

Genetika cystické fibrózy

Lidské tělo je tvořeno milióny buněk. Každá buňka obsahuje ve svém jádru molekuly kyseliny deoxyribonukleové (tj. DNA), které tvoří jednotlivé geny. **Geny** fungují jako sada instrukcí, které kontrolují růst, vývoj a funkci našeho těla. Jsou odpovědné za naše charakteristické znaky, jako je barva očí, krevní skupina nebo výška, ale i různá onemocnění. Podle současných poznatků se odhaduje, že každý člověk nese až 40 tisíc genů, které ovlivňují jeho organismus. Geny se nacházejí na vláknitých strukturách, tzv. **chromozómech**. Každé buněčné jádro obsahuje 23 párů chromozómů, z každého páru je jeden chromozóm původem od matky a jeden od otce. Proto dědíme také dvě kopie od většiny genů, jednu kopii od každého z rodičů. To je důvod, proč máme podobné vlastnosti jako naši rodiče. Dědičné změny v DNA, které narušují normální funkci genů, se označují jako **mutace** a jsou příčinou cystické fibrózy a mnoha jiných dědičných onemocnění.

Proč se narodí dítě s cystickou fibrózou

Miminko s cystickou fibrózou se může narodit pouze v případě, že oba jeho rodiče jsou nosiči mutovaného genu CFTR.

Cystická fibróza je jedno z nejčastějších dědičných onemocnění. Vzhledem k typu dědičnosti (tzv. autozomálně recesivní, AR) vzniká toto onemocnění jen v případě, že **oba geny pro cystickou fibrózu** (geny *CFTR*) nesou mutaci, která je vyřadí z jejich normální funkce. Zdravý gen *CFTR* produkuje specifickou bílkovinu (protein), která se podílí na transportu solí přes buněčnou stěnu, především v dýchacích cestách, vývodech slinivky břišní a potních žlázách.

Rodiče pacienta s cystickou fibrózou mají jen jeden mutovaný gen *CFTR*. Onemocnění CF u nich nevzniká, protože druhý, zdravý gen vyváží svou aktivitou funkci mutovaného genu. Všichni lidé, kteří mají jen jeden mutovaný gen *CFTR*, jsou **zdravými nosiči** mutace genu pro CF (tzv. heterozygoty).

Podle současných výzkumů je přibližně každý 26. jedinec u nás nosičem mutace genu pro CF. Je proto relativně vysoká pravděpodobnost, že se nosiči mutace setkají v manželství (každé 676. manželství). V tomto případě jsou děti těchto partnerů ohroženy **25 procentním rizikem CF**, z 50 procent mohou být zdravými nosiči a z 25 procent nezdedí ani jednu mutaci od svých rodičů.

Obrázek znázorňuje všechny možnosti přenesení CF genu – tedy rizika v *každém těhotenství* pro pár, kde jsou oba nosiči defektního *CFTR* genu.

Každé rodině, v níž se narodilo dítě s cystickou fibrózou, je nutné zajistit **genetické poradenství** a molekulárně genetické vyšetření genu *CFTR*. Všichni pokrevní příbuzní pacienta s CF se mohou nechat vyšetřit, zda jsou zdravými nosiči mutace v genu *CFTR*. Úlohou genetického poradenství je vysvětlení dané problematiky pro konkrétní rodinu s výskytem CF, součástí je také možnost prenatálního vyšetření, event. preimplantační diagnostiky cystické fibrózy

Molekulárně - genetické vyšetření

Provádí se testováním DNA obvykle získané z krve, z části placenty nebo jiných buněk lidského těla. DNA je možno uchovávat ve zmraženém stavu k dalšímu vyšetřování po mnoho let.

Dosud bylo na celém světě objeveno více než 1500 různých mutací v genu pro cystickou fibrózu. Z tohoto obrovského množství se ale pouze 20 mutací vyskytuje poměrně běžně. Zastoupení mutací se liší u různých populací, proto je důležité znát původ rodiny. Nejčastější mutací v *CFTR* genu je F508del (čti delta F508), která se vyskytuje asi u 71% pacientů v České republice.

