



**Univerzita Karlova v Praze
3. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce

**RECEPTORY ZÚČASTNĚNÉ V REGULACÍCH ZÁNĚTLIVÉ REAKCE
U RENÁLNÍCH ONEMOCNĚNÍ**

MUDr. Václav Eis

Praha 2011

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor, předseda oborové rady: Biologie a patologie buňky, prof. MUDr. Milan Elleder, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav patologie 3. LF UK, Šrobárova 50, Praha 10

Autor: MUDr. Václav Eis

Školitel: prof. MUDr. Václav Mandys, CSc.

Školitel specialista: doc. MUDr. Zdenka Vernerová, CSc.

Oponenti: MUDr. Zdeňka Zemanová, CSc.
prof. MUDr. Ondřej Hes, Ph.D.

Autoreferát byl rozeslán dne

Obhajoba se koná dne.....v.....hod. kde.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

Obsah

SOUHRN	4
SUMMARY	5
1 ÚVOD	6
1.1 Chemokiny a nenádorová onemocnění ledvin	6
1.1.1 Chemokiny	6
1.1.2 Chemokinové receptory	7
1.1.3 Chemokiny a ledviny	7
1.2 Endoteliny a nenádorová onemocnění ledvin	9
1.2.1 Endoteliny, endotelinové receptory	9
1.2.2 Endoteliny a ledviny	10
1.2.3 Endoteliny a progresse renálních onemocnění	11
2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	12
3 MATERIÁL A METODIKA	13
4 VÝSLEDKY	16
4.1 Účast chemokinového receptoru CCR1 a CCR5 na leukocytární infiltraci a následné fibróze intersticia ledviny u myšího modelu jednostranné obstrukce ureteru	16
4.2 Pozdní začátek léčby blokátorem CCR1 receptoru vede k zabránění progresse lupusové nefritidy u MRL (Fas)-lpr myši	16
4.3 Blokáda CCR1 redukuje intersticiální zánět a fibrózu u myšího modelu adriamycinem indukované nefropatie	17
4.4 Pozdní začátek blokády endotelinového receptoru u homozygotních Ren-2 potkanů snižuje podocytární poškození podocytů i přes těžkou hypertenzi	17
4.5 Časný začátek blokády endotelinového receptoru u hypertenzních heterozygotních Ren-2 potkanů	18
4.6 Pozdní začátek blokády endotelinového receptoru u hypertenzních heterozygotních Ren-2 transgenních potkanů	19
5 DISKUSE	20
6 ZÁVĚRY	21
7 POUŽITÁ LITERATURA	22
8 SEZNAM PUBLIKACÍ	23

SOUHRN

Chemokiny jsou rozsáhlou rodinou malých chemotaktických cytokinů, které se účastní regulace migrace leukocytů a modulace řady jejich funkcí. Studie na zvířatech zabývající se progresivní intersticiální fibrózou ledviny ukázaly, že chemokinové receptory CCR1 a CCR5 jsou exprimovány na makrofázích a T lymfocytech infiltrujících do místa poškození tubulů a intersticiální fibrózy.

Naším cílem bylo dokázat, že CCR1 a CCR5 hrají roli v infiltraci leukocytů a podílí se na rozvoji fibrózy tubulointersticiálního kompartmentu ledviny. K tomu jsme použili model jednostranné obstrukce ureteru u CCR1 a CCR5 deficientních kmenů myší. Naše práce ukázala, že chybění nebo blokáda CCR1 receptoru v tomto modelu významně snižuje počet infiltrujících leukocytů do poškozené ledviny a redukuje rozsah fibrózy intersticia, zatímco chybění CCR5 nemá tento účinek. Dále jsme prokázali, že blokáda CCR1 v modelu systémového lupus erythematosus a tedy lupusové nefritidy (myší kmen MRL^{lpr/lpr}) omezí množství leukocytů v intersticiu ledviny, redukuje fibrózu, ale nemá vliv na průběh imunokomplexové glomerulonefritidy. Na modelu adriamycinem indukované fokálně segmentální glomerulosklerózy s nefrotickým syndromem jsme ukázali, že blokáda CCR1 antagonistou BX471 nápadně sníží počet leukocytů infiltrujících do intersticiálního kompartmentu a omezí rozsah jeho fibrotizace, aniž by měla vliv na tíži glomerulosklerózy a proteinurie. Blokáda chemokinového receptoru CCR1 by mohla mít terapeutické použití u pacientů s chronickým onemocněním ledvin.

Endotelin 1 (ET-1) je neúčinnějším savčím přirozeným vazokonstriktorem s prozánětlivými, proliferačními a profibrotickými účinky. Působí prostřednictvím vazby na dva typy receptorů, ET_A a ET_B. Endotelinový systém hraje důležitou roli v řízení ledvinných funkcí, jak za normálních podmínek, tak i za patologických stavů. U sůl-senzitivních potkaních modelů hypertenze hraje endotelinový systém významnou roli v rozvoji vysokého krevního tlaku a poškození orgánů.

Při pokusech jsme používali TGR(mRen-2)27, potkaní kmen s inkorporovaným myším genem pro renin. Nejprve jsme zkoumali efekt neselektivní blokády ET_{A/B} a selektivní blokády receptoru ET_A u homozygotních potkanů s rozvinutou maligní hypertenzí. Ukázali jsme, že selektivní blokáda ET_A redukuje rozsah poškození podocytů i orgánové poškození a zlepšuje přežívání nezávisle na výši krevního tlaku. V dalších projektech jsme použili heterozygotní TGR potkany, u kterých je průběh hypertenze mírnější, a dovoluje tedy dlouhodobější studie. Cílem pokusů bylo objasnit roli endotelinu v tomto modelu v časném rozvoji hypertenze u mladých jedinců (preventivní protokol) a v průběhu hypertenze již rozvinuté u dospělých potkanů (regresní protokol). Naše výsledky ukázaly, že selektivní blokáda receptoru ET_A má v porovnání s neselektivní ET_{A/B} blokádou výraznější vliv na snížení krevního tlaku, redukci orgánového poškození a více zlepšuje přežití jak u dospělých heterozygotních potkanů s již rozvinutou hypertenzí, tak u mladých potkanů v časných stádiích rozvoje hypertenze.

SUMMARY

Chemokines, a family of small chemotactic cytokines, play a major role in attracting circulating leukocytes into inflamed renal tissue in a variety of kidney diseases. Studies on progressive renal fibrosis in the mouse have demonstrated that chemokine receptors CCR1 and CCR5 were expressed on infiltrating macrophages and T lymphocytes at sites of tubular damage and interstitial fibrosis.

We hypothesized that both CCR1 and CCR5 might be involved in leukocyte infiltration and the development of renal fibrosis in mice. Using model of unilateral ureteral obstruction (UUO) in genetically generated CCR1-deficient and CCR5-deficient mice we have demonstrated that lack or blockade of CCR1 effectively reduced the infiltration of leukocytes into the UUO kidney and renal fibrosis, whereas lack of CCR5 had no effect. The model of immune complex glomerulonephritis in autoimmune MRL^{lpr/lpr} mice was used to demonstrate that late onset of chemokine receptor CCR1 blockade reduced the amount of leukocytes, apoptotic and proliferating cells in the renal interstitium but not in glomeruli. Using murine model of adriamycin-induced focal segmental glomerulosclerosis with nephrotic syndrome we showed that CCR1 blockade by small antagonistic molecule BX471 significantly reduced the amount of leukocytes in interstitial lesions and also reduced renal fibrosis. In contrast, the extent of proteinuria and glomerular sclerosis was not affected by BX471 treatment. We conclude that CCR1 may be a valuable target for therapeutic intervention for chronic nephropathies accompanied by leukocyte-mediated progressive interstitial fibrosis.

Endothelin-1 (ET-1) is a potent vasoconstrictor with proinflammatory, mitogenic and profibrotic effects involved in both normal renal physiology and pathology. The action of ET is mediated by the activation of two receptor subtypes ET_A and ET_B. ET system plays an important role in the pathogenesis of high blood pressure and associated end-organ damage in salt-sensitive rat models of hypertension.

The hypertensive rat strain transgenic for the mouse renin gene [TGR] is valuable monogenetic model of hypertension. Our first study was performed to determine effects of nonselective ET_{A/B} and selective ET_A receptor blockade in homozygous animals with established hypertension. We have shown that selective ET_A receptor blockade reduces podocyte injury and end-organ damage and also improves survival rates independently of hypertension. Heterozygous TGR provide a suitable model of hypertension for long-term studies, since their hypertension is milder. The aim of our subsequent projects was to evaluate the role of ET-1 in the onset and maintenance of hypertension in heterozygous TGR (early onset treatment) and to evaluate the role of the ET system in heterozygous TGR with established hypertension (late-onset treatment). Our results demonstrate that selective ET_A receptor blockade has more favourable effects on blood pressure, end-organ damage and survival than nonselective ET_{A/B} receptor blockade and that ET_A receptor blockade has similar effects in heterozygous rats with established hypertension as in young animals with developing hypertension.

