

Первый Московский Государственный
Медицинский Университет имени И.М.Сеченова

БОБКОВА И.Н., КОЗЛОВСКАЯ Л.В.,
ЧЕБОТАРЕВА Н.В.

«МЕСТО ПОДОЦИТАРНОЙ ДИСФУНКЦИИ
В МЕХАНИЗМАХ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ
ХРОНИЧЕСКОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА»

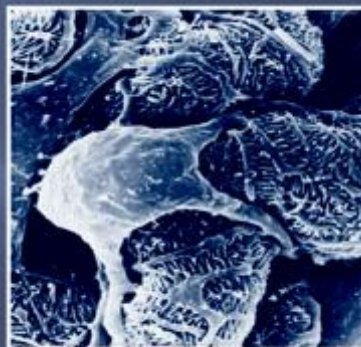
«Дни нефрологии в Санкт-Петербурге»
8-11 июня 2012 г.

Современные достижения в изучении роли подоцита при гломерулопатиях

- Получены новые данные о структуре и функции подоцита
- Уточнены некоторые аспекты участия подоцитов в патогенезе протеинурических форм поражения почек (не только наследственных, но и приобретенных)
- Дано теоретическое обоснование подоцит-специфических моделей лечения ГН

Специализированные функции подоцитов

- Селективная проницаемость для белков по размеру и заряду
- Поддержание формы капиллярных петель
- Противодействие внутригломерулярному давлению
- Синтез и поддержание ГБМ
- Продукция и секреция сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), необходимого для нормального строения слоя гломерулярных эндотелиальных клеток



Протеинурические формы нефропатий/подоцитопатии (1)

ФОРМЫ	ПРИЧИНЫ
Минимальные изменения	<ul style="list-style-type: none"> • Идиопатический • Генетический (NPHS1, NPHS2, DYSF) • Реактивный (дисрегуляция иммунной системы, гематологические опухоли, лекарства (НПВС, золото, пеницилламин, литий, интерферон, памидронат)
Классический ФСГС	<ul style="list-style-type: none"> • Спорадические мутации (NPHS2, ACTN4, CD2AP и др.) • Семейные мутации (NPHS2, NPHS3, ACTN4, CD2AP, TRCP6, WT-1, SYNPO и др.) • Постадаптивные (гиперфльтрация - АГ, ожирение, СД); уменьшение количества нефронов (гипо- и анефрония) • Лекарства (такролимус, литий, интерферон, памидронат)
Целлюлярный/ коллапсирующий ФСГС	<ul style="list-style-type: none"> • Идиопатический • Генетический (WT1, NPHS1, NPHS2, NPHS3, SOQ6, LAMB2 и др.) • Инфекции (вирусы -HIV, parvo B19, CMV, палиомавирус ; ТВС; филярии, лейшмании) • Лекарства (памидронат, интерферон, валпроновая к-та) • Аутоиммунные заболевания (СКВ, РА, б-нь Стилла и др.); ТМА; опухоли

Shankland S.J. Kidney Int. 2006; 69: 2131-2147
Barisoni L., Schnapper, Copp. CJASN 2007.

Протеинурические формы нефропатий/подоцитопатии (2)

ФОРМЫ	ПРИЧИНЫ
Мембранозная нефропатия	Анти-подоцитарные антитела, C5b-9
Мембранопролиферативный ГН	Отложения иммунных комплексов (расщепление ГБМ, сглаживание ножек подоцитов)
Диабетическая нефропатия	Метаболические (гипергликемия) Гиперфильтрация
Амилоидоз	Отложение амилоидного белка (непосредственное повреждение подоцитов)

1. Shankland S.J. «The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis» *Kidney Int.* 2006; 69: 2131-2147
2. Barisoni L. «The evolution of the classification of nephrotic syndrome and the new taxonomy for the podocytopathies», *CJASN* 2007.

Механизмы развития протеинурии, связанные с повреждением подоцитов (I)

ВИД ПОВРЕЖДЕНИЯ	ПОДОЦИТАРНЫЙ ДЕФЕКТ
Изменения белков щелевидной диафрагмы	Мутации генов (<i>NPH1, NPH2, CD2AP</i> и др.)
Сглаживание ножек подоцитов	<ul style="list-style-type: none"> - Изменения белков щелевидной диафрагмы (<i>NPH1, NPH2, CD2AP</i> и др.) - арушение взаимодействия подоцитов с ГБМ (<i>интегрины, дистрогликаны</i>) - Изменения актинового цитоскелета (<i>α-актинин-4, синаптоподин, циклин-зависимые киназы</i>) - Утрата отрицательного заряда подоцитов (<i>подокаликсин и другие анионные белки</i>) - Повреждение апикальных мембранных белков (<i>подокаликсин; фактор регулирующий обмен Na⁺/H⁺ (NHERF2); Ezrin</i>) - Патология митохондрий (<i>CoQ2 NP, CoQ6 NP, mtDNA tRNA^{Leu} и др.</i>) - Нарушения клеточного метаболизма (<i>GLA-Fabry's</i>)

Shankland S.J. *Kidney Int.* 2006; 69: 2131-2147
Barisoni L., Schnapper, *Copp.* *CJASN* 2007.

Механизмы развития протеинурии, связанные с повреждением подоцитов (II)

ВИД ПОВРЕЖДЕНИЯ	ПОДОЦИТАРНЫЙ ДЕФЕКТ
Изменения ГБМ	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ синтез протеаз подоцитами - ↑ синтез оксидантов подоцитами - ↑ синтез ЭЦМ подоцитами, приводящий к утолщению ГБМ - ↓ гепарансульфат протеогликанов
Дисфункция гломерулярных эндотелиальных клеток	- ↓ синтеза и секреции подоцитами VEGF
Изменение числа подоцитов	<p>Пролиферация:</p> <p>↑</p> <p>Увеличение числа подоцитов</p> <p>Потеря:</p> <p>↓</p> <p>Уменьшение числа подоцитов</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Недостаточный синтез ДНК - Повреждение ДНК - Декомпенсированная гипертрофия - Апоптоз - Отслойка от БМК

Shankland S.J. Kidney Int. 2006; 69: 2131-2147

Изменение числа подоцитов при гломерулярных болезнях

Число подоцитов не изменено	Число подоцитов снижено	Число подоцитов увеличено
Мембранозная нефропатия	Мембранозная нефропатия	HIV- ассоциированная нефропатия
Минимальные изменения	Классический ФСГС	Клеточный/ коллапсирующий ФСГС
Классический ФСГС	Диабетическая нефропатия	ХГН с полулуниями
	Амилоидоз	
	Старение	

