

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

A

KLINIKA NEFROLOGIE TC IKEM

doktorandská práce - teze

*MECHANISMY PODÍLEJÍCÍ SE NA PROGRESI A
ROZVOJI KOMPLIKACÍ CHRONICKÝCH
NEFROPATIÍ*

Vypracovala: MUDr. Silvie Bloudíčková

Školitel: Doc. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

Obor studia: Fyziologie a patofyziologie člověka

Praha 2007

OBSAH

1. Úvod.....	3
2. Cíl výzkumné práce.....	3
3. Výzkumná práce.....	5
3.1 Patofyziologická část.....	5
3.2 Genetická část.....	14
4. Diskuze.....	17
5. Závěr.....	27
6. Použitá literatura.....	28
7. Přehled publikovaných prací.....	31

1. ÚVOD

Chronické renální selhání (CHRS) představuje významný zdravotní, psychosociální a ekonomický problém. Celosvětový růst počtu (5-8%/rok) pacientů s chronickými nefropatiemi je odrazem stárnutí populace a nárůstu incidence rizikových faktorů rozvoje a progresu chronického renálního selhání a kardiovaskulárních onemocnění jako systémové hypertenze, hyperlipidémie, diabetu mellitu 1. i 2. typu (především jeho špatná kompenzace), obezity a kouření.

V České republice je do chronického dialyzačního programu zařazeno 4738 pacientů léčených na 92 hemodialyzačních střediscích a přes 3000 nemocných žije s funkční transplantovanou ledvinou [1]. Trend nárůstu pacientů s nezvratným selháním funkce ledvin vyžadujících dialýzu zůstává vyrovnaný, ale významně se změnilo věkové složení dialyzované populace a jejích komorbidit, čímž významně narůstá i mortalita této skupiny nemocných.

2. CÍL VÝZKUMNÉ PRÁCE

Přesná etiologie chronických nefropatií, které zpravidla progredují do chronického renálního selhání, zůstává pro jejich značnou heterogenitu nejasná, a tudíž léčba zůstává pouze symptomatická. Současné poznatky svědčí o ústřední roli imunitního systému. Široká genetická variabilita pak přispívá k různým fenotypovým projevům renálního selhání, jak klinickým projevům včetně komplikací, tak i individuální senzitivitě k terapii.

Pokud tedy předpokládáme, že odchylky v regulaci imunitního systému jsou klíčovými v patogenezi renálního selhání, tak by terapeutické podání imunosupresiv mohlo významně snížit patologickou aktivitu imunitního systému, a tak zabránit rozvoji či zmírnit progresi chronického renálního selhání.

Hypotézu klíčové role lymfocytů v progresi akcelerované nefropatie potvrzují i pozorování z našich předešlých experimentů. Monoterapie takrolimem či enalapilem významně snížila lymfocytární infiltraci a expresi profibrogenních růstových faktorů po ischemicko-reperfučním infarktu. [2] Sirolimus významně zlepšuje progresi akcelerované nefropatie za předpokladu dobře kontrolované hypertenze. [3;4]

Na námi vyvinutém animálním modelu jsme sledovali chronické důsledky ischemicko-reperfučního infarktu a jejich ovlivnění imunosupresivní léčbou. Zablokováním proliferačních mechanismů léky ovlivňující funkci lymfocytů a makrofágů lze zabránit rozvoji akcelerované nefropatie a jejích důsledků. „Novější“ imunosupresiva používaná v současné transplantární medicíně by tak mohla zásadně ovlivnit průběh chronického renálního selhání a díky své vyšší selektivitě by tak léčebný benefit převážil nad mírou nežádoucích účinků.

Dalším předmětem našeho zájmu je možná genetická dispozice k rozvoji MIA syndromu u hemodialyzovaných pacientů. Na základě klasické klinické manifestace trias malnutrice, zánětu a aterosklerózy jsme zvolili primární kandidátní geny s možným vlivem na rozvoj jednotlivých symptomů MIA syndromu.

Cílem této genetické studie je vytipování „rizikových genotypů“ pro rozvoj a progresi MIA syndromu, resp. chronického renálního selhání, jejichž časná detekce by mohla pomoci modifikovat léčbu hemodialyzovaných pacientů, a tak zlepšit jejich prognózu.

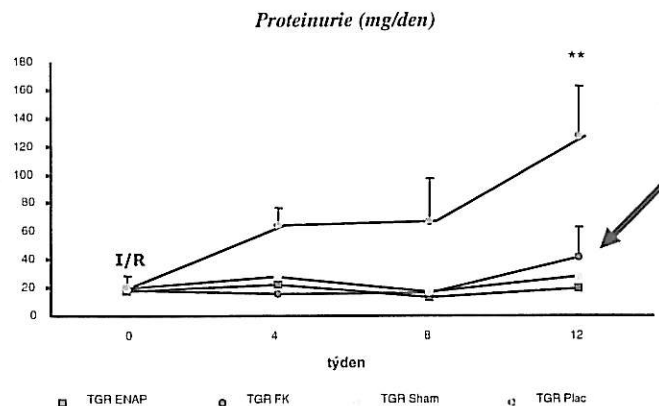
3. VÝZKUMNÁ PRÁCE

3.1 Patofyziologická část: Experimentální model akcelerované nefropatie

K „in vivo“ studiu imunopatologických změn vyvolaných ischemicko-reperfučním poškozením jsme použili dobře definovaný model angiotenzin II- dependentní hypertenze. Tento model představuje transgenní hypertenzní potkan (TGR- transgenic hypertensive rat), jenž vzniká inzercí myšího genu pro renin ren-2 do genomu normotenzního potkana kmene Sprague-Dawley. Výsledkem této genové transfekce je transgenní potkan, u něhož dochází ke spontánnímu rozvoji těžké hypertenze. Heterozygotní transgenní potkani s preexistující vysokoreninovou hypertenzí tak po významném ischemicko-reperfučním infarktu postupně rozvíjejí těžkou proteinurii a glomerulosklerózu. [5]

Ke studiu role imunitního systému v rozvoji změn vyvolaných ischemicko-reperfučním poraněním akcelerovaným hypertenzí jsme podávali inhibitor inozinmonofosfátdehydrogenázy- mykofenolát mofetil (MMF), resp. dihydroorotátdehydrogenázy- leflunomid (FK 778). V těchto experimentech jsme navázali na předcházející, ve

