamin score and incident type 2 diabetes in the Framingham Offspring Study 91: 1627 – 1633.
79. Liu L, Xiang K, Zheng T, Zhang T, Li M, Wang Y, Lu H, Li J. (2003): The heparan sulfate proteoglycan gene polymorphism: Association with type 2 diabetic nephropathy in Chinese. *Molecular and Cellular Biochemistry* 245: 121 - 126.
80. Locatelli E, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner CH, Zoccali C. (2003): The importance of diabetic nephropathy in current nephrological practice. *Nephrol Dialysis Transplant* 18: 1716 – 1725.
81. Lochmanová J.( 2003): Statistická ročenka dialyzační léčby v České Republice 2002, Česká nefrologická společnost, Praha
82. Makita N, Sato J, Manaka K, Shoji Y, Oishi A, Hashimoto M. et al.(2007): An acquired hypocalciuric hypocalcemia autoantibody induces allosteric transition among active human Ca-sensing receptor conformations. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5443-8.
83. Mamillapalli R, VanHouten J, Zawalich W, Wysolmerski J.(2007): Switching of G-protein usage by the calcium-sensing receptor reverses its effect on parathyroid hormone-related protein secretion in normal versus malignant breast cells. *J Biol Chem* 283:24435-47
84. Mangili R, Zebini G, Barlassina C, et al.(1993): Sodium-lithium countertransport and triglycerides in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 44: 127-133
85. Mare M, Bernade P, Gallois Y. et al.(1994): Relationships between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels and diabetic retinal and renal complications. *Diabetes* 43: 384-388
86. Marz w, Seelhorst U, Wellnitz B, Tiran B, Obermayer-Pitsch B, Renner W et al.(2007): Alanine to serine polymorphism at position 986 of the calcium-sensing receptor associated

- with coronary heart disease, myocardial infarction, all-cause, and cardiovascular mortality. *J clin Endocrinol Metab* 9:2363-9
87. Mathieu Ch, van Ettena E, Decallonnea B, Guilletia A, Gysemansa C, Bouillona R, Overbergh L. (2004): Vitamin D and 1,25 - dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> as modulators in the immune systém. *J Ster Biochem and Molr Biol* 89-90: 449 - 452.
  88. Melamed ML, Eustace JA, Plantinga L. et al.(2006): Changes in serum calcium, phosphate, and PTH and the risk of death in incident dialysis patients: a longitudinal study. *Kidney Int* 70:351-357
  89. Miedlich S, Lamesh P, Mueller A, Paschke R.(2001): Frequency of the calcium-sensing receptor variant A986S in patients with primary hyperparathyroidism, *Eur J Endocrinol* 145(4):421-7
  90. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike JW. (1997): Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Molecular Endocrinology* 11: 1165 - 1179.
  91. Moczulski D, Rogus, Antonellis A. et al.(1998): Major susceptibility locus for nephropathy in type diabetes on chromosome 3 q. *Diabetes* 47:1164-1169.
  92. Monciotti CG, Semplicini A, Morocutti, et al.(1997): Elevated sodium-lithium countertransport activity in erythrocytes is predictive of the development of microalbuminuria in IDDM. *Diabetologia* 40: 654-661.
  93. Monhart V.(2012): Možnosti zpomalení úbytku renálních funkcí s manifestní diabetickou nefropatií, *Lékařské listy* 7:14-16.
  94. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. (2008): Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature Review Immunology* 8: 685 – 698.
  95. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. (2008): Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature Review Immunology* 8: 685 – 698.
  96. Muddana V, Lamb J, Greer JB, Elinoff B, Hawes RH, Citron PB, et al.(2008): Association between calcium-sensing receptor gene polymorphisms and chronic pancreatitis in a US population: role of serine protease inhibitor Kazal 1 type and alcohol. *World J Gastroenterol*, 14:4486-91.
  97. Nagaba Y, Heishi M, Tazawa H, Tsukamoto Y, Kobayashi Y. (1998): Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Affect Secondary Hyperparathyroidism in Hemodialyzed Patients. *Am J Kidney Dis* 32: 464 – 496.

