

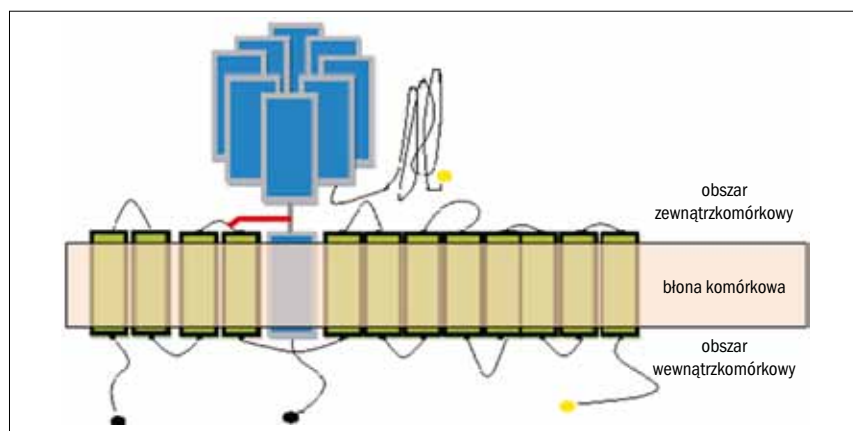
Genetic basis of cystinuria in dogs

Trzeciak M., Gruszczyńska J., Department of Genetics and Animal Breeding, Faculty of Animal Sciences, Warsaw University of Life Science – SGGW

The purpose of this article was to present a hereditary condition of cystinuria in dogs. The predominant clinical manifestation is the formation of urinary cystine calculi. Cystinuria is a genetic disorder, occurring in man and dog, caused by abnormal amino-acids transporters in kidneys and intestine. It is characterized by persistent, excessive excretion of cystine, lysine, ornithine and arginine due to impairment of renal tubular reabsorption of these amino-acids. Transporter $b^{0,+}$ is formed of two different subunits bounded by disulfide bridge. Light subunit, $b^{0,+}AT$ is encoded by *SLC7A9* gene, heavy subunit rBAT is encoded by *SLC3A1*. Failure of amino-acids transport results from mutation in subunits genes and leads to reduction of cystine, arginine, ornithine and lysine reabsorption. This in turn induces forming of cystine calculi, which is the only symptom of the disease. Cystinuria can be recognized basing on biochemical findings and genetic tests. Patients with urolithiasis are treated pharmacologically to prevent stones formation. This hereditary condition in dogs can be eliminated by the careful breeding management.

Keywords: dog, cystinuria, transporter $b^{0,+}$, gene *SLC3A1*, gene *SLC7A9*, urolithiasis.

Cystynuria jest dziedziczną chorobą występującą u ludzi i psów, spowodowaną nieprawidłowym funkcjonowaniem transportera aminokwasowego w nerkach i jelicie cienkim. Transporter ten noszący nazwę $b^{0,+}$ jest heterodimerem i składa się z dwóch różnych podjednostek połączonych za pomocą mostka dwusiarczkowego. Lekka podjednostka $b^{0,+}AT$ transportera



Ryc. 1. Transporter $b^{0,+}$ zbudowany jest z dwóch podjednostek połączonych za pomocą mostka dwusiarczkowego (czerwona kreska). Podjednostka ciężka (niebieska) należy do II typu białek błonowych, posiada N-końiec wewnątrz komórki, a C-końiec na zewnątrz. Lekka podjednostka (zielona) składa się z dwunastu domen przez-błonowych i oba końce tworzącego ją polipeptydu znajdują się wewnątrzkomórkowo. Aminokwasy stanowiące N-końce polipeptydów oznaczono na rysunku czarnymi punktami, a aminokwasy stanowiące C-końce polipeptydów oznaczono żółtymi punktami (4)

Podłoże genetyczne cystynurii u psów

Magda Trzeciak, Joanna Gruszczyńska

z Katedry Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie

jest kodowana przez gen *SLC7A9*, a ciężka podjednostka rBAT jest kodowana przez gen *SLC3A1*. Defekt w przenoszeniu aminokwasów wynika z mutacji występujących w genach kodujących białka, co prowadzi do zaburzenia reabsorpcji w kanalikach nerkowych i wchłaniania w jelitach cystyny, argininy, ornityny i lizyny. Skutkiem zmniejszonej reabsorpcji aminokwasów w kanalikach proksymalnych nerek jest powstawanie nawracających kamieni cystynowych, będących jedynymi objawami choroby. Kamienie zbudowane są wyłącznie z cystyny z powodu jej najniższej rozpuszczalności w moczu. Pacjenci chorzy na cystynurię diagnozowani są na podstawie testów biochemicznych i genetycznych. Mogą być poddani leczeniu, którego celem jest rozpuszczanie i zapobieganie tworzeniu się złogów cystyny.