1 ÚVOD

1.1 Chemokiny a nenádorová onemocnění ledvin

1.1.1 Chemokiny

Chemokiny jsou skupinou malých (8-15 kDa) chemotaktických cytokinů, které mají podobnou sekundární strukturu a jsou syntetizovány většinou buněk v lidském těle. Účastní se regulace migrace leukocytů a modulace funkcí řady imunitních i neimunitních buněk, např. mobilizace CD34+ kmenových buněk, vaskularizace orgánů během embryonálního vývoje a na vývoji T a B buněk. Účastní se i řady patologických procesů, např. vstupu viru HIV-1 do buňky pomocí receptorů, hrají významnou roli při metastazování nádorů.

Chemokiny imobilizované na lumenálním endoteliálním povrchu spolu s adhezivními molekulami endotelu a leukocytů (selektiny, integriny a ICAM) jsou odpovědné za specificitu adheze leukocytů k endotelu a jejich následného průniku do poškozené tkáně. Chemokiny prezentované na endoteliálním povrchu interagují s příslušnými receptory rolujícími leukocytů; to vede k rychlé aktivaci leukocytárních integrinů a tím k zastavení a pevné adhezi leukocytů na daném místě.

V současné době je u člověka známo 42 chemokinů a 18 chemokinových receptorů. Chemokiny vykazují navzájem 20-95% homologii v sekvenci aminokyselin. Současná nomenklatura dělí chemokiny do čtyř skupin CL, CCL, CXCL, CX3CL na základě strukturálního motivu čtyř cysteinů v blízkosti N-terminálního konce. CCL chemokiny mají na N-terminálním konci těsně vedle sebe dva cysteiny. U CXCL chemokinů, dva cysteiny nejbližší N-terminálnímu konci jsou odděleny jednou (variabilní) aminokyselinou. CX3CL chemokin (fraktalkin) je integrální membránový protein, který má na N-konci typickou chemokinovou strukturu se třemi aminokyselinami mezi prvními dvěma cysteiny. CL chemokiny nemají ve své molekule první a třetí cystein typické chemokinové struktury.

Uvnitř jedné skupiny (C, CC, CXC, CX3C) existuje několik chemokinů vážících se jen na jeden receptor, který je pro ně specifický, u většiny vazebných interakcí ligand – receptor se vazebné specificity mezi jednotlivými členy skupiny různě překrývají, v rámci jedné chemokinové skupiny řada chemokinových receptorů váže více než jeden ligand, a některé chemokiny se mohou vázat na více než jeden chemokinový receptor. Žádný z chemokinů není pro danou populaci leukocytů ve své funkci zcela jedinečný a daná subpopulace leukocytů exprimuje receptory pro různé chemokiny – tato nápadná komplexnost interakcí chemokin – receptor a zdánlivá nadbytečnost jednotlivých chemokinů či receptorů je nezbytná pro zachování životně důležitých funkcí, na jejichž řízení se chemokiny podílejí.

Jeden chemokin může působit na různé buněčné populace a naopak, daná populace buněk je schopna odpovídat na stimulaci různými chemokiny. Během daného procesu dochází vždy k sekreci jen určitého specifického setu chemokinů, jejich produkce je časově a místně kontrolovaná, stejně jako je kontrolovaná exprese chemokinových receptorů u dané skupiny leukocytů. Navíc existuje řada dalších mechanismů, které značně omezují a zjemňují nadbytečnost a jistou nespecificitu interakcí v daném systému. Každý receptor váže jen specifickou malou skupinu chemokinů, navíc, dva ligandy jednoho receptoru mají často různou

vazebnou afinitu. Dva různé chemokiny se výrazně liší v tom, jakou funkci řídí (např. adheze, migrace, desenzitizace receptoru), s jakou efektivitou a jakým způsobem (agonista/antagonista). Množství chemokinů produkovaných různými buněčnými populacemi na podkladě stejného stimulu se může značně lišit. Chemokiny produkované simultánně v jednom místě (mikroprostředí) mohou interagovat a modifikovat navzájem výsledný efekt působení.

Chemokiny se váží na solubilní glykosaminoglykany a glykosaminoglykany vázané na povrchu buněk a v extracelulární matrix. Touto vazbou dochází k jejich imobilizaci, usnadní se vytváření haptotaktického chemokinového gradientu důležitého pro směřování migrace leukocytů a zvýší se koncentrace chemokinů v místě produkce. Oligomerizace chemokinů indukovaná vazbou na glykosaminoglykany je zcela nezbytná pro aktivaci některých chemokinových receptorů. Chemokiny jsou transportovány endotelem z extracelulární matrix mechanismem transcytózy na lumenální povrch, zde se naváží na glykosaminoglykany a jsou prezentovány chemokinovým receptorům na povrchu leukocytů.

1.1.2 Chemokinové receptory

Chemokinové receptory mají strukturu receptorů spřažených s G-proteinem tvořenou sedmi transmembránovými α -helixy. Receptory se podobně jako jejich ligandy dělí do čtyř tříd (CR, CCR, CXCR, CX3CR). Lidské chemokiny působí na chemokinových receptorech převážně jako agonisté, některé z chemokinů mohou působit i jako antagonisté chemokinových receptorů.

Po navázání ligandu dochází u chemokinových receptorů ke změně konformace, umožňující navázání heterotrimeru G_i proteinu, vedoucí k spuštění intracelulární signální kaskády vedoucí ke změnám v chování buňky. Signalizace zprostředkovaná G proteinem zahrnuje aktivaci fosfolipázy C, vedoucí k formaci inositoltrifosfátu a diacylglycerolu, zodpovědných za influx vápníkových iontů a aktivaci proteinkinázy C. Dále dochází k indukci aktivace fosfolipázy A2 a uvolnění arachidonové kyseliny, účastníci se chemotaktické odpovědi, a ke spuštění fosfolipázy D, účastníci se transformace buňky a vezikulárního transportu. Chemotaxe řízená chemokiny je podmíněna vysoce komplexními buněčnými procesy, které zahrnují změnu tvaru buňky, polymerizaci/depolymerizaci aktinu a buněčnou adhezi.

1.1.3 Chemokiny a ledviny

Vývoj a průběh renálního onemocnění úzce koreluje svou intenzitou, ale i časově a místně s expresí chemokinů a chemokinových receptorů. Všechny typy renálních buněk dokážou za určitých podmínek produkovat chemokiny. Syntézu a sekreci chemokinů stimuluje řada prozánětlivých látek, oxidační stres, vazoaktivní látky a růstové faktory. Experimentálně byla např. prokázána produkce chemokinů buňkami proximálních tubulů indukovaná lipopolysacharidem a vysokými hladinami albuminu. Mezangiální buňky v buněčné kultuře vytvářejí chemokiny po stimulaci IgA a IgG imunokomplexy. Glomerulární endotel může produkovat chemokin CCL5 na podkladě stimulace angiotenzinem II.

Chemokiny produkované renálními buňkami působí prozánětlivě na několika úrovních. Jednak atrahují cirkulující leukocyty do místa poškození, jednak zřejmě působí místně na samotné renální buňky exprimující chemokinové receptory. Kromě samotných buněk ledvin jsou hlavním zdrojem chemokinů v místě poškození infiltrující leukocyty, což má za následek další cílenou infiltraci tkáně zánětlivými buňkami.

Experimentální studie na zvířecích modelech

Z výsledků experimentálních prací zabývajících se expresí chemokinů a jejich receptorů v ledvinách u zvířecích modelů renálních onemocnění je zřejmé, že k produkci chemokinů dochází na podkladě poškození jak glomerulů, tak tubulointersticia ledviny. Ve zdravé tkáni ledviny nebyla produkce chemokinů prokázána.

Modelem **systemového lupus erythematoses** a zároveň i lupusové nefritidy je myší kmen MRL^{lpr/lpr}. Ten má mutovaný Fas gen (lpr-gen), což vede k poruše Fas-zprostředkované apoptózy. Tento defekt se projeví zejména zvýšenou kontinuální proliferací lymfocytů, produkcí autoprotilátok proti řadě antigenů, včetně jaderných proteinů a DNA, vede k imunokomplexové vaskulitidě a k rozvoji glomerulonefritidy. Z výsledků prací na tomto modelu vyplývá, že chemokiny - zejména CCL2, CCL5 a CCL4 - jsou v ledvinách produkovány před rozvojem proteinurie, morfologicky patrného poškození parenchymu a před nástupem leukocytárního infiltrátu. K produkci chemokinů dochází v místech, do kterých později míří mononukleární infiltrace. Chemokinové receptory (CCR1, CCR2 a CCR5) jsou v ledvinné tkáni prokazatelné až v době, kdy dochází k infiltraci tkáně leukocyty, a paralelně s infiltrujícími leukocyty je detekována i zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů; v tuto dobu dochází také k rozvoji proteinurie.