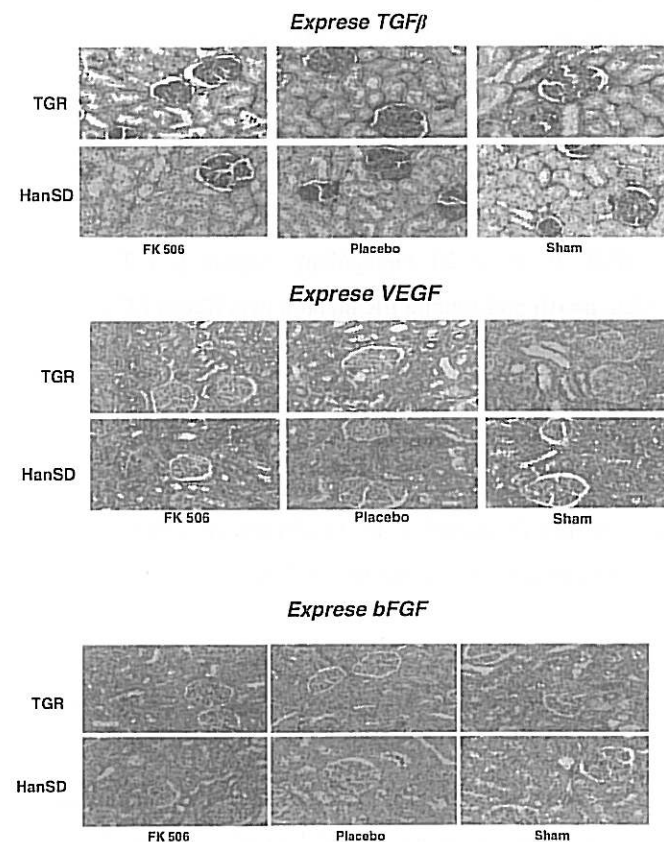
kterém jsme podávali imunosupresivum ze skupiny kalcineurinových inhibitorů- takrolimus (FK 506).



Graf 1 (Rajnoch et al., 2006): Grafické znázornění vlivu imunosupresiva takrolimu a antihypertenziva enalaprilu na progresi proteinurie indukované ischemicko-reperfučním inzultem. Skupiny transgenních potkanu léčené takrolimem (TGR FK) či enalaprilem (TGR ENAP) vykazovaly signifikantní pokles proteinurie srovnatelný se skupinou samovou (TGR Sham) narozdíl od skupiny léčené placebem (TGR Plac).

Prokázali jsme, že takrolimem léčená hypertenzní zvířata vykazovala signifikantně nižší proteinurii a glomerulosklerózu (srovnatelné se shamovými) než zvířata léčená placebem. (graf 1)

Pozorovali jsme zvýšenou expresi mRNA i intrarenální syntézu profibrogenních růstových faktorů- TGFβ, bFGF a VEGF- u hypertenzních, nikoli u normotenzních, zvířat. Lze tedy předpokládat, že se oba faktory podílejí na fibrogenезi navozenou hypertenzí a ischemicko-reperfučním inzultem. (obr. 1) [105]



Obr. 1 (Rajnoch et al. 2006): Imunohistochemický průkaz exprese růstových faktorů TGFβ, VEGF a bFGF u hypertenzních transgenních (TGR) a normotenzních (HanSD) potkanů léčených takrolimem (FK 506), placebem (Placebo) po ischemicko-reperfučním inzultu a kontrolních hypertenzních či normotenzních skupin bez ischemicko-reperfučního inzultu (Sham).

1. Experimentální práce: specifická blokáda enzymu inosinmonofosfátdehydrogenázy (IMPDH) prostřednictvím mykofenolát mofetilu (MMF)

Zvířata (n=34) byla rozdělena do 4 skupin: skupina A (I/R-MMF 20 mg/kg/den, n=10) podstoupila I/R inzult a od 1.dne byla denně léčena MMF v dávce 20 mg/kg/den; skupina B (I/R-MMF 10 mg/kg/den, n=10) podstoupila I/R inzult a byla léčena MMF v dávce 10 mg/kg/den; skupina C (sham, n=4) podstoupila shamovou operaci a nebyla léčena; skupina D (I/R-placebo, n=10) podstoupila I/R inzult a nebyla léčena. (obr. 21) V závěrečné fázi experimentu uhynuli ve skupině A tři potkani, ve skupině B čtyři potkani, jeden potkan v shamové skupině a tři ve skupině placebo. Nejčastější příčinou smrti byla těžká pneumonie a plicní edém.

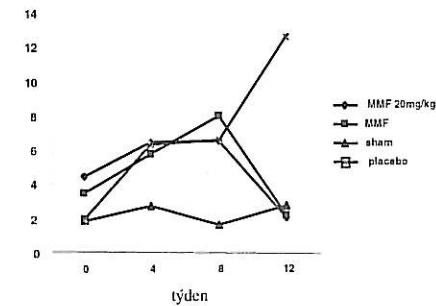
Výsledky:

1) funkční analýza

Obě skupiny léčené MMF měly v závěru experimentu signifikantně nižší proteinurii než skupiny placebo. Skupiny léčené MMF vykazovaly pokles proteinurie již od 8. týdne experimentu, který byl více vyjádřen u zvířat s denní terapeutickou dávkou 20 mg/kg.

Ve 12. týdnu obě MMF- léčené skupiny dosáhly nižších hladin proteinurie než skupina shamová. Naopak, skupiny placebo vykazovaly pozvolnou tendenci k progresi proteinurie. (graf 2)

Proteinurie (mg/den)



Graf 2: Mykofenolát mofetil signifikantně snižuje proteinurii

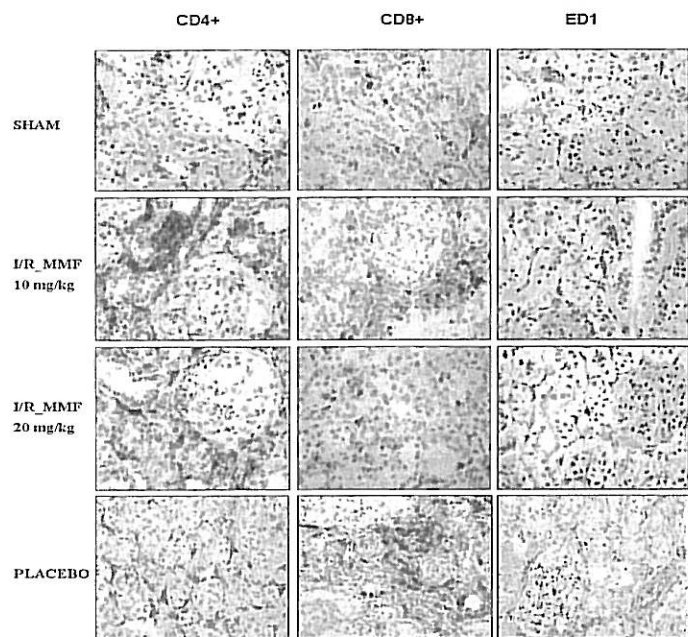
Mezi skupinami jsme nepozorovali významné rozdíly v systolickém krevním tlaku; tendence k mírnému poklesu krevního tlaku nedosáhla statistické významnosti a přetrvával v pásmu hypertenze. U zvířat léčených MMF jsme pozorovali tendenci k poklesu renálního hypertrofičkému indexu, měřenému jako poměr váhy ledviny a tělesné hmotnosti.