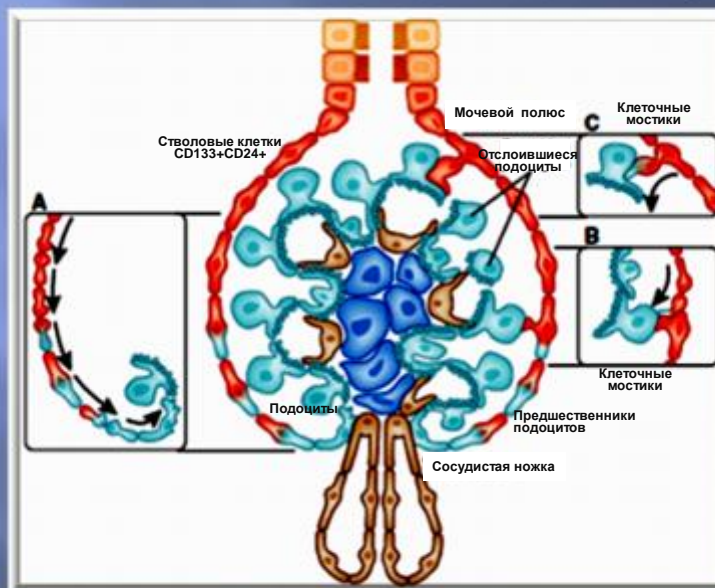
Shankland S.J. Kidney Int. 2006; 69: 2131-2147

Факторы, регулирующие гибель и выживаемость подоцитов

ФАКТОРЫ, АКТИВИРУЮЩИЕ АПОПТОЗ	ФАКТОРЫ, ТОРМОЗЯЩИЕ АПОПТОЗ
AT-II AT1-R TGF- β Гипергликемия Реактивные кислородные радикалы Sher-stress Циклоспорин bFGF SMAD7 ↓P21 ↓P27 P53 Литические концентрации C5b-9	Циклин I Нефрин Подоцин CD2AP VEGF Vcl2 Инсулиноподобный фактор роста Фактор роста гепатоцитов Дексаметазон Клеточно-клеточные контакты

Shankland S.J. Kidney Int. 2006; 69:2132

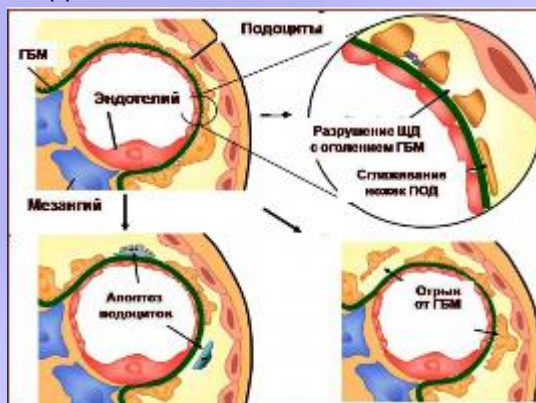
Механизмы подоцитарной регенерации



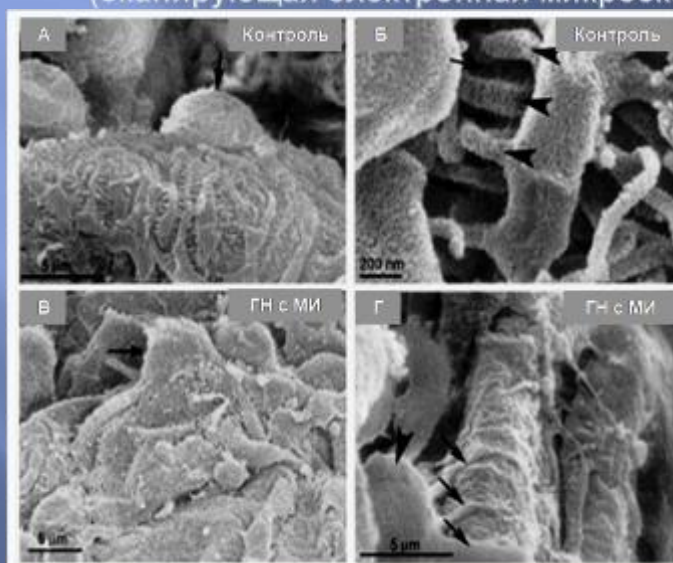
Lasagni L., Romagnani P. J Am Soc Nephrol 2010; 21:1612-1619

Несмотря на то, что протеинурические формы гломерулярного поражения почек различаются клинически, этиологически и по патофизиологическим признакам, их объединяют общие черты (фенотипы) повреждения:

- сглаживание ножек подоцитов на ранней стадии;
- истощение подоцитов (подоцитопения), сопутствующее прогрессированию



Изменения ножек подоцитов у больных ХГН с НС (сканирующая электронная микроскопия)