Modelem tubulointersticiálního poškození a následné progresivní fibrotizace ledvinného parenchymu provázené intersticiálním zánětlivým infiltrátem je **jednostranná obstrukce ureteru**. Na tomto modelu lze studovat změny, ke kterým dochází v tubulointersticiálním kompartmentu při progresi renálního poškození a rozvoji end-stage kidney. V podvázané ledvině se vyvíjí hydronefróza, dochází k poškození tubulárních buněk, k rozvoji zánětu v intersticiu a následně k jeho fibróze. Exprese mRNA CC chemokinů, zejména CCL2 a CCL5, a jejich receptorů CCR1, CCR2 a CCR5 stoupá rychle mezi 2. - 10. dnem. Během této doby nastává i masivní příliv makrofágů a lymfocytů do ledviny. Morfologicky je patrné poškození tubulů s jejich dilatací, s atrofií a nekrózou epitelu tubulů. Dochází k rozšíření intersticia způsobenému zvýšenou tvorbou extracelulární matrix, tj. k rozvoji fibrózy, se zvýšenou akumulací aktivovaných fibroblastů v intersticiu. Data získaná Vielhauerovou studií ukazují korelaci poškození tubulointersticiální tkáně a rozvoje fibrózy spojené se zvýšenou expresí mRNA některých CC chemokinů s intersticiální akumulací lymfocytů a makrofágů exprimujících na svém povrchu příslušné chemokinové receptory.

Chemokiny u lidských onemocnění ledvin

Expresi chemokinů a chemokinových receptorů u různých typů glomerulárních onemocnění u člověka prokázala řada prací. U IgA nefropatie byla u pacientů s akutní formou onemocnění zjištěna zvýšená hladina CXCL8 v moči, která korelovala se stupněm hematurie. V ledvinách byla exprese CXCL8 lokalizována v glomerulech se známkami endokapilární proliferace. U chronického onemocnění byly v moči signifikantně vyšší hladiny CCL2, korelovaly s morfoloickými známkami progresu IgA nefropatie, jako jsou mezangiální proliferace a infiltrace intersticia makrofágy. Imunohistochemicky byl CCL2 detekován v endotelu cév, v tubulárním epitelu a v infiltrujících mononukleárních buňkách v intersticiu ledviny. U lupusové nefritidy, anti-GBM rychle progredující glomerulonefritidy a Wegenerovy granulomatózy byla exprese CCL2 imunohistochemicky prokázána v mezangiu glomerulů. In situ hybridizací byla prokázána mRNA pro CCL2 u pacientů s lupusovou nefritidou v infiltrujících mononukleárech v intersticiu, v kortikálních tubulech a v endotelu, u rychle progredující glomerulonefritidy navíc i v glomerulárním trsu a v srpcích. U neproliferativních glomerulopatií, jako jsou membranózní nefropatie, nemoc minimálních změn a diabetická nefropatie, se nepodařilo prokázat CCL2 v glomerulech. Naproti tomu v tubulech pacientů s membranózní nefropatií byla v biopsiích patrná exprese CCL2 a CCL5 spojená s intersticiálním zánětlivým infiltrátem a fibrózou.

Furuichi et al. se zabývali expresí CCR1 a CCR5 u různých chorob ledvin v korelaci s hladinami jejich ligandů, CCL3, CCL4 a CCL5 v moči. Buňky exprimující CCR1 a CCR5 a zároveň CD3 nebo CD68 (T lymfocyty a makrofágy) našli v glomerulech a v intersticiu. Počet CCR1-pozitivních buněk v glomerulech koreloval s hladinami CCL3 v moči, počet CCR1-pozitivních buněk v intersticiu koreloval s močovými hladinami jak CCL3, tak CCL5. Většina CCR1-pozitivních buněk v intersticiu byly makrofágy, jejich množství korelovalo s intenzitou intersticiální fibrózy a tubulární atrofie. Počet CCR5-pozitivních buněk v glomerulech koreloval s extrakapilárními lézemi a CCL3 hladinami v moči, zatímco počet CCR5-pozitivních buněk v intersticiu, většinou T lymfocytů, koreloval s intersticiálním poškozením a hladinami CCL5 v moči. Segerer et al. sledovali imunohistochemicky přítomnost receptoru CCR5 v renálních biopsiích. Nezávisle na typu onemocnění našli tento receptor pouze na infiltrujících mononukleárech.

1.2 Endoteliny a nenádorová onemocnění ledvin

1.2.1 Endoteliny, endotelinové receptory

Endoteliny jsou skupinou vazokonstrikčních peptidů produkovaných endotelem cév, působící jako autokrinní/parakrinní regulátory. Jsou známy tři isoformy endotelinů, všechny mají délku 21 aminokyselin. Endotelin 1 (ET-1), nejdůležitější z této skupiny peptidů, je nejúčinnějším savčím přirozeným vazokonstriktozem. Působí prostřednictvím vazby na dva typy receptorů, ET_A a ET_B. ET_A váže převážně ET-1, ET_B má stejnou afinitu ke všem ET. ET_B je exprimován zejména endoteliálními buňkami, ET_A byl prokázán ve velkém množství v aortě, srdci a v ledvinách. Aktivace ET_A receptorů hladkosvalových buněk cév a vede

k zvýšení intracelulární koncentrace kalcia a prolongované vazokonstrikci a proliferaci těchto buněk, aktivace ET_B receptorů endoteliálních buněk vede k uvolnění NO a prostaglandinů a tím k vazodilataci. Aktivace ET_B exprimovaných na hladkosvalových buňkách cév může navodit také vazokonstrikci. Výsledný efekt působení endotelinu je tedy tkáňově specifický, daný rozdílnou expresí a denzitou receptorů a tkáňovou koncentrací endotelinů. ET_B má kromě převažující vazodilatační funkce ještě funkci clearance receptoru pro cirkulující ET-1. Po vazbě ET-1 na ET_B receptor dojde k internalizaci komplexu a následné intracelulární degradaci, zejména v plicní cirkulaci. Redukce nebo blokáda ET_B může redukovat clearance ET-1, čímž dojde ke zvýšení jeho koncentrace v plazmě.

ET-1 je produkován převážně endotelem, nicméně nezanedbatelné množství peptidu je syntetizováno i v ledvinách, srdci, mozku a buňkách hladké svaloviny cév.

1.2.2 Endoteliny a ledviny

V ledvinách je ET-1 produkován glomerulárními epiteliálními a mesangiálními buňkami, tubulárním epitelem a epitelem sběracích kanálků. Dřeň ledviny je důležitým místem produkce ET-1, obsahuje nejvyšší koncentrace imunoreaktivního ET-1 ze všech orgánů. ET-1 ovlivňuje jednak hemodynamiku ledviny, dále výměnu elektrolytů a vody tubulárními buňkami, proliferaci a mitotickou aktivitu zejména buněk hladké svaloviny cév a mesangiálních buněk. ET_A je v ledvinách přítomen na buňkách hladké svaloviny cév, ET_B receptory jsou dvakrát častější, vyskytují se zejména na buňkách sběracích kanálků.

ET-1 je mnohonásobně (30-50x) účinnějším vazokonstriktorem renálních cév, než jsou noradrenalin a angiotensin II, působí na interlobulárních arteriích, aa. arcuatae a na aferentních a eferentních arteriolách. Krátkodobá infuze ET-1 do renální arterie vede v pokusu ke snížení průtoku krve ledvinou, ke snížení glomerulární filtrace a diurézy. Systémová infuze vysokých dávek ET-1 má antidiuretický a antinatriuretický efekt, způsobený poklesem průtoku krve ledvinou a poklesem glomerulární filtrace. Nízké dávky ET-1 mají naopak diuretický a natriuretický efekt. Předpokládá se, že za tento efekt nízkých dávek ET-1 na exkreční funkce ledviny je zodpovědný tubulárním epitelem lokálně produkován ET-1, který působí autokrinně/parakrinně, a který zejména inhibuje Na^+/K^+ -ATPázovou aktivitu a blokuje vliv vazopresinu na reabsorpci vody ve sběracích kanálcích. Efekt je zprostředkován přes ET_B receptory, jejich selektivní blokáda v experimentu vede k jeho odstranění. Nezávisle na přímém působení na cévy, kde reguluje vaskulární tonus a krevní tlak, může tedy endotelinový systém ovlivňovat krevní tlak nepřímo, modulací renální hemodynamiky a exkrečních funkcí ledviny. Stejně jako na periferní cévy, působí ET-1 vazokonstrikčně prostřednictvím ET_A receptorů i na cévy v ledvinách, čímž snižuje průtok krve ledvinami. Efekt ET_B na regulaci cévního tonu je dán působením lokálně produkováného ET-1 na vylučování sodíku a vody cestou stimulace receptorů (natriuretické a diuretické působení ET-1 snižuje krevní tlak). Toto působení nicméně nebylo dodnes demonstrováno u člověka.

