

## Perspektivy: Mohou nové informace o struktuře a funkci glomerulární kapilární stěny změnit náš pohled na patogenezi a léčbu chronické glomerulonefritidy?

Prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc.

### Tradiční představa o patogenezi primárních glomerulopatií s nefrotickým syndromem

Primární chronické glomerulonefritidy (nefrotický syndrom s minimálními změnami glomerulů, primární fokální segmentální glomeruloskleróza, idiopatická membranózní nefropatie) s nefrotickou proteinurií jsou histologicky charakterizovány především změnami podocytů (v případě membranózní nefropatie i glomerulární bazální membrány), a řadíme je tedy mezi tzv. podocytopatie. Riziko progresu těchto onemocnění je do značné míry dáno mírou poškození podocytů, zejména jejich úbytkem (Kriz, 1998). Z hlediska etiopatogeneze jsou tyto podocytopatie stále pokládány za onemocnění s imunitní patogenézí.

U idiopatické membranózní nefropatie je úloha imunitní reakce, sublytické aktivace terminálních složek komplementu, velmi dobře dokumentována. U experimentální membranózní nefropatie u potkanů (Heymannovy nefritidy) je vyvolávajícím faktorem poškození podocytů přítomnost protilátek proti podocytárnímu proteinu megalinu (Farquhar et al., 1995). Lidské podocyty megalin neexprimují a potenciální antigen, proti kterému by mohly být patogenní antipodocytární protilátky zaměřeny, dosud nebyl identifikován. Dokladem, že i u lidské idiopatické membranózní nefropatie mohou být příčinou poškození podocytů antipodocytární protilátky, je nedávno publikovaný případ vrozené membranózní nefropatie s protilátkami proti podocytárnímu antigenu neutrální endopeptidáze u dítěte matky s mutací genu pro tento protein (Debiec et al., 2002). Je pravděpodobné, že hledané protilátky proti podocytům budou alespoň u některých pacientů dříve nebo později objeveny. Pochopení patogeneze nefrotické proteinurie u membranózní nefropatie ale vyžaduje porozumět detailněji reakci podocytů na jejich poškození komplementem.

Podstatně méně dokladů existuje pro event. imunopatogenezi nefrotického syndromu s minimálními změnami a primární fokálně segmentální glomerulosklerózy. V experimentu lze u potkanů navodit reverzibilní nefrotický syndrom s histologickým nálezem odpovídajícím minimálním změnám glomerulů u lidí jednorázovým podáním adriamycinu a perzistující nefrotický syndrom s histologickým nálezem fokálně segmentální glomerulosklerózy jeho opakovaným podáním. Jde tedy o přímé toxické poškození podocytů, které nemá imunitní patogenezi. I u lidí byly popsány toxické formy minimálních změn glomerulů nebo fokálně segmentální glomerulosklerózy navozené virovým (HIV, parvovirus B19) nebo toxickým (heroin, pamidronát) agens. V posledních letech bylo popsáno stále rostoucí množství familiálních forem nefrotického syndromu podmíněné mutacemi genů pro různé podocytární proteiny.

Před více než třiceti lety formuloval Shalhoub teorii, že glomerulární změny vyvolávající proteinurii jsou u nefrotického syndromu s minimálními změnami vyvolávány permeabilitním faktorem produkovaným T lymfocyty (Shalhoub, 1974). Možnost navodit remisi nefrotického syndromu kortikosteroidy nebo cyklosporinem je hlavní podporou této imunitní teorie nefrotického syndromu s minimálními změnami. Hledání permeabilitního faktoru je však dosud přes použití metod funkční genomiky a proteomiky neúspěšné. Testování aktivity permeabilitního faktoru pomocí bioeseje přineslo rovněž řadu rozporných nálezů. Permeabilitní faktor

byl např. prokázán i u dětí s familiálním nefrotickým syndromem podmíněným mutací podocinu (Carraro et al., 2002). U pacientů s minimálními změnami glomerulů, kteří byli léčeni cyklosporinem, došlo k vývoji remise nefrotického syndromu, ale aktivita permeabilitního faktoru se nezměnila (Cattran et al., 2003). Etiologický faktor primárních podocytopatií tak zůstává stále neznámý.

### Nové poznatky o patobiochemii podocytů

V posledních osmi letech došlo k obrovskému pokroku v poznání struktury a funkce podocytů. Objev nefrinu jako příčiny kongenitálního nefrotického syndromu finského typu byl postupně následován objevem dalších složek komplexu proteinů membrány mezi výběžky podocytů (slit diaphragm), která je zřejmě terminální bariérou bránící vstupu bílkovin do primitivní moči, a také informacemi o kontaktech mezi podocyty a glomerulární bazální membránou (Pavenstadt et al., 2003).

Membrána mezi výběžky podocytů (slit diaphragm) je modifikovaná zonula adherens (Reiser et al., 2000), jejímž úkolem je nejen spojovat sousední výběžky podocytů a bránit průniku bílkovinných makromolekul do moči, ale také monitorovat přítomnost makromolekul v prostoru mezi bazální membránou a podocyty. Zdá se, že interakce molekul nefrinu a jemu příbuzných proteinů (Neph 1, 2 a 3) s albuminem, který pronikl bazální membránou, má za následek signalizaci do nitra podocytu (pomocí fosforylace intracelulární části nefrinu proteinkinázou fyn a reakce fosforylovaného nefrinu s adaptorovou molekulou Nck1 – Verma et al., 2006) s následnou změnou uspořádání aktinového cytoskeletu podocytů (fúze pedicel podocytů), jejímž smyslem je pravděpodobně bránit průniku albuminu do primitivní moči (Benzing, 2004). Velkým problémem stále zůstává, jak vysvětlit, proč se při zvýšeném průchodu albuminu (a dalších proteinů) glomerulární bazální membránou glomerulární filtr neucpává. Jednou z možností, jak je albumin z prostoru mezi glomerulární bazální membránou a podocyty odstraňován, může být endocytóza albuminu (a event. i dalších proteinů) podocyty s jejich intracelulární degradací. Tyto mechanismy začaly být intenzivněji studovány teprve nedávno.

Vazba podocytu ke glomerulární bazální membráně je zajišťována zejména kontaktem mezi podocytárními adhezními molekulami a proteiny glomerulární bazální membrány. Integrin  $\alpha 3 \beta 1$  v membráně podocytu reaguje s lamininem v bazální membráně a  $\alpha$ -dystroglykan v membráně podocytu reaguje s glykoproteiny glomerulární bazální membrány agrinem a perlecanem. Narušení kontaktu mezi podocytem a glomerulární bazální membránou (např. depozicí komplementu u membranózní nefropatie) nevede jen ke změnám struktury glomerulární kapilární stěny, ale také k signalizaci dovnitř podocytu (cestou ILK – integrin-linked kinase – Teixeira et al., 2005) s reorganizací aktinového cytoskeletu, podobně jako při signalizaci cestou nefrinového komplexu membrány mezi výběžky podocytů.

Od 60. let se předpokládalo, že hlavní bariéru průniku proteinů do moči představuje glomerulární bazální membrána. V posledních letech byla hlavní pozornost obrácena směrem k podocytům a převládá názor, že glomerulární kapilární stěna představuje třívrstevný

filtr se stále se zmenšující velikostí pórů a že hlavní bariéru průniku makromolekul do moči představuje membrána mezi výběžky podocytů. Tyto názory byly v poslední době zpochybněny zjištěním, že mutace genu pro jeden z hlavních proteinů glomerulární bazální membrány laminin vede k nefrotické proteinurii, která zpočátku není provázena zjevnými morfologickými změnami podocytů (fúzí pedicel podocytů) ani změnou exprese podocytárních proteinů.