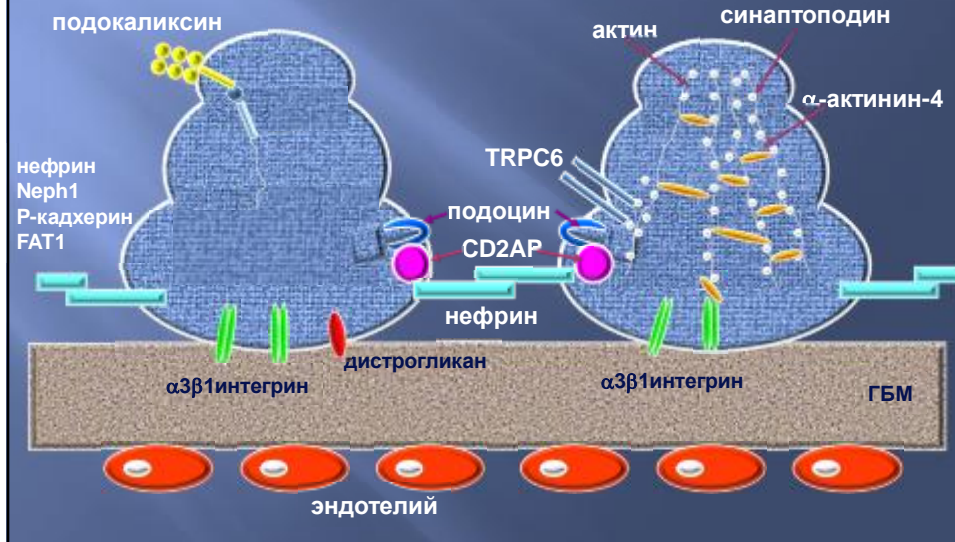


А-Б
Нормальные капиллярные петли с хорошо выраженными отростками подоцитов

В-Г
Капиллярные петли со сглаженными и истонченными отростками подоцитов

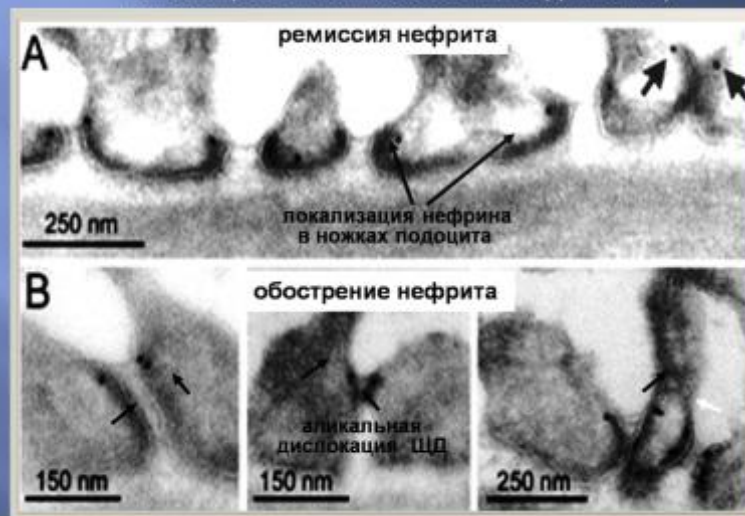
Lahdenkari A.T., Lounatmaa K., Patrakka J. et al. J Am Soc Nephrol. 2004;15:2611-2618

Молекулярная структура ножек подоцитов и щелевой диафрагмы



Апикальное перемещение щелевой диафрагмы (ЩД) при нефрите

(иммуноэлектронная микроскопия с антинефриновыми антителами, конъюгированными с золотом, нефрит с МИ)

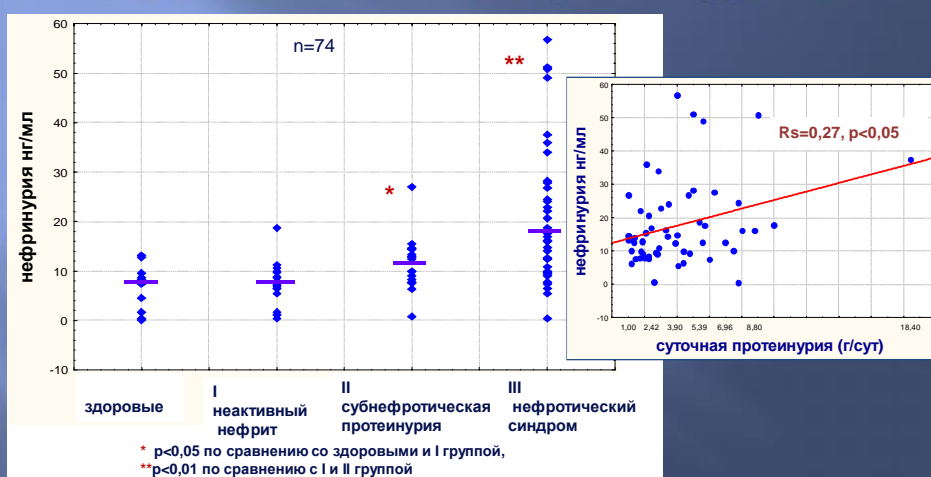


Lahdenkari A.T., Lounatmaa K., Patrakka J. et al. J Am Soc Nephrol. 2004;15:2611-2618

➤ **Нефрин** и сами **подоциты** могут обнаруживаться **в моче** больных протеинурическими формами ГН (но обычно отсутствуют в моче здоровых людей), отражая **активное повреждение** клубочков почек

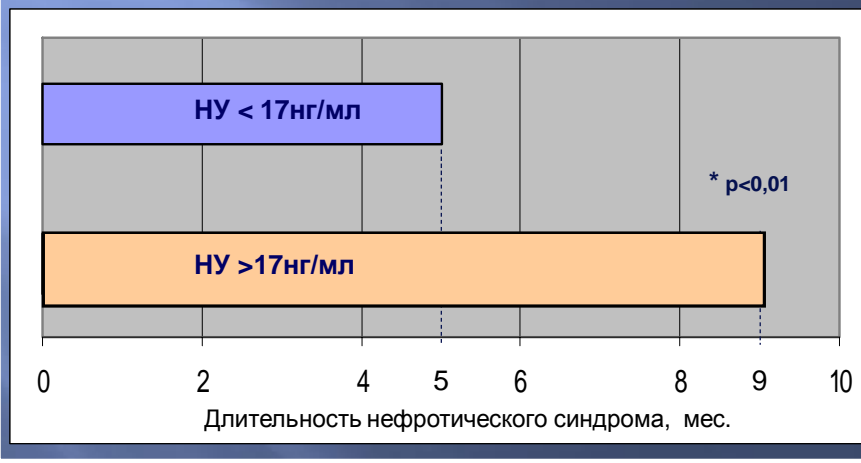
Yu D. et al. J Am Soc Nephrol. 2005;16:1733-1748

Уровень нефринурии у больных ХГН его взаимосвязь с протеинурией



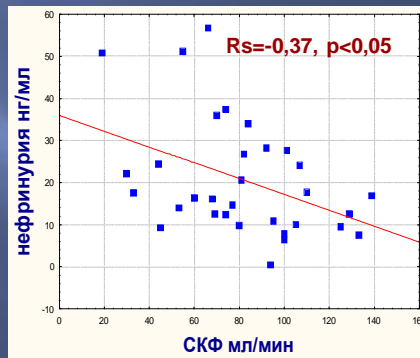
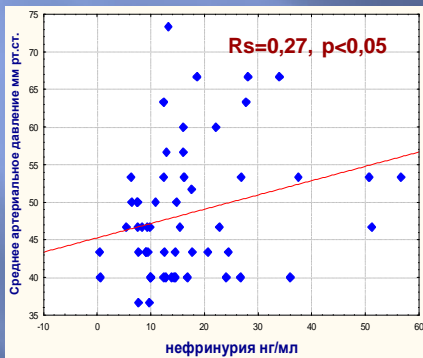
Чеботарева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Еськова О.А 2011 г.