1.2.3 Endoteliny a progresse renálních onemocnění

Význam role endothelinového systému v patofyziologii chronického onemocnění ledvin byl demonstrován v řadě studií. S poklesem renálních funkcí stoupá hladina ET-1 v plazmě, dochází k up-regulaci renálního ET-1, a navíc jsou ledvinné cévy více senzitivní vůči vazokonstrikčnímu efektu ET-1, jak lze usuzovat ze zvířecího modelu; také exkrece ET-1 močí je u pacientů s chronickým onemocněním ledvin několikanásobně vyšší v porovnání se zdravými kontrolami. Zvýšená produkce ET-1 v ledvinách je u chronického onemocnění ledvin stimulována cytokiny, chemokiny, vazoaktivními faktory, řadou růstových faktorů, hormony, reaktivními kyslíkovými radikály a dalšími látkami. U chronických nefropatií s proteinurií je produkce ET-1 v ledvinách výrazně zvýšená zejména v glomerulech, a koreluje s tíží proteinurie; sekrece ET-1 endotelem se naopak významně nemění. Hlavním zdrojem ET-1 za těchto patologických stavů jsou mesangiální buňky. Produkovaný ET-1 autokrinně/parakrinně prostřednictvím ET_A receptoru stimuluje proliferaci mesangiálních buněk a produkci extracelulární (mesangiální) matrix těmito buňkami. Tento mechanismus je považován za významný v rozvoji glomerulárního poškození u diabetu, hypertenze i chronických glomerulonefritid. Nеспецифická blokáda ET_{A/B} bosentanem zabrání deposici mesangiální matrix a ztlustění glomerulární bazální membrány u diabetických potkanů. Při chronické selektivní ET_A blokádě dochází k redukci makroalbuminurie u diabetických pacientů. Tento antiproteinurický efekt byl v dané studii pravděpodobně nezávislý na účinku blokátoru na krevní tlak.

Rozvoj proteinurie u chronických glomerulopatií je spojen se splýváním výběžků podocytů. Expozice vysokým hladinám proteinu v primární moči vede ke strukturálním změnám podocytů se zvýšením produkce ET-1, který zřejmě autokrinně/parakrinně nadále potencuje strukturální podocytární změny (alterace cytoskeletu), což vede k poškození glomerulární filtrační bariéry. ET-1 se podílí na poškození filtrační membrány přímo odstraněním nefrinu, proteinu exprimovaného mezi výběžky podocytů a zodpovědného za udržování její integrity a glomerulární filtrační bariéry. Intraglomerulárně produkovaný ET-1 přispívá k zvýšené filtraci proteinů do primární moče ještě dalším mechanismem – způsobuje vazokonstrikci eferentních arteriol, čímž zvyšuje intraglomerulární hydrostatický tlak a tím i glomerulární permeabilitu.

Reabsorpce filtrovaných proteinů epitelem proximálních kanálků stimuluje sekreci ET-1. ET-1 je secernován abluminálně, vede k proliferaci intersticiálních fibroblastů a stimuluje produkci extracelulární matrix, čímž přímo přispívá k rozvoji fibrotizace intersticia. Navíc má ET-1 chemotaktické účinky na monocyty.

2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

V první skupině prací jsme zkoumali účast vybraných chemokinových receptorů v průběhu chronického renálního onemocnění.

Snažili jsme se zjistit, zda chemokinové receptory CCR1 a CCR5 hrají roli při infiltraci makrofágů a T lymfocytů do intersticia ledviny a při následném rozvoji intersticiální fibrózy v experimentálním modelu jednostranné obstrukce ureteru u myši, reprezentujícím protrahované poškození tubulointersticiálního kompartmentu, ke kterému dochází v průběhu chronického renálního onemocnění.

V další práci byl studován efekt terapeutické blokády chemokinového receptoru CCR1 na průběh progresivního renálního poškození na modelu lupus-like nefritidy, autoimunitního onemocnění, které vede k imunokomplexové vaskulitidě a glomerulonefritidě s následným tubulointersticiálním poškozením a rozvojem chronického renálního selhání, u myšího kmene MRL^{lpr/lpr}.

Na myším modelu adriamycinem indukované fokální segmentální glomerulosklerózy s nefrotickým syndromem a fibrózou renálního parenchymu jsme v další práci sledovali efekt farmakologické blokády na průběh progresivního renálního poškození spojeného s těžkou proteinurií.

Druhá skupina prací byla zaměřena na roli ET-1 při rozvoji hypertenze a orgánového poškození u homozygotních a heterozygotních TGR(mRen-2)27 transgenických potkanů, modelu monogeneticky definované hypertenze.

Nejprve jsme se snažili charakterizovat rozdíl vlivu selektivní ET_A a neselektivní a ET_{A/B} blokády u mladých heterozygotních jedinců ihned po odstavení, s cílem zjistit, zda časně zahájená antihypertenzivní terapie dokáže zabránit rozvoji hypertenze či alespoň zmírnit její průběh a tím i orgánové poškození. Pokusy byly prováděny v normoslaném i vysokoslaném dietním režimu.

V dalších projektech byla řešena otázka, zda blokáda ET systému (selektivní či neselektivní) může mít protektivní účinky na orgánové poškození a vliv na krevní tlak a přežití, pokud je zahájena u dospělých jedinců s již stabilizovanou hypertenzí, a to jednak na homozygotních potkanech, kde průběh onemocnění odpovídá těžké maligní hypertenzi, tak na potkanech heterozygotních, kde postupný rozvoj hypertenze s pozvolnějším rozvojem orgánových změn dovoluje dlouhodobější studie morfologie renálního poškození lépe modelující postupný rozvoj sekundární FSGS jako u lidí.

3 MATERIÁL A METODIKA

Zvířata

V experimentu s jednostrannou obstrukcí ureteru (UUO) jsme použili myši kmene C57BL/6 (Charles River, Sulzfeld, SRN) a CCR1 a CCR5 deficientní myši generované na genetickém pozadí C57BL/6. V celkové anestezii jsme z dolní střední laparotomie provedli podvaz levostranného močovodu 2/0 Mersilenem. Tkáň ledvin pro další analýzy jsme odebírali 10. den po UUO.

V pokusech k objasnění role endotelinových receptorů jsme použili transgenní potkany TGR(mRen2)²⁷ a jako normotenzní kontrolu potkany kmene Hannover Sprague-Dawley (HanSD).

Morfometrická analýza

Tkáňové řezy z UUO ledviny a druhostranné ledviny jsme fixovali v 10 % formalínu v PBS a zalili do parafínu. 4 μ m silné řezy jsme barvili v PAS a stříbřili komerčním kitem dle návodu (Bio-Optica, Milán, Itálie). Ze stříbřených řezů jsme zhotovili 12 fotografických snímků nepřekrývajících se polí ledvinné kůry při 400násobném zvětšení, na tyto snímky byla promítnuta síť 100 (10x10) bodů. Index objemu intersticia (I_{Vol}) byl dán počtem bodů, které překrývaly intersticiální prostor. Obdobně byly získány hodnoty indexu intersticiálních depozit kolagenu (I_{Col}), indexu tubulárního poškození (I_{TCD}), indexu dilatace tubulů (I_{Tdil}). Počet intersticiálních buněk jsme stanovili analýzou 15 polí hpf (400x) imunohistochemicky barvených řezů.

Poškození glomerulů jsme hodnotili na 100 náhodně zvolených glomerulech semikvantitativním skórovacím systémem: stupeň 0: normální glomeruly, stupeň 1: adheze mezi kapilární kličkou a Bowmanovým pouzdrém nebo segmentální skleróza postihující do 25% plochy glomerulu, stupeň 2: skleróza postihující 25-50% glomerulu, stupeň 3: sklerotizace postihující 50-75% plochy glomerulu, stupeň 4: skleróza 75-100% glomerulární plochy. Index glomerulosklerózy jsme počítali pomocí vzorce: $GSI = (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4) / n_1 + n_2 + n_3 + n_4$, kde n_x je počet glomerulů v každém stupni skórovacího systému.

Imunohistochemické vyšetření

Pro imunohistochemická barvení jsme 2 μ m silné řezy odparafinovali, rehydratovali, k odhalování antigenu jsme použili autoklávování nebo vaření v mikrovlnné troubě v citrátovém pufru. Řezy jsme blokovali 3% H_2O_2 , avidin a biotin jsme blokovali komerčním kitem Vector Blocking Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Použili jsme následující primární protilátky: potkaní anti-F4/80 (1:50, Serotec, Oxford, UK), potkaní anti-CD3 (1:50, Serotec), potkaní anti-CD45 (1:200, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), potkaní anti-ER-HR3 (1:100, BMA Biomedicals, Augst, Švýcarsko), králičí anti-TGF- β 1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), králičí anti-FSP1 (1:500, dar dr. E. G. Neilsona, Vanderbilt University, Nashville, TE), myší anti- α SMA (1:100, DAKO, Carpinteria, CA), potkaní anti-kolagen I (1:50, dar dr. L. W. Fischera, National Institutes of Health, Bethesda, MD), potkaní anti-CCL5 (1:50, Peprotech, Rocky Hill, NJ), králičí anti-CCL2 (1:20), králičí anti-Ki-67 (1:25, Dianova, Hamburg, SRN), anti-ssDNA (1:50, Chemicon, Hofheim, SRN). K vizualizaci jsme použili příslušné komerční kity SuperSensitive

Link a SuperSensitive HRP Label (BioGenex, San Ramon, CA, USA). Jako chromogen jsme použili 3-amino-9-ethylkarbazol (BioGenex), řezy jsme dobarvili Mayerovým hematoxylinem.