98. Neugebauer S, Baba T, Watanabe T. (2000): Association of the nitric oxide synthase gene polymorphism with an increased risk for progression to diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 49: 500 – 503.
99. Obermannová B, Šumník Z. (2009): Kalcium-sensing receptor: Fyziologie a onemocnění spojená s jeho poruchami. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie a výživa*, 4:192-200.
100. Olsen S, Mogense CE (1996): How often is NIDDM complicated with no-diabetic renal disease? An analysis of renal biopsie and the literature. *Diabetologia* 39: 1638-1645.
101. Overbergh L, Decallonne B, Valckx D, Verstuyf A, Depovere J, Laureys J, Rutgeerts O, Saint-Arnaud R, Bouillon R, Mathieu C. (2000): Identification and immune regulation of 25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase in murine macrophages. *Clinl and Experim Immun* 120(1): 139 - 46.
102. Pallais JC, Difor O, Chrti YB, Slovik D, Brown EM.(2004): Acquired hypocalciuric hypercalcemia due to autoantibodies against the calcium-sensing receptor. *N Engl J Med* 351:362-9.
103. Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usade HK, Badenhoop K. (2000): Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes* 49: 504 - 507.
104. Parving HH, Jacobsen P, Rossing K. et al.(1996): Benefits of long-term antihypertensive treatment on prognosis of diabetic nephropathy. *Kidney Int* 49:1778-1782.
105. Pelikánová T, Bartoš V. et al (2010): *Praktická diabetologie*, MAXDORF, ISBN 978-80-7345-216-2.
106. Pelikánová T.(2012): Léčba pacientů s diabetem2.typu a renální insuficiencí, *Lékařské listy* 3:16-20.
107. Pettit DJ, Saad MF, Bennett PH, Nelson RG, Knowler WC. et al.( 1990): Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type II diabetes mellitus. *Diabetologie* 33:438-443
108. Pontůch P.(2003): *Diabetická nefropatie*, GRADA, ISBN 80-247-0312-2
109. Pontůch P., Hozlárová JM. za skupinu DIANEBA( 2002): Prevalenci diabetickém nefropatie u diabetikov 1.typu v Bratislave. *Diabetes a obezita* 2: 37-41.
110. Prieto-Carrasquero MC, Harrison-Bernard LM, Kobori H. et al (2004): Enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats. *Hypertension* 44:223-229.

111. Quinn M, Angelico MC. et al.(1996): Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia* 39: 940-946.
112. Ranizad F, Mahban A, Shemirani AI, dMahmoudi T, Vahedi M, Nikzamir A, Zali MR.(2011): Influence of gene variants related to calcium homeostasis on biochemical parameters of women with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet* 28(3):225-32.
113. Raynolds MV, Briston MR, Bush EV, Abraham WT, Lowes BD, Zisman LS, Taft CS, Perryman MB. (1993): Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 342: 1073 - 1075.
114. Riachy R, Vandewalle B, Belaich S, Kerr-Conte J, Gmyr V, Zerimech F, d'Herbomez M, Lefebvre J, Pattou F. (2001): Beneficial effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on cytokine-treated human pancreatic islets. *J Endocrin* 169: 161 - 168.
115. Rigby WF, Stacy T, Fanger MV. (1984): Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). *J Clin Invest* 74(4):1451–1455.
116. Ritz E, Orht SR(1999): Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341:1127-1133.
117. Ritz E, Rychlík I, Locatelli F, Halimi S(1999): End-stage renal failure in type 2 diabetes – a medicinal catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis* 34: 795-808.
118. Rogus JJ, Moczulski DK, Freire MB. et al.(1998): Diabetic nephropathy is associated with AGT polymorphism T235: Results of a family based study. *Hypertension* 31: 627-631
119. Romero P, Niesler B, Schmitz-Winnenthal H, Fízte G, Holland-Cunz S.(2010): Is there a link between the calcium sensing receptor and Hirschsprung's disease ? A mutational analysis. *J Pediatr Surg* 47(3):55-5.