2) morfologická analýza

Morfologické změny zahrnují směs různých stupňů glomerulosklerózy, vaskulárních změn, intersticiální fibrózy a zánětlivé infiltrace.

Obě skupiny léčené MMF měly výrazně sníženou glomerulosklerózu ve srovnání se skupinou léčenou placebem ($p < 0.05$). Glomerulární změny byly více vyjádřené u skupiny léčené 10 mg/kg MMF než u skupiny léčené 20 mg/kg MMF, těžké změny byly ve skupině placebo. Glomerulární změny zahrnovaly kolaps kapilárních klíčků a segmentální či totální sklerózu. Vaskulární a intersticiální změny byly vysoce vyjádřené ve skupině placebo, mezi skupinami léčenými

MMF a shamovou jsme nepozorovali signifikantní rozdíly. Většina arteriol vykazovala hyalinní sklerózu se zužováním lumen a hypertrofií medie.



Obr. 2 (Bloudíčková et al. 2006): Buněčná infiltrace 12 týdnů po ischemicko-reperfučním inzultu.

Tubulointersticiální změny představovaly fokální tubulární atrofii s intersticiální fibrózou a fokální lymfocytární infiltrací. Cystické

dilatace atrofických tubulů byly běžné ve skupině placebo. Ve skupině léčené 10 mg/kg MMF jsme pozorovali mírné disperzní změny v renálním parenchymu (segmentální glomerulární skleróza, mírná fokální tubulární atrofie a fokální intersticiální fibróza). Minimální změny v renálním parenchymu, srovnatelné s shamovou skupinou, jsme pozorovali u skupiny léčené 20 mg/kg MMF. (obr. 2) Pozorovali jsme významné rozdíly v lymfocytární a makrofágové infiltraci. Obě skupiny léčené MMF vykazovaly signifikantní redukcii infiltrace CD4+, CD8+ i ED-1 pozitivními buňkami.

Závěr:

Prokázali jsme, že mykofenolát mofetil signifikantně snižuje proteinurii, redukuje glomerulosklerózu a leukocytární infiltraci v ledvině po ischemicko-reperfučním inzultu (na dávce závislý účinek). Lze tedy říci, že mykofenolát mofetil má jednoznačně protektivní vliv na progresi akcelerované nefropatie, a že naše výsledky potvrzují pozorování, že lymfocyty a makrofágy hrají významnou roli v progresi chronických nefropatií.

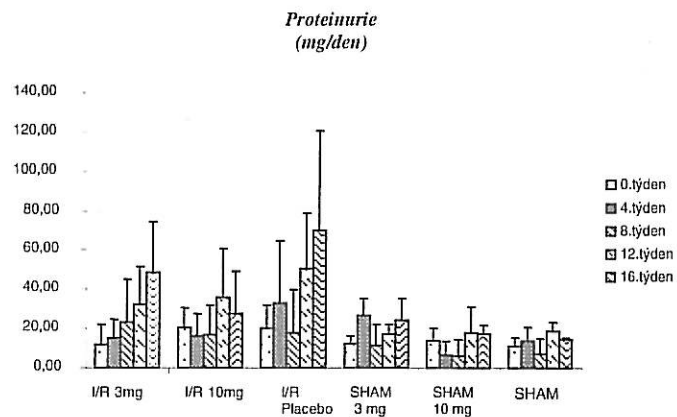
2. Experimentální práce: specifická inhibice enzymu dihydroorotátdehydrogenázy prostřednictvím derivátu leflunomidu (FK 778)

Na stejném animálním modelu jsme studovali 16 týdnů vliv experimentálního imunopresiva FK 778 na progresi postischemických změn. Transgenní hypertenzní potkani (TGR

kmen) představovali model akcelerované nefropatie a normotenzní potkani kmene HanSD (Hannover-Sprague Dawley) kontrolu.

Výsledky:

Na počátku experimentu jsme nepozorovali rozdíly v proteinurii mezi skupinami. Po 16ti týdnech sledování, operovaná zvířata léčená FK 778 měla signifikantně nižší proteinurii ve srovnání se zvířaty léčenými placebem (I/R 3 mg vs. I/R PLAC: 48.42±26.16 vs. 70.13±50.19; I/R 10 mg vs. I/R PLAC: 27.28±21.86 vs. 70.13±50.19, $p<0.05$). Neléčená shamová skupina vykazovala nižší proteinurii než skupiny léčené FK 778 (SHAM 3 mg/kg/day: 24.23±10.89; SHAM 10 mg/kg/day: 17.37±4.13; SHAM: 14.23±1.18). (graf 3)



Graf 3: Vývoj proteinurie během 16ti týdnů po ischemicko-reperfučním infultu u sledovaných skupin.

V porovnání se skupinou léčenou placebem, operované skupiny léčené FK778 měly významně redukovanou míru glomerulosklerózy (I/R 3 mg vs. I/R PLAC: 12.51±8.40 vs. 14.90±7.09; I/R 10 mg vs. I/R PLAC: 7.99±5.94 vs. 14.90±7.09, $p<0.05$). U shamových skupin jsme nepozorovali rozdíly v tíži glomerulosklerózy.

Míra glomerulosklerózy a intersticiální fibrózy je tedy signifikantně snížena u zvířat léčených denní dávkou 10 mg/kg FK778. Morfologické změny, které jsme zaznamenali u skupin léčených FK778 a placebem, korelovaly s proteinurií.

Velmi zajímavé výsledky přinesla analýza funkce ledvin provedená po 16ti týdnech trvání experimentu. Pozorovali jsme, že zvířata léčená 3mg/kg FK778 vykazovala výrazně lepší clearance kreatininu a urey ve srovnání se zvířaty léčenými 10mg/kg či placebem jak u skupin shamových, tak u skupin, které prodělaly ischemicko-reperfuční infult.

