

Vese génterápia (RNSi) és lupus nephritis IVIG kezelésének mellékhatás-vizsgálata egérmodellen

Doktori tézisek

Dr. Rácz Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hamar Péter, MTA doktora, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Prohászka Zoltán, MTA doktora, tudományos
főmunkatárs

Dr. Prechl József, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Benyó Zoltán, MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Csekő Csongor, Ph.D., főosztályvezető

Dr. Lacza Zsombor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest
2012

Bevezetés

Az akut veseelégtelenség gyakori előfordulása és magas letalitása miatt fontos klinikai probléma. Továbbá akut veseelégtelenség krónikus veseelégtelenséghez is vezethet, melynek kezelése a mai napig nem megoldott. Jelen tanulmányban nefrológiában potenciálisan alkalmazható kezelések mellékhatásait vizsgáltuk egérmodelleken.

Az RNS interferencia (RNSi) egy ősi géncsendesítési módszer, mely megvédi a genomot a vírusfertőzésektől és az inzertálódo elemektől. Az RNSi alaplakulája a kettős szálú (ds) rövid interferáló (si) RNS. A vírusok replikációja során is gyakran keletkeznek dsRNS-ek [1], melyek intracitoplazmatikus jelenléte az interferon (IFN) válasz aktiválásához vezet. Az siRNS kísérletek első éveiben azt gondolták, hogy az siRNS-ek túl rövidek ahhoz, hogy interferon választ indukáljanak. Sledz és munkatársai felfedezték, hogy az siRNS-ek interferon választ aktiváltak *in vitro* [2]. Kísérletünkben az RNSi *in vivo* toxicitását vizsgáltuk a szervezet válaszreakcióinak gén (génexpresszió), sejt (enzim, illetve citokin értékek), illetve szövet (szövettan) szinten történő mérésével.

A dolgozatban bemutatott másik kísérletünkben a korábban vizsgált, de mellékhatás miatt elvetett terápiás szert az intravénás immunglobulint (IVIG) alkalmaztunk szisztémás lupus erythematosesben (SLE-ben). Az SLE az egyik leggyakoribb autoimmun betegség, mely a nyugati országok populációjának 0,5%-át érinti [3]. A keringő immunkuoplexek lerakódása és komplement aktiválása által jellemzett III-as típusú hiperszenzitivitási reakciónak központi szerepet tulajdonítanak az SLE patomechanizmusában. Jelenleg az SLE kezelése nem specifikus és toxikus [4], így a mellékhatások minimalizálása érdekében a modern SLE terápiás lehetőségek sokkal inkább az immunválasz szabályozására, mint a gátlására irányulnak. Egy ilyen immunmoduláló tulajdonsággal bíró szer az IVIG, mely számos autoimmun betegségben enyhítette a bőr manifesztációt, közöttük a lupusban is [5]. Megemlítendő azonban, hogy az IVIG használata során korábban nefrotoxicitás jelentkezett melynek pontos mechanizmusa még ismeretlen. A vese szövettani vizsgálata az elsődleges tubulusok vakuolizációját, és a tubulus epithel sejtek duzzadását mutatta, melyet ozmotikus nefrózisnak avagy hidropikus degenerációnak nevezünk [6]. Korábbi kutatások eredményei szerint a nefrotoxicitás oka az IVIG készítmények cukor komponense [7], melyet az immunglobulin G harmadlagos szerkezetének stabilizálásához használnak. Hipotézisünk szerint a nefrotoxikus hatás elkerülhető, ha nem cukorral stabilizált IVIG készítményt alkalmazunk. Kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a hosszú távú, nagy dózisu glicinnel stabilizált IVIG terápia rendelkezik-e jótékony hatással az egerek lupusára, és okoz-e nefrotoxicitást.

Célkitűzés

A bemutatott első kísérletben célunk a napjainkban mind állat, mind humán kísérletekben egyre gyakrabban alkalmazott RNSi mellékhatásainak feltérképezése volt, mely során az alábbi kérdéseket kívántuk megválaszolni:

1. A rövid dsRNS-ek aktiválják-e az interferon választ a szervezet szintjén hidrodinamikus úton, in vivo injektálást követően ?

Vizsgálatunkban arra kerestük a választ, hogy az irodalmi adatokból ismert in vitro rövid dsRNS kezelés esetén leírt **interferon válasz** megjelenik-e szisztémásan alkalmazott rövid dsRNS kezelés során.

2. Ha igen, akkor ez milyen gén- (STAT1 és OAS1), illetve citokin (TNF α , IL-6, IL-12p40 és IFN β) expressziós mintázattal jár?