Длительность нефротического синдрома у больных ХГН с разным уровнем нефринурии (НУ)



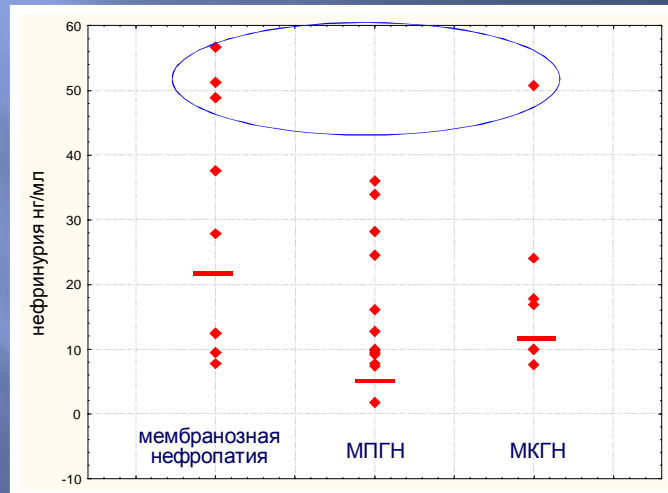
Чеботарева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Еськова О.А. 2011

Корреляции между нефринурией, средним артериальным давлением и СКФ



Чеботарева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Еськова О.А. 2011

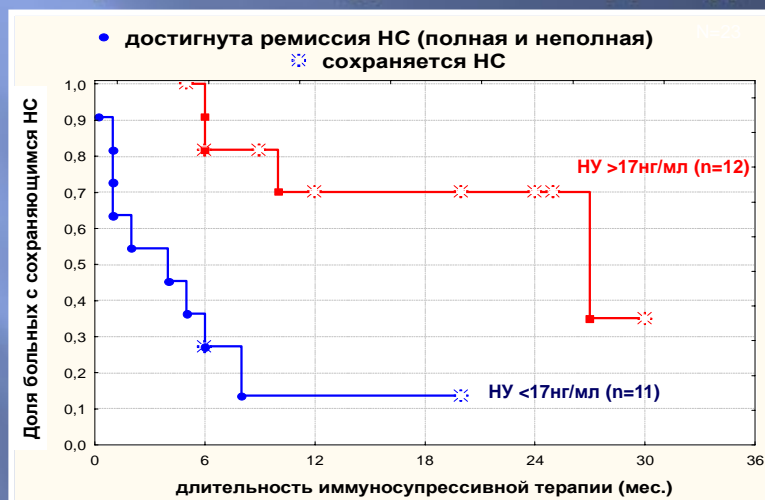
Уровень нефринурии у больных различными морфологическими формами ХГН



На графике представлены медиана и интерквартильный размах (25%-75%)

Чеботарева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Варшавский В.А. 2011

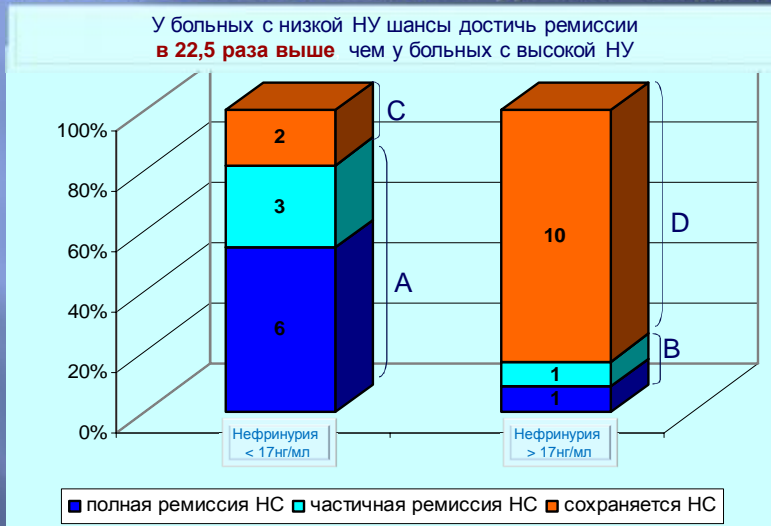
Сроки достижения ремиссии НС у больных ХГН с различным уровнем нефринурии



Различия между группами статистически достоверны (критерий Гехана = -3,154, $p=0,002$, критерий logrank = 2,97, $p=0,003$)

Чеботарева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В. 2011

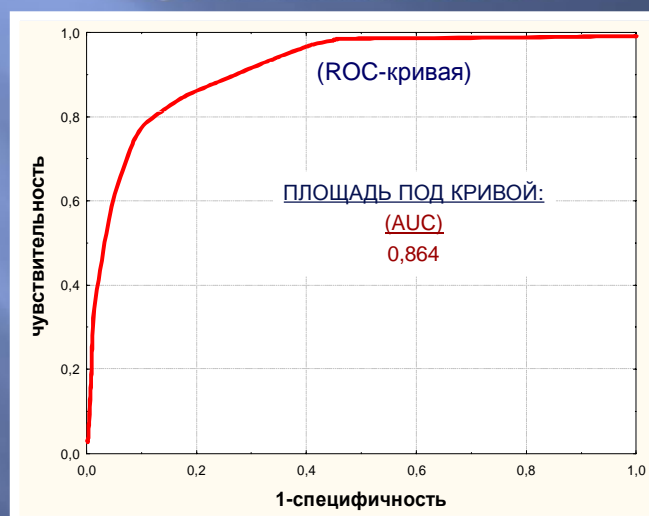
Ответ на иммуносупрессивную терапию у больных ХГН с НС через 6 месяцев лечения в зависимости от исходного уровня нефринурии



Отношение шансов (ОШ) рассчитывали по формуле: $A \cdot D / B \cdot C$ ОШ = $9 \times 10 / 2 \times 2 = 22,5$

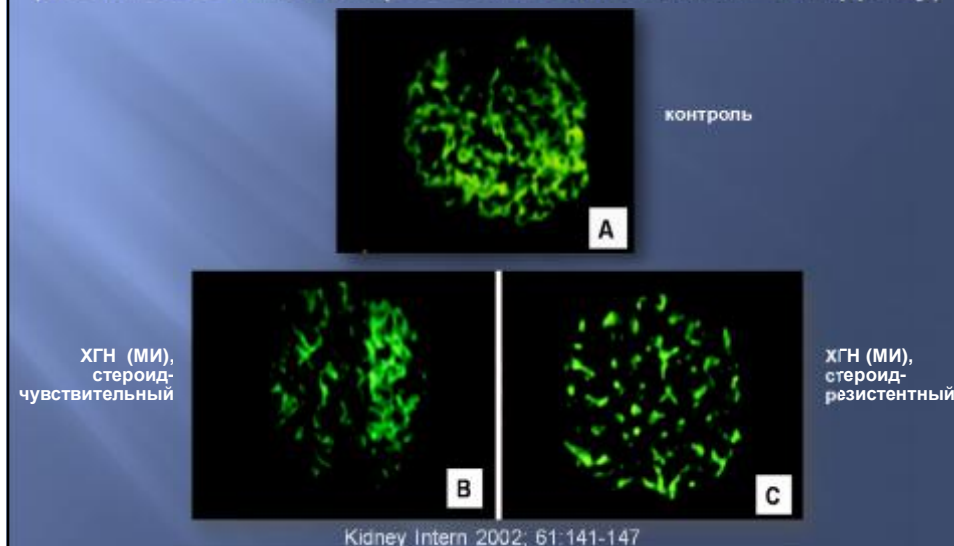
Чеботарева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В. 2011