Nález dvou CF mutací potvrzuje u pacienta diagnózu cystické fibrózy. Různé mutace způsobují rozdílné postižení *CFTR* proteinu, které se může odrazit i na závažnosti klinických obtíží u pacienta. V praxi to znamená, že pokud je nalezena alespoň jedna mírná mutace, dá se předpokládat i mírnější průběh onemocnění. Je ale důležité zmínit, že nejen CF mutace jsou zodpovědné za průběh nemoci. Určitou roli zde hrají další genetické faktory nazývané genetické modifikátory, které jsou v současnosti zkoumány.

Hledání mutace u pacienta s CF spočívá v postupném vylučování nejčastějších mutací, které se vyskytují v dané populaci. Pokud je toto kaskádové vyšetření neúspěšné, zaměřuje se testování na méně časté nebo neznámé mutace. To je dostupné na specializovaných pracovištích.

Vyšetření CF mutací u rodičů je důležité jak k potvrzení genetického výsledku u jejich nemocného dítěte, tak zejména pro jejich budoucí těhotenství, ve kterém lze spolehlivě provést vyšetření plodu v časném těhotenství. Dále je výhodou pro vyšetření příbuzných, kteří také mohou být nosiči mutace CF genu a v budoucnosti budou plánovat rodičovství. Tak lze předejít narození dítěte s CF v širší rodině.

Riziko nosičství mutace genu *CFTR* významně stoupá, pokud se cystická fibróza v příbuzenstvu již vyskytla. Z těchto důvodů doporučujeme proto u všech pokrevních příbuzných pacienta s CF vyšetřit mutace genu *CFTR*. Při zjištění nosičství mutace doporučujeme také vyšetření partnera.

V tabulce jsou uvedeny pravděpodobnosti být nosičem CF genu, pokud jste daným pokrevním příbuzným pacienta s CF:

Bratr nebo sestra	2:3
Teta nebo strýc	1:2
Bratranec nebo sestřenice	1:4

Testování CF nosičství se zaměřuje na nejběžnější mutace a proto zachytí většinu, ale ne všechny CF nosiče. Negativní výsledek (tedy žádná vyšetřená mutace nebyla nalezena) nemusí být absolutně definitivní, i když riziko nosičství se významně sníží.

Novorozenecký screening cystické fibrózy

Protože včasná diagnóza je u CF obtížná, novorozenecký screening cystické fibrózy je v současnosti významným trendem v řadě evropských zemí a USA. Nabývá na významu v rámci odstranění nerovnoměrnosti věku při diagnóze, a tak i v péči o děti s CF. Standardně se provádí vyšetřením kapky krve odebrané z patičky novorozence zpravidla v porodnici, ze které se testují i další vrozená onemocnění. Pomocí novorozeneckého screeningu se zachytí děti s CF do 2 měsíců věku, kdy ještě většina z nich nemá rozvinuté příznaky onemocnění.

Prenatální diagnostika CF

Prenatální diagnostika cystické fibrózy spočívá v molekulárně - genetickém vyšetření genu *CFTR* u plodu v časně fázi těhotenství. Prakticky to znamená, že žena podstoupí ve 12. - 13. týdnu těhotenství odběr buněk z části placenty, tzv. **choriových klků**, nebo v 16. - 17. týdnu těhotenství **amniocentézu**, což je odběr malého množství plodové vody obsahující buňky plodu. Jedná se o dvě různá vyšetření, jejichž společným cílem je získat buňky plodu pro další laboratorní zpracování. Tyto odběry provádí zkušený gynekolog pod kontrolou ultrazvuku. Riziko možných komplikací je minimální, v zásadě nepřekračuje jedno procento.

Ze získaného materiálu je izolována DNA plodu a následně vyšetřen gen pro cystickou fibrózu. Toto vyšetření odhalí, zda se vyvíjí plod s cystickou fibrózou, nebo zdravý jedinec, který nezdědil ani jednu mutaci, nebo zdravý nosič mutace. Definitivní výsledky tohoto vyšetření můžeme rodičům sdělit zhruba do tří týdnů po odběru. Součástí vyšetření plodové vody nebo choriových klků je také vyšetření chromozómů plodu včetně pohlaví a v případě amniocentézy i hladiny enzymů v plodové vodě (podrobně viz plánované rodičovství u CF pacientů ad 3).

V případě, že se prokáže vývoj nemocného dítěte, mají rodiče možnost svobodného rozhodnutí zda těhotenství přerušit a to vždy po podrobném informování lékařem - genetikem. V souladu se zákony České republiky je ukončení těhotenství z genetických důvodů možné provést do konce 24. týdne těhotenství.