Vizsgálatainkban az interferon válasz-specifikus gének expressziós profilja (RT-PCR) mellett vizsgáltuk a gyulladásos válaszreakcióban leggyakrabban résztvevő citokinek vérszintjét (ELISA).

3. Okoz-e a magas volumenű hidrodinamikus injektálással szemben az alacsony volumenű hidrodinamikus injektálás nem specifikus mellékhatásokat?

A korábbi irodalmi adatoknak megfelelően a kezelés hatására leginkább hasúri parenchimaszervek (máj, vese és lép) károsodását vártuk, ezért ezen szervek szövettani és szervfunkciós paramétereit (ALAT, ASAT, BUN) tanulmányoztunk.

A bemutatott másik kísérletben SLE egérmodelljében hosszú távú, magas dózisu glicinnel stabilizált IVIG kezelés mellett a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Hogyan befolyásolja az IVIG kezelés MRL/lpr egerek lupusát?

Az irodalmi adatokból ismert, hogy az IVIG kezelés hatására a vese -és a bőrelváltozások eltérő válaszreakciókat mutatnak. Vizsgálatunkban arra kerestük a választ, hogy az MRL/lpr egértörzsben kialakult lupust, különös tekintettel a bőr -és veseérintettségre, hogyan befolyásolja az általunk választott IVIG kezelés.

2. Kialakul-e szervspecifikus eltérés IVIG kezelés hatására ?

Összehasonlítottuk az általunk alkalmazott IVIG-el kezelt állatok szövettani eltéréseit (bőr és vese), vesefunkciós paramétereit és szérumszintjeit a fiziológias sóoldattal kezelt kontroll csoport paramétereivel.

3. Rendelkezik-e a hosszú távú, magas dózisu, glicinnel stabilizált IVIG kezelés *in vivo* toxicitással?

Vizsgáltuk a glicinnel stabilizált IVIG kezelés vesére gyakorolt hatását a cukorkomponenssel ill. fiziológiás sóoldattal kezelt esetekhez képest (szövettan és vesefunkciós paraméterek).

Anyagok és módszerek

Első kísérletünkben NMRI (naval medical research institute) egereket kezeltünk kétféle natív siRNS-sel, és fiziológiás sóoldattal alacsony volumenű hidrodinamikusan injektálás (AVHDI) protokollja szerint (50 µg/1 ml). A pozitív kontrolok 50 µg polyinozin-policitidil savat (polyI:C) kaptak. A magas volumenű hidrodinamikusan injektálás (MVHDI) irodalomban leírt májkárosító hatásának modellezésére a testsúly 10 %-ának megfelelő térfogatú fiziológiás sóoldatot adtunk be. Hat, illetve 24 órával a kezelés után leöltük az állatokat, és máj, illetve vesefunkciós paramétereket (alanin aminoszferát, aszpartát aminoszferáz, vér urea nitrogén), RT-PCR-rel a májból, veséből és lépéből a STAT1 és az OAS1 gének expresszióját, plazmából pedig az interleukin-6 (IL-6), interleukin-12 (IL-12), tumor nekrozis faktor alfa (TNF α) és interferon béta (IFN β) koncentrációját mértük. Ez utóbbi mérést 1,5-2-6 és 9 órával az AVHDI után végeztük el.

Eredmények

Az alacsony volumenű hidrodinamikusan injektálás (AVHDI) kismértékű emelkedést okozott a STAT1 és OAS1 gének expressziójában, mely nem fokozódott az siRNS-ek hozzáadása után

Májban, vesében és a lépben 6 órával a fiziológiás sóoldat AVHDI-a után mindössze kissé fokozódott a STAT1 és OAS1 gének expressziója, másrészt, szervtől, siRNS szekvenciától és időponttól függetlenül sem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a fiziológiás sóoldattal és az siRNS-sel kezelt állatok expressziós mintázatai között.

Az alacsony volumenű hidrodinamikusan injektálás nem váltott ki szignifikáns szisztémás gyulladáscsökkentő citokin (IFN β , TNF α , IL-6 és IL-12) termelődést

A plazma IFN β szintje 2 órával a poly I:C beadása után emelkedett meg (210,85±164,28 pg/ml), míg a többi csoportban a szintje mérhetően alacsony maradt. A TNF α plazma szintje mindössze másfél órával és kizárólag a poly I:C kezelés után volt mérhető, majd azután visszatért alapszintjére. Az siRNS-sel, illetve fiziológiás sóoldattal kezelt állatok plazmájának IL-6 szintjei ugyan kissé megemelkedtek a kezelés hatására, azonban szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a pozitív kontroll csoport mintái. A plazma IL-12 koncentrációja nem emelkedett meg szignifikánsan az siRNS kezelés hatására, azonban a

pozitív kontrol állatokban magasabb volt, mint a fiziológiás sóoldattal kezeltékben ($p=4,32E-08$).