W związku z dziedzicznym charakterem cystynurii, istnieje możliwość wyeliminowania jej z populacji psów. Taką możliwość stwarza zidentyfikowanie mutacji powodujących defekt transportera aminokwasowego i opracowanie testów genetycznych wykrywających dane mutacje. Obecnie dostępny jest test wykrywający mutację odpowiedzialną za cystynurię u psów rasy nowofundland.

Klub Nowofundland w Polsce podjął uchwałę o obowiązkowym od 2009 r. badaniu wszystkich psów tej rasy, których właściciele należą do klubu. W hodowli mogą być używane jedynie osobniki

genetycznie wolne od defektu i jego bezobjawowi nosiciele. Przy kojarzeniu nosiciela drugiego z osobników musi być wolny od cystynurii. Na terenie kraju badania genetyczne u nowofundlandów wykonuje polecane przez Związek Kynologiczny w Polsce laboratorium Laboklin.

Odkrycie choroby

Pierwsze doniesienia o występowaniu cystynurii u psów pochodzą z 1935 r. (1). Sądzone wówczas, że jest to choroba metaboliczna i wiązano jej występowanie z defektem na poziomie przekształcania cystyny lub cysteiny w siarczan (1). Jednak badania nie potwierdziły tych przypuszczeń i zaczęto domniemywać, że przyczyną cystynurii może być nieprawidłowe funkcjonowanie układu moczowego. Aby jednoznacznie postawić diagnozę, Treacher (1) opracował specjalną metodę pozwalającą ocenić poziom cystyny w płynach ustrojowych oraz w moczu psów, u których występowały złogi cystynowe. Wyniki jego badań nie wykazały żadnych zmian w stężeniu aminokwasów w płynach ustrojowych. Istotne różnice obserwowano natomiast w składzie moczu zdrowych i chorych (podwyższona koncentracja cystyny) psów. Potwierdziło to hipotezę, że cystynuria nie jest nieprawidłowością metaboliczną, lecz ma związek z funkcjonowaniem nerek (1).

W związku z występowaniem choroby głównie w obrębie spokrewnionych ze sobą zwierząt (rodzina, linia hodowlana, rasa) ustalono, że ma ona podłoże genetyczne. Pomógł w tym fakt, że cystynuria u człowieka była uznana za chorobę dziedziczną, a jej kliniczny obraz pod wieloma względami przypomina objawy cystynurii obserwowane u psów (2).

Transport aminokwasów

Podczas ustalania patofizjologii cystynurii usystematyzowano wiedzę odnośnie do fizjologii transportu cystyny i aminokwasów zasadowych (3). Cystyna i aminokwasy zasadowe (arginina, lizyna i ornityna) podlegają absorpcji w nabłonku jelita cienkiego i reabsorpcji z moczu pierwotnego w kanalikach nerkowych (4). W cystynurii transport aminokwasów zostaje zaburzony zarówno w jelicie, jak i w nerkach (5). Transporter, który przenosi cystynę,

ornitynę, lizynę i argininę nosi nazwę $b^{0,+}$ i działa na zasadzie antyportu (ryc. 1; 5). Za jego pośrednictwem aminokwasy obojętne⁽⁰⁾ są usuwane z komórki i wymieniane na aminokwasy zasadowe⁽⁺⁾ (6). Charakterystyczną cechą transportera $b^{0,+}$ jest jego złożona budowa, wynikająca z asocjacji dwóch różnych podjednostek, połączonych za pomocą mostka dwusiarczkowego (7). Taka budowa występuje u ssaków tylko w jednej rodzinie transporterów aminokwasowych – HATs (heteromeric amino acid transporters; 7). W obu podjednostkach transportera mogą wystąpić mutacje prowadzące do cystynurii (7).

Lekka podjednostka – $b^{0,+}$ AT (system $b^{0,+}$ amino acid transporter) składa się z 12 domen przezłonowych i jest nieglikolizowana (7). Jej masa cząsteczkowa wynosi około 50 kDa (4). Oba końce polipeptydu $b^{0,+}$ AT zlokalizowane są wewnątrzkomórkowo (6). Lekka podjednostka odpowiada za swoistość aminokwasową transportera (4) oraz wykazuje aktywność przenośnikową niezależnie od ciężkiej podjednostki (7). Przypuszcza się, że $b^{0,+}$ AT może stanowić funkcjonalną część innego transportera błonowego (7). Ponadto $b^{0,+}$ AT ułatwia dojrzewanie i zwiększa trwałość podjednostki ciężkiej transportera (7). Podejrzewa się zatem, że lekka podjednostka pełni funkcję białka opiekuńczego w stosunku do ciężkiej podjednostki, chroniąc ją przed komórkową degradacją (7).