Zdá se ale, že naše dosavadní představy o funkci glomerulární kapilární stěny byly příliš mechanické. Jednotlivé vrstvy glomerulární kapilární stěny spolu totiž těsně interagují. Podocyty jsou hlavním zdrojem vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF) v glomerulech. Zvýšená exprese VEGF vede v experimentu u zvířat k vývoji kolabující formy fokálně segmentální glomerulosklerózy. Snížená produkce VEGF vede naopak k poruše vývoje a obnovy glomerulárních endotelových buněk. Snížená dostupnost VEGF je v současné době pokládána za hlavní příčinu glomerulárních změn postihujících zejména endotelie u preeklampsie (glomerulární endotelioza) a podobné změny lze navodit v experimentu podáváním protilátek proti VEGF (Lindheimer et al., 2005). Proteinurie vzniká i u pacientů léčených např. pro karcinom ledviny protilátkou proti VEGF bevacizumabem. V tomto modelu také proteinurie předchází morfologickým změnám podocytů (fúzí jejich pedicel), což je uváděno jako příklad toho, že nejen primární poškození glomerulární bazální membrány, ale i primární poškození glomerulárních endotelií může vést k nefrotické proteinurii s intaktními podocyty (Kalluri, 2006). Situace však zdaleka není jasná. Absence morfologických změn podocytů nevylučuje změny jejich funkce. Nedávno byla popsána u pacientek s preeklampií snížená exprese podocytárních genů nefrinu a synaptopodinu (Garovic et al., 2007). Podobně jsou změny glomerulární bazální membrány (např. absence izoformy lamininu normálně přítomné ve zralých glomerulech) provázeny změnami exprese podocytárních proteinů cestou ILK (integrin-linked kinase) (Teixeira et al., 2005) a poškození podocytů vede k poruchám syntézy glomerulární bazální membrány.

### Vliv terapeutických intervencí na podocyty

Antiproteinurický účinek inhibitorů ACE a blokátorů receptorů AT<sub>1</sub> pro angiotensin II (sartanů) je tradičně přičítán snížení intra-glomerulárního tlaku v důsledku dilatace eferentní arterioly. Napětí glomerulární stěny má ale přímý vliv na podocyty a angiotensin II ovlivňuje funkci podocytů prostřednictvím svých receptorů na podocytech. Není tedy vyloučeno, že značná část antiproteinurického účinku inhibitorů ACE a sartanů nesouvisí přímo s jejich hemodynamickým účinkem, ale je zprostředkována přímou inhibicí působení angiotensinu II na podocyty (Benigni et al., 2001; Liang et al., 2006). Přímý vliv na podocyty mají i statiny (Tonolo et al., 2006), které mj. ovlivňují i endocytózu albuminu podocyty u proteinurických stavů.

Není pochyb o tom, že kortikosteroidy či cyklosporinem lze navodit remisi nefrotického syndromu při minimálních změnách glomerulů. Je však tento účinek skutečně zprostředkován vlivem na T lymfocyty a snížením tvorby předpokládaného permeabilního faktoru? Kortikosteroidy mohou proteinurii ovlivnit svým přímým působením na podocyty – ovlivněním exprese nefrinu a podocinu a snížením tzv. endoplazmatického stresu v podocytech (Ransom et al., 2005). Na podocyty a expresi jejich genů přímo působí např. i cyklosporin, kalcitriol (Kuhlmann et al., 2004), all-trans-retinová kyselina (Moreno-Manzano et al., 2004; Suzuki et al., 2003) a agonisté PPAR- $\gamma$ , např. pioglitazon (Benigni et al., 2006). Renoprotektivní účinek agonistů PPAR- $\gamma$  (troglitazonu a pioglitazonu) byl testován se zatím nejednoznačným výsledkem

i v klinických studiích u diabetiků 2. typu (Nakamura et al., 2001; Agarwal et al., 2005).

Je tedy zřejmé, že narůstající informace o patobiochemii podocytů mohou vést ke změně našeho pohledu na etiopatogenezi nefrotického syndromu minimálně u nefrotického syndromu s minimálními změnami a fokálně segmentální glomerulosklerózy.

Studium mechanismů aktivace podocytů cestou jak nefrinového receptorového komplexu, tak integrinového komplexu může navíc vést k identifikaci nových molekul, které by mohly příznivě ovlivnit nejen proteinurii, ale i progresi chronické renální insuficience u primárních glomerulopatií. Doufám, že nejbližší desetiletí přinese objasnění etiopatogeneze nejvýznamnějších primárních glomerulopatií a objev zcela nových způsobů, jak nefrotický syndrom vyvolaný poškozením podocytů léčit.

### Literatura

- Agarwal R, Saha C, Battiwai M, et al. A pilot randomized controlled trial of renal protection with pioglitazone in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2005;68:285–292.
- Benigni A, Tomasoni S, Gagliardini E, et al. Blocking angiotensin II synthesis/activity preserves glomerular nephrin in rats with severe nephrosis. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:941–948.
- Benigni A, Zoja C, Tomasoni S, et al. Transcriptional regulation of nephrin gene by peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist: molecular mechanism of the antiproteinuric effect of pioglitazone. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1624–1632.
- Benzing T. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1382–1391.
- Carraro M, Caridi G, Bruschi M, et al. Serum glomerular permeability activity in patients with podocin mutations (NPHS2) and steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1946–1952.
- Cattran D, Neogi T, Sharma R, et al. Serial estimates of serum permeability and clinical correlates in patients with native kidney focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:448–453.
- Debiec H, Guigonis V, Mougnot B, et al. Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *N Engl J Med* 2002;346:2053–2060.
- Farquhar MG, Saito A, Kerjaschki D, et al. The Heymann nephritis antigenic complex: megalin (gp330) and RAP. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:35–47.
- Garovic VD, Wagner SJ, Petrovic LM, et al. Glomerular expression of nephrin and synaptopodin, but not podocin, is decreased in kidney sections from women with preeclampsia. *Nephrol Dial Transplant* 2007, 25. ledna, on-line.
- Kalluri R. Proteinuria with and without renal glomerular podocyte effacement. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2383–2389.
- Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 1998;54:687–697.
- Kuhlmann A, Haas CS, Gross ML, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F526–F533.
- Liang X-B, Ma L-J, Naito T, et al. Angiotensin type 1 receptor blocker restores podocyte potential to promote glomerular endothelial cell growth. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1886–1895.
- Lindheimer MD. Unraveling the mysteries of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:3–4.
- Moreno-Manzano V, Mampaso F, Sepulveda-Munoz JC, et al. Retinoids as a potential treatment for experimental puromycin-induced nephrosis. *Br J Pharmacol* 2003;139:823–831.
- Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, et al. Effect of troglitazone on urinary albumin excretion and serum type IV collagen concentration in type 2 diabetic patients with microalbuminuria or macroalbuminuria. *Diabet Med* 2001;18:308–313.
- Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003;83:253–307.
- Ransom RF, Vega-Warner V, Smoyer WE, et al. Differential proteomic analysis of proteins induced by glucocorticoids in cultured murine podocytes. *Kidney Int* 2005;67:1275–1285.
- Ransom RF, Lam NG, Hallett MA, et al. Glucocorticoids protect and enhance recovery of cultured murine podocytes via actin filament stabilization. *Kidney Int* 2005;68:2473–2483.
- Reiser J, Kriz W, Kretzler M, et al. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1–8.
- Shaloub RJ. Pathogenesis of lipid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet* 1974;2:556.
- Suzuki A, Ito T, Imai E, et al. Retinoids regulate the repairing process of the podocytes in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic rats. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:981–991.
- Teixeira V de P, Blattner SM, Li M, et al. Functional consequences of integrin-linked kinase activation in podocyte damage. *Kidney Int* 2005;67:514–523.
- Tonolo G, Velussi M, Brocco E, et al. Simvastatin maintains steady patterns of GFR and improves AER and expression of slit diaphragm proteins in type II diabetes. *Kidney Int* 2006;70:177–186.
- Verma R, Kovari I, Soofi A, et al. Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest* 2006;116:1346–1359.