Elektronová mikroskopie

Tkáň ledviny dvou potkanů z každé skupiny jsme zalili do Eponu 812. Ultratenké řezy jsme barvili octanem uranylu a citrátem olova. Řezy jsme hodnotili v transmisním elektronovém mikroskopu Philips EM286/Morgagni (FEI). Tloušťku GBM jsme měřili v 5 glomerulech u každého potkana na 50 místech a vypočítali průměrnou hodnotu.

In situ hybridizace

In situ hybridizace mRNA pro TGF- β 1 byla prováděna, jak je popsáno ve Vielhauer et al. 2001.

Izolace renálních buněk pro vyšetření průtokovou cytometrií

Tkáň ledviny jsme rozřezali na malé kousky, které jsme inkubovali 20 min. při 37°C v 5 ml Hankova roztoku (HBSS), do kterého byl přidán 1 mg/ml kolagenázy I a 0,1 mg/ml deoxyribonukleázy III (Sigma, Deisenhofen, SRN). Dále jsme tkáň inkubovali 20 min. v 5 ml 2mM EDTA a HBSS, získaný supernatant obsahující izolované buňky jsme posléze skladovali na ledu. Pelet jsme znovu inkubovali 20 min. při 37°C v 5 ml HBSS s 1mg/ml kolagenózy I. Získaný další supernatant jsme smíchali s předchozím a po promytí resuspendovali v HBSS.

Průtoková cytometrie

Suspenzi buněk izolovaných z ledviny jsme inkubovali 1 hod s 5 μ /ml potkaní monoklonální protilátky MC-21 (proti CCR2) nebo MC-68 (proti CCR5). Jako izotypovou kontrolu jsme použili potkaní IgG2b (Pharmingen). Po promytí jsme suspenzi inkubovali 1 hod s polyklonální protilátkou proti potkaní IgG značenou biotinem, po promytí jsme suspenzi inkubovali se streptavidinem konjugovaným s fykoeritinem (obě DAKO, Hamburg, SRN). K identifikaci leukocytů jsme následně suspenzi inkubovali s těmito protilátkami: anti-CD11b-fluorescein isothiokyanát, anti-CD4-alofykocyanin, CD8-CyChrom (vše Pharmingen). Buňky byly analyzovány na průtokovém cytometru FACSCalibur (Becton-Dickinson).

In vivo assay leukocytární infiltrace do ledvinné tkáně

F4/80 pozitivní makrofágy a CD8+ T lymfocyty jsme izolovali ze sleziny C57BL/6, CCR1 a CCR5 deficientních myší pomocí imunomagnetické separace buněk (MACS – magnetic-activated cell sorting). Použili jsme následující protilátky CD8a Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, SRN), potkaní anti-F4/80 konjugovaná s FITC (Serotec), Anti-FITC Microbeads (Miltenyi). Čistotu separace jsme ověřili pomocí průtokové cytometrie. Buňky jsme obarvili fluorescenčním barvivem PKH26 (Sigma-Aldrich Chemicals, Steinheim, SRN). Myším divokého kmene C57BL/6 byla 10. den po UOU injikována i.v. suspenze 7,5x10⁵ F4/80+ nebo CD8+ buněk v izotonickém roztoku. Tkáň ledvin jsme odebrali 3 hodiny poté,

zamrazili a krájeli na kryostatu. Počet infiltrujících buněk jsme analyzovali ve fluorescenčním mikroskopu.

Izolace buněk ledviny pro real-time RT-PCR

Buňky jsme izolovali z ledviny 10. den po operaci UUO. Tubulární segmenty byly vypreparovány mikrodisekcí. Pro izolaci fibroblastů jsme kousky tkáně ledviny inkubovali 21 dní v buněčné kultuře v DMEM obohaceném 10% fetálním telecím sérem (obě Invitrogen Corporation, Karlsruhe, SRN). Adherující buňky jsme uvolnili 1,5 mM EDTA, suspenzi jsme zbavili příměsí leukocytů pomocí MACS za použití anti-CD45 protilátky konjugované s FITC a anti-FITC MicroBeads (Miltenyi). Makrofágy a T lymfocyty byly získány způsobem popsaným výše.

Izolace RNA, reverzní transkripce

Tkáň ledviny byla zamrazena v tekutém dusíku a skladována při -80°C . Celkovou RNA jsme izolovali fenol-chloroformovou extrakcí. Výsledný produkt jsme vysušili, rozpustili v ddH₂O a skladovali při -80°C .

Reverzní transkripce byla prováděna 1 hod při 42°C za použití náhodných hexanukleotidových primerů (Boehringer Mannheim, Mannheim, SRN) a reverzní transkriptázy SuperScriptRT™ (Life Technologies, Eggenstein, SRN).

Kvantitativní RT-PCR v reálném čase

Kvantitativní RT-PCR v reálném čase byla prováděna na přístroji TaqMan ABI 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, SRN) za použití TaqDNA polymerázy (Amplitaq Gold, PE Biosystems). Jako referenční gen byl použit GAPDH, jako kontrola ddH₂O. Primery a vnitřní fluorescenčně značené sondy pro myši CCR1, CCR5, TGF- β 1 a GAPDH mRNA jsme získali od PE Biosystems.

Měření krevního tlaku a stanovení proteinurie

Systolický krevní tlak zvířat jsme měřili v týdenních intervalech pletysmograficky (Hatteras Instruments, Cary, North Carolina, USA). Koncentrace proteinu v moči za 24 hodin jsme stanovovali biuretovou metodou (Lachema, ČR).

Stanovení tkáňové koncentrace endotelinu 1

Tkáňové koncentrace ET-1 v kůře ledviny a v levé komoře srdeční jsme stanovili metodou ELISA (Amersham, Brawnschweig, SRN).

Statistická analýza

Výsledky studií jsou ve formátu aritmetický průměr \pm SD, případně aritmetický průměr \pm SEM. Porovnání skupin UUO myši bylo provedeno pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu, v případě vícenásobného porovnání byla použita Bonferroniho post hoc korekce. Porovnání skupin hypertenzních potkanů bylo vypočteno převážně pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu pomocí softwaru Graph-Pad Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

4 VÝSLEDKY

4.1 Účast chemokinového receptoru CCR1 a CCR5 na leukocytární infiltraci a následné fibróze intersticia ledviny u myšího modelu jednostranné obstrukce ureteru

Tato práce byla zaměřena na zjištění role chemokinových receptorů CCR1 a CCR5 exprimovaných makrofágy a T lymfocyty v infiltraci intersticiálního kompartmentu ledviny a v rozvoji jeho fibrózy. V práci jsme použili model jednostranné obstrukce ureteru, kde postupně se rozvíjející hydronefróza vede k poškození tubulů a k fibrotizaci intersticia ledviny, s rozvojem zánětlivé infiltrace intersticia leukocyty. V tubulointersticiu se tedy odehrávají procesy simulující vývoj progredujícího chronického onemocnění ledvin. Ke studiu efektu receptorů jsme použili CCR1 a CCR5 knock-out myší kmeny a dále blokádu CCR1 nízkomolekulárním antagonistou BX471.

Práce ukázala, že chybění nebo blokáda receptoru CCR1 vede ke snížení počtu makrofágů a T lymfocytů infiltrujících do intersticia UUO ledviny u knock-out nebo BX471 léčených myší v porovnání s divokým kmenem myší C57BL/6. Naproti tomu chybění CCR5 nevedlo ke snížení počtu infiltrujících leukocytů.

Použití fluorescenčně značených leukocytů, izolovaných ze sleziny divokého kmene a CCR1 a CCR5 deficientních kmenů myší, injikovaných do myší divokého kmene s jednostrannou hydronefrózou, a následné hodnocení intenzity infiltrace leukocytů do intersticia UUO ledviny těchto zvířat jasně potvrdilo účast CCR1 (ale ne CCR5) na cílené infiltraci makrofágů a T lymfocytů do intersticia poškozené ledviny.

Sledované parametry fibrózy renálního intersticia – počet fibroblastů, objem intersticia, depozice kolagenu a hladina mRNA pro TGF- β 1 – byly u CCR1 deficientních myší v poškozené ledvině sníženy. Chybění CCR5 nevedlo k zabránění rozvoje fibrózy UUO ledviny.

4.2 Pozdní začátek léčby blokátorem CCR1 receptoru vede k zabránění progresi lupusové nefritidy u MRL (Fas)-lpr myší

V této práci byl zkoumán vliv blokády chemokinového receptoru CCR1 nízkomolekulárním antagonistou BX471 na progresi imunokomplexové glomerulonefritidy do chronického renálního selhání.

Porovnání výsledků histologického vyšetření tkáně ledvin kontrolních a léčených myší ukázalo, že blokáda CCR1 snížila výrazně množství makrofágů a T lymfocytů infiltrujících do tubulointersticiálního kompartmentu MRL^{lpr/lpr} myší léčených BX471, ale neměla vliv na infiltraci makrofágů do glomerulu ani na rozvoj glomerulonefritidy a tíži proteinurie.