Ciężka domena – rBAT (related to system $b^{0,+}$ amino acid transporter) przypomina w swej strukturze bakteryjną glikozydazę, lecz nie wykazuje jej aktywności (5). Posiada jedną domenę przezłonową, o masie cząsteczkowej wynoszącej około 90 kDa (4). Koniec C (zawierający grupę COOH) tworzący ją polipeptydu znajduje się wewnątrz komórki, a koniec N (zawierający grupę NH_2) na zewnątrz (6). Podjednostka rBAT jest kluczowa dla skierowania podjednostki lekkiej w rejon błony komórkowej. Warunkiem koniecznym dla tego procesu jest asocjacja obu podjednostek (5).

Podczas badań nad ciężką podjednostką transportera i mutacjami obecnymi w kodującym ją genie zaobserwowano, że jedna z nich (R365W) powoduje specyficzne funkcjonowanie transportera. Na skutek jej wystąpienia dochodzi do upośledzenia wpływu i normalnego napływu argininy do komórki (4). Zaproponowano to istnienie dwóch ścieżek transportu w lekkiej podjednostce (odpowiedzialnej za aktywność transporterową) lub możliwość asocjowania heterodimerów do heterotetramerów w przypadku prawidłowego funkcjonowania obu podjednostek (4).

System $b^{0,+}$ reprezentuje typ transportu, do którego konieczna jest obecność potencjału błonowego i dużej liczby

aminokwasów obojętnych wewnątrz komórki (6). Wymiana aminokwasów tą drogą jest pośrednio związana z obecnością sodu. Sód jest bowiem niezbędny do pracy pomp transportujących aminokwasy obojętne do wnętrza komórki (4). Napływowi cystyny do komórki sprzyja również mechanizm wewnątrzkomórkowej redukcji cystyny do cysteiny (6).

Przypuszcza się, że system $b^{0,+}$ jest wyłącznym transporterem cystyny w nerkach (4), dlatego objawy cystynurii dotyczą jedynie układu moczowego. Nie obserwuje się natomiast niedoborów aminokwasów, których występowanie jest związane z wadliwym funkcjonowaniem transportera jelitowego, gdyż sprawny pozostaje transport dipeptydów i tripeptydów w świetle jelita (4).

Podłoże genetyczne cystynurii u człowieka

Objawy kliniczne cystynurii nie są jednolite u wszystkich pacjentów. Obecnie wiadomo, że wynika to ze złożonego podłoża tej choroby. Początkowo sądzono, że cystynuria jest chorobą jednogenną, a obecność różnych fenotypów uzasadniano istnieniem kilku form allelicznych tego genu. Na podstawie ilości cystyny i dwuzasadowych aminokwasów wydzielanych do moczu heterozygot (potomstwo osób zdrowych i chorych na cystynurię) wprowadzono podział cystynurii na trzy typy (8). W moczu heterozygot należących do I typu nie obserwowano żadnych zmian biochemicznych, w II typie następował znaczny, a w III umiarkowany wzrost wydalania cystyny i dwuzasadowych aminokwasów do moczu. U tych heterozygot dochodziło ponadto do formowania kamieni cystynowych (8, 9).

Na podstawie badań genetycznych ustalono, że typ I wynika z mutacji w genie *SLC3A1* oraz wykluczono związek tego genu z cystynurią III typu (3). Gen *SLC3A1* koduje ciężką podjednostkę transportera. Wykryto w nim liczne mutacje zmiany sensu (3). Następnie odkryto, że cystynuria typu non-I (II i III) u ludzi wywołwana jest mutacjami w genie *SLC7A9*. Jest to gen kodujący lekką podjednostkę transportera. Mutacje w nim wykryte to mutacje zmiany sensu i zmiany ramki odczytu – insercje powodujące przedwczesne pojawienie się kodonu STOP oraz delecje (10, 11). U ludzi zaobserwowano, że większość mutacji zachodzących w genach kodujących podjednostki transportera wykazuje specyficzność, zależnie od pochodzenia pacjentów (12).