Информативность показателя нефринурии для прогнозирования ответа на иммуносупрессивную терапию у больных ХГН с НС



Чеботарева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В. 2011

Изменение экспрессии нефрина в клубочках почки у больных ХГН с разным ответом на терапию (люминесцентная микроскопия с антителами к нефрину)



- **Нефрин**, кроме своей роли как основной структурно-функциональной единицы щелевой диафрагмы, оказывает **антиапоптотический эффект** и действует как **аутокринный фактор выживаемости подоцита**.

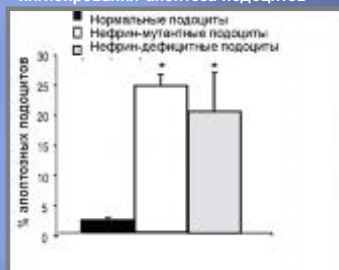
Foster R.R. et al. An J Physiol Renal Physiol 2005; 288: F48-57
Cheng H., Harris R.C et al J Biochem Cell Biol 2010; 42:1380-1387

В эксперименте установлено, что **антиапоптотическое** действие **нефрина** связано с его **фосфорилированием** под влиянием **VEGF**

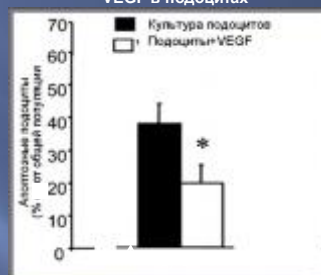
Foster R.R. et al. Am J Physiol Renal Physiol 2005; 288:F48-F57

Антиапоптотический эффект нефрина и VEGF (экспериментальное исследование)

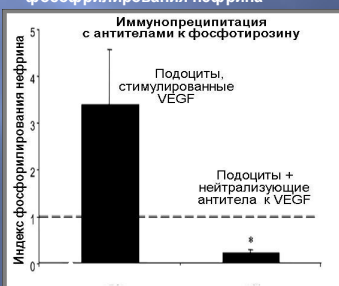
I. Участие нефрина в механизмах ингибирования апоптоза подоцитов



II. Антиапоптотическое действие VEGF в подоцитах



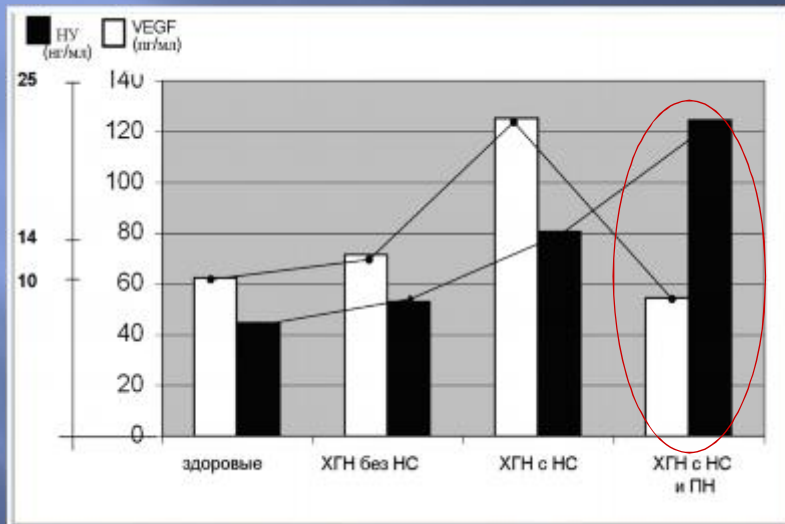
III. VEGF активирует механизмы фосфорилирования нефрина



Механизм антиапоптотического эффекта нефрина связан с его фосфорилированием под влиянием VEGF (с участием тирозинных фосфокиназ); обсуждается активация антиапоптотического протеина Bcl-2.

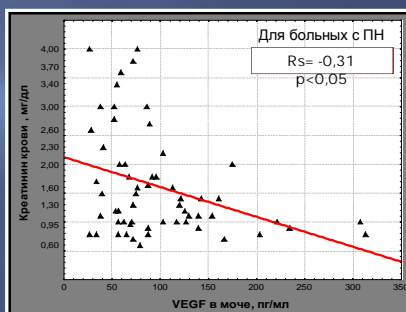
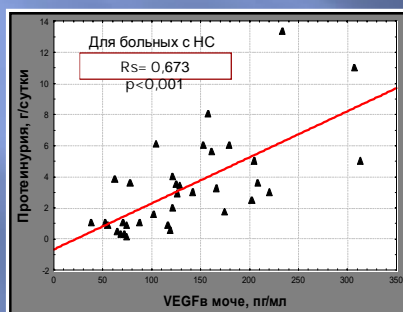
Foster R.R. et al. Am J Physiol Renal Physiol 2005; 288:F48-F57

Соотношение экскреции с мочой VEGF и нефрина у больных ХГН (n=67)



Чеботарева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Рамеева А.С.

Взаимосвязь показателя мочевого экскреции VEGF с протеинурией и уровнем креатинина крови у больных ХГН



Бобкова И.Н., Рамеева А.С., Козловская Л.В. 2011

Экспрессия VEGF в клубочках почки больных ХГН (собственные данные)

Б.
ХГН, НС, ОНС,
СПУ 19,6 г.
(МЗПГН).
Интенсивная (+6)
Экспрессия VEGF
в ядрах гломерулярных
клеток и цитоплазме
эндотелия капилляров
клубочка

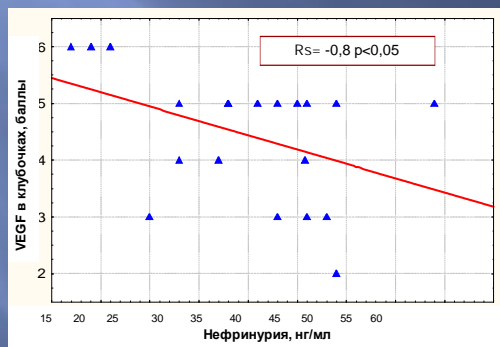
А.
ХГН с НС. СПУ -3,6 г.
(МЗПГН).
Умеренная (+3)
экспрессия VEGF
в ядрах гломерулярных
клеток и цитоплазме
эндотелия капилляров
клубочка.