A poly I:C szervi károsodással járó interferon választ váltott ki, azonban az siRNS-ek alacsony volumenű injektálása után nem láttunk szervi funkció és szövettani károsodást
Az siRNS-sel kezelt egerek veséjében, májában, és lépében ép szöveti szerkezetet láttunk mind a 6, mind a 24 órás leölési időpontban.

A magas volumenű hidrodinamikusan injektálás (MVHDI) után súlyos májkárosodás alakult ki, ellentétben az alacsony volumenű hidrodinamikusan injektálással (AVHDI), amely után a szöveti károsodás enyhe és átmeneti volt.

A kezeletlen egerek csoportjában az ALAT vérplazmában mért aktivitása $13,33 \pm 0,85$ mmol/l volt. Az ALAT enzimaktivitása kétszeresére emelkedett meg az AVHDI (1 ml) után, a kezeletlen állatokhoz képest, és 24 órán belül visszatért az alapértékére. Ezzel ellentétben, a MVHDI (2,5 ml) hatására súlyos májnekrozis lépett fel. A májsejtnekrozis következtében az ALAT koncentrációja két nagyságrenddel nőtt.

A magas dózisú IVIG szisztémás adása enyhítette a bőrbetegséget

A fiziológiás sóoldattal kezelt MRL/lpr egerekben a leöléskor fekélyesedést, és kiterjedt szöveti destrukciót figyeltünk meg, míg az IVIG kezelés szembetűnően csökkentette a leöléskor makroszkóposan látott, bőr és fül érintettségét. A mikroszkópos kiértékelés eredményeként is a bőrmanifesztáció enyhülését láttuk az IVIG hatására (1. Táblázat).

	IVIG (n=8)	Fiziológiás sóoldat (n=10)	P érték
Makroszkópos			
Bőr	0,75±0,34	1,3±0,4	<0,03
Fül	0,25±0,12	0,8±0,2	<0,05
Mikroszkópos			
Dermális elváltozások	0,58±0,47	1,21±0,58	0,001
Bazális membrán megvastagodás	0,41±0,2	0,95±0,54	0,001
Hyper-és/vagy parakeratózis	0,39±0,1	0,66±0,28	0,02
Stratum spinosum kiszélesedése	0,23±0,11	0,61±0,28	0,212 (ns)
Kifekélyesedés	0,11±0,33	0,4±0,51	0,089 (ns)
Gyulladásos beszűrődés	0,35±0,21	0,75±0,42	0,123 (ns)
Összesített mikroszkópos pontszám	0,34±0,29	0,76±0,56	0,05

1. Táblázat

A vesekárosodást nem módosította a kezelés, hidropikus degeneráció nem volt jelen

A kezeletlen MRL/lpr egerekben proliferatív típusú, hipercelluláris lupus nephritis alakul ki, melynek súlyossága hasonló volt a fiziológiás sóoldattal kezelt kontrol, és az IVIG-gel kezelt állatokban. A vér urea nitrogénjének koncentrációja hasonlóképpen alakult mindkét csoportban. A tubulointerstíciumban megfigyelt elváltozások mindkét csoportban hasonlóak voltak (2,42±0,33 vs 2,22±0,446, p=0,269): a tubularis hámsejtek degenerációja, elhalása volt a legszembetűnőbb szöveti elváltozás. A szaharózzal kezelt pozitív kontrol állatok veséjében kialakult ozmotikus nefrózis típusos szöveti képét egyetlen IVIG, illetve fiziológiás sóoldattal kezelt MRL/lpr állatban sem figyeltünk meg.

Komplement-3 (C3) lerakódás bőrben és vesében

A C3 lerakódását a bőrben az erek endotéljében figyeltük meg (döntően az artériákban). Az IVIG kezelés hatására a C3 lerakódás csökkent a bőrben (p=0,02). Ezzel ellentétben, a vesében látott C3 pozitívítás hasonló volt az IVIG illetve a fiziológiás sóoldattal kezelt csoportban (0,387±0,289 vs 0,384±0,267; p=0,975).