Z czasem, gdy lepiej poznano podłoże genetyczne tej choroby, klasyfikacja fenotypowa została zastąpiona klasyfikacją molekularną. Wprowadziła ją w 2003 r. Dello Strologo (13), rozróżniając trzy typy

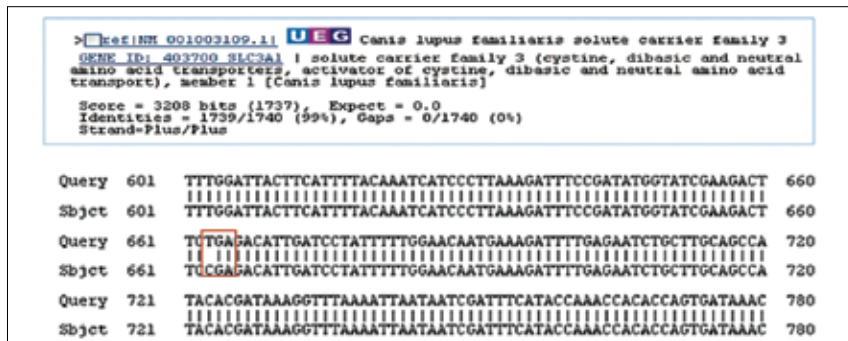
cystynurii, oparte na obecności mutacji w genach *SLC3A1* i *SLC7A9*. Zgodnie z zaproponowanym schematem wyróżniono: typ A – zmutowane oba allele genu *SLC3A1*, typ B – zmutowane oba allele genu *SLC7A9* oraz typ AB – zmutowany jeden allele genu *SLC3A1* oraz jeden allele genu *SLC7A9* (13).

Podłoże genetyczne cystynurii u psów

Mutacje występujące w genach *SLC3A1* i *SLC7A9* odpowiadają za pojawienie się choroby u 70% dotkniętych cystynurią ludzi. U psów różnych ras odkryto wprawdzie obecność mutacji w genach *SLC3A1* i *SLC7A9*, powodujące zmiany aminokwasów, lecz w większości przypadków nie odnaleziono ich bezpośrednio powiązania z cystynurią (14).

Trudno jednoznacznie ocenić sposób dziedziczenia cystynurii u psów (14). Podobnie jak u ludzi wynika to z faktu, że u różnych ras psów występuje odmienny kliniczny obraz choroby. Rasy psów, u których stwierdzono występowanie cystynurii to między innymi: buldog francuski, buldog angielski, spaniel tybetański, terier irlandzki, terier szkocki, jamnik, nowofundland i labrador retriever (14). W sumie choroba została rozpoznana u ponad 60 ras psów (15). Treacher i wsp. (1), badając sposób dziedziczenia cystynurii u psów, przyjęli, że choroba ta jest uwarunkowana genem recesywnym. Jednak w toku dalszej analizy genetycznej zauważono, że mechanizm dziedziczenia cystynurii u terierów szkockich i irlandzkich przypomina dziedziczenie cech sprzężonych z płcią, ponieważ objawy chorobowe obserwowano wyłącznie u samców (2). Natomiast w obrębie rasy nowofundland cystynuria jest diagnozowana u osobników obu płci, z większą częstością u samców niż u sук (14). Zauważono, że ten sposób dziedziczenia cystynurii przypomina cystynurię zaliczaną u ludzi do pierwszego typu według klasyfikacji zaproponowanej w 1966 r. przez Rosenberga i wsp. (8, 15).

U rasy nowofundland choroba dziedziczy się w sposób autosomalny recesywny (16). Mutację odpowiedzialną za cystynurię u tej rasy wykryto w 2000 r. (15). Została odnaleziona w genie *SLC3A1* (egzon 2), który u psa znajduje się w chromosomie 10q. Jest to transycja cytozyny w tymidynę (C663T) wywołująca zamianę argininy w kodon STOP i przedwczesne zatrzymanie translacji (ryc. 2). Prowadzi to do skrócenia powstającego białka rBAT (z 700 do 197 aminokwasów) i jego dysfunkcji (15). Mutacje w genie *SLC3A1* skutkują zwykle upośledzonym przemieszczaniem podjednostek do błony komórkowej (4). Wiadomo, że materiał genetyczny obecny u psa



Ryc. 2. Porównanie sekwencji nukleotydowych genu *SLC3A1* psów chorego (Query) i zdrowego (Subject). Analiza została wykonana za pomocą programu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Analiza potwierdziła, że mutacja występująca w pozycji 663 indukuje powstanie kodonu STOP (22)

w chromosomie 10 pokrywa się z genami zlokalizowanymi w człowieka w chromosomie 2. Może to świadczyć o homologii tych obszarów (15).

Mutacja odpowiadająca za występowanie choroby u psów rasy nowofundland nie została wykryta podczas badania u psów innych ras (14). Przypuszczano, że nieobecność mutacji w genie *SLC3A1* u innych przebadanych ras psów może wynikać z występowania u nich mutacji w *SLC7A9* bądź innym nieodkrytym jeszcze genie (15). Podejrzewa się, że mutacja A217T w genie *SLC7A9* wykryta u psów rasy buldog angielski również może mieć związek z cystynurią. Związek ten wymaga

założenia, że u psów tej rasy zachodzi niekompletny typ dominacji pomiędzy allelami tego genu (14). Gen *SCL7A9* u psa występuje w chromosomie 1, a u człowieka w 19 (NCBI). Gen *SLC7A9* u psa składa się z 13 eksonów. Miejsce inicjacji translacji zakodowane jest w 2, a kodon STOP w 13 egzonie (15). Międzygatunkowe porównanie sekwencji aminokwasowej genu *SLC7A9* obecnej u człowieka wskazuje na większe podobieństwo do sekwencji występującej u psa niż u myszy, szczura czy królika (14).

