



* Σύγκριση της πρωτεομικής ανάλυσης των ενδονεφρικών αρτηριδίων υπερτασικών και νορμοτασικών ζώων

Γ. Μάρκας^{1,2}
Μ. Μακριδάκης¹
Ι. Ζωιδάκης¹

Α. Βλάχου¹
Α. Χαρώνης¹
Δ. Βλάχακος^{1,2}

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υπέρταση είναι αίτιο και αποτέλεσμα νεφρικής βλάβης και σχετίζεται με διαταραχή στην ανατομία και τη λειτουργία των αρτηριδίων του νεφρού. Η υπερτασική νεφροσκλήρυνση αποτελεί τη δεύτερη αιτία, μετά τον διαβήτη, χρόνιας νεφρικής νόσου. Η πάθηση εξελίσσεται αθόρυβα σε ανεπάρκεια νεφρών, και η διάγνωσή της είναι δύσκολη διότι δεν εμφανίζονται ειδικά συμπτώματα και δεν υπάρχουν αξιόπιστοι βιοδείκτες για την εκτίμηση της νεφρικής βλάβης. Οι ασθενείς εκδηλώνουν συμπτώματα, όταν σχεδόν το 90% της λειτουργίας των νεφρών έχει χαθεί. Επιπλέον, οι μηχανισμοί που ενοχοποιούνται για την ανάπτυξη και την πρόοδο της νεφρικής βλάβης, λόγω της υπέρτασης, παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Πρόσφατη μελέτη μας που δημοσιεύθηκε στο περιοδικό *Nephron* δείχνει πως τα κανάλια χλωρίου CLIC4 (Chloride intracellular channel 4) στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο αποτελούν πιθανό βιοδεικτη υπερευτασικής νεφροσκλήρυνσης στους SHR υπερτασικούς αρουραίους¹.

Το ζωικό μοντέλο Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) είναι ένα από τα πιο καλά μελετημένα υπερτασικά μοντέλα². Τα αρσενικά SHR αποτελούν ένα καθιερωμένο μοντέλο μελέτης της ανθρώπινης υπέρτασης και χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή νέων αντιυπερτασικών φαρμάκων. Ένα από τα πλεονεκτήματα του μοντέλου είναι ότι η υπέρταση εμφανίζεται σε νεαρή ηλικία, και οι βλάβες που

προκαλεί είναι παρόμοιες με εκείνες σε ασθενείς με υπερτασική νεφροσκλήρυνση. Τις πρώτες 6-8 εβδομάδες της ζωής τους τα SHR ζώα αναπτύσσουν μια κατάσταση προ-υπέρτασης και στις επόμενες 12-14 εβδομάδες σταδιακά εμφανίζουν υπέρταση, με τα αρσενικά SHR να είναι περισσότερο επιρρεπή από τα θηλυκά, όπως συμβαίνει και στον άνθρωπο. Επομένως, το μοντέλο SHR είναι το πλέον κατάλληλο για τη μελέτη ανεύρεσης πιθανών πρώιμων δεικτών υπερτασικής νεφροπάθειας. Πρόσφατες μελέτες στο μοντέλο υποστηρίζουν πως η βλάβη στα αγγεία ευθύνεται για την ατροφία που παρατηρείται στα νεφρικά σωληνάρια και για τη σπειροματοσκλήρυνση. Επιπλέον, έχει δειχθεί πως σε ορισμένα πειραματικά μοντέλα η βλάβη στα αγγεία προϋπάρχει της βλάβης που εμφανίζεται στα σπειράματα³. Ωστόσο, ο μηχανισμός εξέλιξης της αγγειακής βλάβης σε πειραματική και σωληναριακή βλάβη παραμένει αδιευκρίνιστος.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συγκριτική ανάλυση των βιοχημικών οδών και μακρομορίων στο τοίχωμα αρτηριδίων του νεφρού δυο ομάδων πειραματόζωων, 4 υπερτασικών επίμυων SHR (Spontaneously Hypertensive Rat) και 4 νορμοτασικών επίμυων WKY (Wistar Kyoto) με στόχο την ανίχνευση μοριακών αλλοιώσεων στα νεφρικά αγγεία που σχετίζονται με την υπέρταση.

* Η εργασία έχει πάρει βραβείο από την Ελληνική Εταιρεία Υπέρτασης.

¹ Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, ² Ιατρική Σχολή Ε.Κ.Π.Α.

✉ **Αλληλόγραφια:** Γιώργος Μάρκας, Σωρανού Εφεσίου 4, 11527, Αθήνα • Τηλ.: 6939480649 • Email: g.p.barkas@gmail.com

ΜΕΘΟΔΟΙ

Χρησιμοποιήθηκαν ως υπερτασικά πειραματόζωα τα SHR και ως νορμοτασικοί μάρτυρες οι επίμυες Wistar-Kyoto. Επελέγη η ηλικία των 20 εβδομάδων, για να έχει μεν εγκατασταθεί υπέρταση στα SHR, αλλά να μην έχουν ακόμη αναπτυχθεί μόνιμες αγγειακές βλάβες. Στο συγκεκριμένο υπερτασικό μοντέλο οι αγγειακές βλάβες αναπτύσσονται από την ηλικία των 30 εβδομάδων. Αρχικά, μετρήθηκε η πίεση των υπερτασικών και νορμοτασικών πειραματόζωων χρησιμοποιώντας την τεχνική rat tail-cuff (Kent Scientific, Co., Torrington, CT, US). Η μέση αρτηριακή πίεση των υπερτασικών επίμυων (SHR) ήταν 170 mmHg, σε αντίθεση με τη μέση αρτηριακή πίεση των νορμοτασικών επίμυων (WKY) που ήταν 120 mmHg. Επομένως, τα πειραματόζωα ήταν κατάλληλα για τη συγκεκριμένη μελέτη.

Η απομόνωση των νεφρικών αρτηριδίων έγινε από τομές κρουτομού πάχους 14 μm με τη χρήση Laser (Laser Capture Microdissection, LCM). Η τεχνική LCM μάς επιτρέπει να απομονώσουμε με εξαιρετική ακρίβεια διαφορετικά διαμερίσματα του νεφρικού παρεγχύματος⁴. Τα απομονωμένα αρτηρίδια από κάθε ομάδα ομογενοποιήθηκαν και υπεβλήθησαν σε πρωτεομική ανάλυση υψηλής ευαισθησίας (GeLC-MS analysis)⁵. Ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αναγνωρίστηκε μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών (688), εκ των οποίων 550 υπήρχαν και στις δυο ομάδες και 58 είχαν διαφορετική έκφραση μεταξύ των υπερτασικών SHR και των νορμοτασικών WKY επίμυων (15 υπερεκφράζονταν και 43 υποεκφράζονταν στους υπερτασικούς επίμυες). Ας σημειωθεί πως 71 πρωτεΐνες βρέθηκαν μόνο στα νορμοτασικά ζώα και 67 μόνο στα υπερτασικά ζώα.

Βιοπληροφορική ανάλυση κατέδειξε 114 μεταβολικές οδούς στους νορμοτασικούς επίμυες WKY, 111 μεταβολικές οδούς στους υπερτασικούς επίμυες SHR και 106 κοινές μεταβολικές οδούς και στις δύο ομάδες. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται οδοί που αφορούν τον μεταβολισμό, την οξειδωση, τη διαμεμβρανική μεταφορά, την αποδόμηση των

ριζών οξυγόνου και τη σύσπαση λείων μυϊκών ινών. Ειδικότερα, μεγάλη σημασία έχει η απορύθμιση της οδού του μονοξειδίου του αζώτου, που παρατηρείται μόνο στα υπερτασικά ζώα SHR και περιλαμβάνει πρωτεΐνες (π.χ. Xaa-Pro aminopeptidase 1 [XPP1], N[G] N[G]-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 [DDAH1], Dehydropteridine reductase [DHPR]), που εμπλέκονται με τη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (Nitric Oxide Synthase, eNOS).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η τεχνική LCM σε συνδυασμό με την πρωτεομική ανάλυση υψηλής ευαισθησίας μπορεί να ανοίξει νέους δρόμους για πιο εξειδικευμένες και στοχευμένες μελέτες στα διαφορετικά διαμερίσματα του νεφρικού παρεγχύματος. Σε αυτά τα πλαίσια, η παρούσα μελέτη κατέδειξε αλλαγές στο πρωτεομικό προφίλ των αρτηριδίων των υπερτασικών επίμυων SHR σε σύγκριση με τους νορμοτασικούς επίμυες WKY. Αυτές οι αλλαγές προκαλούνται νωρίς στη φάση της εγκατάστασης και πριν αναπτυχθούν οι βλάβες της υπέρτασης, και σχετίζονται με τη ρύθμιση του αγγειακού τόνου. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να αποδειχθεί εάν αυτές οι αλλαγές μπορούν μακροπρόθεσμα να συμμετάσχουν στην παθογένεια ή/και να θεωρηθούν βιοδείκτες ή θεραπευτικοί στόχοι της υπερτασικής νεφροσκλήρυνσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Hatzioanou D, Barkas G, Critselis E, et al. Chloride intracellular channel 4 overexpression in the proximal tubules of kidneys from the spontaneously hypertensive rat: Insight from proteomic analysis. *Nephron* 2017; 10.1159/000479169.
- Dornas WC, Silva ME. Animal models for the study of arterial hypertension. *J Biosci* 2011; 36: 731-737.
- Bernatova I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: Cause or consequence? *Biomed Res Int* 2014, 2014, 59827110.1155/2014/598271.
- Makridakis M, Vlahou A. GeLC-MS: A Sample Preparation Method for Proteomics Analysis of Minimal Amount of Tissue Methods. *Mol Biol* 2017 Oct 10; doi: 10.1007/7651_2017_76.
- Datta S, Malhotra L, Dickerson R, Chaffee S, Sen CK, Roy S. Laser capture microdissection: Big data from small samples. *Histol Histopathol* 2015; 30: 1255-126910.14670/HH-11-622.