Účast CCR1 na infiltraci leukocytů do intersticia ledviny potvrdil i experiment s použitím fluorescenčně značených makrofágů a T lymfocytů inkubovaných s BX471 a nosičem cyklodextrinem nebo samotným nosičem, injikovaných do MRL^{lpr/lpr} myší, kdy leukocyty inkubované s blokátorem CCR1 infiltrovaly intersticiu v daleko nižším počtu než leukocyty inkubované s cyklodextrinem.

Blokáda CCR1 vedla k redukci intersticiální fibrózy – jak ukázalo vyhodnocení počtu α -SMA pozitivních myofibroblastů v intersticiu, depozice kolagenu I a vyhodnocení hladin mRNA pro kolagen I a TGF- β 1 v ledvinné tkáni.

4.3 Blokáda CCR1 redukuje intersticiální zánět a fibrózu u myšího modelu adriamycinem indukované nefropatie

Práce zkoumala možnost ovlivnění progresu renálního onemocnění spojeného s těžkou proteinurií blokádou chemokinového receptoru CCR1. Jako modelové onemocnění byla použita adriamycinem indukovaná fokálně segmentální glomeruloskleróza u myšího kmene BALB/c, kde poškození glomerulů spojené s proteinurií a rozvojem nefrotického syndromu s následným poškozením a fibrotizací tubulointersticia modelují průběh chronických glomerulopatií provázených těžkou proteinurií u člověka.

V práci jsme nejprve ukázali, že exprese mRNA pro chemokinový receptor CCR1 a chemokiny CCL3 a CCL5 - ligandy CCR1 - je v ledvinách u toho modelu několikanásobně zvýšená ve srovnání s kontrolní skupinou zvířat. V pokusech in vitro jsme prokázali, že mRNA pro CCR1 je exprimována makrofágy a T lymfocyty izolovanými ze sleziny, ale není exprimována v buněčné kultuře TGF- β 1 stimulovanými renálními fibroblasty ani LPS stimulovanou buněčnou linií epiteliálních buněk kortikálních tubulů ledviny.

Výsledky morfometrické analýzy a imunohistochemického vyšetření tkáně ledvin kontrolní skupiny myší a zvířat léčených nízkomolekulárním antagonistou receptoru CCR1 (BX471) ukázaly, že blokáda receptoru CCR1 výrazně snížila počet makrofágů (o 50%) a T lymfocytů (o 20%) infiltrujících do intersticia ledviny.

Léčba BX471 neměla žádný efekt na tíži glomerulárního poškození indukovaného adriamycinem ani na hodnoty proteinurie.

Léčba BX471 snížila rozsah intersticiální fibrózy ledvin (hodnoceno objemem intersticia a počtem intersticiálních fibroblastů).

4.4 Pozdní začátek blokády endotelinového receptoru u homozygotních Ren-2 potkanů snižuje podocytární poškození podocytů i přes těžkou hypertenzi

V této práci jsme použili transgenní potkany s inkorporovaným myším genem pro renin TGR(mRen2)²⁷. Jde o model monogeneticky definované hypertenze. Transgenní homozygotní potkani na vysokoslané dietě byli léčení neselektivním blokátorem ET_{A/B} bosentanem a selektivním blokátorem ET_A atrasentanem. Léčba byla zahájena 51. den života, aby bylo možné sledovat účinky blokády endotelinových receptorů na dospělé jedince s již rozvinutou maligní hypertenzí.

U kontrolního kmene potkanů zůstávaly hodnoty krevního tlaku během celého experimentu na vysokoslané dietě v rámci normotenze. U ostatních tří skupin transgenních potkanů krevní tlak stoupl až do 46. dne. Po zahájení podávání vysokoslané diety a současném zahájení léčby (51. den) došlo u potkanů léčených atrasentanem k redukci hypertenze (měřeno 60. den). 81. den byly

hodnoty tlaku všech tří skupin transgenních potkanů zvýšené, bez statisticky signifikantních rozdílů.

Míra přežívání na konci pokusu (90. den) byla u neléčeného divokého kmene HanSD 93% a nelišila se od přežívání atrasentanem léčených transgenních potkanů. U neléčených transgenních potkanů a u transgenních potkanů léčených bosentanem bylo přežívání signifikantně nižší (50 a 64%). Hodnoty proteinurie se u dosud neléčených transgenních potkanů 50. den života signifikantně nelišily. 80. den života měli neléčení TGR potkani na vysokoslané dietě výrazně vyšší proteinurii než HanSD potkani. Potkani léčení oběma typy endotelinových antagonistů měli hodnoty proteinurie obdobné jako kontrolní potkani.

Glomerulosklerotický index se na konci léčby u přežívajících potkanů všech čtyř skupin signifikantně nelišil. V ultrastrukturálním vyšetření u transgenních potkanů na vysokoslané dietě byly patrné změny GBM. Fokálně bylo patrné splývání pedicel a regresivní změny podocytů. Léčba bosentanem výrazně zlepšuje morfolonii podocytů a podávání atrasentanu ji zcela normalizuje. Tloušťka GBM u neléčených a bosentanem léčených potkanů byla výrazně větší než u kontrolních HanSD potkanů a potkanů léčených atrasentanem. Míra poškození podocytů silně korelovala s mírou přežívání.

Ze získaných výsledků je zřejmé, že blokáda ET receptorů snižuje orgánové poškození u homozygotních transgenních TGR (mRen2)²⁷ potkanů na vysokoslané dietě. Selektivní blokáda ET_A navíc výrazně zlepšuje přežití a vede k přechodnému snížení krevního tlaku.

4.5 Časný začátek blokády endotelinového receptoru u hypertenzních heterozygotních Ren-2 potkanů

Práce zkoumala roli ET-1 v rozvoji hypertenze u heterozygotních TGR(mRen2)²⁷ potkanů v preventivním protokolu, s důrazem na zjištění možného rozdílu mezi neselektivní ET_{A/B} a selektivní ET_A blokádou endotelinových receptorů. Experimenty byly prováděny u mladých potkanů na normoslané a vysokoslané dietě.

U potkanů na normoslané dietě přežili do závěru experimentu všichni potkani. U neléčených transgenních potkanů došlo k rozvoji hypertenze, vzniku hypertrofie srdeční komory a v ledvinách k rozvoji glomerulosklerózy s proteinurií. U transgenních potkanů léčených atrasentanem, selektivním blokátorem ET_A receptoru, došlo v porovnání s kontrolní skupinou neléčených transgenních potkanů k výraznému zpomalení vzestupu systolického i středního krevního tlaku, s méně výraznou hypertrofií srdeční komory, s normálními hodnotami glomerulosklerotického indexu, s nízkými hodnotami proteinurie a s nižšími tkáňovými koncentracemi ET-1. U potkanů léčených neselektivním blokátorem ET_{A/B} bosentanem nedošlo naproti tomu k redukci hypertenze, ostatní měřené hodnoty byly taktéž sníženy, avšak signifikantně méně.

Na vysokoslané dietě bylo přežití na konci experimentu u neléčených potkanů 70%, u léčených neselektivním blokátorem bosentanem 83%. Transgenní potkani na vysokoslané dietě léčení atrasentanem přežili všichni. Systolický a střední krevní tlak rostl u potkanů na vysokoslané dietě významně u všech skupin,

včetně kontrolní skupiny netransgenních zvířat, nicméně u této skupiny stále zůstával na hodnotách považovaných za normální. Na konci experimentu byly systolický a střední krevní tlak u neléčených zvířat a u zvířat léčených bosentanem signifikantně vyšší v porovnání s hodnotami tlaku zvířat léčených atrasentanem. U neléčených zvířat a zvířat léčených bosentanem došlo také k výraznému zvýšení glomerulosklerotického indexu, poškození glomerulů u zvířat léčených bosentanem bylo mírnější. Léčba atrasentanem vedla k zabránění rozvoje glomerulosklerózy. Proteinurie byla výrazně zvýšená u neléčených zvířat, při léčbě bosentanem byla jen nevýznamně nižší, naopak atrasentan způsobil podstatné snížení proteinurie až k normálním hodnotám. U všech skupin zvířat došlo k srdeční hypertrofii a ke zvýšení tkáňových koncentrací endotelinu ET-1.

4.6 Pozdní začátek blokády endotelinového receptoru u hypertenzních heterozygotních Ren-2 transgenních potkanů

Cílem této práce bylo zjistit úlohu endotelinového systému u samčích heterozygotních transgenních TGR(mRen2)27 potkanů s již rozvinutou hypertenzí. Transgenní a kontrolní HanSD potkani byli od 52. dne života krmeni vysokoslanou dietou. Od stejného dne jim byly podávány buď neselektivní ET_{A/B} (bosentan) nebo selektivní ET_A (atrasentan) blokátory.