Rozdíly v buněčné infiltraci mezi skupinami jsme pozorovali pouze u CD5+ buněk. Placebem léčená skupina po ischemicko-reperfučním infultu vykazovala vyšší stupeň CD5+ buněčné infiltrace ve srovnání se skupinami léčenými FK778. Překvapivě jsme mezi skupinami nepozorovali rozdíly v CD4+ ani CD8+ buněčné infiltraci.

Závěr:

Je zřejmé, že FK 778 pozitivně ovlivňuje proteinurii i rozsah glomerulosklerózy a intersticiální fibrózy. Neprokázali jsme signifikantní vliv FK 778 na míru zánětlivého infiltrátu vyjma CD5+ buněk. Funkční analýza však svědčí o možné na dávce závislé

nefrotoxicitě tohoto imunosupresiva, která by mohla být limitujícím faktorem v použití při léčbě chronických progresivních nefropatií.

3.2 Genetická část: Struktura studie „MIA“

- design studie

Pro zařazení do studie museli pacienti splňovat tato kritéria: alespoň tři měsíce probíhající hemodialyzační terapie, absence generalizovaného nádorového onemocnění, předpokládaná délka přežití minimálně tři roky a souhlas s účastí schváleným Etickou komisí IKEM.

Do studie bylo zařazeno 1014 pacientů ze 27 hemodialyzačních středisek, tj. čtvrtina české hemodialyzované populace, kteří jsou sledováni 18 měsíců pomocí elektronického dotazníku. Dotazník obsahuje klinické a laboratorní parametry, které jsou aktualizovány v pravidelných intervalech. Jako výchozí byla určena data při vstupu do studie. Důvodem k vyloučení ze studie jsou přechod na peritoneální dialýzu, transplantace či úmrtí. V případě selhání transplantátu mohou být pacienti znovu přijati do studie.

Po vytvoření genové banky hemodialyzovaných pacientů se analyzují zvolené geny u pacientů „MIA“ a kontrolního souboru zdravé populace „MONICA“. Populace „MONICA“ (*Multinational monitoring of trends and determinants in cardiovascular diseases: Monica Project*) představuje 2559 nepříbuzných Kavkazanů (1191 mužů, 1368 žen ve věku 28-67 let). [52]

Všechna data jsou statisticky analyzována a korelována dle genotypů, klinických a laboratorních parametrů.

- molekulárně-biologická analýza

DNA byla izolována standardní vysolovací metodou. Tabulka 3 ukazuje přehled metodik pro genotypizaci genů, které byly doposud analyzovány, tj. ghrelinu, LBP, HFE, IL-6 a MTHFR.

Výsledky:

Mezi nejčastější příčiny chronického renálního selhání vyžadující hemodialyzační léčbu patří, kromě bioticky nespecifikovatelné diagnózy (obvykle histologický obraz end-stage kidney), diabetická nefropatie, tubulární intersticiální nefropatie a hypertenzní nefroskleróza. Ve sledovaných vstupních klinických a laboratorních parametrech jsme neshledali signifikantní rozdíly mezi muži a ženami.

Analýza genu pro ghrelin

Do současné doby jsme kompletně dokončili analýzu dvou polymorfismů genu pro ghrelin. Stejně jako v kontrolním populačním vzorku „MONICA“ jsme u pacientů „MIA“ zaznamenali více než 90%ní zastoupení genotypu Gln/Gln, resp. Leu/Leu. V zastoupení minoritních genotypů jsme pozorovali signifikantní rozdíl mezi pohlavími pouze u varianty Arg/Gln s vyšší expresí u mužů.

Naše dosavadní výsledky nesvědčí pro vliv varianty Arg>Gln na vývoj BMI, nicméně nositelé alely kódující arginin si udržují signifikantně vyšší hladiny albuminémie již při 15tíměsíčním sledování (p=0.046).

Podobně je tomu tak i u sledovaných lipidových parametrů. Alela kódující arginin se jeví působit projektivně a zachovávat signifikantně nižší hladiny cholesterolémie a triglyceridémie ($p=0.004$, resp. $p=0.028$).

U varianty Leu>Met jsme nenašli žádný vztah k vývoji BMI, albuminémie či cholesterolémie. Ve vztahu k triglyceridémii jsme u nositelů alely kódující methionin našli trvale signifikantně nižší hladiny než u nositelů alely kódující leucin ($p=0.039$).

Analýza dalších genů

V tabulce 1 uvádím zastoupení dalších genů u obou pohlaví, které jsme analyzovali. Doposud jsme neprovedly analýzu možného vztahu polymorfismů jednotlivých genů a příslušných laboratorních a klinických parametrů.

	muži			ženy		
	1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2
<i>GHR 90</i> (N)	491	61	1	379	50	6
(%)	88,79	11,03	0,18	87,13	11,49	1,38
<i>IL6 176</i> (N)	168	271	109	138	216	74
(%)	30,66	49,45	19,89	32,24	50,47	17,29
<i>IL6 634</i> (N)	3	60	489	3	49	379
(%)	0,54	10,87	88,59	0,69	11,37	87,94
<i>HFE 063</i> (N)	26	142	385	10	95	328
(%)	4,7	25,68	69,62	2,31	21,94	75,75
<i>HFE 282</i> (N)	455	37	0	347	32	1
(%)	92,48	7,52	0	91,32	8,42	0,26

Tab. 1: Přehled zastoupení jednotlivých genotypů u dosud analyzovaných genů.

Distribuce genotypů jednotlivých genů mezi pohlavím je téměř shodná. Signifikantní rozdíl jsme pozorovali pouze u minoritních genotypů polymorfismu Gln90Leu genu pro ghrelin (GHR 90) a polymorfismu H63D genu pro hemochromatózu (HFE 063), které se vyskytovaly ve dvojnásobně vyšší frekvenci u žen, resp. u mužů.

4. DISKUZE

V předkládané experimentální práci, ve které se zabýváme studiem rozvoje a progresu chronického renálního selhání, jsme se snažili zodpovědět následující dvě otázky.

1. Klíčová role imunitního systému v patogenezi změn provázejících chronické progresivní nefropatie a chronické renální selhání byla již prokázána. Přispělo by terapeutické podání imunosupresivně působících preparátů ke stabilizaci či normalizaci složek imunitního systému, a tím zastavit či významně zpomalit progresi nefropatií do nezvratného selhání funkce ledvin?
2. Je možné na základě konkrétní genové analýzy rozpoznat mezi pacienty s renálním onemocněním ty, u nichž s vysokou pravděpodobností skončí základní renální onemocnění terminálním selháním funkce ledvin, a v případě již existujícího renálního selhání vytipovat ty, u nichž lze předpokládat vývoj závažných komorbidit provázejících chronické renální selhání?

