

dehydratace, abúzu diuretik, nefrotoxických léků (především ATB) a typu použité kontrastní látky. V této práci nelze vliv některých z těchto faktorů objektivně posoudit, jelikož nemocní užívající tyto léky nebyli do studie vůbec zařazeni. Výskyt ARS také nebyl posuzován s ohledem na typ podaného preparátu. Vzhledem k malému počtu pacientů s ARS ale lze předpokládat, že by tyto výsledky nebyly signifikantní. Zajímavá data vyplynula i z hodnocení vlivu anémie a hypalbuminémie na rozvoj ARS u nefropatie indukované jak gadolinem, tak jinou kontrastní látkou. Pokud jde o anémii, předpokládá se, že prohlubuje ischemizaci zevní dřeňové vrstvy, a tím usnadňuje vznik nefropatie indukované kontrastní látkou. Vliv hypalbuminémie není tak jednoznačný, ale lze spekulovat o poruše perfuze ledvin při sníženém onkotickém tlaku plazmy. Přítomnost obou těchto faktorů se vyskytuje v přímé závislosti na úrovni renální funkce (Nikolsky et al., 2005).

Někteří autoři ve svých pracích ukazují bezpečnost vyšetření MRA s gadolinem i u nemocných s chronickou renální insuficiencí vyšších stadií, pokud se podá gadolinium v dávce 0,1 mmol/kg hmotnosti. V případě použití dávky 0,2 mmol/kg a více jsou ale výsledky velmi kontroverzní (Haustein et al., 1992; Rieger et al., 2002). Nedostatkem řady prací, které se zabývaly nefrotoxicitou gadolinia, bylo to, že nestratifikovaly nemocné podle jejich renální funkce. Celkové průměry renální funkce v těchto studiích byly na úrovni mírné (max. střední) renální insuficience, tedy stupeň 2 a 3, a tudíž celkové riziko vývoje akutního selhání ledvin pro nemocné bylo malé.

Práce Erleye (2004) porovnávala vyšetření digitální subtrakční angiografie za použití gadolinia a jódového kontrastního media (iohexol, neionické hypo-osmolární radiokontrastní medium). Ukázalo se, že kontrastní látka na bázi gadolinia nemá žádné výhody oproti iohexolu a že její použití není zárukou ochrany renální funkce.

Sam (2003) porovnával aplikaci gadoliniového kontrastu intravenózně a intraarteriálně u nemocných s pokročilou chronickou renální insuficiencí a zjistil, že obě cesty podání byly stejně nefrotoxické (při dávkách 0,3–0,4 mmol/kg hmotnosti). Lze předpokládat, že se zdokonalováním zobrazovací techniky i na poli MRI bude možné snížit celkovou dávku podávaného gadolinia na méně než 0,2 mmol/kg, což se jeví z hlediska rozvoje ARS jako relativně bezpečné i u nemocných s pokročilejšími fázemi chronické renální insuficience.

V současné době přibývá publikací, které ukazují na relativní bezpečnost podávání jódových kontrastních látek i u nemocných s těžkou formou chronické renální insuficience či dialyzovaných, pokud jsou splněny některé podmínky. Mezi ně patří především podávání hypo- či izosmolárních jódových kontrastních látek (iopromid, iodixanol) a adekvátní hydratace. Obecně se doporučuje i podávání N-acetylcysteinu, theofylinu či bikarbonátu před vyšetřením, i když v případě těchto doporučení nejsou data tak silná, jako u prvních dvou opatření.

Závěrem je třeba konstatovat, že MRA s použitím gadolinia u rizikových skupin nemocných s chronickou renální insuficiencí stadia 3 a 4 se v současné době nejvíce jeví jako bezpečnější v porovnání s použitím jódovaných kontrastních látek. K definitivním závěrům je třeba si počkat na kontrolované studie.

## Literatura

- Nikolsky E, Mehran R, Lazic Z, et al. Low hematocrit predicts contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary interventions. *Kidney Int* 2005;67:706–713.
- Haustein J, Niendorf HP, Krestin G, et al. Renal tolerance of gadolinium DTPA/dimeglumine in patients with chronic renal failure. *Incest Radiol* 1992;27:153–156.
- Rieger J, Sitter T, Toepfer M, et al. Gadolinium as an alternative contrast agent for diagnostic and interventional angiographic procedures in patients with impaired renal function. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:824–828.
- Erley CM, Bader BD, Berger ED. Gadolinium-based contrast media compared with iodinated media for digital subtraction angiography in azotaemic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:2526–2531.
- Sam AD, Morasch MD, Collins J, et al. Safety of gadolinium contrast angiography in patients with chronic renal insufficiency. *J Vasc Surg* 2003;38:313–318.

