

ÚJ PATOMECHANIZMUSOK ÉS KEZELÉSI CÉLPONTOK A DIABÉTESZES NEFROPÁTIA MEGELŐZÉSÉBEN ÉS TERÁPIÁJÁBAN

Fekete Andrea

Semmelweis Egyetem – MTA Lendület Diabétesz Kutatócsoport

OTKA PD záróbeszámoló 2011-2012

Rövid irodalmi háttér: A diabétesz (DM) - az anyagcsere komplex zavara - a populáció közel 4%-át érinti. Mikro-, és makrovaszkuláris szövődményei a betegek várható élettartamát 5-10 évvel csökkentik. Mivel az angiotenzin II (ANGII) a diabéteszes szövődmények kialakulásában központi szerepet tölt be, a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) gátlók hatékony terápiát jelenthetnek a sokszervi szövődmények megelőzésében. Bár e szerek antihipertenzív hatása jól ismert, cukorbetegségben alkalmazási területük és hatásuk nem egyértelmű, a patofiziológiai háttér pedig továbbra is jórészt tisztázatlan.

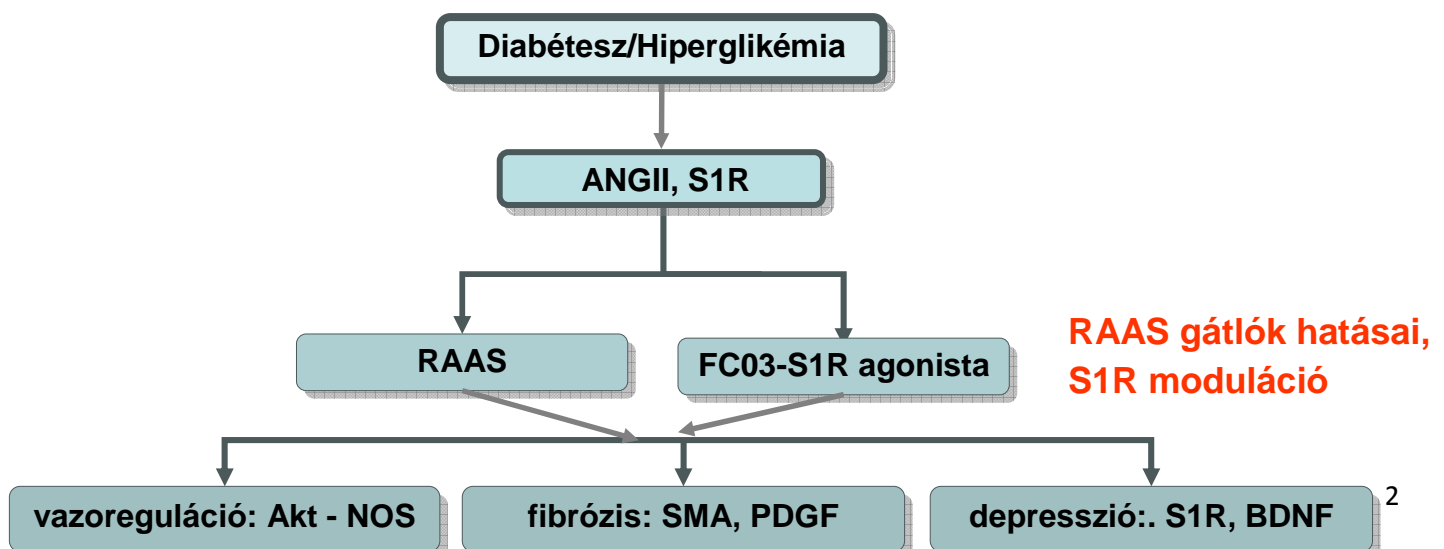
Nemrégiben merült fel a RAAS gátlók antidepresszáns szerepe is, bár kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Egyes vizsgálatok szerint az aktivált RAAS kapcsán kialakuló hiperaldoszteronizmus összefügg a depresszív viselkedéssel, illetve az ARB kezelés enyhítheti a cukorbeteg depresszióját.

A DM és krónikus veseelégtelenség társbetegségeként jelentkező depresszió fokozza a nefropátia progresszióját. DM-ben az elsődlegesen választandó antidepresszánsok a szelektív szerotonin visszavétel gátlók, melyekről a közemúltban derült ki Sigma-1 receptor (S1R) agonista hatásuk. A S1R egyes szervekben (pl. szívizom) az Akt foszforilálása révén az eNOS szintjét emeli. A S1R a vesében is kifejeződik, ugyanakkor renális lokalizációja és funkciója nem ismert.

A pályázat 3 évében diabéteszes patkánymodellben a RAAS gátlás és a S1R moduláció új lehetséges hatásait több fő kísérleti útvonalon vizsgáltuk, melyet az alábbi ábra összegez. Mivel az alkalmazott S1R agonista szer jelenleg szabadalmi bejelentés alatt van, a továbbiakban FC03 kóddal jelölöm a beszámolóban. Tekintettel a számos eredményre a beszámolóban csak a legfontosabb adatok kerülnek részletes ismertetésre. (A pályázat a Pályázó Dr. Fekete Andrea bérét fedezte, a kísérletekhez szükséges dologi és befektetett eszközök teljes költségét a Pályázó egyéb kutatási pályázatai biztosították).

Célkitűzések röviden:

- **A RAAS inhibitorok protektív szerepének tanulmányozása a DM okozta epiteliális mezenhimális transzformáció (EMT) és fibrózis kivédésében.**
- **A RAAS gátlók hatásának vizsgálata a DM-hez társuló depresszió patomechanizmusában.**
- **A S1R jelátviteli út modulációjának (agonisták, antagonisták, RAAS gátlók) tanulmányozása a nefropátia és depresszió kialakulásában.**
- **A kombinált S1R és RAAS gátló kezelések hatásának vizsgálata a fenti folyamatokra.**



1. ábra A diabétesz, a hiperglikémia és a renin-angiotenzin-aldoszteron (RAAS) rendszer gátlás potenciális hatásai (ANGII-angiotenzin II, S1R- sigma1 receptor, NOS- nitrogén-monoxid szintáz, α SMA-simaizom-aktin, PDGF-platelet derived growth factor)

A fenti patofiziológia utak vizsgálatához több közös modellt használtunk. Összehasonlítottuk a DM következményeit, a különböző RAAS gátlók és az FC03 hatását.

Állatmodell: Hím Wistar patkányokban streptozotocinnal (STZ) 1-es típusú DM-et indukáltunk. Héthetes (D7- DM hosszútávú következménye) STZ-DM fennállása után, két hétig kezeltük az állatokat *per os* az alábbi RAAS gátlókkal: enalapril (0.5mg/tskg/nap), ramipril (0.1mg/tskg/nap) lozartán (5mg/tskg/nap); spironolakton (50mg/tskg/nap); eplerenon (50mg/tskg/nap).

In vitro sejtkultúra HK-2 proximális tubulussejteket 10%-os FBS tartalmú tápoldatban tenyésztettünk. A sejtek egy részét fiziológiás (5mM/L), másik részét magas cukortartalmú (35mM/L) oldatban tartottuk 72 órán át. A RAAS gátlók hatásának vizsgálatára a sejteket a következők szerint kezeltük: enalapril (végcc. 2.5uM); ramipril (,,,,,) lozartán (végcc.10uM); spironolakton (végcc. 1uM) és eplerenon (végcc. 10uM). Ozmotikus kontrollként 35mM/L cc. Mannóz oldatban tenyésztett sejteket használtunk.

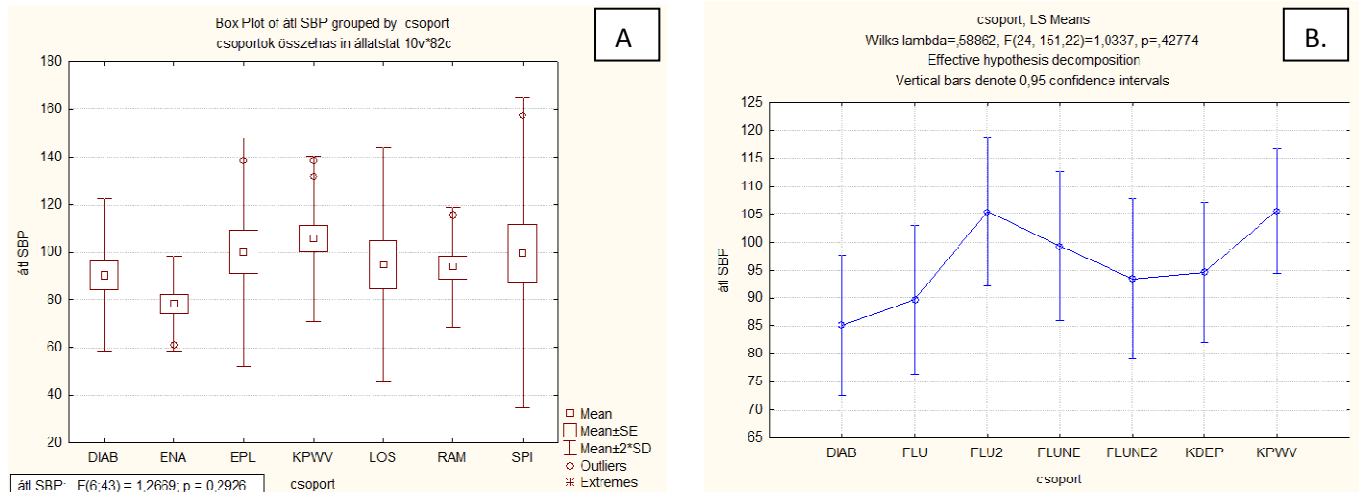
Célkitűzés 1. A RAAS gátlás és a FC03 terápiás lehetőségeinek tanulmányozása a DM nefropátia kialakulásában.

Kísérlet 1. A RAAS gátlók és az FC03 Szisztémás hatások vizsgálata (1. táblázat).

Eredmények 1/1.

Paraméter	Kontroll	Diabétesz (D)	D+Enalapril	D+Lozartán	D+Spironolakton	D+Eplerenon	
Vérnyomás (mmHg)	Kezelés előtt	105 ± 17	117 ± 20	103 ± 33	110 ± 18	118 ± 22	118 ± 25
	Kezelés után	100 ± 14	103 ± 21	116 ± 29	109 ± 17	108 ± 19	125 ± 11
Pulzus (/perc)	Kezelés előtt	443 ± 48	366 ± 47*	346 ± 41	334 ± 39	349 ± 32	366 ± 42
	Kezelés után	422 ± 70	350 ± 49*	356 ± 26	362 ± 43	400 ± 20 [§]	389 ± 35 [§]
Vércukor (mmol/L)	Kezelés előtt	9,24 ± 1,27	>25	>25	>25	>25	>25
	Kezelés után	11,6 ± 1,1	43,6 ± 3,2***	35,6 ± 5,2 [§]	36,1 ± 5,9 [§]	33,2 ± 2,4 ^{§§§}	38,5 ± 4 [§]
Testtömeg (g)	Kezelés előtt	260 ± 12	250 ± 41	264 ± 48	250 ± 45	290 ± 28	290 ± 62
	Kezelés után	342 ± 13	260 ± 29***	256 ± 42	250 ± 65	323 ± 34 ^{§§§}	273 ± 55

1. táblázat Kontroll, diabéteszes és kezelt diabéteszes állatok vérnyomás, pulzus, vércukor és testtömeg értékei. *p < 0,05 vs. Kontroll; ***p < 0,001 vs. Kontroll; §p < 0,05 vs. Diabétesz; §§p < 0,01 vs. Diabétesz; §§§p < 0,001 vs. Diabétesz. (n=8/csoport; átlag ± SD)



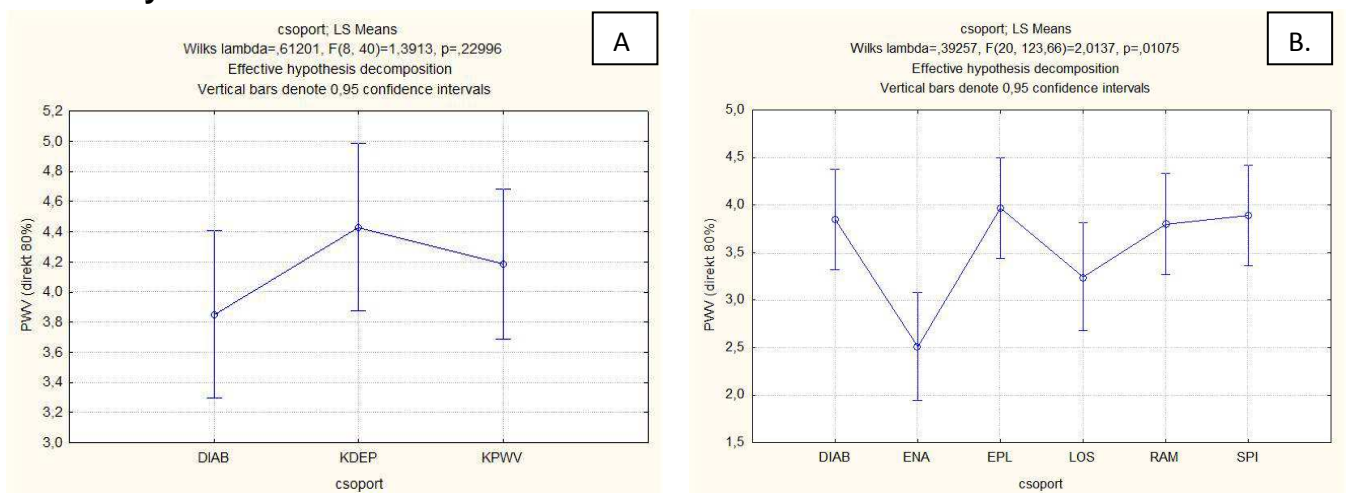
2. ábra Kontroll (KPWW), diabéteszes (DIAB) és kezelt diabéteszes állatok vérnyomás és pulzus értékei (n=8/csoport; átlag ± SD) A. RAAS gátló kezelések; B. S1R agonista FC03 kezelés

Sem a DM, sem a kezelések nem eredményeztek jelentős vérnyomásváltozás az egyes csoportok között. Mindez arra utal, hogy ezek a szerek az alkalmazott dózisban szisztémás hipotenziót nem okoznak (1. táblázat), és egyéb észlelt hatásaik nem vérnyomás-csökkentő tulajdonságukból adódnak.