В.
ХГН с НС и ПН.
СПУ- 8г, Сг- 2,0 мг/ дл.
(МЗПГН + ФПТ).
Слабая (+1)
экспрессия VEGF
в клубочке .

Г.
Гломерулосклероз.
Экспрессия VEGF
в клубочке
отсутствует

Швецов М.Ю., Полова О.П., Иванов А.А.

Корреляция выраженности экспрессии VEGF в клубочках почки с уровнем нефринурии у больных ХГН



Бобкова И.Н., Чеботарева Н.В., Швецов М.Ю., Полова О.П., Иванов А.А.

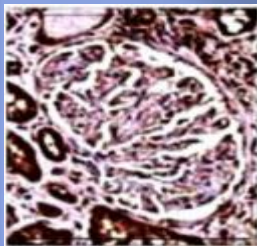
Изменения подоцитов при их повреждении

тяжесть и длительность повреждения
(медиаторы воспаления, АТ II, ТФР- β , ROS, гипергликемия и др.)

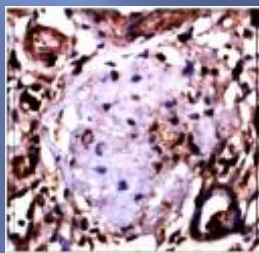


Адаптированная схема по Liu Y. J Am Soc Nephrol. 2010; 21: 212-222

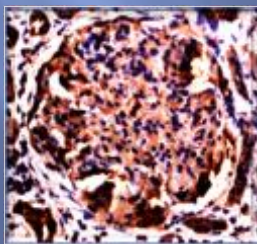
Экспрессия матричной металлопротеиназы 9 типа (ММП-9) в клубочках почек больных ХГН



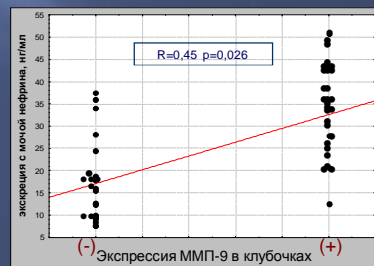
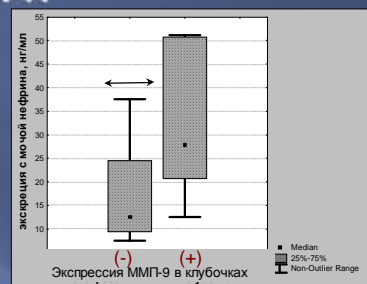
ХГН с МС. СПУ -1,8 г. (МЗПГН)
Умеренная экспрессия ММП-9 в клубочке



Нефросклероз
Сниженная экспрессия ММП-9 в клубочке



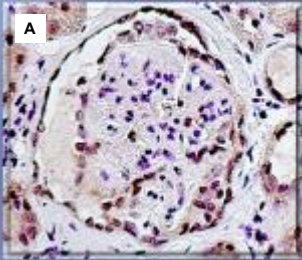
ХГН с НС. СПУ -4,0 г. (МЗПГН)
Усиленная экспрессия ММП-9 в клубочке



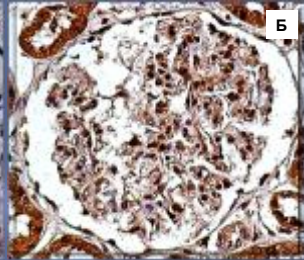
Ли О.А., Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Варшавский В.А. 2010

Экспрессия PAX-2 в клубочках почки больных ХГН (собственные данные)

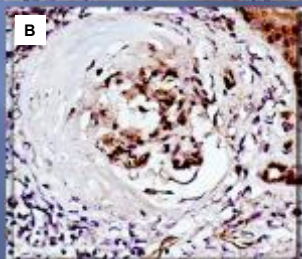
А.
ХГН с МС (СПУ-1,7 г)
(МЗПГН).
Слабая экспрессия (+1)
PAX-2 в ядрах
подоцитов



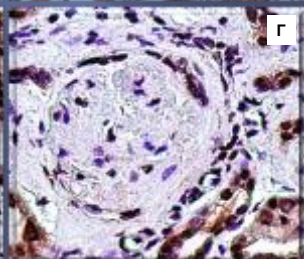
Б.
ХГН с НС (СПУ-8,0г)
(МН).
Экспрессия (3+)
PAX-2 в ядрах
подоцитов



В.
БПГН
(СПУ-3,2 г Сг 2,5
мг/дл)
(ГН с полулуниями).
Экспрессия (2+)
PAX-2 в ядрах
сохранившихся
подоцитов

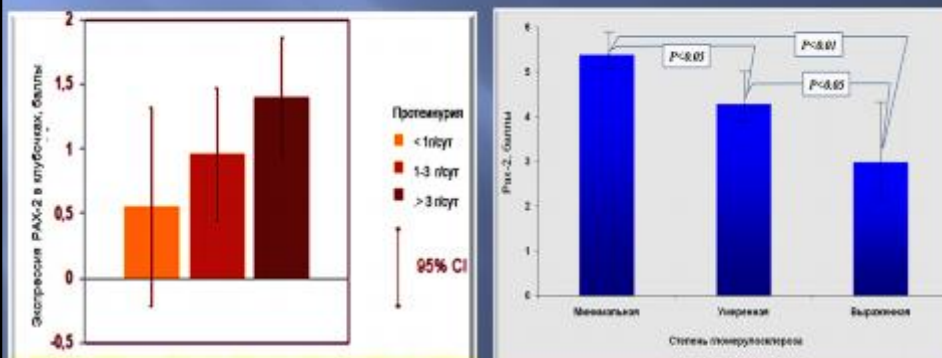


Г.
Гломерулосклероз.
Выраженное
снижение
экспрессии PAX-2
в клубочке.