Znalost „rizikových“ genotypů spolu s kombinovanou imunosupresivní a antihypertenzní léčbou či účinnou profylaxí mohla významně přispět k uchování ledvinných funkcí.

Ke studiu první otázky jsme použili námi modifikovaný „in vivo“ model akcelerovaného renálního poškození, kde jsou důsledky ischemie jedné ledviny potencovány hypertenzí indukovanou vysokými hladinami reninu.

V předchozích experimentech jsme na stejném animálním modelu neprokázali pozitivní efekt dlouhodobé léčby sirolimem u hypertenzního potkana. Naše pozorování je v souladu s pozorováními, že dlouhodobá terapie sirolimem je spojena s proteinurií, která negativně ovlivňuje renální funkce. Nicméně sirolimus snížil proteinurii a zmírnil strukturální změny navozené ischemicko-reperúzním inzultem u normotenzních zvířat jak u modelu „jedné ledviny“ (single-kidney), tak u modelu transplantačního.

Rozvoj strukturálních změn, především intersticiální fibrózy a vaskulárních změn, se zdá být zprostředkován zánětlivými buňkami, jimi secernovanými cytokiny a profibrogenními růstovými faktory. V našem dalším experimentu, v němž jsme obdobně sledovali účinek takrolimu na změny navozené ischemicko-reperúzním inzultem, jsme prokázali, že míra exprese proangiogenních/profibrogenních růstových faktorů (bFGF, VEGF, TGF) koreluje s tíží postischemických změn jako glomeruloskleróza a intersticiální fibróza. [6, 7]

Na základě těchto výsledků jsme vytvořili hypotézu, že by antiproliferativně působící imunosupresivum, jako mykofenolát mofetil či derivát leflunomidu, mohlo významně snížit postischemickou zánětlivou buněčnou infiltraci a následně i míru fibrotických změn v poškozené ledvině.

V předkládaných experimentech jsme samostatně hodnotili účinek dvou imunosupresiv působících na bázi specifické reverzibilní inhibice leukocytárních enzymů nezbytných pro de novo syntézu purinů, resp. pyrimidinů, které jsou klíčové pro proliferaci a diferenciaci lymfocytů a monocytů/makrofágů, tj. inhibitoru inosinmonofosfátdehydrogenázy- mykofenolát mofetilu (MMF) a inhibitoru dihydroorotátdehydrogenázy- derivátu leflunomidu (FK 778).

Jelikož jsme v předchozích studiích pozorovali významný nárůst mortality u transgenních potkanů mezi 12. a 16. týdnem po ischemicko-reperúzním inzultu, rozhodli jsme se experimenty ukončit po dvanácti týdnech sledování u mykofenolát mofetilu a po šestnácti týdnech u FK 778.

Pozorovali jsme, že mykofenolát mofetil významně snížil mononukleární infiltraci a glomerulosklerózu, se kterou korelovala i tendence k poklesu renálního hypertrofického indexu odrážejícího stupeň strukturálního poškození. Recentní studie potvrzují, že přidání ACE- inhibitorů či blokátorů angiotenzinových receptorů k mykofenolát mofetilu akcentuje jeho imunosupresivní účinek v prevenci glomerulárního a intersticiálního poškození. [8, 9] Další práce ukázaly, že mykofenolát mofetil účinně inhibuje proliferaci

myofibroblastů, kritickou pro syntézu komponent extracelulární matrix v animálních modelech renální fibrózy. Samotná léčba mykofenolát mofetilem či kombinovaná se sirolimem vedla k redukcí exprese různých genů asociovaných s fibrózou. [10] Antifibrogenní efekt mykofenolát mofetilu je spojen nejen s přímým inhibičním účinkem na buňky zodpovědné za fibrotickou přestavbu, ale i na klíčový profibrogenní cytokin- TGF β . [11]

Jak jsem již uvedla, mononukleární buněčná infiltrace korelovala s morfologickými nálezy. V obou skupinách léčených mykofenolát mofetilem jsme pozorovali signifikantní snížení CD4⁻, CD8-lymfocytů a makrofágů. Nicméně dávka 20mg/kg byla jednoznačně účinnější v redukci zánětlivého infiltrátu než dávka 10mg/kg.

Muller et al. na „remnant kidney“ modelu prokázali, že i krátkodobé preventivní podání (před ischemicko-reperfúzním inzultem) mykofenolát mofetilu signifikantně snížilo perivaskulární a periglomerulární mononukleární infiltraci a expresi adhezivních molekul (ICAM-1). [12] Podobný efekt mykofenolát mofetilu na expresi adhezivních molekul (ICAM-1, LCAM-1, LFA-1) a leukocytární infiltraci pozoroval i Heemann. [13] Mykofenolát mofetil aplikovaný v čase ischemicko-reperfúzního inzultu sice neovlivnil leukocytární infiltraci, ale signifikantně suprimoval proliferaci CD4⁻ a CD8- lymfocytů a produkci cytokinů. [14]

V experimentu s leflunomidem jsme šestnáct týdnů po ischemicko-reperfúzním inzultu zaznamenali signifikantní rozdíly ve vývoji proteinurie. Operovaná zvířata léčená FK 778 jednoznačně vykazovala nižší proteinurii než zvířata léčená pouze placebem.

Zároveň však neoperovaná zvířata léčená FK 778 ve srovnání s neléčenými shamovými zvířaty měla proteinurii vyšší. Tento výsledek koreluje i s úrovní renálních funkcí, tj. s clearancí urey a kreatininu, které jsme vyhodnotili v 16. týdnu. Skupiny léčené FK 778, které podstoupily ischemicko-reperfúzní inzult, vykazovaly signifikantně vyšší hodnoty clearance ve srovnání se skupinou neléčenou. Při porovnání shamových, tj. neoperovaných skupin, jsme u skupin léčených FK 778 zaznamenali o polovinu sníženou clearance urey i kreatininu, srovnatelnou se skupinou placebovou, v porovnání s neléčenou shamovou skupinou.