Neléčení transgenní potkani vykazovali na konci experimentu (90. den) míru přežívání 71%, při podávání bosentanu byla míra přežívání na konci experimentu 83%, atrasentan výrazně zlepšoval přežívání na 92%. Na konci experimentu se systolický krevní tlak potkanů léčených bosentanem nelišil od tlaku neléčených potkanů, systolický krevní tlak potkanů léčených atrasentanem byl výrazně nižší. U neléčených transgenních potkanů se vyvinula hypertrofie levé srdeční komory, podávání bosentanu a zejména atrasentanu vedlo k její redukci. Proteinurie byla 50. den experimentu u všech transgenních potkanů signifikantně vyšší v porovnání s HanSD potkany. Osmdesátý den byla proteinurie u neléčených potkanů a u potkanů léčených bosentanem signifikantně vyšší než v kontrolní skupině potkanů. Léčba atrasentanem výrazně redukovala proteinurii.

Hypertenzní poškození glomerulů při morfologickém vyšetření ledvin zahrnovalo mírné rozšíření mezangia a segmentální sklerózu kapilárního trsu. V elektronovém mikroskopu byla patrna částečná fúze pedicel. Nejvýraznější změny byly patrné u neléčených TGR potkanů, méně výrazné u potkanů léčených bosentanem, a potkani léčení atrasentanem nevykazovali žádné změny glomerulů na úrovni světelné mikroskopie ani na úrovni ultrastrukturální. Imunohistochemicky byla v četných glomerulech u neléčených potkanů patrna pozitivita desminu, markeru podocytárního poškození. U potkanů léčených bosentanem i atrasentanem byla indukce positivity desminu v podocytech výrazně nižší. Podocytární exprese CD10 (neprilysin) byla u neléčených potkanů výrazně redukována, léčba bosentanem vedla jen k částečnému zvýšení exprese, léčba atrasentanem prakticky úplně restituovala expresi CD10 u podocytů.

5 DISKUSE

Ukázali jsme, že CCR1 (ale ne CCR5) hraje významnou roli v procesu infiltrace leukocytů do tubulointersticiálního kompartmentu v myším modelu UUO. Získaná data jsou v souladu s předchozími pozorováními, kde blokáda CCR1 měla příznivý vliv na snížení zánětlivého infiltrátu v experimentálních modelech např. transplantace ledviny, srdce, plicní fibrózy či experimentální encefalitidy. Data potvrzují výsledky předchozí práce, která ukázala, že antagonist CCR1, BX471, snižuje u modelu UUO počet leukocytů infiltrujících do intersticia ledviny.

Oba receptory, CCR1 i CCR5, jsou exprimovány na povrchu leukocytů infiltrujících intersticiem ledviny. Přesto chybění CCR5 nevede v modelu UUO ke snížení počtu infiltrujících leukocytů. U jiných modelových onemocnění, jako například u dextransulfátem indukované kolitidy, nebo u transplantace srdce, chybění CCR5 snižuje počet infiltrujících leukocytů. Naopak infiltrace makrofágů v modelu experimentální encefalomyelitidy nezávisí na CCR5. Naše pozorování, že chybění CCR5 nezabrání migraci leukocytů do ledviny po UUO, nelze vysvětlit tím, že chybí ligand, tedy příslušný atrahující chemokin, protože v předchozích pracích bylo prokázáno, že CCL5 je v poškozené ledvině u tohoto modelu výrazně exprimován. Interakce CCL5/CCR5 v ledvině v tomto modelu však může mít jinou roli. Z výsledků lze odvodit, že role CCR5 receptoru při zprostředkování leukocytární infiltrace je u různých modelových onemocnění odlišná, což může být dáno i různou kombinací exprimovaných receptorů.

Podstatným přínosem této práce je zjištění, že chybění receptoru CCR1 vede k redukci intersticiální fibrózy ledviny po UUO. Obdobný efekt blokády CCR1 ve zpomalení rozvoje intersticiální fibrózy ledviny jsme pozorovali i v modelu lupusové nefritidy a FSGS. Vzhledem k tomu, že renální fibroblasty ani tubulární epitel neexprimují CCR1, nejde zřejmě o přímý efekt blokády CCR1 receptoru na tyto buňky, ale o důsledek sníženého počtu infiltrujících leukocytů. Infiltrující leukocyty přispívají produkcí prozánětlivých a profibrotických cytokinů k proliferaci fibroblastů, produkci kolagenu a procesu epiteliální - mezenchymální přeměny. CCR1 knock-out myši měly sníženou hladinu mRNA pro TGF- β 1 v UUO ledvině. Pomocí in situ hybridizace a imunohistochemicky jsme lokalizovali produkci TGF- β 1 do intersticia ledviny v místě zánětlivého infiltrátu. Snížená sekrece TGF- β 1 v UUO ledvině je dána spíše snížením počtu infiltrujících leukocytů než díky jeho snížené produkci leukocyty neexprimujícími CCR1. Vliv blokády CCR1 na snížení počtu infiltrujících leukocytů do UUO ledviny a tím i zabránění procesu epiteliální - mezenchymální přeměny a redukci intersticiální fibrózy ledviny potvrdila i novější studie na novorozených myších.

V modelu lupusové nefritidy blokáda CCR1 nezabránila infiltraci makrofágů do glomerulu. To je v souladu s předchozími pozorováními na modelech glomerulárního poškození. Chemokinový receptor CCR1 se zřejmě podílí na infiltraci tubulointersticiálního a ne glomerulárního kompartmentu ledviny, což může být dáno odlišnými adhezními molekulami přítomnými v cévách, které různě modulují chemokiny zprostředkovanou adhezi a transmigraci do tkáně.

Léčba BX471 neměla žádný efekt na tíži glomerulárního poškození v modelu adriamycinem indukované nefropatie. U tohoto modelu se předpokládá, že iniciální poškození glomerulů je způsobeno přímým cytotoxickým efektem adriamycinu na

podocyty a progresivní glomeruloskleróza je výsledkem pokračujících změn vyvolaných primárním inzuletem. Tyto změny jsou nezávislé na CCR1.

Významný pozitivní efekt blokady receptoru CCR1 na zpomalení rozvoje intersticiální fibrózy ledviny v modelu adriamycinem indukované nefropatie je velmi zajímavý vzhledem k tomu, že léčbou nedošlo u myší k redukci těžké proteinurie. Těžká proteinurie je významným stimulem pro tubulární epitelové buňky, které na jejím podkladě produkují množství chemokinů a profibrotických cytokinů. Naše nálezy ve skupině myší léčených blokátorem BX471 nicméně ukazují, že těžká proteinurie sama o sobě nedokáže vyvolat výraznou intersticiální fibrózu, pokud je zabráněno infiltraci leukocytů do intersticia ledviny.

Výsledky studie blokady endotelinových receptorů u heterozygotních TGR potkanů v preventivním protokolu ukázaly, že vysokoslaná dieta výrazně akceleruje rozvoj hypertenze a zvyšuje mortalitu a orgánové poškození u tohoto kmene. Práce potvrdila předchozí výsledky, kde nefroprotektivní efekt neselektivní blokady bosentanem byl nezávislý na změnách krevního tlaku. Ukázali jsme, že působení ET-1 na rozvoj hypertenze a orgánové poškození je zprostředkováno ET_A receptorem, zejména u sůl-senzitivních modelů hypertenze. Selektivní blokáda ET_A má výrazný vliv na snížení krevního tlaku a orgánového poškození a na míru přežití. Bosentan nemá vliv na snižování krevního tlaku, neselektivní blokáda ET zřejmě potlačí nejen vazokonstrikční a proliferační účinky zprostředkované ET_A , ale zároveň i vazodilatační a natriuretický efekt zprostředkovaný ET_B .

Výsledky studie blokady endotelinových receptorů u heterozygotních TGR potkanů v regresním protokolu ukázaly, že selektivní blokáda ET_A má výraznější efekt na snížení krevního tlaku a orgánového poškození než neselektivní $ET_{A/B}$ blokáda. Ve srovnání se studii provedenými na homozygotních TGR potkaních se ukazuje, že blokáda ET receptorů má u heterozygotních TGR potkanů podobný efekt, když je zahájena u potkanů s již rozvinutou hypertenzí (regresní protokol), jako u mladých jedinců (preventivní protokol). Na rozdíl od studií provedených na homozygotních transgenních potkaních, u heterozygotních potkanů je neselektivní blokáda $ET_{A/B}$ bosentanem daleko méně účinná ve snižování mortality než selektivní ET_A . Rozdíl je pravděpodobně dán vyšší aktivací ET systému u homozygotních potkanů.

6 ZÁVĚRY

Předložená práce přispěla ke zjištění role některých chemokinových receptorů u vybraných modelů zánětlivých onemocnění ledvin. Práce zejména ukázala pozitivní efekt blokady chemokinového receptoru CCR1 exprimovaného lymfocyty a makrofágy infiltrujícími tubulointersticiální kompartment ledviny na redukci rozvoje intersticiální fibrózy. Tento poznatek by mohl mít i praktické uplatnění v léčbě pacientů s chronickým onemocněním ledvin.