120. Rosochová I, Šufliarska A, Podracká L, Kovács L.(2000): Mikro a makroangiopatické komplikácie diabetu 2.typu a význam stanovenia polymorfizmu ACE génu. *Lek.obzor*, 49:213-216.
121. Rosolová H.(2012): Význam albumiurie v prevenci kardiovaskulárných nemocí, *Lékařské listy* 3:21-24.
122. Rossing P, Rossing K, Jacobsen P. et al.(1995): Unchanged incidence of diabetic nephropathy in IDDM patients. *Diabetes* 44:739-743

123. Rutkowski B with CEE Advisory Board in Chronic Renal Failure nad Scientific Advisory Board of ERA-EDTA Registry(2000): Changign pattern of end-stage renal disease in central and eastern Europe. *Nephrol.Dial.Transplant*, 15:156-160
124. Rychlík I, Flise D, Rith E.( 1999): Non-diabetic renal disease in type 2 diabetes. In: Rith E, Rychlík I (Eds) *nephropathy in type 2 diabetes*. Oxford University Press, Oxford, 81-88.
125. Saidak Z, Mentaverri R, Brown EM.(2009): The role of the calcium-sensing receptor in the developmet and progression of cancer. *Endocrine Rev* 30:178-95.
126. Sainz J, Van Tornout JM, Loro ML, Sayre J, Roe TF, Gilsanz V. (1997): Vitamin D-receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal American girls of Mexican descent. *E J Med* 337: 77 - 82.
127. Sander JL, Chattopadhyay N, Infor O, Yamaguchi T, Butters RR, Brown EM. (2000): Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathayroid hormone related peptide seretion in human breast cancer cell lines. *Endrocrinology* 141:4357-64.
128. Sanders JL, Chattopadhyay N, IFOR O, Yamaguchi T, Brown EM.(2002): Ca (2+) sensing receptor expression and PTHrP secretion in PC-3 human prostate cancer cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1267-74.
129. Saudek F.(2012): Chronické selhání ledvin u pacientů s diabetem: kdy je vhodná transplantační léčba, *Lékařské listy* 7:23-26.
130. Scillitani A, Guarnieri V, Battista C, De Veroniko S, Muscarella LA, Chiodini I. et al.(2007): Primary hyperparathyroidism and the presence of kidney stones are associated with different hyplotypes of the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 92:277-83.
131. Scillitani A, Guarnieri V, De Veroniko S, Muscarella LA, Battista C, DÁrgruma L. et al.(2004): Blood ionized calcium is associated with clustered polymorphisms in the karboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5634-8.
132. Sedláček J. (2003): Fyziologie vylučování. In: Trojan S. a kol. (eds.): *Lékařská fyziologie*. 4. vydání, Graga Publishing, Praha 2004, 451 – 454.
133. Shik J, Paarfrey PS.(2005): The clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14:550-557.
134. Shlipak MG, Kath R, Kestenbaum B et al.(2009): Rapid decline of kidney function increase cardiovascular risk in the elderly *J Am Soc Nephrol*. 20(12):2625-30

135. Schmidt S, Giessel R, Borgis KH. et al.(1996): Angiotensinogen gene M235T polymorphism is not associated with diabetic nephropathy. The Diabetic Nephropathy Study Group. *Nephrol Dial Transplant*: 11:1755-1761.
136. Schmidt S, Ritz E.(1995): Association of ACE gene polymorphism and diabetic nephropathy? The Diabetic Nephropathy Study group. *Kidney Int* 47: 1176-1181.
137. Schmidt S, Ritz E.(1997): Genetic determinant of diabetic renal disease and their impact on therapeutic intervention. *Kidney Int*. 52: 27-31.
138. Schunkert H, Hense HV, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH, Riegger GAJ.(1994): Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *NE J Med* 330: 1634 - 1638.
139. Smidtke J, Pape B, Krenkel U, Lagenberg U, Cooper DN, Breyel E, Mayer H. (1984): Restriction fragment length polymorphisms at the human parathyroid hormone gene locus. *Hum gen* 67: 428 - 431.
140. Solini A, Dalla Vestra M, Saller A. et al.(2002): The angiotensin-converting enzyme DD genotype is associated with glomerulopathy lesions in type 2 diabetes mellitus, *Diabetes* 51:251-255.
141. Sotorník I.(2011): *Kostní minerály a skelet při chronickém onemocnění ledvin, GALÉN*, ISBN 80-7262-769-1.
142. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes FaNB, Institute of Medicine(1997): *Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride*. Washington, DC: National Academy Press
143. Stankovic AR, Fischer NDL, Hillenber NK.(2006): Prorenin and angiotensin-dependent renal vasoconstriction in type 1 and type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 17:3293-3299.
144. Stárka L. a spol.(1997): *Endokrinologie, MAXDORF*, ISBN 80-85800-77-2
145. Szendroi A, Speer G, Tabak A, Kosa JP, Nyirady P, Majoros A, Romics I, Lakatos P.(2011): The role of vitamin D, estrogen, calcium sensing receptor genotypes and serum calcium in the pathogenesis of prostate cancer. *Can J Urol* 18(3): 5710-6.
146. Šeda O. (2005): *Genetika diabetu*. In: Perušičová J. (ed): *Diabetologie 2005*. 1.vydání, Triton s.r.o, Praha, 91 – 95.
147. Škrabič V, Zemunik T, Šitum M, Terzič J. (2003): Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in the Dalmatian population. *Diabetes Research and Clinical Practice* 59: 31 - 35.

148. Šmahelová A. (2012): Léčba diabetu mellitu u pacientů s chronickou renální insuficiencí. *Lék.listy* 7:20-22.
149. Tanaka Y, Castillo L, Deluca HF.(1977): The 24 - hydroxylation of 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Journal of Biological Chemistry* 252: 1421 – 1424.
150. Tarnow J.et al.(1974): Kidney perfusion under etomidate. *Anaesthetist* 23(10):421-2.
151. Teng M, Wolf M, Ofthun MN. et al.(2005): Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *J Am Soc Nephrol* 16:1115-1125.
152. Tentori F, Hunt WC, Stidley CA et al.(2006): Mortality risk among hemodialysis patients receiving defferent vitamin D analogs. *Kidney Int* 70:1858-1865.
153. Teplan V, Mengerová O, Štollová M, Adamcová J.(2011): Prevence incipientní diabetické nefropatie. *Lékařské listy* 7:8-10.
154. Pontůch P, Diabetická nefropatie, 2003 GRADA, ISBN 80-247-0312-2
155. Teplan V, Nefrologie(2003): TRITON, ISBN 80-7254-422-5
156. Tobin MD, Tomaszewski M, Braund PS, Hajat C, Raleigh SM, Palmer TM. et al.(2008): Common variants in genes underlying monogenic hypertension and potension and blood pressure in the gereal population. *Hypertension* 51:1658-64.
157. Tsukamoto K, Orimo H, Hosoi T, Miyao M, Ota N, Nakajima T. et al.(2000): Association of bone minerál density with polymorphism of the human calcium-sensint receptor locus. *Calcif Tissue Int* 66:181-3.
158. U.S. Renal Data Systém( 2001): Annual Data Report. USRDS Coordinating Center, Minneapolis
159. ÚZIS ČR (2010): Aktuální informace Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky, 23: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/cinnost-oboru-diabetologie-pece-diabetiky-roce-2010>.
160. Van Etten, Decallonnea B, Bouillona R, Mathieu Ch. (2004): NOD bone marrow-derived dendritic cells are modulated by analogs of 1,25 - dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Ster Biochem and Mol Biol* 89-90: 457 – 459.
161. Vardarli I, Baier Lj, Hanson RL. et al.( 2002): Gene for susceptibility to diabetic nephropahty in type 2 diabetes maps to 17q22.3-3. *Kidney Int* 62:2176-2183.