Vyšetření genu *CFTR* u plodu je nabízeno všem rodinám s 25procentním rizikem CF.

V případě, že je v rodině známa pouze jedna mutace, lze využít nepřímou prenatální diagnostiku a doplnit ji ultrazvukovým vyšetřením plodu, event. biochemickým vyšetřením plodové vody.

Pokud je sourozenec nebo jiný pokrevní příbuzný CF pacienta zdravým nosičem mutace genu *CFTR*, doporučujeme vyšetření genu *CFTR* také u jeho partnera. Po vyloučení nejčastějších mutací je riziko narození dítěte s cystickou fibrózou u těchto partnerů menší než 0,1 procenta. V těchto případech je vhodné provést podrobné ultrazvukové vyšetření plodu se zaměřením na střevní průchodnost v období 18. – 20. týdne těhotenství.

Specializované genetické poradenství je určeno všem rodinám, kde se CF vyskytla, a to v ideálním případě před plánovaným rodičovstvím nebo na začátku gravidity.

Plánované rodičovství u nemocných s CF a jejich partnerů

Současná úroveň péče vede k zlepšení stavu a kvality života pacientů s CF, což jim umožňuje přiměřené vzdělání, zaměstnání, začlenění do společnosti a také manželství a v řadě případů i plánované rodičovství.

Při plánovaném rodičovství u pacientů s cystickou fibrózou je prenatální péče rozdělena do tří rovin:

1) **Péče o pacienta samotného z hlediska interního**, komplexní léčba CF vedená příslušnými odborníky, a pokud je pacientkou s CF žena také řešení gynekologicko-porodnické problematiky.

2) **Péče o fertilitu (plodnost) páru**. U muže to znamená vyšetření počtu a kvality spermií (tzv. spermioqram). Je totiž prokázáno, že více než 90 procent mužů s CF má uzávěr chámovodů, což způsobuje jejich neplodnost. U ženy s CF závisí schopnost otěhotnět víceméně na jejím celkovém zdravotním stavu. Především pro muže s CF a prokázanou neplodností do této péče patří i asistovaná reprodukce (tedy IVF, tzn. in vitro fertilizace, neboli mimotělního oplodnění), a to především v případě, že pár není schopen otěhotnět spontánně. Současné metody asistované reprodukce umožňují získat spermie přímo z varlete.

Ty jsou pak injikovány do vajíček získaných od partnerky (metoda ICSI). Pokud by tato metoda byla neúspěšná, mohou se partneři rozhodnout pro oplodnění vajíčka spermiemi dárce, u kterého byl vyšetřen gen pro cystickou fibrózu.

3) **Prenatální diagnostika cystické fibrózy.** Nejprve je potřeba vyloučit maximální množství mutací genu *CFTR* u zdravého partnera a tím u něj minimalizovat zbytkové riziko nosičství mutace v genu *CFTR*. Pokud nenalezneme žádnou z vyšetřovaných mutací, je riziko postižení plodu CF u tohoto páru přibližně 4,5x vyšší než běžné populační riziko. Vzhledem k tomu, že nemůžeme u zdravého partnera absolutně vyloučit některou z méně častých mutací genu *CFTR*, nabízíme páru provedení amniocentézy. To nám umožní vyšetřit gen *CFTR* u plodu. Vzhledem k tomu, že jeden z rodičů je pacient s CF, plod od něj vždy zdědí jednu mutaci genu *CFTR*. To znamená, že narozené dítě bude vždy minimálně zdravým nosičem mutace. Pokud by však byl zdravý rodič nosičem nám neznámé mutace genu *CFTR* (což nemůžeme současnými metodami 100 procentně vyloučit), mohl by plod tuto mutaci zdědit a v tom případě by se již jednalo o plod s CF. K minimalizaci tohoto rizika vyšetřujeme v plodové vodě ještě tzv. střevní mikrovilární enzymy. Jde především o enzym GMT (gamaglutamyltransferázu), jehož hladina v plodové vodě při postižení plodu CF významně klesá. Tento enzym totiž odráží míru průchodnosti střev u plodu, která je při CF porušená v důsledku prenatálního postižení slinivky břišní. Dalším doporučeným vyšetřením je v 18. - 20. týdnu těhotenství ultrazvukové vyšetření plodu zaměřené na střevní průchodnost. Další péče o těhotenství je již obdobná jako u ostatních těhotenstvích.

