

## Remisi lupusové nefritidy lze v experimentu navodit pomocí malé interferující RNA

Shimizu H, Hori Y, Kaname S, et al. siRNA-based therapy ameliorates glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:622–633.

**M**alé (nebo krátké) interferující RNA (small interfering, siRNA) patří mezi malé RNA (Liang et al., 2009), které fyziologicky přispívají k intracelulární degradaci exogenní (např. virové) dvojvláknové RNA, mohou ale být připraveny siRNA obsahující komplementární sekvence k specifickým mRNA vznikajícím transkripcí kterýchkoli genů kódujících proteiny (Chu et al., 2007). Vazba siRNA k této specifické mRNA vede k její degradaci, a tím selektivně inhibuje transkripci příslušného genu.

Pomocí dvojvláknové krátké interferující RNA (siRNA) lze specificky inaktivovat vybrané geny. Klinické použití siRNA je ale limitováno její omezenou stabilitou (v důsledku enzymatické degradace) a omezeným přestupem přes buněčnou membránu. Hlavním problémem specifické terapie pomocí siRNA je tedy dodání siRNA do cílových buněk. V komentované studii autoři použili pro transport siRNA nanopřenašeč tvořený komplexem polyethylenglykolu (PEG) a polylysinu (PLL). Pomocí tohoto transportního systému bylo možno u myši s lupusovou nefritidou dosáhnout snížení glomerulární exprese mitogenem aktivované proteinkinázy 1 (MAPK1) jak na úrovni RNA, tak i překládaného proteinu se současným zmírněním zánětlivých změn v glomerulech.

Nanočástice o průměru 10 nm vzniklé elektrostatickou vazbou vybrané (negativně nabitě) siRNA na (kladně nabitý) kopolymer PEG-PLL byly nejprve testovány na kultuře mesangiálních buněk s průkazem snížené exprese cílového genu (pro MAPK1). Po intraperitoneálním podání nanočástic byla prokázána u myši lokalizace fluorescenčně značených částic v plicích, játrech a ledvinách (glomerulech), zatímco podání volné siRNA vedlo převážně k její degradaci a exkreci do moči. Zatímco intraperitoneálně podaná volná siRNA byla z krve eliminována během 10 minut, nanočástice vážící siRNA byly v krvi prokazatelné ještě dvě hodiny po jejich podání.

Malá interferující siRNA zaměřená proti MAPK1, vázaná v popsané nanočástici, byla intraperitoneálně podána myším MRL/lpr,

kteří spontánně vyvíjejí lupusovou nefritidu, a vysoce významně a specificky suprimovala glomerulární expresi mRNA pro MAPK1 i expresi MAPK1 proteinu. Jiné glomerulární geny (např. gen pro synaptopodin) suprimovány nebyly. Opakované podání siRNA zaměřené proti MAPK1 (mezi 12. a 16. týdnem věku myši) významně snížilo glomerulární expresi TGFβ a inhibitoru aktivátoru plasminogenu-1 (PAI-1), sérovou koncentraci urey a proteinurii a stupeň i rozsah glomerulosklerózy, ale neovlivnilo rozsah tubulointersticiální fibrózy.

### ■ KOMENTÁŘ

Prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc.

V komentované studii autoři prokázali možnost dodat pomocí vazby na nanočástice cíleně do glomerulů krátkou interferující RNA, která v glomerulárních buňkách zablokovala transkripci genu pro MAPK, a tím omezila u myši s lupusovou nefritidou rozsah glomerulosklerózy a tubulointersticiální fibrózy. Vazba na nanočástice zabránila časné degradaci siRNA a její eliminaci do moči a prodloužila jejich biologický poločas. Dodání nanočástic ke glomerulárním buňkám je usnadněno vysokým průtokem krve ledvinou a snazším průnikem skrze endotel díky tomu, že glomerulární endotelie jsou fenestrovány. Fenestrace glomerulárních endotelových buněk mají průměr okolo 100 nm, zatímco průměr nanočástic s navázanou siRNA je jen asi 10–20 nm. Nanočástice tedy snadno pronikají endotelem a vzhledem k tomu, že neprocházejí glomerulární bazální membránou (efektivní šíře póru je 4 nm), dostávají se snadno do kontaktu s mesangiálními buňkami, které jsou od nitra glomerulární kapiláry odděleny jen fenestrovanými endoteliemi. Je pravděpodobné, že u pacientů, kteří nemají hrubší poškození glomerulární bazální membrány, nanočástice nepřicházejí do kontaktu s podocyty, u pacientů s nefrotickou proteinurií naopak může snadný průnik nanočástic do močového prostoru omezit jejich působení na mesangiální buňky. Nanočástice této velikosti vážící siRNA by tak mohly být neúčinnější v léčbě „mesangiopatií“, IgA nefropatie či (spíše méně pokročilých forem) lupusové nefritidy.

Myši MRL/lpr mají mutaci genu *fas* a vyvíjejí autoimunitní syndrom, který připomíná lupusovou nefritidu, v časně fázi (doba podání siRNA) mesangioproliferativní, v pokročilejších fázích difuzní proliferativní glomerulonefritidu se srpkou s progresí do terminálního selhání ledvin a smrti. Aktivace mitogeny aktivované proteinkinázy 1 (MAPK1) hraje roli v patogenezi experimentální mesangioproliferativní glomerulonefritidy (Bokemeyer et al., 2000) a lupusové nefritidy u myši MRL/lpr (Iwata et al., 2003). MAPK1 působí jako efektor profibrogenního cytokinu TGFβ, ale produkci TGFβ také stimuluje. Inhibice genu pro MAPK1 prostřednictvím siRNA proto významně inhibuje proliferaci mesangiálních buněk i tvorbu extracelulární matrix.

Je zřejmé, že převedení těchto slibných experimentálních výsledků do léčby lupusové nefritidy či jiných glomerulopatií bude muset překonat ještě mnoho komplikací (výběr optimálního cílového genu, cílené dodání do buněk se zvýšenou expresí daného genu, zabránění nežádoucím účinkům způsobeným inhibicí stejného genu v jiných buňkách či jiných orgánech), ale v principu je jistě možné. Cílená inhibice transkripce vybraných genů by tak mohla v budoucnu doplnit (nebo nahradit) dnešní biologickou terapii fungující na principu interakce monoklonální protilátky nebo solubilního receptoru s proteiny exprimovanými na povrchu buněk.

**Literatura**

- Bokemeyer D, Ostendorf T, Kunter U, et al. Differential activation of mitogen-activated protein kinase in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:232–240.
- Chu C-Y, Rana TM. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol* 2007;213:412–419.
- Iwata Y, Wada T, Furuichi K, et al. Mitogen-activated protein kinase contributes to autoimmune renal injury in MRL-Fas lpr mice. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:57–67.
- Kreidberg JA. siRNA therapy for glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:549–551.
- Liang M, Liu Y, Mladinov D, et al. MicroRNA: a new frontier in kidney and blood pressure research. *Am J Physiol* 2009;297:F553–F558.