Badania metodą immunoprecypitacji wykazały, że rBAT ulega dimeryzacji w błonie komórek kanalików nerkowych

zarówno z b⁰⁺AT, jak i z inną cząsteczką nieznanego genu (4). Stąd przypuszczenie, że ewentualna mutacja genu kodującego tę cząsteczkę może być powiązana z cystynurią u chorych, u których nie odkryto jeszcze podłoża tej choroby (4).

Objawy choroby

Jak wspomniano wcześniej, u psów objawy cystynurii charakteryzują się dużą zmiennością obserwowaną pomiędzy i w obrębie zbadanych ras (14). Różnorodność ta dotyczy występowania choroby u jednej bądź obu płci, ilości cystyny wydalanej z moczem oraz tempa powstawania kamieni (14). W obrazie choroby istnieje tzw. izolowana cystynuria (podwyższone wydzielanie wyłącznie cystyny do moczu) i cystynuria połączona ze zwiększonym wydzieleniem jednego bądź kilku aminokwasów dwudodatnich (14). Ilość ornityny, argininy i lizyny w moczu jest umiarkowanie podwyższona (16).

Kamica cystynowa, jak każda kamica nerkowa stanowi zagrożenie dla zdrowia wywołana możliwością pojawienia się zatoru w układzie moczowym. Choroba częściej diagnozowana jest u samców niż u samic z uwagi na budowę cewki moczowej, predysponującą samce do występowania zatorów (17). Nie zawsze stwierdza się obecność kamieni nerkowych w przebiegu cystynurii (17). Badanie przeprowadzone na grupie 48 psów pokazały szeroki zakres wieku pojawiania się kamieni nerkowych (18). Jednak wydalanie cystyny notowane jest na istotnie wyższym poziomie w grupie młodych psów (do 5 roku życia) niż u starszych (19).

Do momentu rozpoczęcia formowania się kamieni nie występują kliniczne objawy choroby (12). U psów rasy chihuahua do ujawnienia się choroby może dojść w wieku 6 lat (17). U psów rasy nowofundland objawy te rozwijają się dużo wcześniej – w wieku 4–6 miesięcy. Wydaje się, że u tej rasy choroba przybiera szczególnie ciężką postać. Ilość cystyny wydalanej z moczem stale utrzymuje się na bardzo wysokim poziomie (16). Oprócz upośledzonego procesu reabsorpcji cystyny i aminokwasów dwudodatnich dochodzi bowiem do aktywnej sekrecji cystyny do moczu (15). Ponadto nawrót choroby następuje ciągu 6–12 miesięcy od chirurgicznego usunięcia kamieni (19). U psów z nawracającą kamicą obserwuje się wyższy poziom wydzielenia cystyny niż u tych, u których obecność złożeń była epizodyczna (19). Wobec perspektywy nawrotu kamicy wielu właścicieli decyduje się na eutanazję chorego psa (19).

W literaturze są również stwierdzone przypadki, gdy w złożeń cystynowych obecne są domieszki, np. struwity (fosforan

Tabela 1. Ilość cystyny w moczu (mmol/mol kreatyniny) u zdrowych oraz chorych psów (14)

Psy objęte badaniem	Zawartość cystyny w moczu
Zdrowe	10
I grupa	13–15
Chore	45–97
III grupa	146–650

Tabela 2. Sposoby wykrywania i śledzenie przebiegu cystynurii (9, 12, 14, 17)

BADANIE	WYNIK
Mikroskopia elektronowa i krystalografia osadu moczu	typy złożeń cystynowych: - chropowaty: jednorodny, heksagonalny - gładki: nieregularny układ kryształów
Laserowe rozbijanie i analiza kamieni	charakterystyczny zapach siarkowodoru (cystyna zawiera siarkę); kryształy cystynowe są żółte bądź żółto-brązowe i tworzą romboidalne struktury
Test z nitroprusykiem sodu (cyjanek rozrywa dwusiarczkowy mostek w cystynie, uwalniając cysteinę, która wiąże nitroprusydek – purpurowa barwa)	wynik po 2–10 min; fałszywie dodatni wynik u chorych na homocystynurię i acetonurię, u chorych przyjmujących leki zawierające grupy siarkowe, ampicylinę, N-acetylocysteinę
Badanie z 24-godzinnej zbiórki moczu z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej	określenie ilości cystyny w moczu
Oznaczanie stężenia w moczu: wapnia, cytrynianów, kwasu moczowego	wykluczenie kamicy mieszanej i niecystynowej
Pomiar pojemności cystynowej	ustalenie, czy mocz jest nasycony, czy przesycony cystyną (w ocenie skuteczności leczenia)
Rentgenowskie zdjęcie przeglądowe	homogeniczne, szkliste cienie złożeń cystynowych, o mniejszym wysyceniu w porównaniu ze złożami wapniowymi
Badanie ultrasonograficzne nerek	ocena obecności kamieni