162. Vasicek TJ, McDevitt BE, Freeman MW, Fennick BJ, Hendy GN, Potts JT, Rich A, Kronenberg HM.(1983): Nucleotide sequence of the human parathyroid hormone gene. *Biochemistry* 80: 2127 - 2131.
163. Vavřinec J.(2008): Prevence diabetu mellitu 1.typu, *Remedia* 1:49-55

164. Vezzoli G, Tanini A, Ferrucci L, Sodami L, Bianchin C, Franceschelli F. et al (2002): Influence of calcium-sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-forming patients. *J Am Soc Nephrol* 13:2517-23.
165. Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T, Biasion R, Coviello D, Syren ML. et al.(2007): R990C polymorphism of calcium-sensing receptor does produce a gain-of-function and predispose to primary hypocalciuria. *Kidney Int* 71:1155-62.
166. Vezzoli G, Tanini A, Ferrucci L et al.(2002): Influence of Calcium-Sensing Receptor Gene on Urinary Calcium Excretion in Stone-Forming Patients. *J Am Nephrol* 13:2517-2523.
167. Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T, Soldati L.(2011): Genetics and calcium nephrolithiasis. *Kidney Int* 80 (6): 587-93.
168. Ward BK, Magno AL, Walsh JP, Ratajczak T. (2012): The role of the calcium-sensing receptor in human disease. *Clinical Biochemistry* 45: 943–953.
169. Wang S, Head J, Stevens, Fuller JH.(1996): WHO Multinational Study Group: Excess mortality and its relation to hypertension and proteinuria in diabetic patients. The WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diab.Care* 19:305-3127.
170. Wang Y, Kikuchi S, Suzuki H, Nagase S, Koyama A. (1999): Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in intron 4 affects the progression of renal failure in non-diabetic renal diseases. *Nephrol Dialysis Transplant* 14: 2898 - 2902.
171. Warra JH, Gearing G, Laffel L, Krolewski AS.(1996): Effect of duration of type 1 diabetes on the prevalence of stages of diabetic nephropathy defined by urinary albumin/creatinine ratio. *J Am Soc Nephrol* 7: 930-937.
172. Wolf M, Shah A, Gutierrez O. et al.(2007): Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. *Kidney Int* 72:1004-1013.
173. Yan Jenny Chung P, Van Hul W.(2011): Paget's Disease of Bone: Evidence for Complex Pathogenetic Interactions. *Semin Arthritis rheum* 27.
174. Yano S, Macleod RJ, Chattopadhyay N, Tfelt-Hansen J, IFOR O, Butters RR. et al.(2004): Calcium-sensing receptor activation stimulates parathyroid hormone-related protein secretion in prostate cancer cells : role of epidermal growth factor receptor transactivation. *Bone* 35:664-72.
175. Yun FHJ, Wong BYL, Chase M, Shuen AY, Canaff L, Thongthai K. et al.(2007): Genetic variation and the calcium-sensing receptor (CASR) locus: implications for clinical molecular diagnostics. *Clin Biochem* 40:551-61.



176. Zadák Z, Květina J.(2011): Metodologie předklinického a klinického výzkumu v metabolismu, výživě, imunologii a farmakologii, GALÉN, , ISBN 80-7262-748-6
177. Zdrbáni G, Maestroni A, Mangili R. et al.(1998): Amiloride-insensitive Na-H exchange: a candidate mediator of erythrocyte Na-Li countertransport. *J.Am.Soc.Nephrol*, 9:2203-2211.
178. Živná M, Hůlková H, Matigno M. et al.(2009): Dominant renin gene mutation associated with early-onset hyperuricemia, anemia, and chronic kidney failure. *Am J hum Genetics* 85:1-10
179. Žofková I, Zajíčková K, Hill M, Vanková M. (2005): Role of intron 5 C/T polymorphism of the calcium sensing receptor gene in the regulation of the serum FSH and LH in post-menopausal women. *J Endocrinol Invest* 28: 638-642.