## Dexamethason a porušený transport nefrinu v důsledku stresu v endoplazmatickém retikulu

Fujii Y, Khoshnoodi J, Takenaka H, et al. The effect of dexamethasone on defective nephrin transport caused by ER stress: a potential mechanism for the therapeutic action of glucocorticoids in the acquired glomerular diseases. *Kidney Int* 2006;69:1350–1359.

Japonští autoři se snaží svým článkem alespoň částečně objasnit možnost působení glukokortikoidů na nefrotický syndrom. Řadu let se ví, že cílovou buňkou jejich působení je pravděpodobně podocyt, který exprimuje jednak glukokortikoidní receptor (GR), ale i inaktivační enzymy (11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza typ II). Řada prací na molekulární úrovni prokázala, že různá hereditární onemocnění (včetně renálních) jsou způsobena poruchou transportu syntetizovaných bílkovin z endoplazmatického retikula (ER) na cílové místo určení (do organel, plazmatické membrány, extracelulárního prostoru). Transport z ER je negativně ovlivňován stresem ER. Ten může být vyvolán energetickou deplecí, hypoxií, virovou infekcí či jen špatným prostorovým uspořádáním syntetizovaných proteinů.

Ve shodě s těmito nálezy se ukázalo, že nefrin, hlavní komponenta „slit“ membrány podocytů, zůstává při získaném nefrotickém syndromu (NS) na podkladě minimálních změn glomerulů retinován intracelulárně v podocyty a nedochází k jeho expresi vně buňky a zabudování do membrány. Tím je tato membrána porušena a důsledkem je vznik nefrotického syndromu. Experimentálně byla tato situace navozena přidáním tunicamycinu.

Autoři využili předchozích zkušeností a zformovali hypotézu, že stres endoplazmatického retikula (navozený odebráním glukózy jako energetického substrátu pro tvorbu ATP), zodpovědný za patologickou N-glykosylaci nefrinu, může být pozitivně ovlivněn podáváním dexamethasonu.

Pro vlastní pokus byla vybrána subpopulace buněk HEK-293 (human embryonic kidney), která stabilně exprimovala na povrchu plnohodnotný nefrin (293-NPH). Jako indikátor stresu ER byl vytipován GRP 78 (glucose-regulated protein). Buňky 293-NPH byly vystaveny rozdílné koncentraci glukózy (5,5 a 25 mmol/l) a v různých časových inter-

valech (24, 48 a 72 hodin) byly vyhodnocovány koncentrace GRP78.

V kultuře 293-NPH buněk vystavených působení media s koncentrací glukózy 25 mmol/l byla po 72 hodinách detekována dostatečná koncentrace nefrinu, a to jeho obou izoform (175-kDa – forma zůstávající v ER i 185-kDa – forma nefrinu zabudovaná v plazmatické membráně). Pokud se ale kultura vystavila koncentraci media 5,5 mmol/l glukózy, již po 24 hodinách nebylo možné detekovat aktivitu ani jedné izoformy nefrinu. Současně s tím byl zaznamenán signifikantní vzestup koncentrace GRP78. Po přidání tunicamycinu k oběma kulturám nebylo možné detekovat žádnou aktivitu normálně formovaného (glykosylovaného) nefrinu. Na základě těchto výsledků bylo uzavřeno, že snížená syntéza plně funkčního nefrinu je dána alterací jeho glykosylace v důsledku stresu ER.

K detekci lokalizace patologicky glykosylovaného nefrinu v buňkách bylo použito imunofluorescenční vyšetření za pomoci protilátek proti nefrinu a anti-KDEL (marker značící ER). Buněčné kultury kultivované v koncentraci glukózy 25 mmol/l vykazovaly jasnou lokalizaci nefrinu v plazmatické membráně, zatímco kultury kultivované v koncentraci glukózy 5 mmol/l měly většinu aktivity detekované intracelulárně, shodně s aktivitou ER. Hlavní komponentou, na kterou se patologicky glykosylovaný (ale i plně glykosylovaný) nefrin v ER váže, je zřejmě kalretikulín. Tato molekula je z velkou pravděpodobností i místem vazby nefrinu ve „slit“ membráně.

Pro objasnění předchozích nálezů byl zkoumán vliv podání dexamethasonu (DEX) v různých koncentracích na stres endoplazmatického retikula a glykosylaci nefrinu. Ke kultuře 293-NPH buněk vystavených působení media s koncentrací glukózy 5,5 mmol/l byl přidáván dexamethason v koncentracích 0,01, 0,1 a 1,0  $\mu\text{mol/l}$ . Koncentrace 1,0 a 0,1  $\mu\text{mol/l}$  (nikoli však 0,01  $\mu\text{mol/l}$ ) byly schopné významně zvýšit syntézu 185-kDa izoformy nefrinu, tedy plně glykosylované formy zabudované v plazmatické membráně, v porovnání s kontrolami bez dexamethasonu. Současně došlo u léčené skupiny k významnému snížení koncentrace GRP78. Účinek dexamethasonu se v kulturách dostavil v intervalu 48–72 hodin. Autoři také zkoumali přesné místo vazby/zásahu dexamethasonu v těchto buňkách za použití antagonisty GR RU486. Ukázalo se, že kultura „předléčená“ RU486 před aplikací dexamethasonu nebyla podáním kortikoidu vůbec ovlivněna, a koncentrace 185-kDa izoformy nefrinu se tedy nezvýšila. Toto zjištění vedlo autory k závěru, že dexamethason působí na podocyty (resp. 293-NPH buňky) prostřednictvím glukokortikoidních receptorů.

Pozitivní ovlivnění stresu endoplazmatického retikula prostřednictvím dexamethasonu je kromě snížení koncentrace GRP78 zřejmě dáno i úpravou energetických poměrů v buňkách, a sice zvýšením intracelulární koncentrace ATP, jež je zřejmě podmíněná up-regulací některých mitochondriálních genů. Pro plnou glykosylaci nefrinu je totiž potřebná dostatečná koncentrace nejen glukózy, ale i ATP jako energetického substrátu.

Na závěr si autoři ještě položili otázku, zda lze účinek dexamethasonu očekávat i u stresu endoplazmatického retikula vyvolaného jinou noxou než nízkou koncentrací glukózy. Jako odlišný podnět pro stres ER aplikovali A23187 (látku snižující intracelulární koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ ). Poté došlo k výraznému zvýšení koncentrace GRP78 (dokonce i za situace koncentrace glukózy v médiu 25 mmol/l), tedy byl prokazatelně zvýšen stres ER. Podání dexamethasonu ale nevedlo ke zvýšení 185-kDa izoformy, pouze ke zvýšení syntézy 175-kDa izoformy nefrinu. Nefrin tedy zůstával lokalizován v ER a netransportoval se do plazmatické membrány. Zdá se tedy, že dexamethason ovlivňuje pouze ten stres ER, který závisí na intracelulární koncentraci glukózy a ATP.

## KOMENTÁŘ

Doc. MUDr. Romana Ryšavá, CSc.

*Úloha nefrinu v patogenezi nefrotického syndromu je v současné době vcelku nezpochybnitelná. Porucha jeho syntézy či lokalizace do „slit“ membrány vede k poškození funkčnosti této struktury, která funguje jako filtrační bariéra pro přestup proteinů do močového prostoru nefronu. Existuje celá řada mechanismů a faktorů, které k tomu mohou přispívat. Doublier ve své práci (2001) studoval distribuci nefrinu v renálních biopsiích 17 nemocných s NS či mikroalbuminurií na podkladě diabetické nefropatie (DM 1. i 2. typu) a srovnával ji s nálezem u 10 zdravých dobrovolníků. Expres nefrinu u diabetických nemocných byla významně snížena (hodnoceno semikvantitativně prostřednictvím imunofluorescenčního barvení) v porovnání se zdravými kontrolami (67 % u DM 1. a 65 % u DM 2. typu oproti 100 % u zdravých jedinců,  $p = 0,001$ ). Takto významná redukce byla patrná nejen u nemocných s NS, ale i u těch s mikroalbuminurií. Navíc se změnil charakter IF barvení z lineárního (u normální distribuce) na granulární (u diabetických nemocných), což nepřímě ukazuje na poruchu kontinuity lokalizace nefrinu na povrchu podocytů. Příčinou této redukce je zřejmě zvýšení koncentrace glykosylovaného albuminu a angiotensinu II u těchto nemocných. Autoři spekulují o možnosti obsazení receptoru RAGE (který se při glykosylaci nefrinu uplatňuje) pokročilými produkty glykace proteinů či redistribucí cytoskeletu podocytů angiotensinem II s potlačením exprese nefrinu. Tato pozorování byla potvrzena i v jiné práci téhož autora (Doublier II), kde stejný negativní vliv jako hyperglykémie na expresi nefrinu na povrchu podocyty měly i jiné působky, např. imunokomplexy s obsahem  $\text{IgG}_4$ , komplex komplementu  $\text{C}_5\text{--C}_9$ ,  $\text{TNF}\alpha$  či puromycin.*