S proteinurií korelovaly i morfologické nálezy. Jak míra glomerulosklerózy, tak intersticiální fibrózy byla signifikantně snížena u operovaných skupin léčených FK 778 ve srovnání se skupinou léčenou placebem. Naopak shamové skupiny léčené FK 778 vykazovaly vyšší glomerulosklerotické a fibrotické tkáňové změny na rozdíl od neléčené shamové skupiny. Popsaná pozorování podporují domněnku, že tyto změny, více vyjádřené u skupin léčených vyšší dávkou FK 778 (10mg/kg) vznikly jako důsledek pravděpodobné nefrotoxicity tohoto imunopresiva. (nepublikovaná data)

Předmětem zájmu recentních studií je efekt derivátu leflunomidu na průběh chronické transplantační nefropatie (CAN). Ačkoli my jsme překvapivě nepozorovali mezi skupinami signifikantní rozdíly v zánětlivé infiltraci (vyjma CD5⁺ buněk), současné práce se shodují ve schopnosti FK 778 významně snížit jak míru fibrotických změn, tak míru buněčné infiltrace (CD4⁺, CD8⁺, ED-1 buňky) ve štěpu. [15] Možnou příčinou odlišného výsledku (ovlivnění zánětlivého infiltrátu)

našeho experimentu je rozdíl v čase vyhodnocení a použité terapeutické dávce. Citované práce hodnotily účinek FK 778 v dávkách 5-20mg/kg na míru postischemických změn již 10-12 týdnů po transplantaci. Je možné, že po 16ti týdnech po ischemicko-reperfúzním inzultu v závislosti na podané dávce dominují spíše nefrotoxické než léčebné účinky. To by odpovídalo i pozorováním, že derivát leflunomidu v dávce 2,5mg/kg je neúčinný a v dávce 40mg/kg toxický. [16;17]

Časná zvýšená exprese adhezivních molekul je raným markerem buněčné rejeckce. FK 778 významně snižuje expresi selektinů, adhezivních molekul (ICAM-1, VCAM-1), sérových imunoglobulinů (IgM, IgG) a cytokinů (TGF- β 1, PDGF). [18;19]

V obou předkládaných experimentálních pracích jsme v důsledku ischemicko-reperfúzního inzultu pozorovali nadměrnou aktivaci imunitního systému. Léčba mykofenolát mofetilem i derivátem leflunomidu vedla k významné redukci glomerulosklerózy a intersticiální fibrózy po ischemicko-reperfúzním inzultu, MMF navíc významně snížil i infiltraci CD4-, CD8- lymfocyty a makrofágy, FK 778 pouze CD5+ leukocyty. Terapie mykofenolát mofetilem i FK 778 byla spojena s lepšími renálními funkcemi, které jsme vyhodnotili v závěru experimentu. Úroveň renálních funkcí, proteinurie, clearance kreatininu a urey, u zvířat léčených byla prakticky srovnatelná se shamovými zvířaty. Terapeutický účinek však jednoznačně závisel na dávce. Redukci zánětlivého infiltrátu a glomerulosklerózy jsme zaznamenali u obou použitých dávkách mykofenolát mofetilu.

Nicméně pouze vyšší dávka (20 mg/kg) byla spojena s lepšími funkčními parametry, zejména s proteinurií v závěru experimentu.

V případě FK 778 jsme zaznamenali podobné výsledky ve smyslu jeho lepší terapeutické účinnosti ve vyšší dávce. Ačkoli zvířata léčená dávkou 10mg/kg vykazovala signifikantní redukci morfologických změn obdobnou se zvířaty shamovými, funkční parametry měly jednoznačně horší než skupiny léčené dávkou 3 mg/kg. Jak vyšší proteinurie, tak clearance urey a kreatininu svědčí pro nefrotoxický potenciál FK 778.

Snížení proteinurie, fibrotických změn a na dávce závislý pokles leukocytárního infiltrátu potvrzuje terapeutický účinek mykofenolát mofetilu i FK 778.

Naše výsledky podporují hypotézu, že imunitní systém je klíčovým v rozvoji a progresi chronické progresivní nefropatie. Selektivní imunosupresivně působící látky s potenciálem blokovat trvalou patologicky zvýšenou aktivitu imunitního systému by tak mohly hrát významnou úlohu v terapii chronických nefropatií.

Druhou otázkou, tj. možnost podílu genové predispozice k rozvoji ledvinného onemocnění a pravděpodobnosti jeho progresu do nezvratného renálního selhání, jsme se pokusili zodpovědět pomocí genové analýzy výše uvedených genů. Vzhledem ke stále probíhajícímu genotypizacím a sběru laboratorních a klinických dat pacientů zařazených do studie „MIA“ však není možné jednoznačně

potvrdit kauzální souvislost mezi analyzovanými geny, vznikem a průběhem chronických nefropatií.

V získaném souboru pacientů jako nejčastější verifikovaná příčina chronického renálního selhání dominuje diabetická nefropatie, tubulointersticiální nefropatie a nefroskleróza na podkladě hypertenze. Bohužel většina nemocných s chronickým renálním selháním je bioprována ve fázi „end-stage kidney“, a tudíž nelze histologicky identifikovat základní renální onemocnění, které vedlo k nezvratnému selhání funkce ledvin. Ve vstupních sledovaných laboratorních a klinických parametrech jsme nepozorovali signifikantní rozdíly mezi pohlavími.

Podrobnou genovou analýzu jsme doposud provedli pouze u dvou níže uvedených variant genu pro ghrelin, včetně korelace k laboratorním a klinickým parametrům. U obou genů kódující interleukin 6 a HFE jsme analyzovali dva známé polymorfismy a jejich frekvenční zastoupení u mužů a žen. U genu pro ghrelin jsme doplnili genotypizaci o nověji identifikovaný polymorfismus Gln90Leu. Z přehledné tabulky (Tab. 6) je zřejmé, že statisticky významné jsou rozdíly v zastoupení vzácných genotypů u varianty Gln90Leu a H63D. V prvním případě je výskyt vzácného genotypu-Leu/Leu- 7,5krát vyšší u žen než u mužů, naopak genotyp D63D se u mužů vyskytuje dvakrát častěji.