V případě, že partner pacienta s CF je prokázáný zdravý nosič jedné mutace genu *CFTR*, je riziko postižení plodu cystickou fibrózou 50 procent. V 50 procentech se narodí zdravý nosič mutace v genu *CFTR*. V tomto případě opět nabízíme rodičům amniocentézu, abychom přímo vyšetřili plod a zjistili, zda zdědil jednu nebo dvě mutace genu *CFTR*. Pokud toto vyšetření prokáže vývoj dítěte s CF, mohou se rodiče eventuálně rozhodnout pro ukončení těhotenství.

Preimplantační diagnostika cystické fibrózy

Preimplantační genetická diagnostika (PGD) je nejnovější metodou časné prevence CF, těžkých vrozených vývojových vad a jiných vrozených onemocnění. Lidské embryo, které vzniká fertilizací in vitro (tzv. IVF, oplodnění ve zkumavce), je ve stáří několika dnů tvořeno šesti až osmi buňkami. V tomto stádiu je možné odebrat jednu až dvě buňky embrya a vyšetřit gen *CFTR*. Do dělohy jsou pak přenesena pouze zdravá embrya bez mutací nebo přenašeči jedné mutace v genu *CFTR*. Vzhledem k tomu, že touto metodou je možné předejít případnému ukončení těhotenství pro postižení plodu CF, tak jako je tomu u prenatální diagnostiky, představuje PGD CF z hlediska psychologického a etického významný pokrok, přestože je metodicky a finančně velmi náročná. Tato metoda je již v České republice dostupná.

Přestože se neustále zlepšují molekulárně genetické techniky pro vyšetření mutací genu *CFTR*, stále je přítomno nezanedbatelné riziko technického selhání metody (falešné pozitivita či negativita) při použití několika buněk pro izolaci DNA. Z tohoto důvodu by se měla PGD CF provádět jen na pracovišti s kvalitním molekulárně genetickým zázemím.

Genová terapie

Vzhledem k závažnosti choroby a velkému množství nemocných dětí s CF je celosvětové úsilí soustředěno na zajištění co nejdokonalejší léčby CF. Ta by měla zbavit nemocné jejich příznaků nápravou porušené funkce genu *CFTR* v buňkách. Praktické využití

moderních experimentálních poznatků genové terapie však dosud naráží na řadu závažných a nedořešených problémů. V současné době se pracuje na způsobech přenosu opraveného genu *CFTR* do buňky.

Podstatné je to, že genovou terapii bude možno provádět jen u pacientů, jejichž orgány nejsou dosud nezvratně poškozeny. Proto je zapotřebí, aby byly co nejpřesněji dodržovány současné léčebné postupy a doporučení odborných lékařů. Významně se tím zvýší šance, že se pacienti s CF dočkají genové terapie v co nejlepším zdravotním stavu.

Jaký význam má genetický test ?

1. *Pro pacienta s CF:*

Zjištění mutací CF genu patří spolu se zvýšenou koncentrací chloridů v potu k základním kritériím přesné diagnózy CF. U nemocných s hraniční nebo dokonce normální koncentrací chloridů v potu může zjištění dvou mutací rozhodnout o stanovení diagnózy. Přítomnost některých “mírných” mutací (např. R117H, 3849+10kb C-T) může i předpovědět mírný průběh onemocnění! Nejčastěji se přímo určí obě mutace, v některém případě ale zůstávají jedna, výjimečně obě mutace neznámé.

2. *Pro rodiče pacienta:*

Vyšetření mutací *CFTR* genu u obou rodičů je důležité k potvrzení výsledku molekulárně genetického testu u jejich nemocného dítěte, ale především pro jejich další plánované těhotenství.

3. *Pro sourozence a pokrevní příbuzné pacienta:*

Příbuzní pacienta s CF mají významně zvýšené riziko nosičství mutace CF genu. Znalost nosičství mutace je však důležitá především *před plánováním těhotenství*, kdy doporučujeme vyšetření partnera prokázaného nosiče na alespoň nejčastější mutace *CFTR* genu.

4. *Pro jedince, v jejichž rodinách se CF dosud nevyskytla:*

Jde především o partnery již prokázaných nosičů mutace genu pro CF.