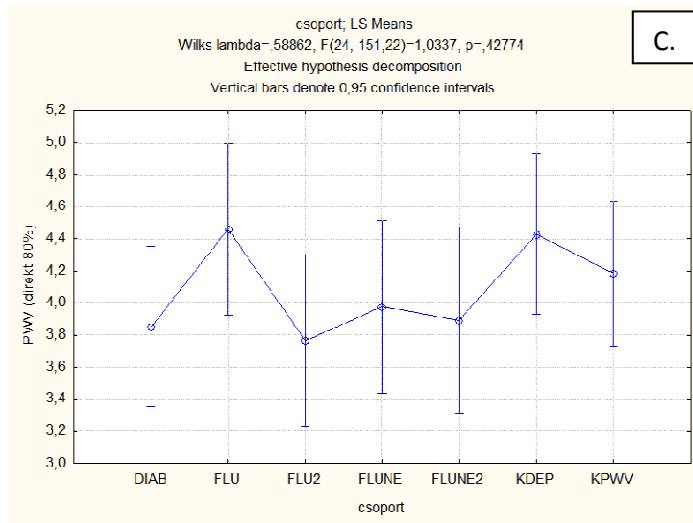
A DM állatok szívfrekvenciája alacsonyabb, melyet a csökkent baroreceptor aktivitásnak tulajdonítunk. Az aldoszteron-antagonistákkal történő kezelés a pulzust jelentősen növelte, ami felveti, hogy ez a gyógyszercsoport - a hipertónia indukciója nélkül - képes a baroreflex aktivitás visszaállítására. Az FC03-ral történő kezelés a pulzust nem változtatta. (data not shown).

A DM-ben a mortalitás egyik kiemelt oka a megnövekedett kardiovaszkuláris rizikó, ezért a pulzushullám-terjedési sebesség (PWV) mérését is elvégeztük. A PWV a klinikai gyakorlatban még nem rutin eljárásként, de egyre szélesedő körben alkalmazott non-invazív módszer az érfal rugalmasság mérésére és a kardiovaszkuláris rizikó megítélésére. Állatkísérletekben nagyon kevés adat áll rendelkezésre, a RAAS gátlók hatását pedig egyáltalán nem vizsgálták.

Eredmények 1/2.



3. ábra Kontroll (KPWW), diabéteszes és kezelt diabéteszes állatok pulzushullám terjedési sebesség(WV) értékei (n=8/csoport; átlag ± SD) A. Kontroll vs. DM; B. DM vs RAAS gátló kezelések; C. DM vs. S1R agonista FC03 kezelés



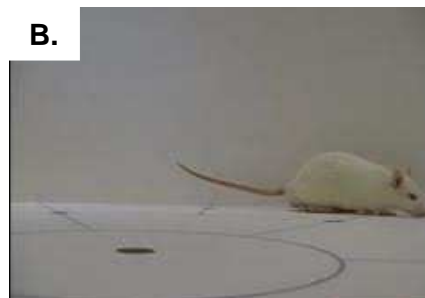
Kimutattuk, hogy a hagyományosan és az új ajánlások szerinti távolság, ill. a belőlük képzett két PWV érték kiváló egyezést mutat. A PWV értékét mérés során rögzített testtömeg, a szisztolés és a diasztolés vérnyomás befolyásolta. Bár a DM ezen korai időszakában nem mutatható ki szignifikáns érfalrugalmasság csökkenés a diabeteses állatokban, azonban az enalapril és losartan a PWV értékét mérsékli. Bár az FC03 kezelés tendenciájában csökkenti a PWV-t, a változás nem szignifikáns. További vizsgálatokat tervezünk 2-es típusú DM állatmodelljén is, ahol várhatóan nagyobb az érfali ateroszklerózis.

Kísérlet 2. A RAAS gátlók és az FC03 antidepresszáns hatásának vizsgálata.



A depresszió és a szorongás vizsgálatát: kényszeres úszás teszttel, illetve open field teszttel végeztük:

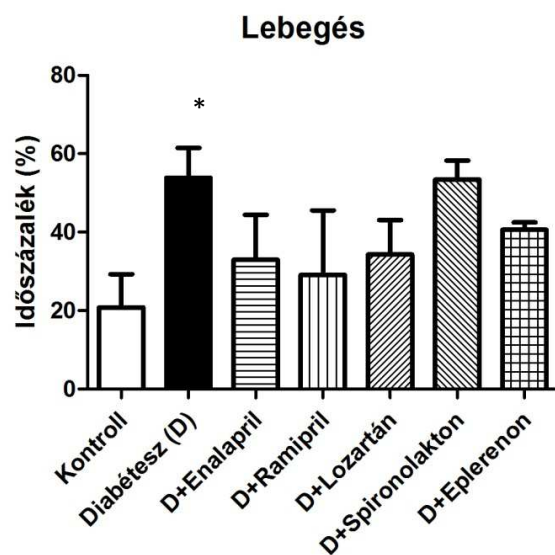
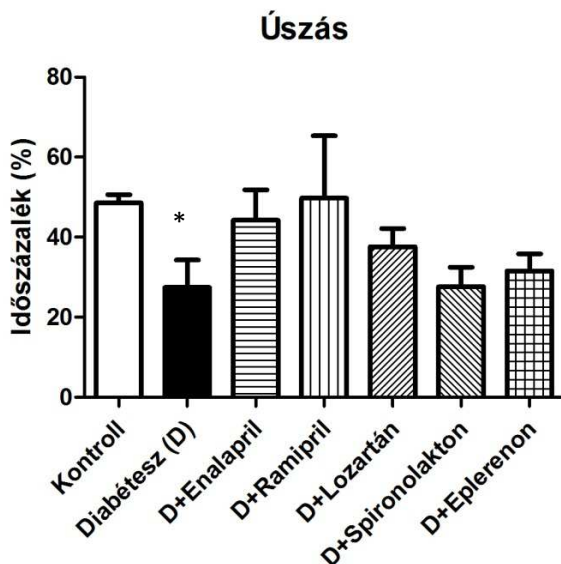
Vízzel telt hengerben 10 percig, videón rögzítjük az állatok viselkedését és elemezzük, a különböző magatartásformákat (úszás, lebegés) (A).



1m x 1m-es négyzetrácsos aljú dobozban megfigyeljük az állatok mobilitását és helypreferenciáját. A mozgásmintázatokat statisztikailag értékeltük. (B).

Eredmények 2/1.

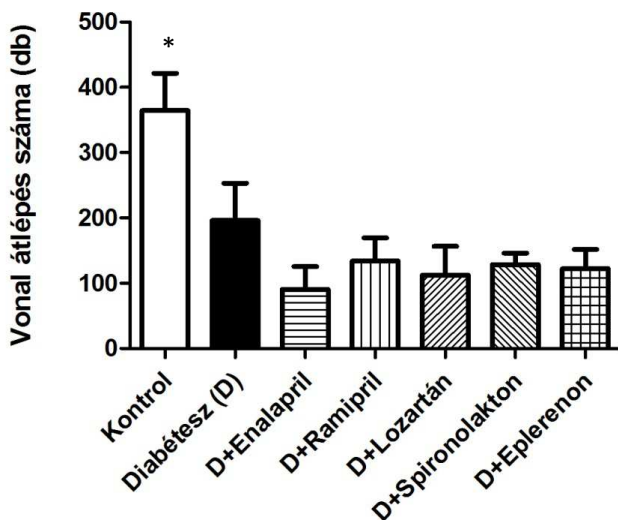
a. Kényszeres úszástezt a depresszió megítélésére RAAS kezelést követően



4. ábra Kontroll, diabéteszes (D) és RAAS gátló kezelt diabéteszes állatok kényszeres úszástereszt eredményei (n=5/csoport; átlag ± SD; *p<0,05)

A kényszeres úszástereszt során depresszióra utal a lebegéssel töltött idő megnövekedése, illetve ezzel párhuzamosan az úzás, csökkenése. Azt találtuk, hogy a D csoportban mindegyik mozgásmintázat a depresszióra utaló változást mutatta a kontrollokhoz képest, míg a RAAS gátló kezelések változó mértékben, de összességében javítani látszottak a depressziós tüneteket. Legkifejezettebb hatása az ACE gátlóknál észleltünk.

b. Open field teszt a szorongás megítélésére RAAS kezelést követően

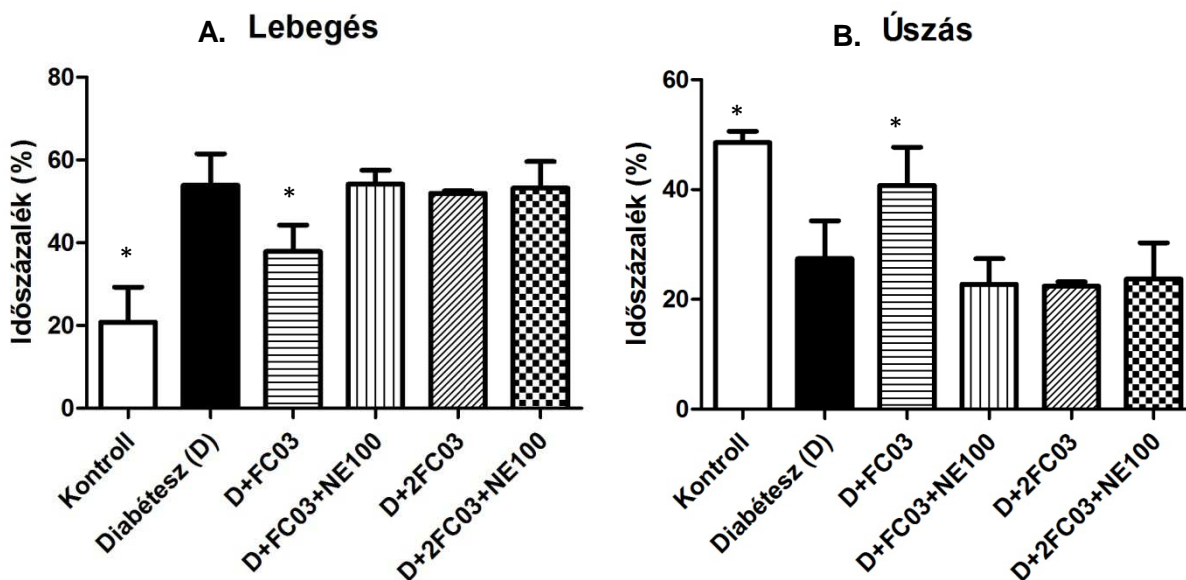


5. ábra Kontroll, diabéteszes (D) és RAAS gátló kezelt diabéteszes állatok kényszeres úszástereszt eredményei (n=5/csoport; átlag ± SD; *p<0,05)

DM-ben csökkent a mozgékonyosság, de ezt a RAAS gátló kezelések nem befolyásolták. Mindez arra utal, hogy az úszástereszt során észlelt különbség az állatok depressziós viselkedésének tulajdonítható inkább, mint fizikai állapotuk romlásának.