amonowo-magnezowy) i apatyty (fosforan wapnia) (18). Obecność domieszek apatytów może wynikać z utrzymywanej w cystynurii diety ukierunkowanej na podwyższenie pH moczu (18).

W cystynurii obserwuje się powstawanie kamieni również u psów niewydzielających do moczu znacznie podwyższonych ilości cystyny (14; **tab. 1**). Fakt formowania kamieni w grupie psów wydalających cystynę w ilościach niewiele przekraczających normę zwraca uwagę na udział innych czynników w tym procesie (14). Kwaśny odczyn pH przyspiesza formowanie kamieni cystynowych (17).

Wykrywanie cystynurii

Cystynuria najczęściej diagnozowana jest w momencie wystąpienia ostrych, klinicznych objawów choroby. Wiązą się one z obecnością zatoru uniemożliwiającego oddawanie moczu. Dodatkowo może im towarzyszyć proces zapalny rozwijający się na skutek uszkodzenia nabłonka dróg moczowych przez przemieszczający się kamień (17). W związku z dotkliwym bólem odczuwanym przez pacjenta należy monitorować stan zdrowia osobników z cystynurią w wywiadzie rodzinnym. Dostępne środki diagnostyczne opierają się na analizie kryształów obecnych w moczu, analizie biochemicznej i chromatograficznej moczu oraz przeprowadzaniu badań genetycznych. Sposoby wykrywania cystynurii i monitorowania jej przebiegu przedstawione są w **tabeli 2**.

Badanie mikroskopowe moczu jest ukierunkowane na wykrywanie heksagonalnych kryształów cystynowych (19). Kryształy są płaskie, bezbarwne, mogą posiadać równe bądź nierówne ściany i występować pojedynczo lub w postaci agregatów (17). W związku z obecnością siarki w cystynie mocz może nabierać zapachu przypominającego woń zgniętego jajka (12).

Do wykazania zwiększonej ilości cystyny w moczu stosuje się test przesiewowy cyjankowo-nitroprusydkowy (próba Branda), w którym cyjanek redukuje cystynę do cysteiny, której grupa SH reaguje z nitroprusydkiem sodu, dając purpurowe zabarwienie. Wynik dodatni obserwuje się, jeżeli zawartość cystyny w moczu wynosi >100 mg/g kreatyniny (17). Test z nitroprusydkiem należy przeprowadzać kilkakrotnie, z uwagi na charakterystyczną dla choroby, zmienną ilość cystyny w moczu (19). Może się zdarzyć, że pomimo negatywnego wyniku testu choroba występuje u zwierzęcia. Wynik pozytywny badania powinien zostać potwierdzony w badaniu chromatograficznym próbki moczu pochodzącej z dobowej zbiórki (12).

Diagnostyka oparta na testach genetycznych jest skuteczniejsza od metod

tradycyjnych. Dzięki niej obecność mutacji prowadzących do wystąpienia choroby może być stwierdzona, gdy brak klinicznych oznak choroby.

Recesywny sposób dziedziczenia utrudniał eliminację cystynurii z populacji psów rasy nowofundland. W związku z koniecznością identyfikacji osobników będących nosicielami wadliwych genów został opracowany test wykrywający mutację C663T za pomocą sekwencjonowania (15). Jednak z uwagi na wysokie koszty analiz, należało opracować alternatywną dla sekwencjonowania metodę pozwalającą na szybką, przesiewową identyfikację mutacji. Dokonał tego zespół Matos i wsp. (20), wykorzystując metodę opartą na wysokosprawnej denaturującej chromatografii cieczowej (denaturig high-performance liquid chromatography – DHPLC). W badaniu przeprowadzonym na grupie 22 psów (u jednego psa zdiagnozowano wcześniej kliniczne objawy cystynurii) stwierdzono obecność 16 genotypów typu dzikiego, 5 heterozygot i jedną homozygotę recesywną. Badanie (po nałożeniu prób) trwało 6 min, a otrzymane wyniki były w pełnej zgodności z rezultatami sekwencjonowania. Ponadto DHPLC okazała się stosunkowo tanią metodą diagnostyczną, koszty w przeliczeniu na jedną próbę wyniosły około 4,6 €.