První výsledky analýzy dvou variant genu pro ghrelin (Arg51Gln, Leu72Met) svědčí o tom, že ghrelin by mohl hrát zásadní roli v udržení energetické rovnováhy a v prevalenci kardiovaskulárních komplikací u hemodialyzovaných pacientů. Analýza dvou variant

genu pro ghrelin prokázala, že vzácněji se vyskytující alely obou variant, tj. arginin, resp. methionin, jsou spojeny se signifikantně nižší triglyceridemií, alela pro arginin navíc i se signifikantně nižší cholesterolemíí a vyšší albuminemií. Vztah k BMI (body mass index) jsme nepozorovali ani u jedné z variant. Výsledky současných prací se s našimi shodují jen částečně, neboť většina nachází jednoznačný korelát pouze mezi polymorfismem Leu72Met, hyperlipidemií, obezitou a výskytem kardiovaskulárních chorob, včetně hypertenze. Jeví se, že homozygoté pro methionin mají signifikantně nižší lipidemii i prevalenci kardiovaskulárních onemocnění. Naproti tomu alela kódující leucin je asociována s hyperlipidemií, vyšším BMI, obezitou a výskytem kardiovaskulárních onemocnění. [20] Naopak u varianty Arg51Gln se výsledky doposud publikovaných studií rozcházejí. V zásadě však nespovídá, že by existoval jednoznačný vztah tohoto polymorfismu k uvedeným parametrům.[21, 22]

Možnou příčinou rozdílů mezi našimi daty, resp. asociacemi mezi variantami genu pro ghrelin a sledovanými parametry, a dosud publikovanými pracemi by mohla být určitá specifita samotné populace pacientů s chronickým renálním selháním. Jak jsem již uvedla, jednotlivé studie se rozcházejí nejen v asociacích jednotlivých polymorfismů, kardiovaskulárních rizik a rozvoje metabolického syndromu, ale i ve frekvencích jejich výskytu u konkrétních populací. Tuto genovou stratifikaci podporují nálezy signifikantně vyššího zastoupení mutací Leu72Met a Gln90Leu u evropské populace (Německo, Švédsko) ve srovnání s populací americkou. Samotné rozdíly jsou i mezi rasami. [23] Tyto nesrovnalosti mohou být

zapříčiněné právě genetickou heterogenitou či faktory zevního prostředí, které následně ovlivňují fenotypový projev určité genové varianty.

Ze získaných prvotních výsledků můžeme vyvodit, že alely kódující arginin, resp. methionin, by mohly zastávat protektivní úlohu v udržení dobrého nutričního stavu a svým účinkem na lipidémii snižovat i riziko rozvoje metabolického syndromu či kardiovaskulárních onemocnění u hemodialyzovaných pacientů. V porovnání se zdravou populací jsme nezaznamenali signifikantní rozdíly ve frekvencích výskytu jednotlivých genotypů u obou variant.

Můžeme předpokládat, že u pacientů s chronickým renálním selháním může kombinace více „protektivně působících“ alel rozhodnout o dlouhodobě příznivém průběhu či v opačném případě k rychlé progresi onemocnění. Včasná detekce rizikových genotypů by tak mohla pomoci modifikovat léčbu či zahájit včasnou profylaxi hemodialyzovaných pacientů, a tak zlepšit jejich prognózu.

5. ZÁVĚR

V našich experimentech jsme zjistili tyto významné poznatky:

- 1) Terapie inhibitory inosinmonofosfátdehydrogenázy (MMF) či dihydroorotátdehydrogenázy (FK 778) je spojena s významnou redukcí proteinurie a zlepšením renálních funkcí.
- 2) Inhibitory inosinmonofosfátdehydrogenázy (MMF) a dihydroorotátdehydrogenázy (FK 778) významně snižují míru glomerulosklerózy a intersticiální fibrózy.
- 3) Inhibitory inosinmonofosfátdehydrogenázy (MMF) a dihydroorotátdehydrogenázy (FK 778) významně redukuje leukocytární infiltraci v ledvině po ischemicko-reperfúzním inzultu. FK 778 nemá prokazatelný efekt na zánětlivou infiltraci vyjma CD5+ pozitivních buněk.
- 4) Substitute argininu za glutamin ve variantě Arg>Gln genu pro ghrelin je spojena s vývojem signifikantně nižší triglyceridémie, cholesterolemie a vyšší albuminémie.
- 5) Substitute methioninu za leucin ve variantě Leu>Met genu pro ghrelin je spojena s vývojem signifikantně nižší triglyceridémie.
- 6) Prokázali jsme protektivní úlohu vzácnějších alel (Arg., resp. Met) v obou analyzovaných variantách genu pro ghrelin ve vztahu k nutričnímu stavu a prevalenci kardiovaskulárních komplikací (hypertenze) u hemodialyzovaných pacientů.

6. POUŽITÁ LITERATURA

1. www.nefrol.cz
2. Bohmova R, Honsova E, Heemann U *et al.*: Effect of sirolimus on ischemia/reperfusion injury in transgenic hypertensive rat. *Transplant Proc* 34:3051-3052, 2002.
3. Rajnoch J, Viklicky O: Angiogenesis and organ transplantation. *Folia Microbiol (Praha)* 49:499-505, 2004.
4. Vincenti F: What's in the pipeline? New immunosuppressive drugs in transplantation. *Am J Transplant* 2:898-903, 2002.
5. Viklicky O, Bohmova R, Ouyang N *et al.*: Effect of sirolimus on renal ischaemia/reperfusion injury in normotensive and hypertensive rats. *Transpl Int* 17:432-441, 2004.
6. Rajnoch J, Lodererova A, Szabo A *et al.*: Regulators of angiogenesis in renal ischemia/reperfusion injury in normotensive and hypertensive rats: effect of tacrolimus. *Transplant Proc* 37:352-354, 2005.
7. Yang CW, Ahn HJ, Jung JY *et al.*: Preconditioning with cyclosporine A or FK506 differentially regulates mitogen-activated protein kinase expression in rat kidneys with ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 75:20-24, 2003.
8. Ventura CG, Coimbra TM, de Campos SB *et al.*: Mycophenolate mofetil attenuates renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 13:2524-2533, 2002.
9. Bloudickova S, Viklicky O: New immunosuppressive agents in chronic progressive glomerulopathies: an update. *Prague Med Rep* 105:261-269, 2004.