Metodikai probléma is felmerült a mérések kapcsán, így más viselkedésteresztet is alkalmazunk majd a szorongás megítélésére.

c. Kényszeres úszástereszt a depresszió megítélésére FC03 kezelést követően



6. ábra Kontroll, diabéteszes (D) és FC gátló kezelt diabéteszes állatok kényszeres úszástereszt eredményei (n=5/csoport; átlag ± SD; *p<0,05)

A D csoportban észlelt depressziós mozgásmintázatot az FC03 - elsősorban a nagyobb (20mg/tskg) dózisban - mérsékelte. Az antagonistá kezelés a jótékony hatást felfüggesztette. A kezelésnek szorongáscsökkentő hatása ebben az esetben sem volt. (Data not shown)

Kísérlet 3. A RAAS gátlók és az FC03 hatásának vizsgálata a renális paraméterek változására**Eredmények 3/1.**

Paraméter	Kontroll	Diabétesz (D)	D+Enalapril	D+Lozartán	D+Spironolakton	D+Eplerenon
Szérum kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	55,6 \pm 5,4	64,6 \pm 6,7*	57,8 \pm 9,8	54,8 \pm 7,1 ^{§§}	56,7 \pm 4,5 ^{§§}	67,2 \pm 5,8
Szérum karbamid	7,12 \pm 0,28	15 \pm 2,8**	11,9 \pm 2,4	11,9 \pm 1,5	8,61 \pm 1,05 ^{§§}	11,4 \pm 2,3 [§]
Nátrium (mmol/L)	154 \pm 8,46	135 \pm 3,7***	137,2 \pm 3,1	138 \pm 1	141 \pm 2 ^{§§}	140 \pm 2,3 ^{§§}
Kálium (mmol/L)	5,78 \pm 0,43	7,26 \pm 0,86**	7,24 \pm 1,08	6 \pm 0,5 [§]	5,34 \pm 1,39 ^{§§}	6,12 \pm 0,84 [§]
Proteinuria (mg/L)	551 \pm 187	215 \pm 168** 214,8 \pm 167,88	118 \pm 49	101 \pm 63	431 \pm 167 [§]	32 \pm 10 [§]
Glükózuria (mmol/L)	ND	396 \pm 25*	414 \pm 40	335 \pm 32	471 \pm 35 [§]	445 \pm 19 [§]
FeNa	1,09 \pm 0,05	2,57 \pm 0,23*	1,16 \pm 0,08 [§]	0,6 \pm 0,02 [§]	1,2 \pm 0,05 [§]	1,06 \pm 0,06 [§]
Vizelet protein/kreatinin	0,12 \pm 0,02	1,77 \pm 0,89**	0,14 \pm 0,03 ^{§§§}	0,21 \pm 0,1 ^{§§§}	0,35 \pm 0,1 ^{§§}	0,04 \pm 0,02 ^{§§}

2. táblázat Kontroll, diabéteszes és kezelt diabéteszes állatok vesefunkciós paramétereit. * $p < 0,05$ vs. Kontroll; ** $p < 0,01$ vs. Kontroll; § $p < 0,05$ vs. Diabétesz; §§ $p < 0,01$ vs. Diabétesz; §§§ $p < 0,001$ vs. Diabétesz. FeNa – frakcionált nátriumürítés, ND – nem detektálható. (n=8/csoport; átlag \pm SD)

Eredmények 3/2.

Paraméter	Kontroll	Diabétesz (D)	D+FC03	D+FC03+NE100	D+ 2FC03	D+2FC03+NE100
Szérum kreatinin ($\mu\text{mol/L}$)	52,6 \pm 5,3	64,6 \pm 6,7*	59,8 \pm 4,2	54,8 \pm 7,1 ^{§§}	56,7 \pm 4,5 ^{§§}	67,2 \pm 5,8
Szérum karbamid	7,72 \pm 0,5	17 \pm 3,8**	11,9 \pm 2,4	11,9 \pm 1,5	8,61 \pm 1,05 ^{§§}	11,4 \pm 2,3 [§]
Nátrium (mmol/L)	147 \pm 4,46	135 \pm 3,1***	136 \pm 4,4	138 \pm 1	141 \pm 2 ^{§§}	140 \pm 2,3 ^{§§}
Kálium (mmol/L)	6,05 \pm 1,23	7,67 \pm 1,82**	7,57 \pm 1,38	6 \pm 0,5 [§]	5,34 \pm 1,39 ^{§§}	6,12 \pm 0,84 [§]
Proteinuria (mg/L)	402 \pm 87	187 \pm 79** 214,8 \pm 167,88	153 \pm 49	177 \pm 63	273 \pm 167 [§]	222 \pm 10 [§]
Glükózuria (mmol/L)	ND	319 \pm 75*	315 \pm 31*	337 \pm 32*	341 \pm 65 [§]	291 \pm 19 [§]
GFR (ml/min/100g)	3,11 \pm 0,13	1,51 \pm 0,97**	1,55 \pm 0,62	1,21 \pm 0,1 ^{§§§}	1,93 \pm 0,1 ^{§§}	1,33 \pm 0,04 ^{§§}

3. táblázat Kontroll, diabéteszes és kezelt diabéteszes állatok vesefunkciós paramétereit. * $p < 0,05$ vs. Kontroll; ** $p < 0,01$ vs. Kontroll; § $p < 0,05$ vs. Diabétesz; §§ $p < 0,01$ vs. Diabétesz; §§§ $p < 0,001$ vs. Diabétesz., ND – nem detektálható. (n=8/csoport; átlag \pm SD)

A DM következtében kialakuló nefropátiát jelzik az emelkedett vesefunkciós értékek, GFR csökkenése a hiponatrémia, hiperkalémia, a fokozott Na és fehérjeürítés (2-3. táblázat). A kezelések hatására javult a vesefunkció, csökkent a nátrium és fehérjeürítés és az aldosteron-antagonista csoportban mérséklődött a hiperkalémia. Mindezek az adatok igazolják az alkalmazott kezelések nefroprotektív hatását

Kísérlet 4. A RAAS gátlók és az FC03 hatásának vizsgálata a metabolikus paraméterek változására

A kontroll, D7 és kezelt csoportokban meghatároztuk a szérum glükóz, triglicerid, koleszterin, (atherogén tényezők) összfehérje, albumin Htk, Hb (DM és veseelégtelenség okozta anemizálódás jellemzésére) értékét.

Eredmények 4/1.

Paraméter	Kontroll	Diabétesz (D)	D+Enalapril	D+Lozartán	D+Spironolakton	D+Eplerenon
Testtömeg (g)	342 ± 13	260 ± 29 ^{***}	256 ± 42	250 ± 65	349 ± 29 ^{§§§}	273 ± 55
Vércukor (mmol/L)	11.6 ± 1.1	43.6 ± 3.2 ^{***}	35.6 ± 5.2 ^{§§}	36.1 ± 5.9 ^{§§}	33.2 ± 2.4 ^{§§§}	38.5 ± 4 ^{§§}
Össz koleszterin (mmol/L)	1.72 ± 0.43	4.1 ± 2.3 [†]	3.13 ± 1.64	2.72 ± 0.91	1.64 ± 0.32 ^{§§}	2.28 ± 0.44 [§]
LDL-koleszterin (mmol/L)	ND	1.63 ± 1.95 [†]	0.65 ± 1	0.48 ± 0.54	ND [§]	ND [§]
Triglicerid (mmol/L)	1.32 ± 0.17	4.94 ± 3.7 [†]	4.54 ± 5.17	2.45 ± 1.51	0.79 ± 0.29 ^{§§}	2.16 ± 1.17 [§]
Összfehérje (mmol/L)	65,8 ± 2,8	56,4 ± 3,8 ^{***}	59 ± 2	60 ± 1 [§]	60,6 ± 3,8 [§]	53 ± 4
Albumin (mmol/L)	42,8 ± 1,6	33,9 ± 1,8 ^{***}	34,2 ± 1,8	35 ± 2	35 ± 2	35,8 ± 1,6 [§]

4. táblázat *Kontroll, diabéteszes és kezelt diabéteszes állatok metabolikus paramétereit.* *p<0,05 vs. Kontroll; **p<0,01 vs. Kontroll; ***p<0,001 vs. Kontroll; §p < 0,05 vs. Diabétesz; §§p<0,01 vs. Diabétesz; §§§p< 0,001 vs. Diabétesz. ND – nem detektálható. (n=8/csoport; átlag ± SD)

Eredmények 4/2.

Paraméter	Kontroll	Diabétesz (D)	D+FC03	D+FC03+NE100	D+ 2FC03	D+2FC03+NE100
Testtömeg (g)	342 ± 18	276 ± 40 ^{***}	261 ± 22	237 ± 45	267 51 ^{§§§}	270 ± 45
Vércukor (mmol/L)	11.6 ± 3.1	42.4 ± 4 ^{***}	36.6 ± 6.2 ^{§§}	44.1 ± 12	29.2 ± 7.4 ^{§§§}	44.5 ± 4 ^{§§}
Össz koleszterin (mmol/L)	1.72 ± 0.43	2.2 ± 0.2 [†]	1.91 ± 2.1	2.18 ± 1.1	1.63 ± 0.92 ^{§§}	1.79 ± 0.14 [§]
Triglicerid (mmol/L)	0.58 ± 0.27	1.1 ± 2.7 [†]	1.54 ± 5.1	2.45 ± 1.51	0.79 ± 0.29 ^{§§}	2.16 ± 1.17
Összfehérje (mmol/L)	57.8 ± 2,2	44.4 ± 4,8 ^{***}	56 ± 2	46 ± 10	46.6 ± 2 [§]	47 ± 4

5. táblázat *Kontroll, diabéteszes állatok metabolikus paramétereit.* *p<0,05 vs. Kontroll; **p<0,01 vs. Kontroll; ***p<0,001 vs. Kontroll; §p < 0,05 vs. Diabétesz; §§p<0,01 vs. Diabétesz; (n=8/csoport; átlag ± SD)

Az állatok Hgb és Htk értékei nem különböztek az egyes csoportok között (anemizációt nem okozott a nefropátia). A D7 csoportban a fehérvérsejt-szám jelentősen magasabb volt ($7,85 \times 10^9/l$ vs. $3,33 \times 10^9/l$; p<0,01) a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az emelkedett leukocitaszám jól tükrözi a DM hatására kialakuló mikroinflammációs folyamatok jelenlétét.

Az STZ indukció hatására az állatok vércukra jelentősen emelkedett és kifejezett glükózúria alakult ki (4-5. táblázat). A vércukorértékeket az FC03 kezelések csökkentették, de a cukorürítést nem mérsékeltek. A cukorbeteg állatok testtömege csökkent a kontrollokhoz képest. A fogyást egyik kezelés sem védte ki. Adataink alapján feltételezhető, hogy a RAAS gátló kezelések és FC03 - főleg a kisebb dózisban - az cukorbetegségben renoprotektív hatásuk mellett, a szénhidrát-anyagcserét is jótékonyan befolyásolják. A spironolakton súlynövelő hatása háttérben enyhe ösztrogén-szerű hatása feltételezhető.

Kísérlet 5. A RAAS gátlás és a S1R kombináció hatásának vizsgálata**Eredmények 5/1.**

Paraméterek		Kontroll	Diabétesz (D)	D+RAM+FC03	D+LOS+FC03	D+SPI+FC03	D+EPL+FC03
MAP (mmHG)	Kezelés előtt	119 ± 14	111 ±15	108 ±23	100 ±11	108 ±13	112 ±12
	Kezelés után		116 ±25	121 ±19	110 ±12	112 ±14	122 ±22
Szívfrekvencia (bpm)	Kezelés előtt	397 ± 46	374 ±68	375 ±67	373 ±39	358 ±43	370 ±67
	Kezelés után		352 ±40	415 ±69	366 ±41	365 ±25	388 ±53
Szisztolés Vérnyomás (mmHG)	Kezelés előtt	141 ±21	136 ±13	134 ±20	127 ±14	134 ±14	142 ±15
	Kezelés után		138 ±19	147 ±20	135 ±12	139 ±13	147 ±20
Diasztolés Vérnyomás (mmHG)	Kezelés előtt	94 ±3	99,3 ±16,9	96,3 ±25,0	87,4 ±9,7	95,1 ±12,8	97,9 ±10,5
	Kezelés után		105,2 ±28	109 ±20	97,5 ±11,5	99,3 ±15,1	110 ±24

6. táblázat *Kontroll, diabéteszes és kombinációval kezelt diabéteszes állatok vérnyomás és pulzus adatai.* *p<0,05 vs. Kontroll; **p<0,01 vs. Kontroll; §p<0,05 vs. Diabétesz; §§p<0,01 vs. Diabétesz; §§§p<0,001 vs. Diabétesz., ND – nem detektálható. (n=8/csoport; átlag ± SD)

A kombinációs kezelés a vérnyomás és a pulzus értékét nem befolyásolta, ami alátámasztja, hogy a választott kezelések non-presszor dózisban történtek, tehát az észlelt változások függetlenek az alkalmazott szerek esetleges antihipertenzív tulajdonságától.

Eredmények 5/2.

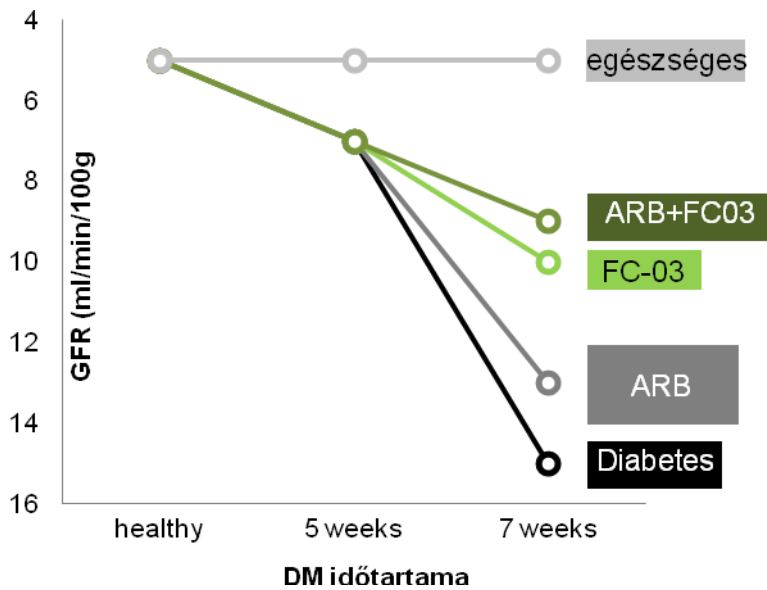
Paraméter	Kontroll	Diabétesz (D)	D+RAM+FC03	D+LOS+FC03	D+SPI+FC03	D+EPL+FC03
Szérum kreatinin (µmol/L)	52,6 ± 5,3	64,6 ±6,7*	57,8 ± 3,8§	56,58 ± 2,2§§	55,1 ± 3,5§§	54,2 ± 2,8§§
Szérum karbamid	7,72 ± 0,5	17 ± 3,8**	10,4 ± 1,3§§	9,93 ± 1,3§§	8,16 ± 1,8§§	8,5 ± 1,§
Nátrium (mmol/L)	147 ± 4,46	135 ± 3,1***	139 ± 4,4	134 ± 1	136 ± 2	135 ± 2,3
Kálium (mmol/L)	6,05 ± 1,23	7,67 ± 1,82**	5,7 ± 1,27§	6,3 ± 1,5§	4,74 ± 1,39§§	5,93 ± 0,14§
Proteinuria (mg/L)	402 ± 87	187 ± 79** 214,8 ± 167,58	153 ± 49	177 ± 63	363 ±207§	236 ± 170§
Glükózuria (mmol/L)	ND	319 ± 75*	102 ± 41*	204 ± 22*	258 ± 46§	268 ± 52§

7. táblázat *Kontroll, diabéteszes és kombinációval kezelt diabéteszes állatok vesefunkciós paramétereit.* *p<0,05 vs. Kontroll; **p<0,01 vs. Kontroll; §p<0,05 vs. Diabétesz; §§p<0,01 vs. Diabétesz; §§§p<0,001 vs. Diabétesz., ND – nem detektálható. (n=8/csoport; átlag ± SD)

Eredmények 5/3.

Paraméter	Kontroll	Diabétesz (D)	D+RAM+FC03	D+LOS+FC03	D+SPI+FC0	D+EPL+FC03
Testtömeg (g)	342 ± 18	276 ± 40***	291 ± 22	279 ± 34	287 ± 56§§§	291 ± 54
Vércukor (mmol/L)	11,6 ± 3,1	42,4 ± 4***	36,6 ± 2,5§§	38,5 ± 2,2	33,1 ± 6,6§§§	33,9 ± 4,5§§
Össz koleszterin (mmol/L)	1,72 ± 0,43	2,2 ± 0,2 [†]	1,91 ± 2,1	2,18 ± 1,1	1,63 ± 0,92§§	1,79 ± 0,14§
Triglicerid (mmol/L)	0,58 ± 0,27	1,1 ± 2,7 [†]	1,54 ± 5,17	2,45 ± 1,51	0,79 ± 0,29§§	2,16 ± 1,17
Összfehérje (mmol/L)	57,8 ± 2,2	44,4 ± 4,8***	44 ± 5	42 ± 3	45,3 ± 5,6	46 ± 5,5

8. táblázat Kontroll, diabéteszes és kombinációval kezelt diabéteszes állatok metabolikus paramétereit. *p<0,05 vs. Kontroll; **p<0,01 vs. Kontroll; ***p<0,001 vs. Kontroll; §p < 0,05 vs. Diabétesz; §§p<0,01 vs. Diabétesz; (n=8/csoport; átlag ± SD)



7. ábra GFR változása kontroll, diabéteszes, ramiprillel, illetve ramipril+FC03-mal kezelt diabéteszes állatokban (n=6/csoport)

Igazoltuk, hogy a kombinációs kezelés a vizsgált renális paraméterek szinte mindegyikében és a vércukor csökkentésében is szignifikánsan kedvezőbb hatással bírt, mint a monoterápia.

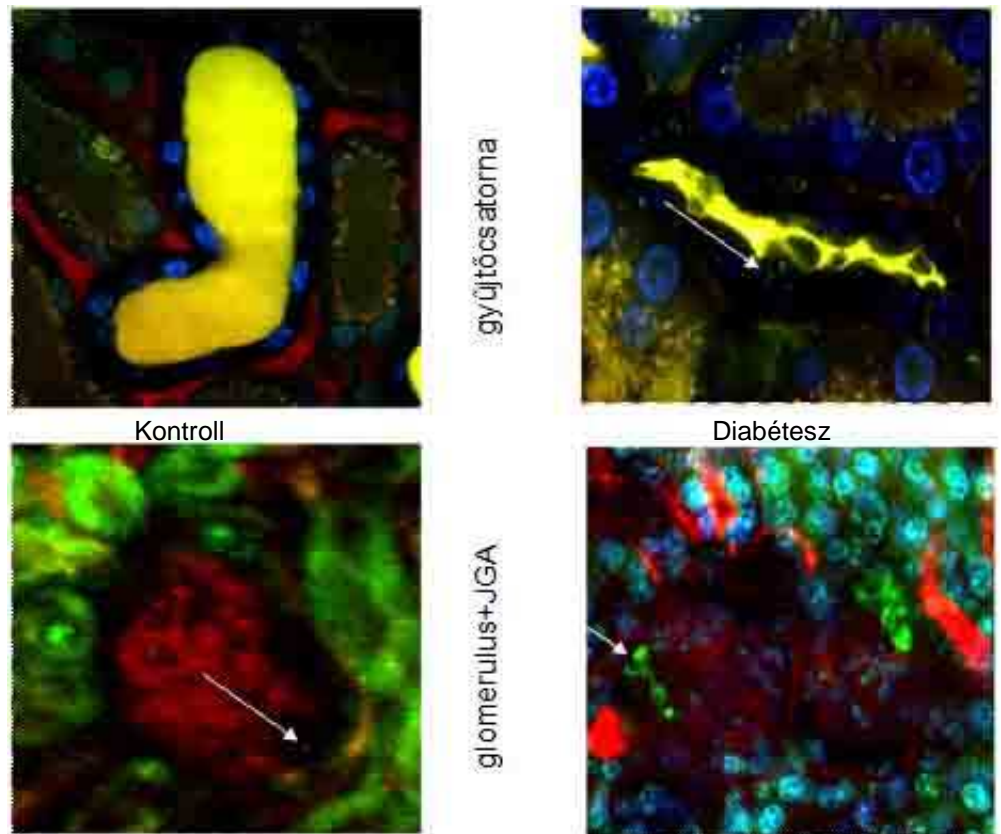
Kísérlet 6. A RAAS rendszer DM okozta aktivációjának és gátlásának vizsgálata

- *In vivo* multifoton mikroszkóppal vizsgáltuk a renin szekréciót (renin tartalmú granulumok megjelenése és renin tartalom mérése)

Eredmények 5/1.

7. ábra Kontroll (A-C) és diabéteszes (B-D) állatok renin szekréciója és renin-tartalmú granulumok (piros: rhodamin dextran (ér); zöld: quinacrin (renin); sárga: lucifer yellow (tubulus); kék: Hoechst (mag) (n=3/csoport). A nyilak a renin-tartalmú granulumokat jelölik.

In vivo elsőként mutattuk ki, hogy a krónikus vesekárosodást követően gyűjtőcsatornában is megjelennek a renin-tartalmú granulumok, melyek egészséges állatokban csak a juxtaglomeruláris apparátusában (JGA) ill. a proximális tubulusokban lokalizálódnak. A vesekárosodás során mindkét helyen nő a termelt renin mennyisége, ami hozzájárulhat DM-ben a RAAS rendszer aktiválódásához.



Kísérlet 7. Plazma renin és ANGII szintek meghatározása

Tekintettel arra, hogy az ANGII szint meghatározása patkány-szérumban bizonytalan és radioaktív módszerrel történhet csak, az ezekkel korreláló aldoszteron-szinteket határoztunk meg.

Eredmények 7/1.

	Kontroll	Diabétesz (D)	D+Enalapril	D+Lozartán	D+Spironolakton	D+Eplerenon
Plazma-Aldoszteron	12,4 ± 6,9	42,9 ± 21 [*]	26,1±25 [§]	20,4 ± 6 [§]	29 ± 12 [§]	30,6± 11 [§]

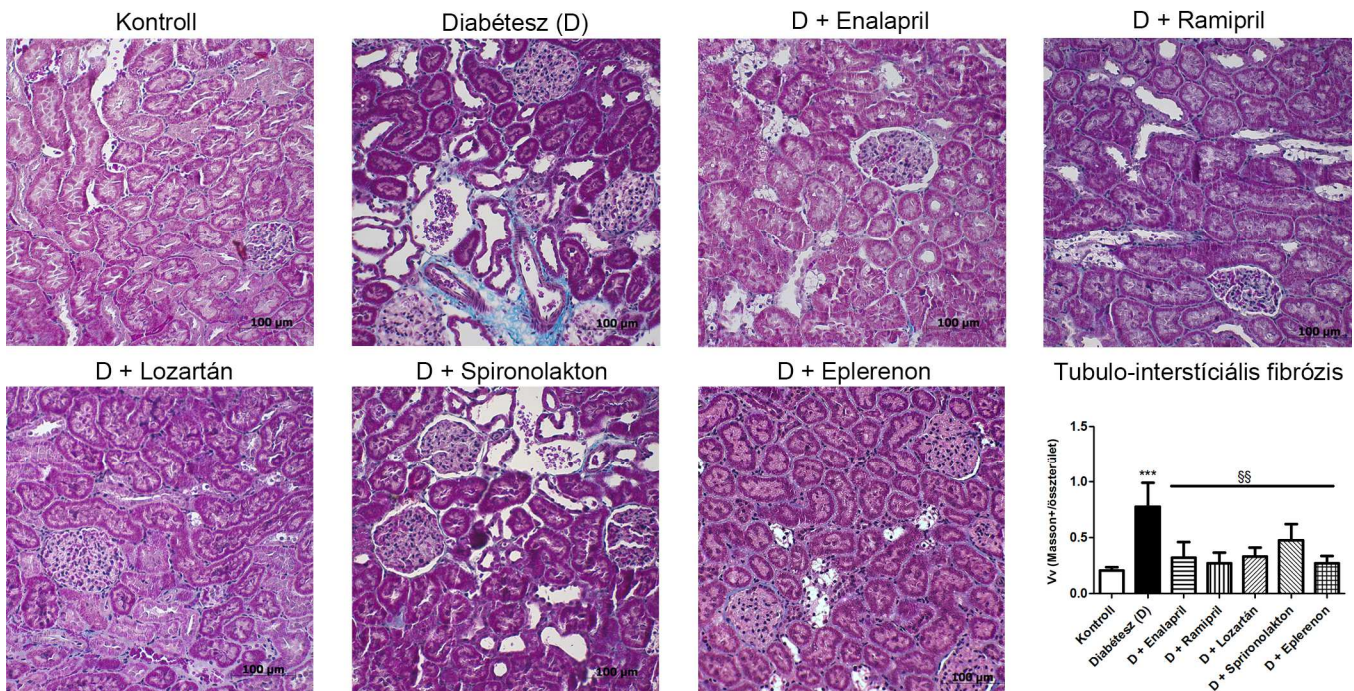
6. táblázat Kontroll, diabéteszes és kezelt diabéteszes állatok plazma aldoszteron szintje.*p<0,05 vs. Kontroll; §p<0,05 vs. Diabétesz; (n = 8/csoport átlag ± SD)

A különböző típusú RAAS gátlók hatékonyan csökkentették a szérum aldoszteronszintet, az aldoszteron-antagonisták gátló hatásában nem volt különbség (6. táblázat).

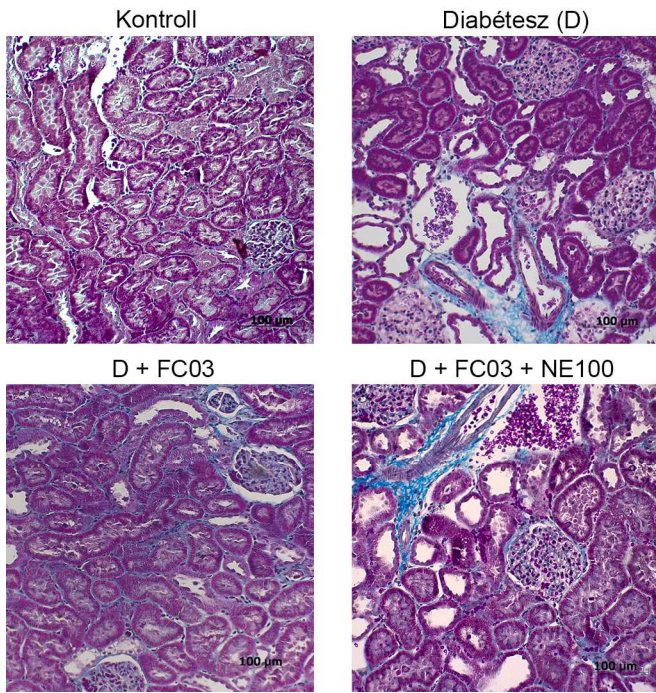
A RAAS inhibitorok és a S1R agonisták protektív szerepének tanulmányozása a DM okozta renális fibrózis kivédésében.

Ismert, hogy a DNP-ban a renális fibrózis központi jelentőségű a vesekárosodás szempontjából, mégis a fibrotikus léziók kialakulásához vezető mechanizmusok még mindig kevésbé körvonalazottak, antifibrotikus terápia egyáltalán nem áll rendelkezésre.

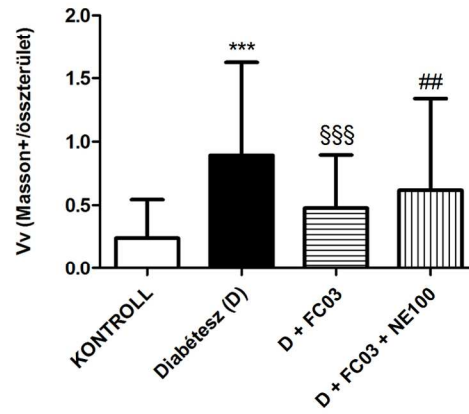
Kísérlet 8/1. A DM, a RAAS gátlás és az FC03 hatása a vese szövettani elváltozásaira



9. ábra Kontroll (A), diabéteszes (B) és kezelt diabéteszes állatok Masson festett vese szövettani képe Mezangiális számított terület (Vv). (n = 8/csoport átlag ± SD)

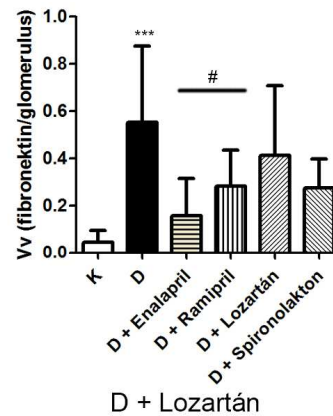
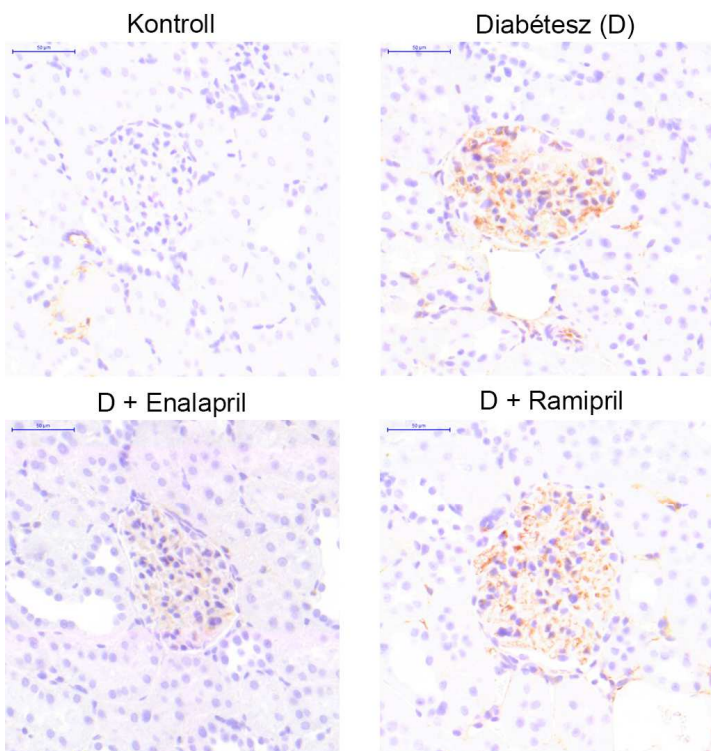


Tubulo-interstitiális fibrózis

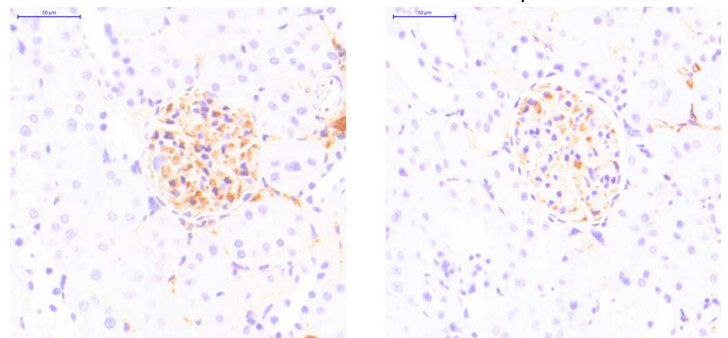


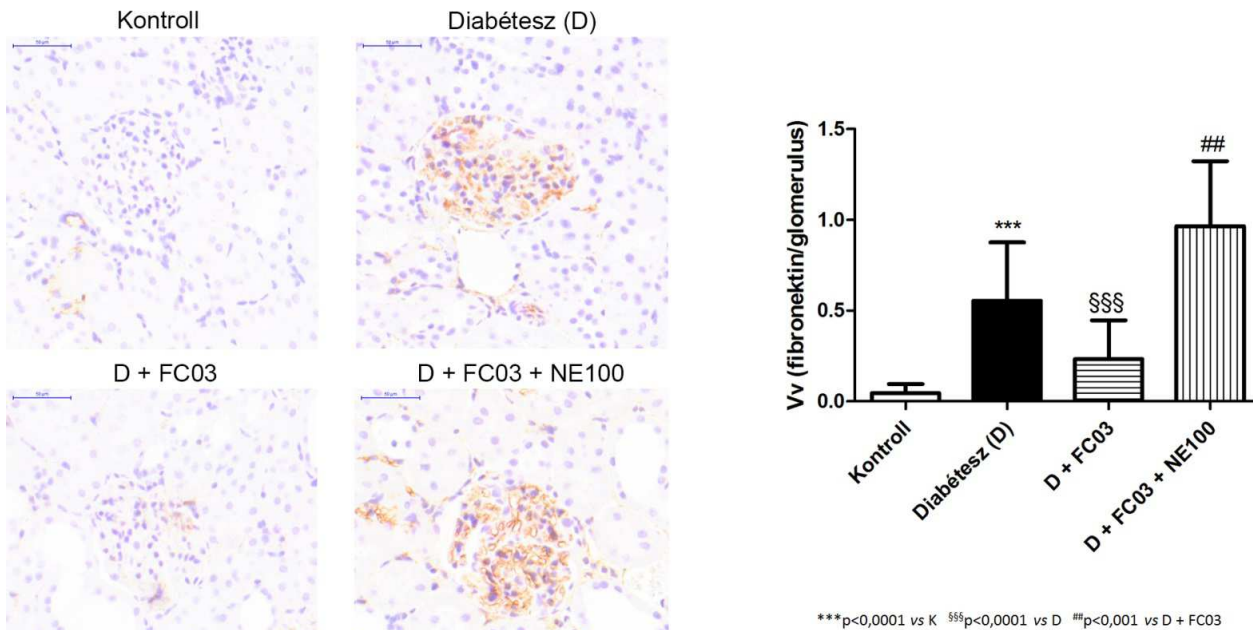
***p<0,0001 vs K §§§p<0,0001 vs D ##p<0,001 vs D + FC03

10. ábra Kontroll, diabéteszes és kezelt diabéteszes FC03 (20 mg/ttskg) ill.2FC03 (2mg/tskg) állatok Masson festett vese szövettani képe Mezangiális számított terület (Vv). (n = 8/csoport átlag ± SD)



11. ábra Kontroll, diabéteszes (D) és RAAS gátló kezelt diabéteszes állatok fibronectin veséjének reprezentatív szöveti képe (n=8/csoport; átlag ± SD; *p<0,005 vs K; #p<0,05 vs D)





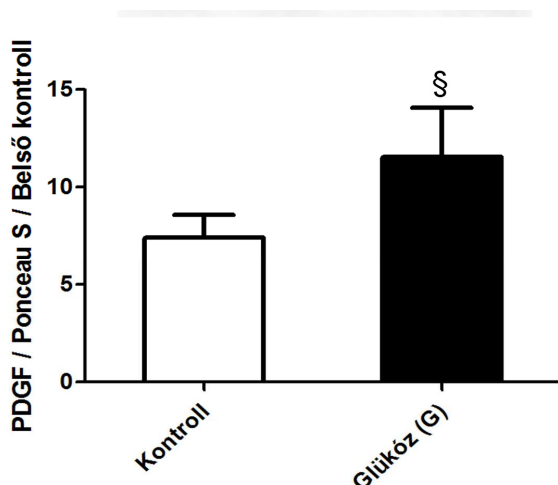
12. ábra Kontroll (A), diabéteszes (B) és kezelt diabéteszes FC03 (20 mg/ttskg) ill.2FC03 (2mg/tskg) állatok fibronektin festett veséjének reprezentatív szövettani képe Mezangiális számított terület (Vv). (n = 8/csoport átlag ± SD)

Az STZ kezelés renális fibrózist eredményezett, melyet a megnövekedett tubuláris atrófia igazolt. A DM-ben kialakuló fibrózisra specifikusabb fibronektin mennyisége is emelkedett a cukorbeteg állatokban. Mind a RAAS gátló kezelések, mind az FC03 mindkét dózisban jelentősen csökkentette a strukturális károsodást.

Kísérlet 8/2. A DM, a RAAS gátlás és az FC03 hatása a renális fibrózis molekuláris folyamataira.

Az elmúlt években *in vitro* igazolták, hogy a fibrózis folyamata során a renális tubuláris epitélisejtek miofibroblasztta transzformálódnak, aktin vázuk α -simaizom-aktin (α -SMA) által újrarendeződik. A miofibroblasztok migrációs kapacitással rendelkeznek, rezisztensek az apoptózissal szemben és extracelluláris mátrix összetevőket termelnek és fibrózist indukálnak.

Magas cukorkoncentráció (35mmol/l) hatása az epitélisejtek PDGF termelésére

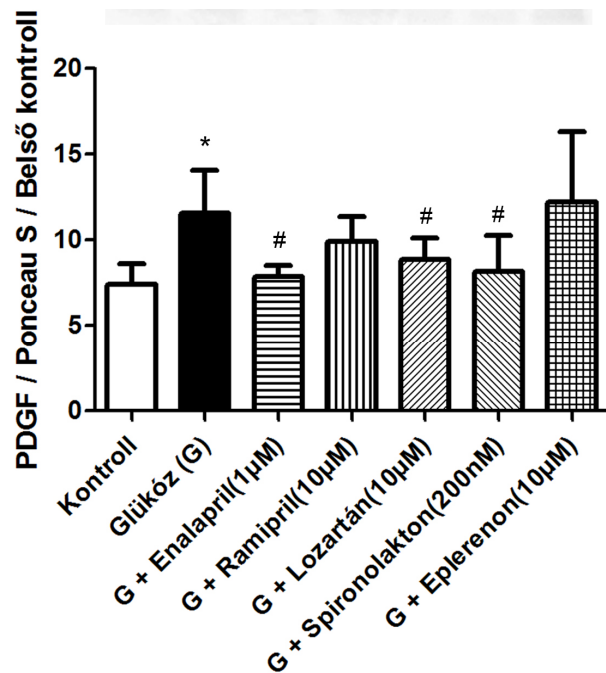


11. ábra Kontroll, magas glükóztartalmú (G) HK2 sejtek PDGF fehérjeszintje (n=6/csoport; átlag ± SD; §p<0,05)

Eredmények 8/2a.

A tubuláris epitélisejteknek 24 órás magas glükózon történő tenyésztést követően a fibrotikus hatású PDGF termelődése számottevően emelkedett.

Kísérlet 8/2b. RAAS gátlók hatása a magas cukor-koncentráció (35mmol/l) tartott sejtek PDGF termelésére



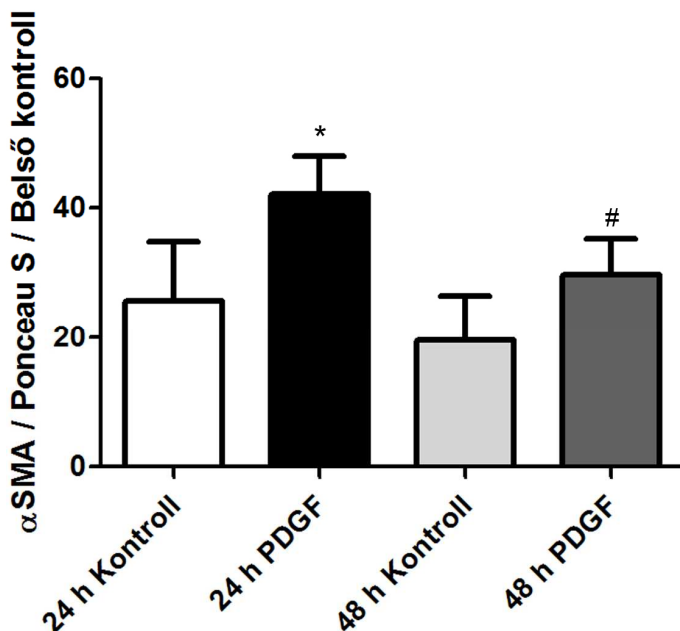
12. ábra Kontroll, magas glükóztartalmú (G) HK2 sejtek PDGF fehérjeszintje RAAS gátló kezelést követően (n=6/csoport; átlag ± SD; §p<0,05 vs.K; # p<0,05 vs.G)

Eredmények 2/2b. A HK2 sejtek magas glükóz hatására történő emelkedett PDGF termelődését a RAAS gátlók mindegyik csoportja, változó mértékben, de csökkentette.

A HK2 sejtek FC03 adását követő PDGF termelésének, illetve a teljes vesében a RAAS és FC03 kezelést követően a PDGF szint változásának mérése folyamatban van.

Kísérlet 82c. A PDGF kezelés hatásának vizsgálata a periciták α-SMA termelésére

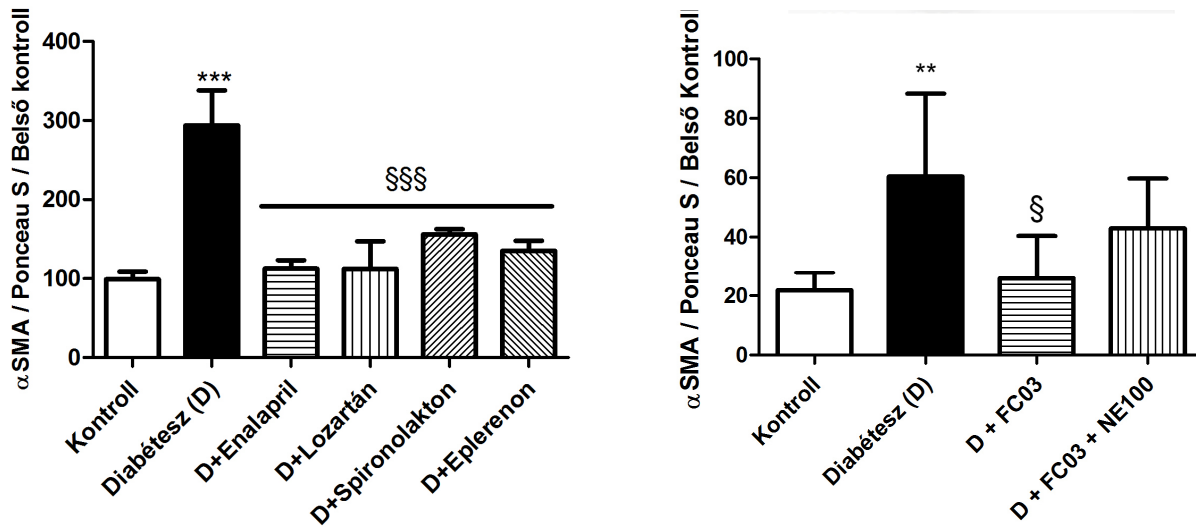
Bár a bőrben, illetve a szemben már ismert a PDGF periciták α-SMA termelődését kiváltó hatása, a vesét illetően nincs ilyen irodalmi adat, ezért első lépésben ezt igyekeztünk bizonyítani.



13. ábra NRK (pericita) sejtek α-SMA termelése 2ng/ml koncentrációjú 24, illetve 48 órás PDGF kezelést követően (n=6/csoport; átlag ± SD; *p<0,05 vs 24K; #p<0,05 vs. 48K)

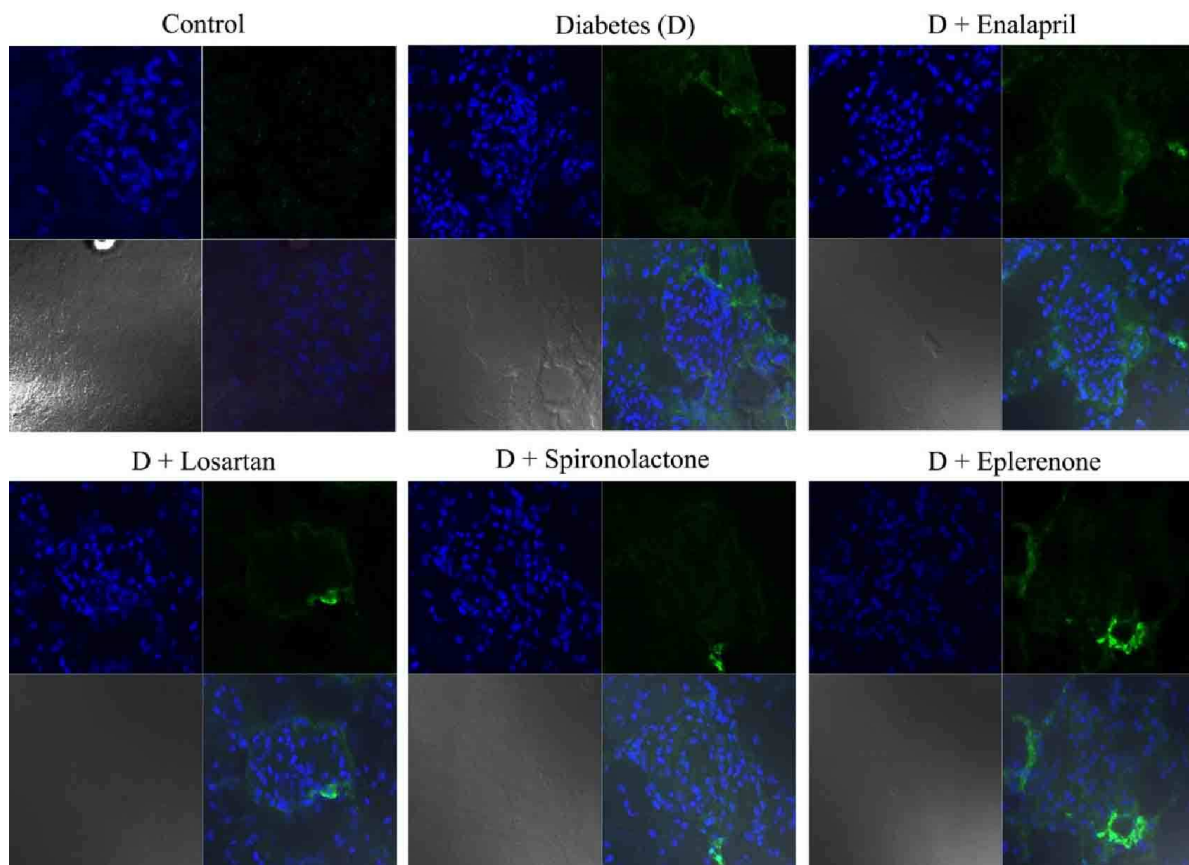
Eredmények 8/2c A tubuláris epitelsejteknek 24 órás magas glükózon történő tenyésztést követően a fibrotikus hatású PDGF termelődése számottevően emelkedett. A PDGF kezelés időtartama a növekedés mértékét nem befolyásolta.

Kísérlet 8/2d. A RAAS gátló, illetve FC03 kezelés hatásának vizsgálata a renális α -SMA termelésére

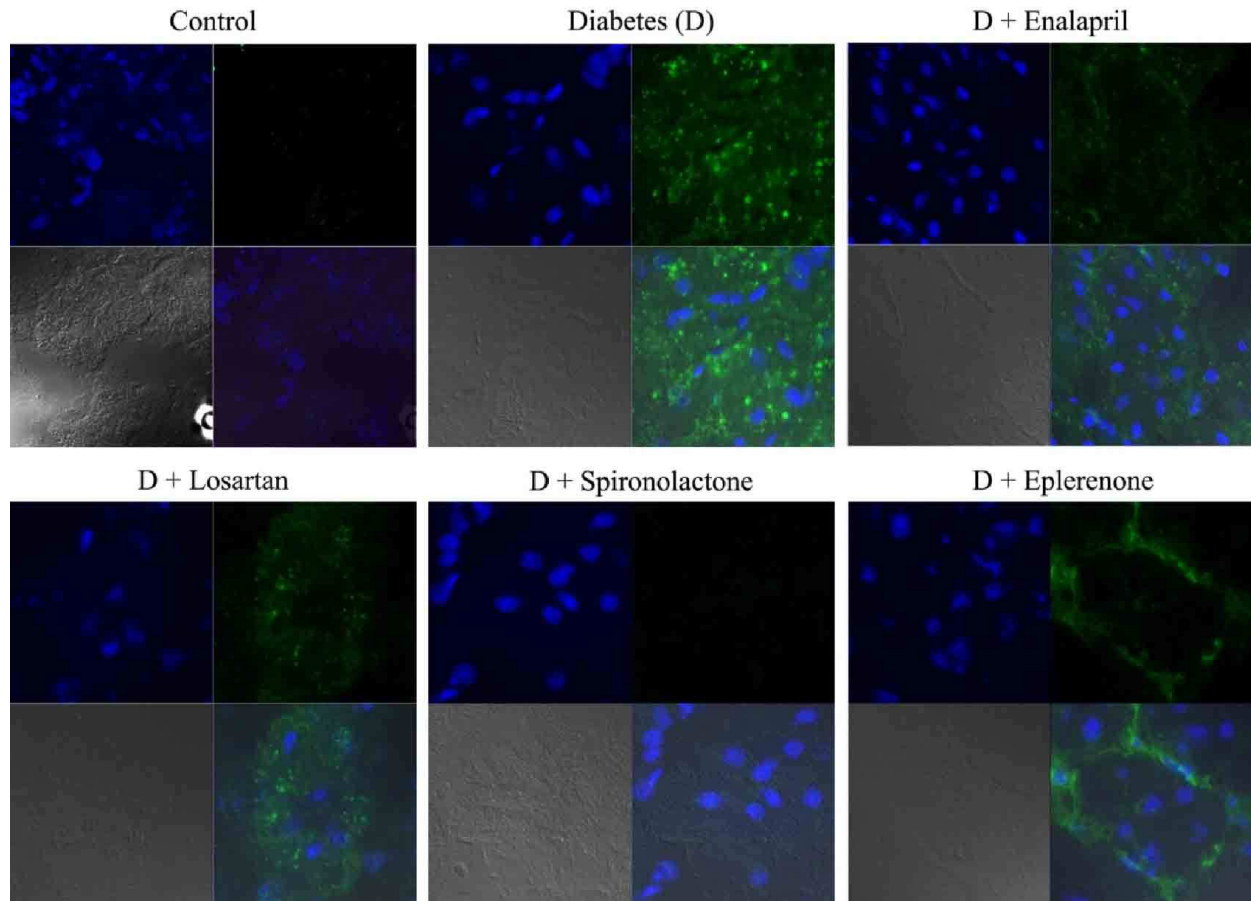


14. ábra Teljes vesehomogenizátum α -SMA termelése kontroll, diabéteszes és kezelt diabéteszes állatokban (n=6/csoport; átlag \pm SD; *p<0,05 vs 24K; #p<0,05 vs. 48K)

Eredmények 8/3.



15. ábra Reprezentatív képek az α -SMA (zöld) lokalizációjáról kontroll illetve diabéteszes és diabéteszes kezelt állatok glomerulusaiban. A sejtmagokat kékkel festettük. (63x nagyítás, Zeiss-LSM konfokális mikroszkóp)



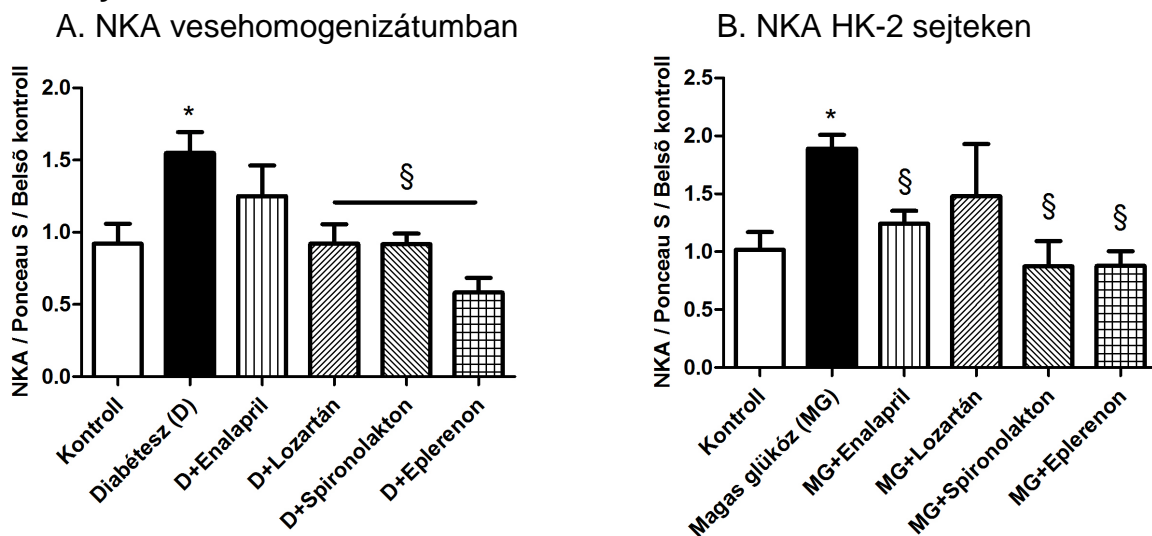
16. ábra Reprezentatív képek az α -SMA (zöld) lokalizációjáról kontroll illetve diabéteszes és diabéteszes kezelt állatok tubulusaiban. A sejtmagokat kékkel festettük. (63x nagyítás, Zeiss-LSM konfokális mikroszkóp)

Kontrollokban α -SMA kizárólag az erek mentén jelent meg (így pl. a glomerulus érhálózatában), DM hatására glomerulus-szerte, illetve a tubulusok közötti interstíciumban is fokozódott a mennyisége.

Eredményeink arra utalnak, hogy DM-ben már önmagában a megnövekedett vércukorszint beindítja a vesében a fibrózis előfolyamatának tekinthető EMT kialakulását, melyet a RAAS gátló kezelések – elsődlegesen az aldoszteron antagonisták jótékonyan befolyásolnak. Mindezek alapján felmerül, hogy a RAAS inhibitorok – antihipertenzív tulajdonságuk mellett – a fibrotikus átalakulás direkt gátlásán keresztül is nefroprotektív hatásúak a DM vesekárosodás kialakulásában. A α -SMA termelődésért feltehetően a vese pericitái felelősek. Ez a hatás potenciálisan új terápiás célpontja - esetleges szabadalmi lehetősége – lehet a RAAS gátlók alkalmazásának.

Kísérlet 9. A RAAS gátlók hatása az NO rendszer fehérjéinek (S1R. Akt, eNOS, nNOS, Na/K ATPáz változására

Eredmények 9/1.

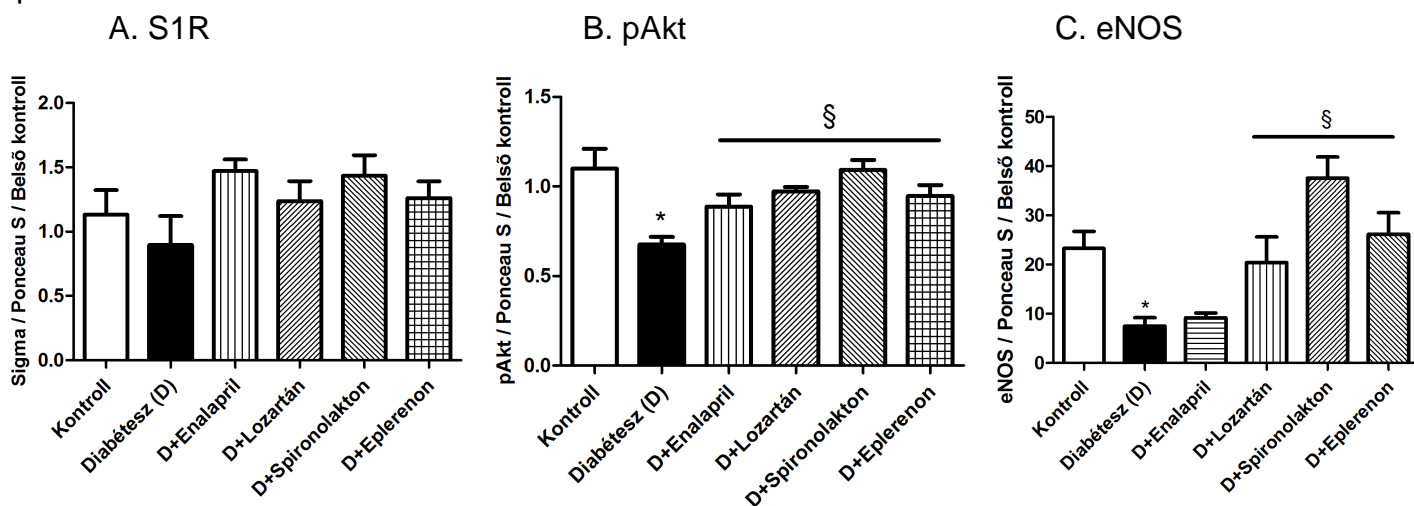


17. ábra A Na/K ATPáz (NKA) fehérje mennyiségi változása kontroll, diabéteszes, illetve diabéteszes kezelt állatok vesehomogenizátumában (4A). NKA fehérje mennyisége kontroll, magas cukortartalmú (35mmol/l) és magas cukor+kezelés HK-2 proximális tubulussejt kultúrában (4B). *p<0,05 vs. Kontroll; §p<0,05 vs. Diabétesz; §§p<0,01 vs. Diabétesz; §§§p<0,001 vs. Diabétesz. (n=8/csoport; átlag ± SD)

DM-ben fokozódott a NKA fehérjeszintje a kontrollokhoz képest, a növekedést az enalapril kivételével az összes kezelés mérsékelte, legkifejezettebb hatása az eplerenonnak volt (A ábra). Hiperglikémiás sejteken hasonló változásokat észleltünk, bár a lozartán itt nem bizonyult hatékonynak(B ábra). Ez arra utal, hogy az *in vivo* körülmények között észlelt változás tehát nem az inzulinhiány, hanem inkább a hiperglikémia következménye (4B ábra). Bár a mannóz kezelés hatására is emelkedett a NKA expressziója, ez jelentősen elmaradt a hiperglikémiában észlelt növekedéstől. (Data not shown). Mindez arra utal, hogy a növekedés nem a glükóz ozmotikus aktivitásának, hanem a glükóz direkt toxicitásának következménye.

Eredmények 9/2.

Alveolaris epithelsejteken igazolták, hogy a NKA inzulin hatására észlelt transzlokációjához az Akt szerin-foszforilációja elengedhetetlen. Mi arra kerestük a választ, hogy hasonló patomechanizmus aktiválódik-e a vesében is DM hatására.



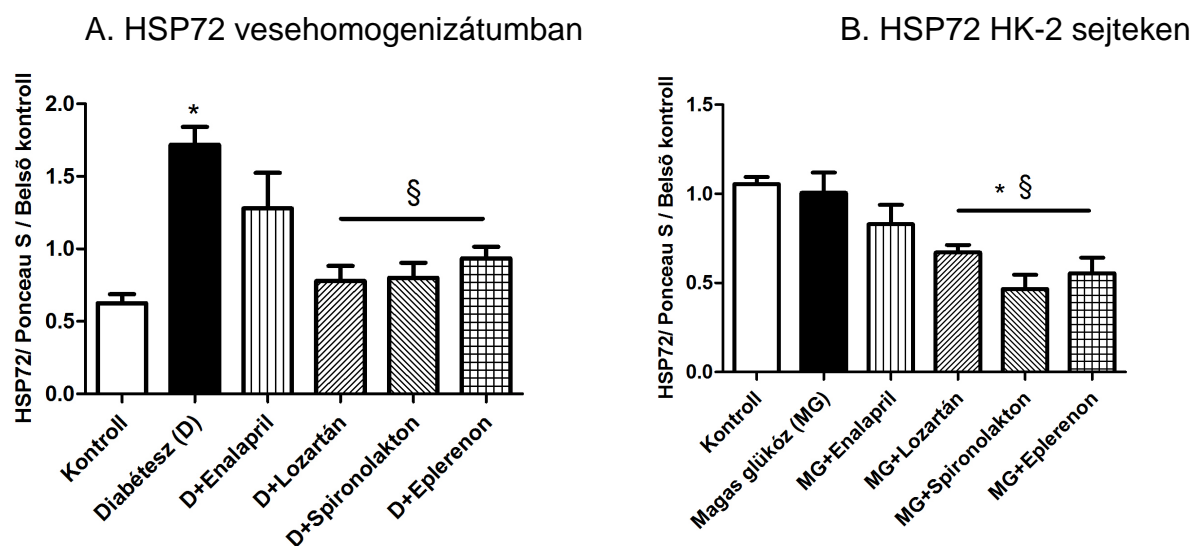
18. ábra Sigma-1 receptor (Sigma 1R; A), pAkt (B) és eNOS (C) fehérje mennyiségi változása kontroll, diabéteszes, illetve diabéteszes kezelt állatok vesehomogenizátumában. * $p < 0,05$ vs. Kontroll; § $p < 0,05$ vs. Diabétesz; (n=8/csoport; átlag \pm SD)

Kimutattuk, hogy DM hatására a S1R szintje csökkent, a csökkenést a kezelések mérsékeltek és kontroll szintjére állítottak vissza (A ábra). Bár DM-ben az Akt össz mennyisége nem változott, a fehérje foszforilációja jelentősen csökkent (B ábra). Az egyes RAAS gátló kezeléseket követően az aktivitás a kontroll szintre tért vissza. A vazodilatatív tulajdonságán keresztül nefroprotektív hatású eNOS mennyisége DM-ben jelentősen kevesebb (C ábra), a RAAS gátló kezelések – az enalapril kivételével – növelik az eNOS szintet. Az eNOS mennyiségét leghatékonyabban az aldoszteron antagonisták emelték.

Eredményeink felvetik az Akt-eNOS aktiváció szerepét a NKA membránhoz történő lokalizációjában, valamint a kezelések hatására történő fokozott Akt aktivitásra utalnak. A jelenség hátterében valószínűleg nem a Sigma-1R változása, hanem más jelátviteli út áll.

Eredmények 9/3.

Az Akt mellett, chaperon hatása révén, a HSP72 is szerepet játszik a membránstabilitás megőrzésében és így a NKA bazolaterális lokalizációjának és funkciójának fenntartásában. Meghatároztuk a HSP72 változását DM és RAAS gátló kezelés hatására.



19. ábra A HSP72 fehérje mennyiségi változása kontroll, diabéteszes, illetve diabéteszes kezelt állatok vesehomogenizátumában (A). A HSP72 mennyisége kontroll, magas cukortartalmú (35mmol/l) és magas cukor+kezelés HK-2 proximális tubulussejt kultúrában (B) * $p < 0,05$ vs. Kontroll; § $p < 0,05$ vs. Diabétesz; (n=8/csoport; átlag \pm SD)

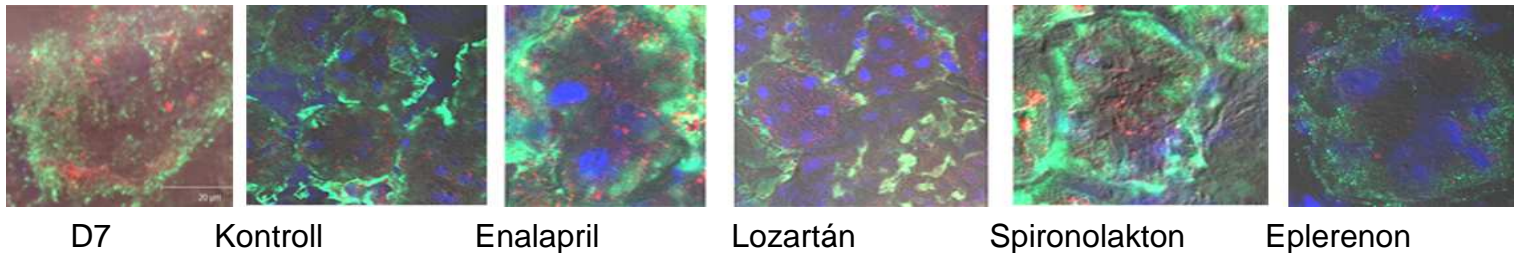
Kísérleteinkben az STZ-DM okozta károsodás kivédésére a HSP72 szintje nőtt, melyet az összes kezelés mérsékelte (A ábra). A hiperglikémiás modellben nem találtunk a cukor hatására hasonló változást (B ábra).

Eredmény 9/4.

Patológiás körülmények között a NKA kifejeződése és megjelenési helye megváltozik az enzim NKA élettani helyéről, a bazolaterális membránból a sejtplazmába kerül át, így működése zavart

szerved. Fluroesczens immunhisztokémiával vizsgáltuk a fenti fehérjék renális lokalizációját, illetve esetleges kihelyeződését

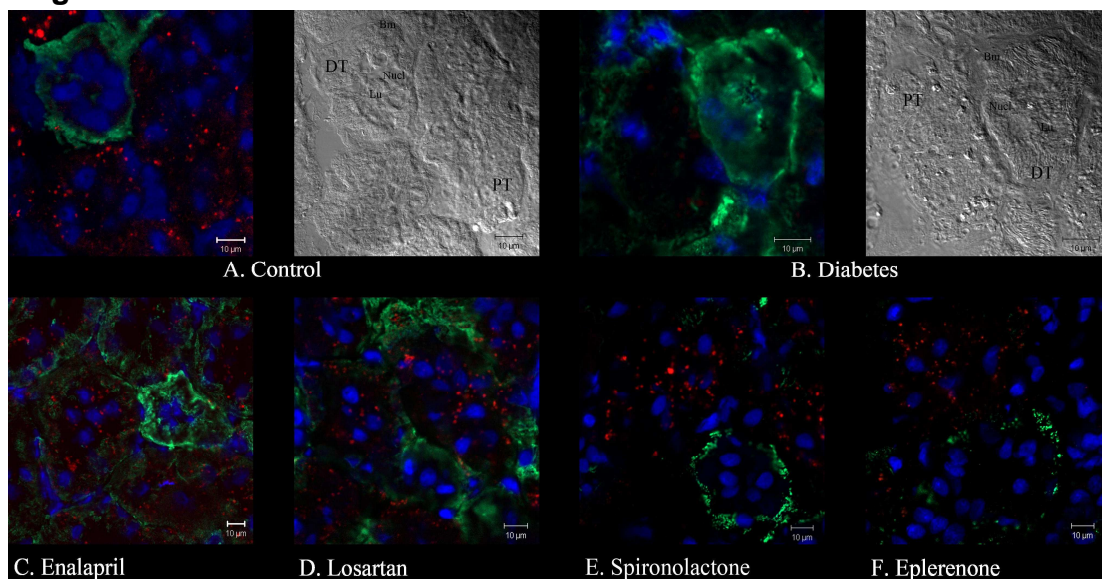
a. NKA és HSP72 ko-lokalizáció



20. ábra Reprezentatív képek a HSP72 (piros) és a NKA α -1 (zöld) ko-lokalizációjáról, diabéteszes, illetve kezelt állatok proximális tubulus-sejtjeinn. A sejtmagokat kékkel festettük. (63x nagyítás, Zeiss-LSM konfokális mikroszkóp)

A tubulus epithelsejtek NKA α -1 alegységének membrán lokalizációja csökkent DM-ben, az enzim átkerült a citoszólba, illetve az apikális membránra. Ezzel párhuzamosan a HSP72 expressziója fokozódott, lokalizációja a NKA-val megegyezett. Bár különböző mértékben, de mindegyik kezelés kivédte a NKA citoszólba, illetve membránra történő kihelyeződését (20ábra).

b. NKA és Sigma-1R kolokalizáció

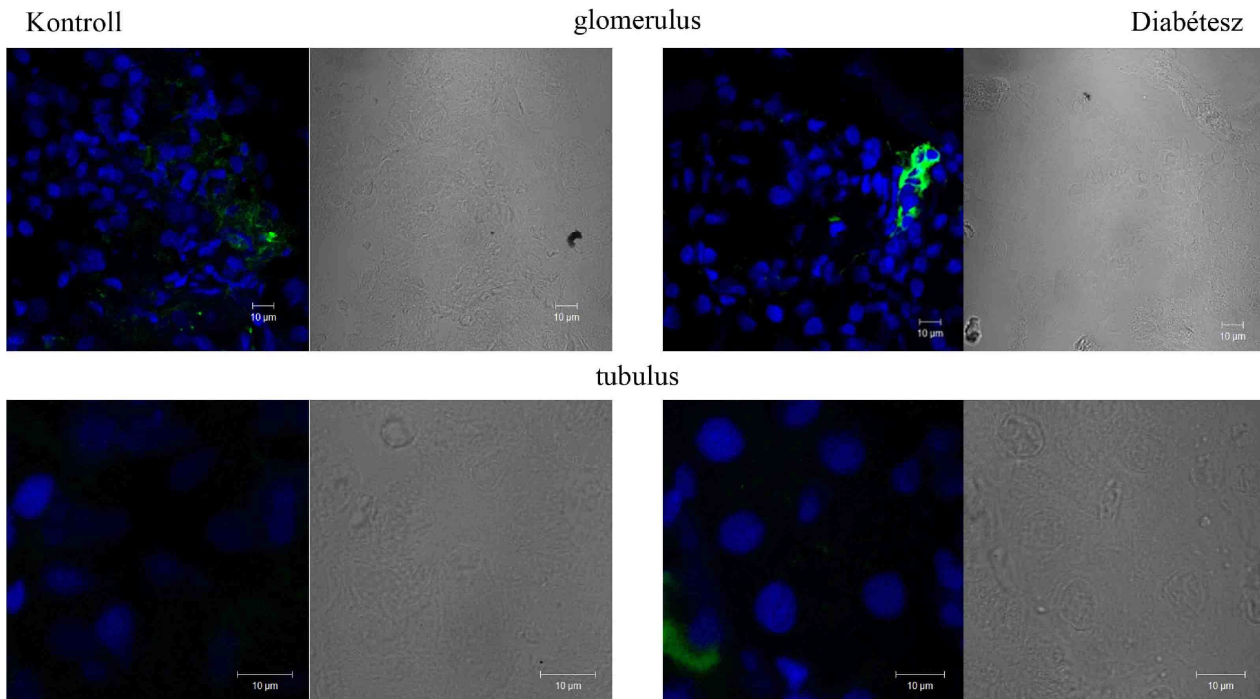


21. ábra Reprezentatív képek a Sigma-1R (piros) és a NKA α -1 (zöld) ko-lokalizációjáról, diabéteszes, illetve kezelt állatok proximális tubulus-sejtjeinn. A sejtmagokat kékkel festettük. (63x nagyítás, Zeiss-LSM konfokális mikroszkóp PT–proximális tubulus, DT–disztális tubulus, Bm–bazál membrán, Nucl – sejtmag, Lu – tubulus lumen)

A S1R szerepét és lokalizációját a vesében mindeddig kevésbé vizsgálták. Elsőként mutattuk ki, hogy a S1R a glomerulusokban egyáltalán nem expresszálódik, előfordulása inkább a vese tubulussejtekre – elsősorban a proximális tubulusokra korlátozódik (21 ábra). DM-ben minimális expressziót detektáltunk, mely a RAAS gátló kezelések hatására a proximális tubulussejtekben jelentősen növekedett. Ezekben a sejtekben, a S1R az endoplazmatikus membránból a citoszólban helyeződve járul hozzá az eNOS foszforilációjához és aktivációjához.

9/5. nNOS alfa lokalizáció

Az nNOS lokalizációja DM vesében mindeddig ismeretlen volt. Kimutattuk, hogy míg kontroll vesében az nNOS szinte kizárólag a glomerulusok juxtaglomeruláris apparátusának megfelelő területre lokalizálódik (22 *ábra felső panel*); DM-ben megjelenik a proximális tubulusok bazális membránjának környezetében (23 *ábra alsó panel*). A RAAS gátló kezelések hatásának értékelése, illetve az nNOS mennyiségi változásának vizsgálata folyamatban van.



23 ábra Reprezentatív képek az nNOS (zöld) lokalizációjáról kontroll illetve diabéteszes, állatok veséjében (proximális tubulus és glomerulus). A sejtmagokat kézzel festették. (63x nagyítás, Zeiss-LSM konfokális mikroszkóp)

Eredmények rövid összefoglalása:

STZ diabéteszes patkánymodellben elsőként igazoltuk, hogy a cukorbetegséghez társuló depressziót tüneteit a különböző RAAS gátló kezelések mérsékeltek. A patofiziológiai háttér részletes feltérképezése a következő évekre várható, azonban ezek az eredmények ígéretes kiindulást jelentenek a depresszió és a DM közös útvonalának vizsgálatához, illetve a RAAS gátlók depresszióban történő alkalmazásához.

Kísérleti modellünkben STZ indukciót követően az állatokban típusos DNP-re utaló funkcionális károsodások alakultak ki, melyet szövettanilag egyértelműen a renális fibrózisra jellemző strukturális változások kísértek. Kimutattuk, hogy a RAAS gátló kezelés direktén – a vese pericitáira – hatva csökkenti a renális fibrózist, mely a RAAS inhibitorok pleiotrop hatásának új irányára mutat. Vizsgálataink alapján megalapozottnak tűnik az aldoszteron-antagonisták monoterápiás hatékonysága a DNP kezelésében. Az eddig kizárólag szívbetegségben használt, kevés anti-androgén mellékhatással bíró eplerenon ígéretes új szer lehet a cukorbetegség veseszövődményeinek megelőzésében.

Eredményeink alapján cukorbetegségben nő a tubuláris NKA és HSP72 mennyisége, megváltozik lokalizációja, melynek hátterében inkább a hiperglikémia, mint az inzulinopénia szerepe feltételezhető. A RAAS gátló kezelések, az ACE inhibitorok kivételével, a NKA mennyiségét csökkentik, citoszólba történő kihelyeződését megakadályozzák, részben az emelkedett HSP72 okozta fokozott chaperonhatás, részben az Akt-eNOS foszforiláció serkentésén keresztül. Ezek a változások alátámasztják ezen fehérjék esetleges szerepét a DNP kialakulásában. Az egyes RAAS gátlók különböző hatás-mintázattal védték ki / gátolták a DNP okozta károsodásokat, mely magyarázhatja eltérő klinikai hatékonyságukat a cukorbetegség szövődményeinek megelőzésében.

Az FC03 tesztmolekulával végzett kísérleteink eredményei egy olyan új patofiziológiai útvonal és antifibrotikus szer jelentőségét támasztják alá, mely ígéretes új szer lehet a cukorbetegség veseszövődményeinek megelőzésében. Igazoltuk, hogy a kombinációs kedvezőbb hatású, mint a monoterápia. Ismerve a két szer eltérő támadáspontját és hatásmechanizmusát feltételezzük, hogy szinergista hatásról van szó, ami a későbbi terápia és gyógyszeripari hasznosítás szempontjából is előnyös lehet.

A BESZÁMOLÁSI IDŐSZAK (2010.okt - 2013. okt.) EREDMÉNYEINEK ÖSSZEGZÉSE

A Pályázó vezetésével részben az OTKA támogatásnak köszönhetően megalakulhatott egy zömében PhD hallgatókból és fiatal posztdoktorokból álló - önálló kutatócsoport. Egyéb pályázati keretből, kutatóhelyi támogatásból több új, nagykötségű műszer került beszerzésre, jelentősen javítva a Kutatólabor infrastruktúráját. Több, új hazai és nemzetközi kooperációt is kezdeményeztünk (KOKI, SE Élettani Intézet, Sebészeti Klinika, Kórélettani Intézet, University of Washington,).

A tervezett kísérletek jelentős részét sikerrel megvalósítottuk. A kísérletsorozat eredményeit 9 nemzetközi, 6 magyar publikációban, 2 könyvfejezetben és számos nemzetközi, illetve hazai előadás formájában mutattuk be. A beszámolási időszakban 2 hallgató szerezte meg PhD fokozatát, TDK és rektori pályamunkák részesültek díjazásban, az eredmények jelentős része a pályázat kapcsán született. Folyamatban van egy szabadalmi bejelentés is a renális fibrózis gátlására. Pályázó a beszámolási időszakban számos szakmai díjban (MTA Miklós György díj, Hugonnai Vilma emlékérem, Talentum akadémiai díj, ERA-EDTA National Grant, EU Masterclass Grant) részesült, Lendület pályázatot nyert és gyermekgyógyászat szakvizsgát szerzett.