Po zastosowaniu tego testu w badaniu psów chorych na cystynurię, lecz należących do innych ras niż nowofundland nie wykazano obecności mutacji C663T, zgodnie z wynikami otrzymanymi przez Henthorn i wsp. (15). Świadczy to o istnieniu heterogennego podłoża choroby u psów, podobnie jak ma to miejsce u człowieka (15).

Leczenie

Dotychczas nie opracowano skutecznego sposobu leczenia cystynurii. W cystynurii kluczową rolę odgrywa zapobieganie tworzeniu się kamieni (21). Leczenie objawowe nastawione jest na zwiększenie diurezy i rozpuszczanie istniejących kamieni (19).

Podstawowym sposobem przeciwdziałania powstawaniu kamieni cystynowych jest stosowanie profilaktycznej diety. Dieta zalecana przy cystynurii ukierunkowana jest na podwyższenie pH moczu (do około 7,5) w celu zwiększenia rozpuszczalności cystyny. Przekroczenie pH moczu powyżej 7,5 jest niekorzystne ze względu na możliwość formowania się kamieni wapniowo-fosforanowych. Dietę stosowaną w cystynurii powinna charakteryzować zawartość pokarmów o obniżonej zawartości białka oraz sodu. Na rynku dostępne są lecznicze karmy spełniające te warunki, np. Hill's Prescription diet canine u/d.

Do alkalizacji moczu w zakresie pH 6,5–7,0 stosuje się doustne podawanie wraz z karmą cytrynianu potasu w początkowej dawce 75 mg/kg m.c. co 12 godz. (12).

Sposobem rozpuszczania złożeń cystynowych jest terapia opierająca się na penicylaminie (Cuprenil, Polfa Kutno) lub tioproninie (2-merkaptopropionylglicynin-MPG; Acadione, firmy Aventis). Są to leki zawierające grupę tiolową, która w reakcji z cystyną powoduje jej przekształcenie do cysteiny, zwiększając rozpuszczalność złożeń (21). Zastosowanie penicylaminy powoduje 50-krotny wzrost rozpuszczalności cystyny, lecz wiąże się z wysokim ryzykiem wystąpienia niepożądanych objawów. Lek jest bardzo toksyczny, wywołuje wymioty i brak łaknienia, prowadzi do upośledzenia czynności nerek oraz układu krwiotwórczego (9, 12). Natomiast podanie tioproniny stymuluje 30-procentowy wzrost rozpuszczalności cystyny w porównaniu z leczeniem penicylamina i wywołuje mniej skutków niepożądanych (9, 12).

Penicylaminę stosuje się w dawce 15 mg/kg m.c., wraz z pokarmem, dwa razy dziennie.

Tioproninę stosuje się doustnie w dawce dziennej 40 mg/kg m.c. podzielonej na dwa podania. Do zalet tej terapii należą rozpuszczanie istniejących kamieni (do 60%; 19) i wydłużenie czasu do nawrotu kamicy (do 18 miesięcy). Terapia ta czasami jest związana z występowaniem objawów, takich jak białkomocz, trombocytopenia, niedokrwiistość regeneratywna, podwyższenie aktywności enzymów wątrobowych we krwi, zmiany skórne, agresywność oraz miopatia (19). Objawy te ustępują po zaprzestaniu stosowania leku (19).

Efekty leczenia powinny być monitorowane badaniem rentgenowskim lub ultrasonograficznym co 4 tygodnie. Jeżeli nie dojdzie do rozpuszczenia kamieni w ciągu 2–3 miesięcy, należy rozważyć ich usunięcie chirurgiczne. Zaleca się jednak wykonywanie takich zabiegów w ostateczności. Przesłankami do interwencji chirurgicznej jest brak rezultatów leczenia farmakologicznego i istniejące u samców duże prawdopodobieństwo zatkania cewki moczowej (21). Postępowanie chirurgiczne w cystynurii prowadzone jest zgodnie ze standardowym schematem leczenia kamicy nerkowej (9, 12). W ciągu roku po chirurgicznym usunięciu kamieni zwykle dochodzi do nawrotu choroby. Zalecane jest profilaktyczne stosowanie tioproniny w dawce 15 mg/kg m. c., *p.o.*, co 12 godzin.

Ponadto w cystynurii może być wskazana antybiotykoterapia w celu likwidacji często zdarzających się zakażeń, rozwijających się z powodu mechanicznego drażnienia i uszkodzenia nabłonka dróg moczowych wywołanego obecnością kamieni (17).

Podsumowanie

Wydaje się, że przyczyny występowania kamicy nerkowych są takie same u ludzi i u zwierząt (21). Odnalezienie zwierzęcego homologa cystynurii u psów stwarza możliwość wykorzystania go jako gatunku modelowego w badaniach nad cystynurią u człowieka (15). Z pewnością współpraca pomiędzy lekarzami medycyny i lekarzami weterynarii posłuży szybszemu osiągnięciu sukcesu w walce z tą chorobą.