Az IVIG kezelés nem befolyásolta a plazma autoantitest szinteket MRL/lpr egerekben

Az anti-Sm, anti-DNS és anti-hisztin autoantitestek optikai denzitása hasonló volt mindkét kísérleti csoportban. Az anti-nukleáris antitest (ANA) pozitívítás szintén hasonló arányban volt megfigyelhető az IVIG és fiziológiás sóoldattal kezelt állatokban. Az ANA mintázata is

hasonló volt: az esetek többségében homogén (IVIG n=6, fiziológiás sóoldat, n=5), néhány esetben granuláris megjelenésű (IVIG n=3, fiziológiás sóoldat n = 4) mindkét csoportban.

Következtetések

Kísérleteink eredményei alapján elmondhatjuk, hogy egérmódeljeinken a szervezetet károsító mellékhatások fellépésével nem kell számolnunk sem az siRNS-ek hidrodinamikusan bevitelével, sem a glicinnel stabilizált IVIG intravénás alkalmazása során.

1. Az alacsony volumenű hidrodinamikusan úton, in vivo beadott rövid dsRNS-ek nem aktiválják az interferon választ.

A mai legmodernebb terápiás eszköz a génterápia, azon belül is az RNS interferencia, melyet leggyakrabban rövid interferáló RNS-ek alkalmazásával értünk el. Az ígéretes terápiás lehetőségek mellett, a mellékhatások, mint például az interferon (IFN) válasz, az immunrendszer aktiválódása, illetve a szervi károsodás még mindig nem teljesen ismert. Kísérletünkben azt találtuk, hogy a szisztémás, rövid interferáló RNS kezelést követően nem alakul ki *in vivo* az immunrendszer aktivációja. RT-PCR vizsgálataink kimutatták, hogy az siRNS kezelés nem aktiválja a Jak/STAT útvonalat. Szöveti vizsgálataink alátámasztották az expressziós mintázatokat: célszervi károsodást egyik, általunk vizsgált szervben (vese, máj és lép) sem láttunk.

2. A STAT1, és az OAS1 gén expressziója és a TNF α , IL-6, IL-12p40, és az IFN β citokinek vér-szintje nem fokozódik az siRNS-ek szisztémás beadása után.

Az AVHDI hatására nem találtunk szignifikáns expresszióbeli emelkedést sem a STAT1 sem az OAS1 gén expressziójában, sem a plazmában mért citokin koncentrációkban egyik siRNS kezelés hatására sem. A gyulladásos citokinek plazma szintjei és a szervi károsodás nem volt jelen az AVHDI után, függetlenül attól, hogy a beadott folyadék tartalmazott-e siRNS-t vagy sem.

3. A hidrodinamikusan injektálás nem specifikus mellékhatásai volumen függőek.

Az AVHDI kismértékű alanin aminotranszferáz (ALAT) emelkedést, valamint enyhe hepatocita károsodást okozott, míg a MVHDI jóval magasabb ALAT szintekkel és kifejezett hepatocita nekrozissal járt. Mindezek mellett azt láttuk, hogy maga a hidrodinamikusan injektálás kiváltott kismértékű STAT1 és OAS1 génexpresszió fokozódást. Tehát az AVHDI is okozhat enyhe szervi károsodást és IFN válasz génexpresszió emelkedést.

Az intravénás immunglobulin (IVIG) számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik az autoimmun betegségek kezelésében. Immunmoduláló és komplement gátló hatása révén az

IVIG-et korábban már kipróbálták szisztémás lupus erythematosesben (SLE), azonban az IVIG-et stabilizáló cukorkomponensek jelenléte miatt kialakult ozmotikus tubuluskárosodás miatt a lupus nephritis progresszióját figyelték meg néhány betegben, így az IVIG kezelést lupusban elvetették. A napjainkban már rendelkezésre álló, nem cukorral stabilizált IVIG elérhetősége felvetette az SLE IVIG kezelésének újraértelmezését. Kísérletünkben a magas dózisu, hosszú távú, glicinnel stabilizált IVIG kezelés hatásait mértük fel humán SLE egér modelljén.

1. A magas dózisu, hosszútávú, glicinnel stabilizált IVIG kezelés enyhítette az MRL/lpr egerek bőr lupusát.

MRL/lpr egereket heti egy alkalommal kezeltünk glicinnel stabilizált IVIG-gel vagy fiziológiás sóoldattal (0,2 ml/10 g) 6 hetes és 5 hónapos kor között. Az állatok leölésekor makroszkóposan is azt találtuk, hogy az IVIG enyhítette a lupus bőrmanifesztációját. A szövettani kiértékelés során szignifikáns különbséget láttunk az IVIG-el és fiziológiás sóoldattal kezelt állatok között.

2. Az IVIG kezelés hatására nem láttunk változást a vese érintettség tekintetében

A részletes szövettani vizsgálatok és a komplement-3 immunhisztokémiai festés alátámasztotta a bőrbetegség szignifikáns enyhülését IVIG kezelés után. A kezelés során a vesetünetek nem enyhültek.

3. A glicinnel stabilizált IVIG nem rendelkezik *in vivo* vese toxicitással

A glicinnel stabilizált IVIG kezelés során a vese szövettani vizsgálata során nem láttuk az 5%-os szaharózzal, illetve 10%-os maltózzal (IVIG stabilizálására használt cukrok, alkalmazott koncentrációban) kiváltott típusos un. ozmotikus nefrózist.

Adataink igazolják, hogy az IVIG enyhítette a kután lupust a veseérintettség súlyosbítása nélkül. Eredényeink alátámasztják azt a hipotézist, hogy az SLE nem homogén patomechanizmusú betegség, hanem klinikai szindróma, melyben a vese és a bőr érintettség patomechanizmusa eltérő lehet. Az SLE szervspecifikus megjelenésének mélyebb megértése nagyban előlendítené a személyre szabott és a hagyományosnál jóval hatékonyabb kezelést.

Saját publikációk jegyzéke

Összesített IF: 41,003

Összesített hivatkozás: 49

1. **Rácz Z**, Hamar P: Can siRNA technology provide the tools for gene therapy of the future? *Curr Med Chem.* 2006;13(19):2299-307. IF: 5,207, hivatkozás: 32
2. **Rácz Z** és Hamar P: SiRNA technológia, a jövő génterápiája? *Orvosi Hetilap* 2008;149(4):153-159. Hivatkozás: 5
3. **Rácz Z**, Hamar P: RNA interference in research and therapy of renal diseases, *Contributions to Nephrology*, editor: G. Remuzzi, Karger, 2008, Vol 159, 78-95. IF=1,83, hivatkozás: 8
4. **Rácz Z**, M Godó, C Révész and P Hamar. Immune activation and target organ damage are consequences of hydrodynamic treatment but not delivery of naked siRNAs in mice. *Nucleic Acid Ther.* 2011 21: 215-24. IF=2,986
5. Kaucsár T, **Rácz Z**, Hamar P. Post-transcriptional gene-expression regulation by micro RNA (mi RNA) network in renal disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(14):1390-401. IF=13,577, hivatkozás: 1
6. Stokman G, Qin Y, **Rácz Z**, Hamar P, Price LS. Application of siRNA in targeting protein expression in kidney disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(14):1378-89. IF=13,577, hivatkozás: 3
7. **Rácz Z**, T Kaucsar, P Hamar: The huge world of small RNAs: regulating networks of microRNAs. *Acta Physiologica Hungarica.* 2011 98: 243-254. IF=1,226
8. **Rácz Z**, Nagy E, Rosivall L, Szebeni J, Hamar P: Sugar-free, glycine-stabilized intravenous immunoglobulin prevents skin but not renal disease in the MRL/lpr mouse model of systemic lupus. *Lupus* 2009. 0, 1-14. IF=2,6

Irodalomjegyzék

- ¹ Groskreutz DJ, Babor EC, Monick MM, Varga SM, Hunninghake GW: Respiratory syncytial virus limits α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) phosphorylation to maintain translation and viral replication. *J Biol Chem.* 2010;285:24023-24031.
- ² Sledz CA, Holko M, Veer MJ, Silverman RH, Williams BR: Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol.* 2003;5:834-839.
- ³ Danchenko N, Satia JA, Anthony MS: Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus.* 2006;15:308–18.
- ⁴ D’Cruz DP, Hughes GRV: The treatment of lupus nephritis. *BMJ.* 2005;330:377–378.
- ⁵ Generau T, Chosidow O, Danel C, Chérin P, Herson S: High-dose intravenous immunoglobulin in cutaneous lupus erythematosus. *Arch Dermatol.* 1999;135:1124-1125.
- ⁶ Wajanaponsan N, Cheng SF: Acute renal failure resulting from intravenous immunoglobulin therapy. *Hawaii Med J.* 2004;63:266–267.
- ⁷ Ahsan N, Wiegand LA, Abendroth CS, Manning EC: Acute renal failure following immunoglobulin therapy. *Am J Nephrol.* 1996;16:532-536.