*Nefrin obsahuje deset míst, která mají N-terminus, a kde mohou inhibitory glykosylace potenciálně působit. Pokud se ke kultuře nefrin-exprimujících buněk přidá tunicamycin, což je přirozeně se vyskytující látka s účinkem antibiotik, dochází k poruše glykosylace nefrinu v oblasti N-terminálních konců, jejímž výsledkem je špatné prostorové složení nefrinu. Získaná změna omezí jeho migrační schopnosti a tato izoforma o molekulové hmotnosti jen 155 kDa zůstává retinována v endoplazmatickém retikulu a není transportována do membrány podocyty. Tato studie ukázala na zásadní význam správné N-glykosylace*



nefrinu pro jeho uložení, a tedy i fungování (Yan et al., 1999). A jakou roli v ovlivnění tohoto patogenetického mechanismu hrají kortikoidy?

Pro to, aby kortikosteroidy (DEX) mohly ovlivňovat porušenou syntézu či redistribuci nefrinu, je nutné, aby byl dostupný substrát (receptor), jehož prostřednictvím se kortikosteroidy v buňkách váží. Předpokládalo se, že se tato vazba uskutečňuje prostřednictvím glukokortikoidního receptoru. Místo jeho lokalizace v ledvinách ale dlouho nebylo přesně známo. Yan (Yan et al., 1999) se ve své další práci tímto problémem zabýval. Prostřednictvím protilátky proti lidskému GR byla detekována místa s expresí glukokortikoidního receptoru jednak v homogenizátech normálních glomerulů, a jednak v kulturách mesangálních buněk. Byl identifikován protein 94 kDa (shodný s molekulovou hmotností GR), který vykazoval silnou aktivitu v jádru buněk, slabší aktivitu pak v cytoplazmě všech glomerulárních buněk, v parietálních i viscerálních epitelálních buňkách, endotelálních buňkách i buňkách mesangia. Navíc, pokud se k izolovaným glomerulárním či mesangialním buňkám přidal dexamethason, byla imuno fluorescenční intenzita GR v místě jádra podstatně větší než nativně. Lze tedy konstatovat, že všechny buňky renálního kortexu exprimují glukokortikoidní receptor, jehož největší koncentrace je v jádru.

#### Literatura

- Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, et al. Nephron redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 2001; 158: 1723–1731.
- Doublier S, Salvidio G, Lupia E, et al. Nephron expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. *Diabetes* 2003;52:1023–1030.
- Yan K, Khoshnoodi J, Ruotsalainen V, Tryggvason K. N-linked glycosylation is critical for plasma membrane localization of nephrin. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1385–1389.
- Yan K, Kudo A, Hirano H, et al. Subcellular localization of glucocorticoid receptor protein in the human kidney glomerulus. *Kidney Int* 1999; 56: 65–73.

## Pokles mortality spojený s pomalejší ultrafiltrací při delší době hemodialyzační léčby

Saran R, Bragg-Gresham JL, Levin NW, Twardowski ZJ, Wizemann V, Saito A, Kimata N, Gillespie BW, Combe C, Bommer J, Akiba T, Mapes DL, Young EW, Port FK. Longer treatment time and slower ultrafiltration in hemodialysis: associations with reduced mortality in the DOPPS. *Kidney Int* 2006;69:1222–1228.

**P**řavidelná hemodialyzační léčba (HD) je zatížena vysokou mortalitou (USRDS, 2003). Ačkoli v řadě studií bylo možno pozorovat souvislost mezi délkou trvání HD léčby a přežíváním nemocných, nebyl tento vztah potvrzen v recentní studii, kterou publikovali Lowrie a spol. (2004). Přitom již počátkem 80. let minulého století naznačovaly výsledky americké studie zvýšené přežívání ve vazbě na delší dobu HD léčby (Parker, 1983). Jiné severoamerické studie (zvl. studie HEMO) publikované v nedávné minulosti se však zaměřovaly spíše na dávku dialyzační léčby hodnocenou dle kinetiky urey (Kt/V) a na průtok membránou (high-flux vs. low-flux dialyzátory) než na délku HD sezení.

Je známo, že nadměrné mezidialyzační přírůstky hmotnosti jsou nezávislým faktorem pro predikci mortality. Představují totiž zvýšenou volumovou zátěž, vedoucí k abnormální přestavbě levé komory a následně k srdečnímu selhání. Navíc bývá u nemocných s nadměrnými mezidialyzačními přírůstky dosahováno vyšší ultrafiltrace (UF), tedy mechanismu, který s sebou nese vzestup epizod intradialyzační hypotenze (IH). Tyto epizody zvyšují ischemizaci různých orgánů, zvláště myokardu. Lze předpokládat, že nižší UF povede ke snížení závažnosti a frekvence intradialyzační hypotenze, a tím i k omezení výskytu devastujících hypotenzních příhod.

**Cílem** studie bylo stanovit vztah mezi dobou léčby (TT – treatment time) a ultrafiltrací a klinickými a laboratorními ukazateli hodnocenými v rámci mezinárodní, prospektivní studie DOPPS (Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study), zaměřené na skupiny hemodialyzovaných pacientů a zařízení poskytující hemodialyzační léčbu.

**Soubor** – Údaje byly čerpány z kombinované databáze DOPPS (fáze I 1997–2002, fáze II 2002–2004), do které bylo zahrnuto 22 000 nemocných léčených hemodialýzou ze sedmi zemí (Francie, SRN, Itálie, Španělsko, Velká Británie, Japonsko a USA). Na studii se celkově podílelo 551 středisek, přičemž průměrný počet nemocných z jednoho střediska byl kolem 30.

**Metody** – **Definice:** TT = předepsaná doba léčby v rámci jednoho HD sezení; rychlost UF = rychlost odstranění objemu tekutin během HD léčby vztahované na TT; dávka dialýzy (Kt/V) = jednokompartmentový model Kt/V za použití Daugirdasova vzorce 2. generace; intradialytická hypotenze = pokles systolického tlaku  $\geq 30$  mm Hg v kombinaci s hodnotou systolického tlaku  $\leq 100$  mm Hg.

**Statistická analýza** – Logistická regresní analýza byla použita pro studium predikce TT  $> 240$  min a UF  $> 10$  ml/h/kg hmotnosti a Coxův proporční model náhodné regrese byl užít pro studium přežívání, stratifikovaného dle tří geografických oblastí (Evropa, Japonsko a USA) a dvou fází DOPPS. Statistické úpravy byly učiněny s ohledem na demografické údaje, komorbiditu, dialyzační dávku (Kt/V) a tělesné rozměry. Byla rovněž testována možná interakce mezi parametry Kt/V TT.

**Výsledky** – Celková průměrná TT (ze všech zemí) byla 220 min. Průměrná TT v Evropě a Japonsku byla významně delší ( $p < 0,0001$ ) než TT v USA (232 a 244 min vs. 211 ve studii DOPPS fáze I; 235 a 240 min vs. 221 ve studii DOPPS fáze II). Při porovnání dvou fází studie DOPPS došlo pouze v USA k vzestupu TT (z 211 na 221 min), zatímco v dalších oblastech se TT významně neměnila. Celková průměrná UF byla 8,9 ml/h/kg hmotnosti. Průměrná UF v Evropě byla významně nižší ( $p < 0,05$ ) než UF v USA (8,3 vs. 9,2 v DOPPS I; 8,4 vs. 9,8 v DOPPS II). Průměrná ultrafiltrace v Japonsku se z hodnoty 8,2 ve studii DOPPS fáze I zvýšila významně na hodnotu 9,9 ve fázi DOPPS II. Doba léčby  $> 240$  min byla nezávislým faktorem spojeným s nižším relativním rizikem mortality (RR = 0,81;  $p < 0,0005$ ). Prodloužení hemodialýzy o 30 min bylo spojeno se 7% snížením