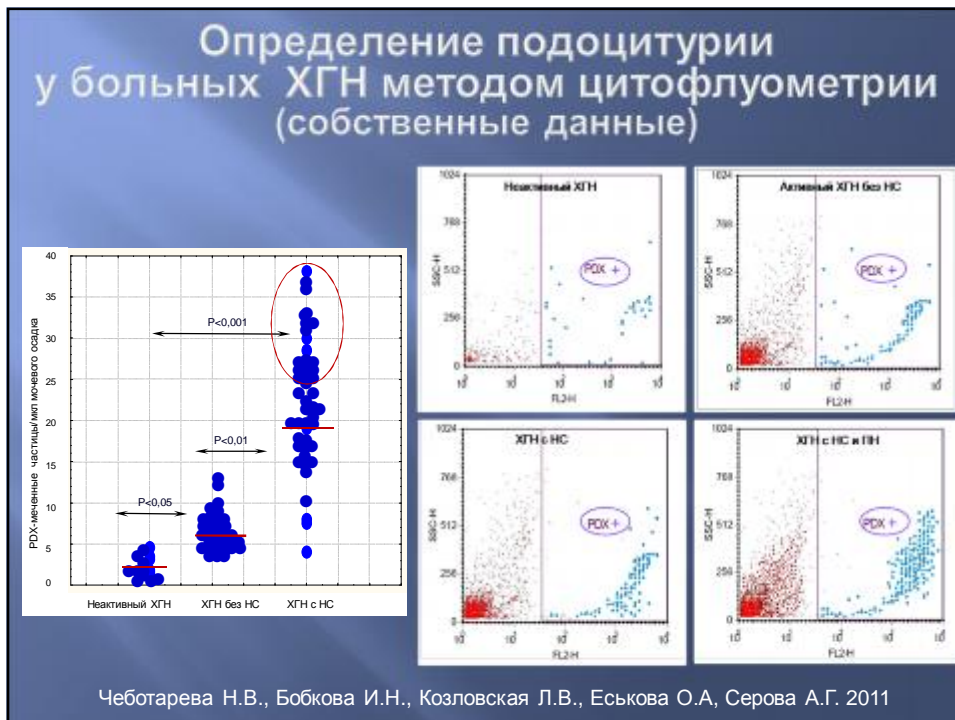
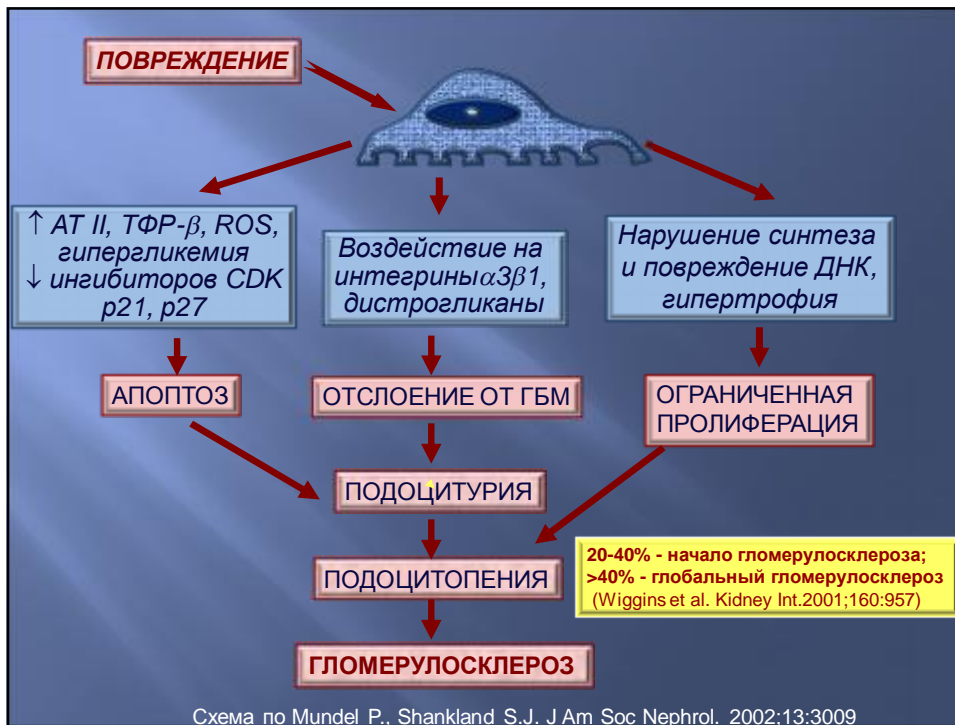


Швецов М.Ю., Попова О.П., Иванов А.А.

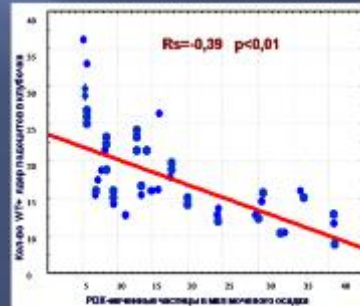
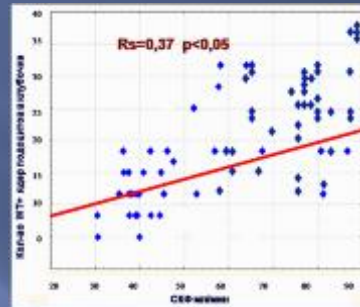
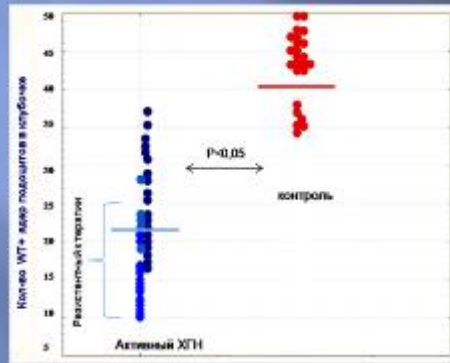
Связь интенсивности экспрессии PAX-2 в подоцитах с выраженностью протеинурии и гломерулосклероза у больных ХГН



Швецов М.Ю., Попова О.П., Иванов А.А. 2011



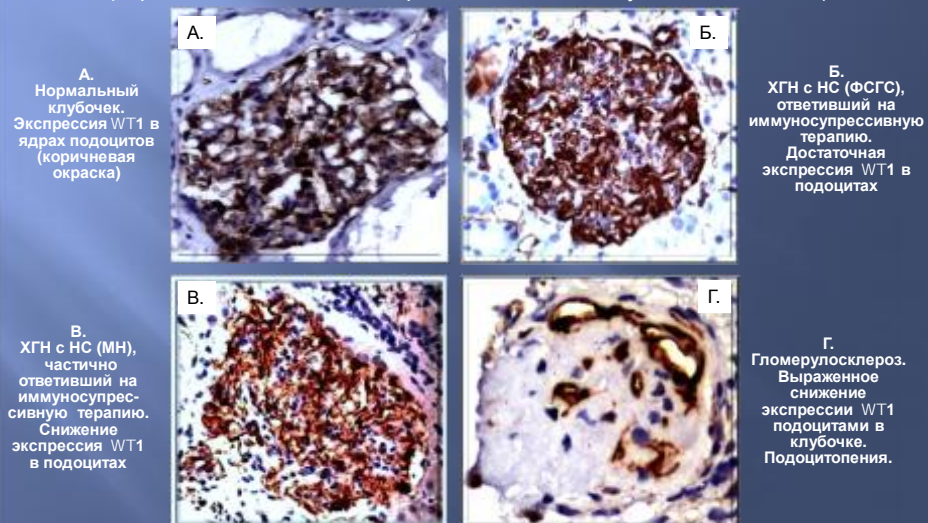
Оценка подоцитопении у больных ХГН



Чеботарева Н.В., Бобкова И.Н.,
Козловская Л.В., Варшавский В.А. 2011

Иммуногистохимическое исследование подоцитов в клубочках почки больных ХГН (собственные данные)