10. Flechner SM, Kurian SM, Solez K *et al.*: De novo kidney transplantation without use of calcineurin inhibitors preserves renal structure and function at two years. *Am J Transplant* 4:1776-1785, 2004.
11. Morath C, Schwenger V, Beimler J *et al.*: Antifibrotic actions of mycophenolic acid. *Clin Transplant* 20 Suppl 17:25-29, 2006.
12. Muller V, Hamar P, Szabo A *et al.*: Effect of mycophenolate mofetil on the in vivo infiltration of lymphocytes in the rat remnant kidney. *Transplant Proc* 30:982, 1998.
13. Heemann U, Azuma H, Hamar P *et al.*: Mycophenolate mofetil inhibits lymphocyte binding and the upregulation of adhesion molecules in acute rejection of rat kidney allografts. *Transpl Immunol* 4:64-67, 1996.
14. De Greef KE, Ysebaert DK, Vercauteren SR *et al.*: Effect of immunosuppression on damage, leukocyte infiltration, and regeneration after severe warm ischemia/reperfusion renal injury. *Transplant Proc* 34:791-794, 2002.
15. Rintala JM, Savikko J, Rintala SE, von WE: The effect of FK778 on acute rat renal allograft rejection and expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Transplant Proc* 38:2719-2721, 2006.
16. Pan F, Ebbs A, Wynn C *et al.*: FK778, a powerful new immunosuppressant, effectively reduces functional and

histologic changes of chronic rejection in rat renal allografts. *Transplantation* 75:1110-1114, 2003.

17. Schrepfer S, Deuse T, Schafer H, Reichenspurner H: FK778, a novel immunosuppressive agent, reduces early adhesion molecule up-regulation and prolongs cardiac allograft survival. *Transpl Int* 18:215-220, 2005.

18. Fitzsimmons WE, First MR: FK778, a synthetic malononitrilamide. *Yonsei Med J* 45:1132-1135, 2004.

19. Rintala JM, Savikko J, Rintala SE, von WE: The effect of leflunomide analogue FK778 on development of chronic rat renal allograft rejection and transforming growth factor-BETA expression. *Transplant Proc* 38:3239-3240, 2006.

20. Hinney A, Hoch A, Geller F *et al.*: Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2716, 2002.

21. Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P *et al.*: Role of ghrelin polymorphisms in obesity based on three different studies. *Obes Res* 10:782-791, 2002.

22. Walia B, Wang L, Merlin D, Sitaraman SV: TGF-beta down-regulates IL-6 signaling in intestinal epithelial cells: critical role of SMAD-2. *FASEB J* 17:2130-2132, 2003.

23. Steinle NI, Pollin TI, O'Connell JR *et al.*: Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the Old Order Amish. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6672-6677, 2005.

7. PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

1. **Bloudickova S**, Rajnoch J, Lodererova A, Honsova E., Viklicky O. *MYCOPHENOLATE MOFETIL AMELIORATES ACCELERATED PROGRESSIVE NEPHROPATHY IN RAT*. *Kidney Blood Pressure Research* 2006; 29(1): 60-66. **IF 2,408**
2. **Bloudíčková S**, Viklický O. *NEW IMMUNOSUPPRESSIVE AGENTS IN CHRONIC PROGRESSIVE NEPHROPATHIES: AN UPDATE*. *Prague Medical Report* 2004; Vol. 105(3): 261-269.
3. Rajnoch J, Lodererova A, Szabo A, Honsova E, Vannay A, **Bloudickova S**, Matl I, Viklicky O. *REGULATORS OF ANGIOGENESIS IN RENAL ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY IN NORMOTENSIVE AND HYPERTENSIVE RATS: EFFECT OF TACROLIMUS*. *Transplant Proc.* 2005 Jan-Feb;37(1):352-4. **IF 0,799**
4. **Silvie Bloudíčková**, Jan Rajnoch a Ondřej Viklický. *EXPERIMENTÁLNÍ MODEL V TRANSPLANTAČNÍ NEFROLOGII*. In : *Transplantace v experimentu*, Peter Baláž, Hynek Mergental et al. (kapitola- učební text, Galén, 2007).
5. Hubáček JA, **Bloudíčková S.**, Bohuslavová R., Viklický O. and MIA group. *GHRELIN VARIANT INFLUENCE DEVELOPMENT OF BMI AND PLASMA LEVELS OF TOTAL*

CHOLESTEROL IN DIALYZED PATIENTS. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (přijato k publikaci 2/2007) **IF 1,918**

Abstrakta:

1. Rajnoch J, Lodererova A, Szabo A, Honsova E, Vannay A, **Bloudickova S**, Matl I, Viklicky O. *REGULATORS OF ANGIOGENESIS IN RENAL ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY IN NORMOTENSIVE AND HYPERTENSIVE RATS: THE EFFECT OF TACROLIMUS.* Transplantation 2004;78(2):628. **IF 3,879**
2. Viklicky O, **Bloudickova S.**, Rajnoch J., Lodererova A., Honsova E., Vitko S. *MYCOPHENOLATE MOFETIL IN ACCELERATED RENAL INJURY.* Am J Transplant 2005; Suppl. 11, Vol. 5(5): 443. **IF 6,002**
3. Hubacek JA, Bohuslavova R, **Bloudickova S**, Viklicky O for MIA group. *GHRELIN VARIANT INFLUENCE DEVELOPMENT OF PLASMA LEVELS OF TOTAL CHOLESTEROL AND ALBUMIN, BUT NOT BMI, IN DIALYZED PATIENTS.* Clin. Chem. Lab. Medicine 2006;44(8): A64-A65. **IF 1,918**
4. **Bloudíčková S**, Hubáček JA, Viklický O. *GHRELIN JAKO RIZIKOVÝ FAKTOR*

ROZVOJE MIA SYNDROMU U HEMODIALYZOVANÝCH PACIENTŮ. Aktuality v nefrologii 2006, 12, Suppl 1, 21.

5. Hubáček JA, **Bloudíčková S**, Viklický O. *GENETICKÁ PODSTATA KOMPLIKACE HEMODIALYZAČNÍ LÉČBY- SYNDROMU MIA.* Aktuality v nefrologii 2006, 12, Suppl 1, 32.
6. Hubacek JA, **Bloudickova S**, Bohuslavova R, Adamkova V, Skodova Z. *Leu72>Met VARIANT IN GHRELIN INFLUENCES PLASMA LEVELS OF HDL-CHOLESTEROL IN CAUCASIAN FEMALES.* Atherosclerosis 2005; 6 Suppl (Last minute abstracts): 5-6. **IF 3,777**
7. **BLOUDICKOVA S**, VIKLICKY O, HUBACEK JA. *GHRELIN Leu72>Met POLYMORPHISM AND ATHEROSCLEROTIC RISK FACTORS IN HAEMODIALYSED PATIENTS.* Atherosclerosis 2005; 6 Suppl (Last minute abstracts): 6-7. **IF 3,777**
8. **Bloudíčková S**, Viklický O, Hubáček JA. *POLYMORFISMUS GENU PRO GHRELIN JAKO RIZIKOVÝ FAKTOR PROGRESE RENÁLNÍHO SELHÁNÍ.* DMVE 2005; 8-Suppl 3: 32.