Dalším přínosem práce je zpřesnění úlohy endotelinu 1 a jeho receptorů ET_A a ET_B v rozvoji hypertenze a orgánového poškození. Ukazuje se, že na snížení krevního tlaku, zmenšení rozsahu orgánového poškození a následné mortality má výrazný vliv zejména selektivní blokáda ET_A . Klíčovou roli v poškození ledvin u studovaných modelů hypertenze hraje poškození podocytů, blokáda ET_A vede k výraznému potlačení rozvoje tohoto poškození.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- Abassi, Z. A., Ellahham, S., Winaver, J., et al.:** The intrarenal endothelin system and hypertension. *News Physiol Sci*, 16, 2001; 152-156
- Anders, H. J., Vielhauer, V., Kretzler, M., et al.:** Chemokine and chemokine receptor expression during initiation and resolution of immune complex glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 12, 2001; 5: 919-931
- Anders, H. J., Vielhauer, V., Frink, M., et al.:** A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J Clin Invest*, 109, 2002; 2: 251-259
- Anders, H. J., Vielhauer, V., Schlondorff, D.:** Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int*, 63, 2003; 2: 401-415
- Colobran, R., Pujol-Borrell, R., Armengol, M. P., et al.:** The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity. *Clin Exp Immunol*, 148, 2007; 2: 208-217
- Furuichi, K., Wada, T., Sakai, N., et al.:** Distinct expression of CCR1 and CCR5 in glomerular and interstitial lesions of human glomerular diseases. *Am J Nephrol*, 20, 2000; 4: 291-299
- Haynes, W. G., Webb, D. J.:** Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens*, 16, 1998; 8: 1081-1098
- Kohan, D. E.:** Endothelins in the normal and diseased kidney. *Am J Kidney Dis*, 29, 1997; 1: 2-26
- Kohan, D. E.:** Endothelin, hypertension and chronic kidney disease: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 19, 2010; 2: 134-139
- Lange-Sperandio, B., Trautmann, A., Eickelberg, O., et al.:** Leukocytes induce epithelial to mesenchymal transition after unilateral ureteral obstruction in neonatal mice. *Am J Pathol*, 171, 2007; 3: 861-71.
- Levin, E. R.:** Endothelins. *N Engl J Med*, 333, 1995; 6: 356-363
- Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., et al.:** International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 52, 2000; 1: 145-176
- Neuhofer, W., Pittrow, D.:** Endothelin receptor selectivity in chronic kidney disease: rationale and review of recent evidence. *Eur J Clin Invest*, 39 Suppl 2, 2009; 50-67
- Perez de Lema, G., Maier, H., Nieto, E., et al.:** Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol*, 12, 2001; 7: 1369-1382
- Rossi, D., Zlotnik, A.:** The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*, 18, 2000; 217-242
- Segerer, S., Mack, M., Regele, H., et al.:** Expression of the C-C chemokine receptor 5 in human kidney diseases. *Kidney Int*, 56, 1999; 1: 52-64
- Segerer, S., Cui, Y., Hudkins, K. L., et al.:** Expression of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor chemokine receptor 2 in human crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 11, 2000; 12: 2231-2242
- Segerer, S., Nelson, P. J., Schlondorff, D.:** Chemokines, chemokine receptors,

and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol*, 11, 2000; 1: 152-176

Vielhauer, V., Anders, H. J., Mack, M., et al.: Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. *J Am Soc Nephrol*, 12, 2001; 6: 1173-1187

8 SEZNAM PUBLIKACÍ

1. Publikace s IF, které jsou podkladem disertace:

- **Eis, V.,** Luckow, B., Vielhauer, V., Sireke, J., Linde, Y., Segerer, S., Perez de Lema, G., Cohen, C. D., Kretzler, M., Mack, M., Horuk, R., Murphy, P. M., Gao, J.-L., Hudkins, K. L., Alpers, C. E., Gröne, H.-J., Schlöndorff, D., Anders, H.-J.: Chemokine receptor CCR1 but not CCR5 mediates leukocyte recruitment and subsequent renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol*, 15, 2004; 2: 337-347. **IF 6,644**
- Anders, H.-J., Belemezova, E., **Eis, V.,** Segerer, S., Vielhauer, V., Perez de Lema, G., Kretzler, M., Cohen, C. D., Frink, M., Horuk, R., Hudkins, K. L., Alpers, C. E., Mampaso, F., Schlöndorff, D.: Late onset of treatment with a chemokine receptor CCR1 antagonist prevents progression of lupus nephritis in MRL-Fas(lpr) mice. *J Am Soc Nephrol*, 15, 2004; 6: 1504-1513. **IF 6,644**
- Vielhauer, V., Berning, E., **Eis, V.,** Kretzler, M., Segerer, S., Strutz, F., Horuk, R., Gröne, H.-J., Schlöndorff, D., Anders, H.-J.: CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 66, 2004; 6: 2264-2278. **IF 4,790**
- Opočenský, M., Kramer, H. J., Bäcker, A., Vernerová, Z., **Eis, V.,** Červenka, L., Čertíková Chábová, V., Tesař, V., Vaněčková, I.: Late-onset endothelin-A receptor blockade reduces podocyte injury in homozygous Ren-2 rats despite severe hypertension. *Hypertension*, 48, 2006; 5: 965-971. **IF 6,007**
- Vaněčková, I., Kramer, H. J., Bäcker, A., Schejbalová, S., Vernerová, Z., **Eis, V.,** Opočenský, M., Dvořák, P., Červenka, L.: Early-onset endothelin receptor blockade in hypertensive heterozygous Ren-2 rats. *Vascul Pharmacol*, 45, 2006; 3:163-170. **IF 1,718**
- Vernerová, Z., Kramer, H. J., Bäcker, A., Červenka, L., Opočenský, M., Husková, Z., Vaňourková, Z., **Eis, V.,** Čertíková Chábová, V., Tesař, V., Malý, J., Vaněčková, I.: Late-onset endothelin receptor blockade in hypertensive heterozygous Ren-2 transgenic rats. *Vascul Pharmacol*, 48, 2008; 4-6:165-173. **IF 1,718**

2. Publikované přehledné práce s IF související s tématem disertace

- **Eis, V.,** Vielhauer, V., Anders, H.-J.: Targeting the chemokine network in renal inflammation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 52, 2004; 3: 164-172. **IF 0,663**

- Vielhauer, V., **Eis, V.**, Schlöndorff, D., Anders, H.-J.: Identifying chemokines as therapeutic targets in renal disease: lessons from antagonist studies and knockout mice. *Kidney Blood Press Res*, 27, 2004; 4: 226-238. **IF 1,067**

3. Publikace bez vztahu k tématu dizertace

a) s IF

- Anders, H.-J., Vielhauer, V., **Eis, V.**, Linde, Y., Kretzler, M., Perez de Lema, G., Strutz, F., Bauer, S., Rutz, M., Wagner, H., Gröne, H.-J., Schlöndorff, D.: Activation of toll-like receptor-9 induces progression of renal disease in MRL-Fas(lpr) mice. *FASEB J*, 18, 2004; 3: 534-556. **IF 6,820**
- Čertíková Chábová, V., Kramer, H. J., Vaněčková, I., Vernerová, Z., **Eis, V.**, Tesař, V., Škaroupková, P., Thumová, M., Schejbalová, S., Husková, Z., Vaňourková, Z., Kolský, A., Imigg, J. D., Červenka, L.: Effects of chronic cytochrome P-450 inhibition on the course of hypertension and end-organ damage in Ren-2 transgenic rats. *Vascul Pharmacol*, 47, 2007; 2-3: 145-159. **IF 1,718**
- Heráček, J., Urban, M., Sachová, J., Kuncová, J., **Eis, V.**, Mandys, V., Hampl, R., Stárka, L.: The endocrine profiles in men with localized and locally advanced prostate cancer treated with radical prostatectomy. *Neuro Endocrinol Lett*, 28, 2007; 1: 45-51. **IF 0,924**
- Heráček, J., Hampl, R., Hill, M., Stárka, L., Sachová, J., Kuncová, J., **Eis, V.**, Urban, M., Mandys, V.: Tissue and serum levels of principal androgens in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Steroids*, 72, 2007; 4: 375-380. **IF 2,849**
- Hrbáček, J., Urban, M., Hamšíková, E., Tachezy, R., **Eis, V.**, Brabec, M., Heráček, J.: Serum antibodies against genitourinary infectious agents in prostate cancer and benign prostate hyperplasia patients: a case-control study. *BMC Cancer*, 11, 2011; 1: 53. **IF 2,74**

b) bez IF

- Hrbáček, J., Heráček, J., **Eis, V.**, Hamšíková, E., Tachezy, R., Urban, M.: Incidence, diagnostika a léčba karcinomu prostaty u HIV pozitivních pacientů. *Čes Urol*, 14, 2010; 1: 16-23
- Heráček, J., Sobotka, V., Kindlová, E., **Eis, V.**: Mužská plodnost a onkologická léčba. *Čas lék čes*, 149, 2010; 1: 16-20.
- Hrbáček, J., Konopásek, P., **Eis, V.**, Hamšíková, E., Tachezy, R., Pokorný, J., El-Balouly, K., Urban, M., Heráček, J.: Urologické komplikace HIV/AIDS. *Čas lék čes*, 149, 2010; 3: 115-119.