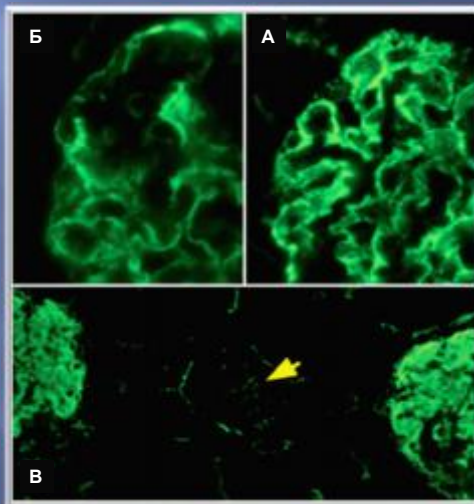
(окраска подоцитов на ядерный антиген WT1, увеличение x400)



Чеботарева Н.В., Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Варшавский В.А.

Иммунофлюоресцентное исследование подоцитов в ткани почки у больных ХГН

Б.
ХГН с НС
(ослабленная флюоресценция меченных антителами к подокаликсину подоцитов - подоцитопения)

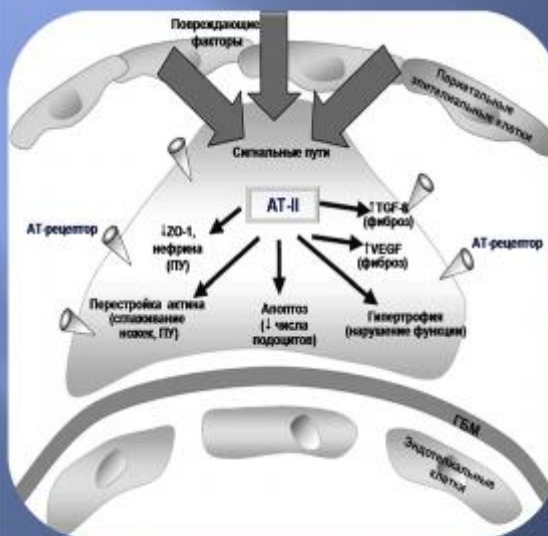


А.
Контроль

В.
ХГН с НС
(выявление подокаликсин-положительного материала в просвете канальцев - смущенные подоциты)

Masanori Hara, Tosio Yanagihara, Itaru Kihara et al. J Am Soc Nephrol. 2005;16:408-416

Воздействие на подоциты «старых» лекарственных средств, применяемых в нефрологии



I. Ингибиторы АПФ и БРА

- уменьшение апоптоза
- уменьшение гипертрофии
- предупреждение перестройки актинового цитоскелета → ↓ ПУ
- сохранение экспрессии нефрина и др. белков щелевидной мембраны → ↓ ПУ
- уменьшение синтеза VEGF (↓ продукцию подоцитами $\alpha 3$ цепи коллагена IV типа, ↓ проницаемость эндотелия)
- снижение уровня ТФР- β
- уменьшение синтеза ЭЦМ
- Уменьшение ПУ → снижение действия альбумина на подоциты → увеличение выживаемости подоцитов

Shankland S.J. Kidney Int. 2006; 69: 2131-2147

Воздействие на подоциты «старых» лекарственных средств, применяемых в нефрологии

II. Глюкокортикоиды

помимо иммуномодулирующего эффекта могут оказывать непосредственное воздействие на подоциты:

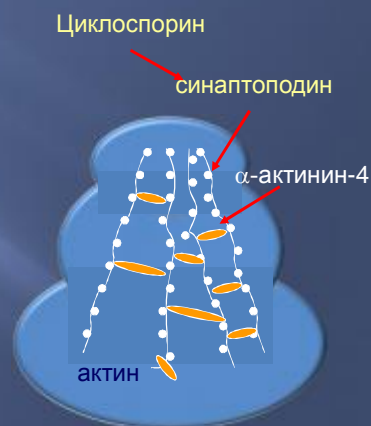
- ▣ тормозят процесс **апоптоза подоцитов** и, предотвращая подоцитопению, уменьшают степень гломерулосклероза;
- ▣ повышают **стабильность актинового цитоскелета подоцита** при повреждении, уменьшая сглаживание ножек (effacement), в том числе через экспрессию белка теплового шока 27

Воздействие на подоциты «старых» лекарственных средств, применяемых в нефрологии

III. Циклоспорин А

Установлено, что циклоспорин оказывает непосредственное воздействие на подоциты, не связанное с Т- и В-клетками:

Циклоспорин блокирует кальцийнейрин-опосредованное дефосфорилирование **синаптоподина** (защищает его от протеолиза) и, таким образом, стабилизирует актиновый цитоскелет подоцита



Новые направления воздействия на подоциты

- ▣ **All-транс-ретиноевая кислота (ATRA)**
Подоциты экспрессируют рецепторы к трансретиноевой кислоте. Введение ATRA предотвращает снижение экспрессии нефрина и подоцина, уменьшает гломерулосклероз.
- ▣ **Ингибиторы циклин-зависимых киназ CDK2 (Roscovitine, cyclacel)**
уменьшают протеинурию и улучшают функцию почек в эксперименте. Cyclacel уменьшает почечную дисфункцию у ВИЧ-трансгенных мышей и у мышей с мембранозной нефропатией (PAN модель)

Роль ритуксимаба (АТ к CD20 В-лимфоцитов) в лечении мембранозной нефропатии

- ▣ Предполагают, что в основе МН лежит аутоиммунизация к тубулярным белкам, которые экспрессируются также на ножках подоцитов; открыт первый нефритогенный антиген человека – **подоцитарная нейтральная эндопептидаза (NEP)**
- ▣ Важную роль в продукции нефритогенных Ig (АТ) придают Th2- цитокин-зависимой активации **В- лимфоцитов CD20+**, в связи с чем теоретически обосновано применение при МН **ритуксимаба**. Опыт лечения накапливается.

С новыми научными исследованиями
связаны надежды наших пациентов
во всем мире.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