Piśmiennictwo

- Treacher R. J.: The aetiology of canine cystinuria. *Biochem. J.* 1963, **90**, 494-498.
- Harnevik L.: *Molecular genetic studies on cystinuria*. Linköping University Medical Dissertations, 2007.
- Calonge M. J., Volpini V., Besceglia L., Rousaud F., De Sanctis L., Beccia E., Zelante L., Testar X., Zorzano A., Estovill X., Gasparini P., Nunes V., Palacin M.: Genetic heterogeneity in cystinuria: the *SLC3A1* gene is linked to type I but not to type III cystinuria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995, **92**, 9667-9671.
- Palacin M., Nunes V., Font-Llitjós M., Jiménez-Vidal M., Fort J., Gasol E., Pineda M., Feliubadaló L., Chillarón J., Zorzano A.: The genetics of heteromeric amino acid transporters. *Physiology* 2005, **20**, 112-124.
- Bröer S.: Apical transporters for neutral amino acids: physiology and pathophysiology. *Physiology* 2008, **23**, 95-103.
- Palacin M., Borsani G., Sebastio G.: The molecular bases of cystinuria and lysinuric protein intolerance. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2001, **11**, 328-335.
- Reig N., Chillarón J., Bartoccioni P., Fernández E., Bendahan A., Zorzano A., Kanner B., Palacin M., Bertran J.: The light subunit of system b⁰⁺ is fully functional in the absence of the heavy subunit. *The EMBO Journal*, 2002, **21/18**, 4906-4914.
- Rosenberg L. E., Downing S., Durant J. L.: Cystinuria: biochemical evidence for three genetically distinct diseases. *J. Clin. Invest.* 1966, **45**, 3, 365-371.
- Gmerek P.: Cystinuria – diagnostyka i postępowanie. *Przegląd Urologiczny* 2007, **8/2**, (42).
- Feliubadaló L.: Non-type I cystinuria caused by mutations in *SLC7A9*, encoding a subunit (b⁰⁺AT) of rBAT. *Nature Genetics*, 1999, **23**, 52-57.
- Pras E., Raben N., Golomb E., Arber N., Aksentijevich I., Schapiro J. M., Harel D., Katz G., Liberman U., Pras M., Kastner D. L.: Mutations in the *SLC3A1* transporter gene in cystinuria. *Am. J. Hum. Genet.*, 1995, **56**, 1297-1303.
- Biyani C. S., Cartledge J. J.: Cystinuria – diagnosis and management. *EAU – EBU Update Series* 2006, **4**, 175-183.
- Dello Strologo L.: Cystinuria. *Orphanet encyclopedia* 2003, 1-5.
- Harnevik L., Hoppe A., Söderkvist P.: *SLC7A9* cDNA cloning and mutational analysis of *SCL3A1* and *SLC7A9* in canine cystinuria. *Mammalian Genome* 2006, **17**, 769-776.
- Henthorn P. S., Liu J., Gidalevich T., Fang J., Casal M. L., Patterson D. F., Giger U.: Canine cystinuria: polymorphism in the canine *SLC3A1* gene and identification of a nonsense mutation in cystinuric Newfoundland dogs. *Hum. Genet.* 2000, **107**, 295-303.
- Casal M., Giger U., Bovee K. C., Patterson D. F.: Inheritance of cystinuria and renal defect in Newfoundlands. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1995, **207**, 1585-1589.
- Pallatto V., Wood M., Grindem C.: Urine sediment from a Chihuahua. *Vet. Clin. Pathol.* 2005, **34**, 425-428.
- Escolar E., Bellanato J., Rodriquez M.: Study of cystine urinary calculi in dogs. *Can. J. Vet. Res.* 1991, **55**, 67-70.
- Hoppe A., Denneberg T.: Cystinuria in the dog: clinical studies during 14 years of medical treatment. *J. Vet. Intern. Med.* 2001, **15**, 361-367.
- Matos F. A. J., Mascarenhas C., Magalhães P., Pereira Pinto J.: Efficient screening of the cystinuria-related C663T *SLC3A1* nonsense mutation in Newfoundland dogs by denaturing high-performance liquid chromatography. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2006, **18**, 102-105.
- Robinson M. R., Norris R. D., Sur R. L., Preminger G. M.: Urolithiasis: not just a 2-legged animal disease. *J. Urol.* 2008, **179**, 46-52.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=Nucleotide&dopt=GenBank&val=11385351>

Mgr Magda Trzeciak, Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt, Wydział Nauk o Zwierzętach SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa