

A podocita károsodás molekuláris mechanizmusainak vizsgálata diabéteszben

Doktori tézisek

Pappné Dr. Fang Lilla

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kökény Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Haris Ágnes, Ph.D., főorvos
Dr. Reismann Péter, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Reusz György, az MTA doktora,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Fekete Andrea, Ph.D., egyetemi tanársegéd
Dr. Vörös Péter, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest
2015

1. BEVEZETÉS

A glomerulusban található vizcerális epiteliális sejtek, vagyis a podociták fontos szerepet játszanak a glomeruláris filtrációs barrier szerkezetének és funkciójának megtartásában. Humán és kísérleti modelleken végzett megfigyelések a podocita károsodást a diabéteszes nefropátia egyik korai indikátoraként azonosítják, azonban a podocita károsodás molekuláris mechanizmusai nem teljesen ismertek, terápiája nem megoldott.

1.1 Szelektív foszfodiészteráz 5 gátlás diabéteszes nefropátiában

A diabéteszben fokozódó intraglomeruláris nyomás és ennek következtében kialakuló glomeruláris hipertenzió csökkentése a ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) – nitrogén monoxid (NO) tengely befolyásolása révén is lehetséges. NO hatására a vese erei dilatálnak, beleértve az afferens arteriolákat is.. Az NO hatását az intracellulárisan termelődő cGMP közvetíti, amely az erek simaizom-relaxációját váltja ki. Hemodinamikai folyamatok mellett, az NO közvetítő cGMP részt vesz a glomeruláris filtráció szabályozásában, a rés-diafragma és a citoskeleton átrendeződés befolyásolása révén. Foszfodiészteráz-5 (PDE5) enzim bontja a cGMP-t, PDE5 gátlókkal pedig a vaszkuláris cGMP-NO útvonal serkenthető. A PDE5 gátlók (szildenafil, tadalafil, vardenafil) a cGMP szint emelkedését teszik lehetővé, és elsősorban erektilis diszfunkció kezelésére használják, minthogy a pénisz ereinek elernyedését elősegítve a barlangos test könnyebben telítődik. A PDE5 enzim bőségesen kimutatható a vesében is. Nefropátiában fokozódik a foszfodiészterázok aktivitása, ennek következtében lecsökken a cGMP mennyisége, és így közvetve csökken az NO hatása is. Foszfodiészterázgátlókkal a cGMP szint normalizálható. A megnövekedett cGMP szint feltehetőleg fokozza az NO hatást, és emiatt a glomeruloszklerózis kialakulása lelassul. Ezen az elgondoláson alapszik számos kutatás napjainkban, amelyek a PDE inhibitorok működését vizsgálják a különböző nefropátiákban. Diabéteszes nefropátiában még kevés adat áll rendelkezésre a foszfodiészterázok aktivitására vonatkozóan, de azok eredménye, illetve más nefropátiákban való jótékony

hatása alapján a foszfodiészterázgátló kezelés diabéteszes nefropátiában is létjogosultságot kaphat.

Diabéteszes nefropátiában az NO-cGMP rendszer homeosztázisa több ponton károsodik: az oxidatív stressz miatt elégtelenné válik az eNOS működése; az NO-t reaktív oxigén gyökök (ROS) hatástalanítják, a megvastagodott endotheliális bazális membránon keresztül csökken az NO penetráló képessége. Továbbá a cGMP degradáció felgyorsul, amint az oxidált sGC funkciózavara miatt csökken a cGMP szintézis, illetve a cGMP-t katabolizáló PDE-k aktivitása megnő. Végeredményben lecsökken az NO-függő cGMP hatás.

Kutatásunk során azt vizsgáltuk, hogy a PDE5 inhibitor vardenafil képes-e megőrizni a podocita funkcionális épségét, képes-e csökkenteni a podocita károsodást streptozotocin-indukált 1-es típusú cukorbetegség patkány modelljén. Modellünkben a vardenafil kezelés megemelte a szérum cGMP szintet, illetve a podociták intracelluláris cGMP szintjét, csökkentette a proteinuria mértékét, csökkentette a podocita károsodást és helyreállította a nefrin és podocin expressziót.

1.2 A SCAI fehérje szerepe diabéteszes nefropátiában

A DN kutatásokban, terápia mellett, sok figyelmet kap újabb jelátviteli útvonalak megismerése is. A SCAI molekula – rákos sejtek invázióját szuprimáló molekula (suppressor of cancer cell invasion)- egy újonnan azonosított transzkripció kofaktor, amelynek szabályozása kulcsfontosságúnak ígérkezik a rákos megbetegedésekben. A SCAI és a Wnt/ β -katenin útvonal szoros kapcsolatát írták le a glióma patogenezisében, illetve a SCAI expresszió befolyásolásával a glióma progressziója is arányosan változik. A rákos folyamatokban túlműködő Wnt jelátviteli útvonal 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben szintén túlműködik. A SCAI bízató hatásai rákos megbetegedésekben felvetik a kérdést, hogy ha a SCAI és Wnt/ β -katenin útvonal egymással összefügg, a DN patomechanizmusában miként alakul a SCAI molekula működése.

Brandt és mtsai. 2009-ben írták le –a korábban hipotetikus- SCAI fehérjét, amely az invazív sejt migráció szabályozásában játszik szerepet. A SCAI erősen konzervált szerkezetet és széleskörű szöveti megoszlást mutat a gerinceseknél. SCAI hiányában extrém mértékben nő a β 1-integrin gén expressziója, amely egy adhéziós

sejtfelszíni receptor. Az integrinek hatására fokozódik az aktin felhalmozódás, közvetlenül aktiválják az aktin polimerizációt, illetve az aktin citoskeletonhoz kötik az extracelluláris mátrixot. Az α -simaizom-aktin (α -SMA), az aktin hatféle izoformája közül az egyik, a fibrózisban jelentős szerepet játszó miofibroblasztok legjellemzőbb markere. Vesében az α -SMA intersticiális upregulációja aktiválja a miofibroblasztokat, mindez pedig korrelál az intersticiális fibrózis mértékével. A Wnt/ β -katenin jelátvitel ugyancsak érintett a mezangiális sejtek epitheliális-mezenchimális átalakulásának (EMT) folyamatában, diabéteszben. A TGF- β fontos közvetítő molekula a magas vércukorszint okozta EMT kialakulásában, melyben a mikroRNS-ek (miR) is szerepet játszanak. A miR-ek rövid, körülbelül 20-24 nukleotid hosszúságú, fehérjét nem kódoló, egyszálú RNS molekulák, melyek a velük részlegesen komplementer szekvenciájú mRNS-hez kapcsolódva a célmolekulák lebontását eredményezik, így gátolva az expressziót. A miR-215 célpontja a β -katenin-közvetítő-fehérje-1 (CTNNBIP1). Diabéteszben a fokozott miR-215 expresszió gátolja a CTNNBIP1-et, és aktiválja Wnt/ β -katenin útvonalat, amelynek következtében fokozódik a TGF- β közvetítette EMT a mezangiális sejtekben és megnövekszik a fibronektin és az α -SMA expresszió. Az integrinek expressziója és az α -SMA-pozitív miofibroblasztok száma megnövekszik és döntő szerepet játszik a vesefibrózis patomechanizmusában, azonban a feltételezhetően mindezt felülről (upstream) befolyásoló SCAI expressziójának alakulását vesefibrózisban még nem vizsgálták eddig.

Úgy feltételeztük, hogy olyan állapotokban, ahol magas α -SMA expressziót találunk (vesefibrózis), a SCAI expresszió alacsony lehet. Diabéteszes nefropátia modellben tanulmányoztuk a SCAI mRNS és fehérje expresszióját, valamint a szöveti lokalizációját. Kísérleteink arra engednek következtetni, hogy a SCAI részt vesz a vesefibrózisban, a jelentős miofibroblaszt marker, α -SMA expresszió gátlása révén.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A diabéteszes nefropátia patogenezisének illetve az ahhoz társuló podocita károsodás molekuláris mechanizmusainak feltárása végett kísérleteinket az alábbi célkitűzésekkel végeztük:

- Befolyásolható-e a I. típusú diabéteszes nefropátia progressziója patkányban az NO-cGMP útvonal farmakoterápiás támogatásával, vardenafillal?
- Milyen változásokat eredményez a vardenafil kezelés a diabéteszes vesében szöveti és molekuláris szinten?
- Hogyan alakul a podociták cGMP expressziója diabéteszben kezelés nélkül, illetve vardenafil kezelés hatására?
- Hogyan alakul a SCAI expresszió diabéteszes vesében?
- Befolyásolja-e a hiperglikémia a podociták SCAI expresszióját in vitro?

3. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

3.1 Állatok, diabétesz indukció

Kísérletünket fiatal, három hónapos hím Sprague-Dawley patkányokkal (250-300 gramm). Az állatokban I. típusú diabétesz mellituszt indukáltunk streptozotocin (STZ, 60mg/kg) egyszeri intraperitoneális injekciójával. Az STZ-t citrát pufferben (0,1 mol/L, pH 4.5) oldottuk fel, a kontroll állatok tisztán pufferoldatot kaptak. Azokat az állatokat, amelyeknek 72 órával később a vércukor értékei 15 mmol/l felettiéek voltak, diabéteszesnek tartottuk, és bevontuk a kísérletbe.

A vardenafilos kísérletben a diabéteszes patkányokat két csoportra osztottuk, az egyik lett a pozitív kontroll csoport (STZ, n=6), a másik pedig a vardenafil kezelést kapó csoport (STZ-Vardenafil, n=8). Azok a patkányok, amelyek csak citrát puffer injekciót kaptak, szolgáltak egészséges kontroll csoportként (Kontroll, n=7). A csoportbeosztás után 8 hétig kezeltük az állatokat, a nem-betegeket és a diabéteszes kontroll állatokat citrát puffer vivőanyaggal (0.01 mol/L), a másik diabéteszes csoportot per os szelektív foszfodiészteráz-5 inhibitor vardenafillal (10 mg/kg/nap) ivóvízben feloldva. A napi folyadékfogyasztást rögzítettük és a vardenafil dózist folyamatosan hozzáigazítottuk. A kísérlet végén ismét megmértük a testtömeget, ezzel együtt a vesetömeget is

A SCAI molekuláris szerepének vizsgálatához a patkányokat a diabétesz indukciót követően két csoportra osztottuk: Diabéteszes, n=4, és Kontroll, n=4. A Kontroll csoport állatai streptozotocin helyett csak citrát puffer injekciót kaptak.

A renális SCAI génexpresszió vizsgálatához FVB/N egerekben (n=10) diabéteszt indukáltunk 8 hetes korban. Ehhez 5 napon keresztül naponta egyszeri intraperitoneális streptozotocin injekciót kaptak (STZ, 50 mg/kg/nap dózisban, pH 4,5 citrát pufferben frissen oldva /összdózis 250 mg/kg/). A kontroll egerek (n=5) csak citrát puffert kaptak. Egy hét múlva, akiknek az éhomi vércukor szintje kisebb volt, mint 20 mmol/l, kihagytuk a kísérletből (n=3). Az egereket 8 héttel a diabétesz indukció után feláldoztuk, és feldolgoztuk a veséjüket.

3.2 Vérnyomásmérés patkányokban, vér- és vizeletvizsgálat

A kísérlet végén a patkányokat elaltattuk, és melegítő padra helyeztük őket. A maghőmérsékletüket 37°C-on tartottuk. 2F mikrohegyű nyomás-volumen illesztettünk a jobb carotis artériába és az aszcendáló aortába vezettük. 5 percnyi stabilizáció után rögzítettük az artériás vérnyomásértékeket. Az átlagos artériás nyomást (MAP) egy speciális szoftver (PVAN) segítségével számítottuk ki.

A szérum és vizelet glukóz, a szérum urea értéket és a vizelet kreatinin koncentrációt fotometriásan határoztuk meg Reflotron készülékkel. A vizelet fehérje koncentráció-méréshez BCA Protein Assay-t használtunk. A mért értékekből meghatároztuk a vizelet protein/kreatinin hányadost (UPCR).

A szérum ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) szinteket kereskedelmi forgalomban kapható enzim immun-assay (EIA) kittel határoztuk meg.

3.3 Vese szövettan

A vesemintákat formalinban fixáltuk és paraffinos beágyazást követően 4 µm-es metszeteket készítettünk. A paraffinos metszetek szövettani kiértékelésére perjódsva Schiff (PAS) festést követően értékeltük történt. A vesekárosodást glomeruloszklerózis (0-4 fokozat) és tubulointersticiális károsodás (1-5. fokozat) mértéke szerint pontoztuk. Minden állat glomeruloszklerózis indexét fénymikroszkópban, 400x-os nagyítás mellett határoztuk meg 60 kiértékelt glomerulus pontjainak számtani közepéből. A tubulointersticiális károsodás mértékét a fénymikroszkóp 100x-os nagyítása alatt becsültük meg. A minták kiértékelését vakon végeztük.

3.4 Immunhisztokémia

A paraffinos metszket avidin-biotin módszer segítségével festettük. A metszetek kecske szérummal blokkoltuk, majd a primer antitestekkel inkubáltuk (fibronektin, TGF- β 1, dezmin, nefrin, nitro tirozin, cGMP, SCAI) Mosást követően a megfelelő biotinilált másodlagos antitesttel inkubáltuk a metszeteket. Ezt követően alkalikus foszfátazzal konjugált streptavidinnel inkubáltuk a mintákat. Végül metszeteket Fast Red szubsztráttal hívtuk elő. A metszeteket vakon értékeltük ki, szemikvantitatív pontozási rendszer segítségével (fokozatok: 0-3).

A nefrin és cGMP kettős festést fagyasztott metszeten végeztük. A metszeteket acetonban fixáltuk és kecske szérummal blokkoltuk. Majd az elsődleges antitestekkel inkubáltuk (cGMP, nefrin). Mosást követően a megfelelő fluoreszcens fénykibocsátó festékekkel konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk a metszeteket. A kiértékelés fluorszcens mikroszkóp alatt történt.

3.5 Western-blot

Az állatok teljes vese mintáit RIPA lízis pufferben homogenizáltuk. A fehérje koncentrációt bicinkoniniksavas módszerrel mértük meg. A mintákat 1:1 arányban 2x-es Laemmli pufferben 100 °C-on denaturáltuk. Az azonos fehérjetartalmú mintákat 10%-os géleken szeparáltuk, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat zsírmentes tejpor oldatában blokkoltuk, majd mosás után az elsődleges antitestben (PDE5a, SMA, GPDH) inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán át. A megfelelő peroxidázzal konjugált szekunder antitesttel történő inkubálás után az immunoreaktív csíkokat kemilumineszcens reakcióval jelenítettük meg.

3.6 Kvantitatív RT-PCR (qPCR)

Teljes vese homogenizátumból izoláltuk az össz RNS-t, SV Total RNA kit segítségével, majd ellenőriztük az RNS integritást. Mindegyik PCR reakció (patkány: TGF- β , eNOS, nNOS, nefrin, podocin, GAPDH; egér: SCAI, GAPDH) egy BioRad CFX thermal cycler készülékben történt. A reverz transzkripciót 2 μ g RNS-sel és random primerekkel végeztük. Minden mintát duplikátumban mértünk, és gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) expresszióra normalizáltunk.

3.7 Egér podocita sejtvonal vizsgálata

Kísérletünkben immortalizált termoszenzitív SV40-T génnel transzfektált egér podocita sejteket használtunk (Jeffrey Kopp, NIH). A podocitákat permisszív körülmények között növesztettük fel. Amikor a sejtek elérték a 70%-os konfluenciát, két csoportra osztottuk a plate-eket (n=5 plate/csoport), nem-permisszív körülmények között differenciáltattuk a sejteket. Öt napos differenciálódást követően az egyik csoport az 5mM glukózt tartalmazó médiumot kapta továbbra is (Normoglikémiás), a másik csoport 25mM glukózt tartalmazó médiumot kapott (Hiperglikémiás). A sejtekből 48h és 7 nap után RNS-t izoláltunk Trizol oldattal.

3.8 Statisztikák

Minden adatot átlag \pm szórás (SD) formában tüntettünk fel. A csoportok közötti különbségek kiértékelésére először normalitás vizsgálatot végeztünk. A normál eloszlású mérések eredményeit ANOVA segítségével hasonlítottuk össze Tukey post-hoc teszttel. A nem normál eloszlást mutató eredményeket Kruskal-Wallis teszttel vizsgáltuk. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értéken határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A ciklikus GMP szint emelése szelektív foszfodiészteráz-5 gátlóval csökkentette a podocita károsodás mértékét diabéteszes patkányban

A szérum cGMP szint a kezeletlen diabéteszes csoportban tendenciájában alacsonyabb volt, mint az egészséges kontroll csoportban, de a különbség nem volt szignifikáns feltehetően a kontroll állatok nagy szórása miatt. A vardenafillal kezelt állatok szérumában ezzel szemben mindkét csoportnál szignifikánsan magasabb cGMP értéket mértünk, ami igazolja a PDE5 gátló kezelés hatásosságát.

Diabétesz indukció után az érintett csoportokban (STZ és STZ-Vardenafil) a szérum glukóz szintek és a napi vízfogyasztás jelentősen megnövekedett. A vardenafil kezelés nem befolyásolta ezeket a paramétereket. Szignifikáns vese hipertrófia alakult ki a mind a kezelt, mind a kezeletlen cukorbeteg állatokban, amelyet a megnövekedett vesetömeg/testtömeg arány is mutat.

A szérumban a urea szintek a diabéteszes állatokban magasabbak voltak, mint a kontroll csoportban. A vardenafil kezelés nem volt hatással a szérumban a urea szintekre. Az artériás középnyomás (MAP) értékei azonban nem különböztek a három csoportban.

A cukorbetegség következtében glomeruláris és tubuláris károsodás jött létre, amit a kezeletlen állatoknál (STZ) mért emelkedett vizelet protein/kreatinin hányados (UPCR) jellemez. Vardenafil kezelés hatására szignifikánsan csökkent a vizelet protein/kreatinin hányados.

Az állatok veséjéből készült metszeteket PAS festés után vizsgáltuk meg fénymikroszkóposan. A nem diabéteszes kontroll állatok veséje egészséges volt. Az STZ-Kontroll állatok veséjében glomeruláris hipertrófiát, enyhe mezangiális kiszélesedést, és a Bowman-tokhoz való kitapadást találtunk. A tubulointersticiális károsodást az STZ állatokban tubuláris dilatáció és atrófia jellemezte. Vardenafil kezelés hatására szignifikánsan csökkent a kezelt diabéteszes patkányok glomeruloszklerózisa és a tubulointersticiális elváltozások mértéke. Mononukleáris sejtek beszűrődése nem volt tapasztalható a nem diabéteszes kontroll vesékben, és a diabéteszes vesékben is kezeléstől függetlenül csak minimális mértékben.

Immunhisztokémiai vizsgálatok során az STZ-Kontroll állatok veséje fokozott fibronectin expressziót mutatott az egészséges kontrollhoz viszonyítva. A vardenafilal kezelt csoportban a festődés szignifikánsan gyengébb volt, ami a kezelés antifibrotikus hatására utal.

A teljes vese homogenizátumból mért TGF- β 1 mRNS expresszió szignifikánsan magasabb volt a kezeletlen cukorbeteg (STZ-Kontroll) állatokban, mint az egészséges kontrollokban. A vardenafil kezelés (STZ-Vardenafil) normalizálta a TGF- β 1 mRNS expressziót, amely szintén a kezelés antifibrotikus hatását mutatja.

A TGF- β 1 fehérje expressziójának immunhisztokémiai kiértékelésénél az STZ-Kontroll állatoknak mind a glomerulusaiban, mind a tubulointersticiumában fokozott expressziót találtunk a kontrollokhoz képest. Ezzel szemben a vardenafilal kezelt csoportban a festődés jóval gyengébb volt, ami jól korrelál az mRNS expressziós vizsgálat eredményével.

Immunblott segítségével fokozott PDE5 expressziót találtunk mind a kezeletlen, mind a kezelt diabéteszes állatok veséjében az egészséges kontrollokéhoz képest.

Immunfestéssel jelentős mértékű glomeruláris cGMP-t találtunk az egészséges kontroll vesékben, nagyrészt a podociták citoplazmájában és kisebb mértékben az endotél sejtekben. A kezeletlen diabéteszes patkányok glomerulusaiban alacsonyabb volt a cGMP festődés intenzitása, amely vardenafil kezelésre szinte teljesen normalizálódott. Hasonló eredményt tapasztaltunk a tubuláris cGMP festés kiértékelésekor. Mindez arra utal, hogy a vardenafil kezelés a PDE5 gátlása révén segít megőrizni az intracelluláris cGMP tartalmat diabéteszes vesékben.

Fluoreszcens kettős immunfestés segítségével a cGMP és a nefrin jelentős glomeruláris kolokalizációját találtuk az egészséges kontroll és az STZ-Vard vesékben. Ezzel szemben a kezeletlen diabéteszes patkányok veséiben a cGMP festődés gyakorlatilag hiányzott a nefrin-pozitív sejtekből. A cGMP-pozitív területek 2-5%-ában nem volt nefrin kolokalizáció a kapilláris kacsokban, amely feltehetően az endotél sejtek cGMP festését mutatta.

Mivel az egészséges podociták jelentős mennyiségű cGMP-t tartalmaztak, a podocita károsodás mértékét is vizsgálni kívántuk a cGMP tartalom változásának tükrében. Ehhez dezmin és nefrin immunfestést végeztünk. A kezeletlen STZ csoportban szignifikánsan magasabb volt a dezmin expresszió, mint a nem-diabéteszes patkányok veséjében. A vardenafil kezelés szignifikánsan csökkentette a dezmin expresszió mértékét, a nem-diabéteszes és az STZ csoportban mérthez képest egy köztes szintre állította be. Ezzel szemben a nefrin expresszió szignifikánsan lecsökkent az STZ-csoportban a nem-diabéteszes csoporthoz képest, amely a vardenafil kezelés hatására normalizálódott. A vesekárosodás progressziója során általában a podociták nefrin és podocin expressziója csökken, amely fokozódó proteinuriával jár együtt. Kísérletünkben mind a nefrin, mind a podocin mRNS expressziója megközelítőleg 50%-kal csökkent diabétesz hatására a nem-diabéteszes csoporthoz képest, amely vardenafil kezeléssel visszaállt a normális szintre.

A lokális oxidatív stressz egyik lehetséges markereként nitrotirozin immunfestést végeztünk. A szemikvantitatív kiértékelés a kezeletlen diabéteszes állatok (STZ-Kontroll) glomerulusaiban és tubulointerstíciumában emelkedett nitrotirozin

festődést mutatott, az egészséges kontrollokhoz képest. Ugyanakkor a vardenafil kezelés nem befolyásolta a nitrotirozin képződést.

Az NO szintáz (NOS) változás detektálásához mindhárom izoforma (nNOS, eNOS és iNOS) mRNS expresszióját megvizsgáltuk. Az nNOS expresszió a kezeletlen és kezelt diabéteszes állatokban szignifikánsan emelkedett volt. Az eNOS expresszió tendenciájában magasabb volt a diabéteszes állatokban a kontroll csoporthoz képest, de a különbség statisztikailag nem szignifikáns. A vardenafil kezelés nem befolyásolta az eNOS expressziót. Az iNOS mRNS expressziója mindhárom csoportban hasonlóan alakult.

4.2 SCAI expresszió vizsgálata diabéteszes nefropátiában

Diabétesz indukció hatására megemelkedett a vizelet protein/kreatinin hányados, a szérum glükóz, és a szérum urea érték a diabéteszes patkányokban a nem-diabéteszesekhez képest.

A diabéteszes állatokban glomeruláris és tubulointersticiális károsodás alakult ki: mezangiális kiszélesedés és tubuláris atrófia, hialin lerakódások és enyhe mononukleáris sejtes beszűrődés, amely a korai diabéteszes nefropátiára jellemző.

Hogy alátámasszuk az elképzelésünket, Western blottal ellenőriztük, hogy fennáll-e a SCAI és az SMA expresszió fordított arányossága a kontroll és beteg vesékben. Ehhez a kontroll és diabéteszes patkányok vese medulláját használtuk fel. A Western blot csökkent SCAI expressziót mutatott ki a diabéteszes patkányokban, mely szignifikáns α -SMA túltermeléssel párosult a Kontrollhoz képest. Tehát fennállt a fordított arányosság a SCAI és az SMA expresszió között.

A kontroll vesék tubulus sejtjeiben intenzívebb sejtmagi SCAI festődés volt látható, mint a diabéteszes vesék tubulus sejtjeiben.

A podociták mindkét csoportban hasonlóan festődtek, bár a diabéteszes glomerulusokban tendenciájában erősebb SCAI festődés volt megfigyelhető, mint a Kontroll csoportban.

Annak érdekében, hogy ne csak a fehérje, de mRNS expresszióról is képet kapjunk, diabéteszes egerek veséjében megvizsgáltuk a SCAI mRNS expresszió mértékét. A SCAI mRNS expresszió szignifikánsan, mintegy 50%-al alacsonyabb volt a diabéteszes egerek veséjében az egészséges kontroll csoporthoz képest. Ez az eredmény megfelel a diabéteszes patkányok veséjében Western blottal és immunfestéssel talált

SCAI fehérje expresszió csökkenésének.

Mivel a glomeruláris, ezen belül is a podocita SCAI immunfestődés tendenciájában erősebb volt diabeteszes patkányokban, a podociták hiperglikémiára adott válaszát in vitro is megvizsgáltuk. Egér podocita sejtekben a hiperglikémiás (25 mmol/l glukóz) csoportban 48 óra után enyhén, mintegy 20%-ak magasabb SCAI expressziót mértünk, mely 7 nap után még további 40%-al emelkedett a normoglikémiás (5 mmol/l) csoporthoz képest.

Összefoglalva az eredményeket, az egészséges vesében jelentős SCAI mRNS és fehérje expressziót találtunk. Diabétesz hatására a renális SCAI génexpresszió, illetve a tubulussejtek SCAI fehérje mennyisége lecsökkent. Ezzel szemben, in vitro körülmények között podocitákban mind korai, mind későbbi hatásként a hiperglikémia növelte a SCAI génexpresszió mértékét.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A diabeteszes nefropátia patomechanizmusa multifakoriális. Amikor a progresszió végállapotú veseelégtelenségbe torkollik, a betegek életminősége és életkilátásai drasztikusan romlanak. Élethosszig tartó vesepótló kezelésnek, dialízisnek vagy transzplantációnak kell alávetniük magukat, amely végleg meghatározza a betegek életét, az általában mellette fennálló társbetegségekkel együtt. A nefropátia kivédésének, a progresszió lassításának új, hatékonyabb lehetőségei ezért fontos életminőségbeli, epidemiológiai és gazdasági haszonnal járhatnak.

A kísérletünk és az irodalmi adatok alapján a fokozott PDE-5 aktivitásnak fontos szerepe lehet diabeteszes nefropátia progressziójában. Elsőként írhattuk le, hogy a PDE-5 szelektív gátlása a cGMP szint emelése révén célzottan védelmező hatást fejt ki a podocitákra diabeteszes körülmények között patkányban. Az egészséges illetve károsodott podocitákban zajló molekuláris mechanizmusok jobb megértése hozzájárulhat a proteinuria, illetve a progresszív vesebetegségek hatékonyabb kezeléséhez. Állatmodellünk alapján érdemes lehet tehát a szelektív PDE-5 gátlók klinikai alkalmazhatóságát is vizsgálni diabeteszes vesebetegség kiegészítő terápiájaként.

A diabeteszes nefropátia patomechanizmusában a korábban nem ismert SCAI fehérje expresszióját is vizsgáltuk egészséges és diabeteszes vesében, in vivo és in vitro.

Kísérletünkben az egészséges vese jelentős SCAI mRNS és fehérje expressziót mutatott, míg diabétesz hatására a teljes vese, illetve a tubulussejtek tekintetében a SCAI expresszió lecsökkent, a podocitákban viszont fokozódott. A SCAI expresszió kizárólag α -SMA termelő tubulussejtekben csökkent, amelyek összefüggésbe hozhatók a miofibroblasztok kialakulásával. Érdeemes lenne megvizsgálni, hogy a SCAI expresszió serkentése diabéteszben csökkentené-e az EMT kialakulását, esetleg biztosíthat-e egyfajta endogén védelmet vesefibrózis ellen.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

- 1 Fang L, Radovits T, Szabó G, Mózes MM, Rosivall L, Kökény G. (2013) Selective phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitor vardenafil ameliorates renal damage in type 1 diabetic rats by restoring cyclic 3',5' guanosine monophosphate (cGMP) level in podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 7:1751-61.
- 2 Fintha A, Gasparics Á, Fang L, Erdei Z, Hamar P, Mózes MM, Kökény G, Rosivall L, Sebe A. (2013) Characterization and role of SCAI during renal fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition. *Am J Pathol.* 2:388-400.