

Metabolische Urinprofile im Rattenmodell als diagnostisches Instrument zur Charakterisierung nephrotoxischer Effekte von Cyclosporin/Sirolimus

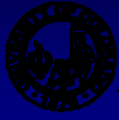
a,b Volker Schmitz, b,d Jost Klawitter, a Wenzel Schöning, b Jamie Bendrick-Pearl, b Manuel Haschke, c Cristopher Rivard, c Laurence Chan, d Dieter Leibfritz, b Uwe Christians.

a Charité, Campus Virchow, Abteilung für Allgemein-, Viszeral und Transplantationschirurgie, Berlin

b Dept. Anesthesiology, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, CO, USA

c Dept. of Nephrology, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, CO, USA

d Institut für organische Chemie, Universität Bremen



Einführung

Die meisten aktuellen immunsuppressiven Behandlungsprotokolle basieren nach wie vor auf einem der beiden Calcineurin Inhibitoren FK 506 oder Cyclosporin. Beide Substanzen verhindern zwar suffizient eine Abstoßung, haben aber auch nephrotoxische Eigenschaften, welche insbesondere im Langzeitverlauf über eine persistierende Vasokonstriktion und Endothelzellschädigung zu einer interstitiellen Fibrose und Tubulusatrophie mit Funktionsverlust führen können. Heutige Screening Methoden (Serumkreatinin, Biopsie) zur Erkennung einer solchen Nephrotoxizität, sind häufig weder praktikabel noch sensitiv genug, um eine Schädigung früh genug zu erkennen oder deren genaue Ursache (immunologisch versus medikamenteninduziert) zu unterscheiden. Sog. toxikodynamische Strategien, bei denen man Veränderungen molekularer Signaturen in Gewebe, Blut oder Urin nachweist, wären daher attraktive Optionen, um z.B. eine Calcineurin Inhibitor vermittelte Toxizität rechtzeitig zu erkennen. Im Folgenden stellen wir verschiedene auf sog. „Metabonomics“ basierte Marker im Urin dar, welche ein prädiktives diagnostisches Potential bei der Nachbehandlung transplanterter Patienten haben könnten.

Methoden

Behandlungsgruppen (n=6/Gruppe): (I) Kontrollen (Vehikel: fettarme Milch für 6/28 Tage), (II) CsA 10, (III) CsA 25 (IV), Rapa 1, (V) CsA 10+Rapa 1, (VI) CsA 25+Rapa 1 jeweils für 6 Tage, (VII) CsA 10, (VIII) Rapa 1, (IX) CsA 10+Rapa 1 jeweils für 28 Tage [alle Dosierungen in mg/kg/Tag].

Glomeruläre Filtrationsrate (GFR): Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-Inulin (Sigma, St. Louis, MO) Clearance. Inulinalgabe (0.75mg/ 100ml NaCl) i.v. über 2 Stunden (2ml/h). Urinsammlung über einen 10-0 Silikonkatheter (linker Ureter). Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Inulinkonzentration. GFR-Berechnung ($\mu\text{l}/\text{min}$) anhand der Formel $(U \times V)/P$ (U: Inulin Urin-Konzentration, V: Urin Volumen/Zeit, P: Inulin Plasma-Konzentration)

Medikamentenspiegel: Cyclosporin und Sirolimus wurden mit etablierten, komplett validierten Verfahren, mit jeweils hoher Sensitivität und Spezifität bestimmt (HPLC-MS). **15-F2t-Isoprostane.** Bestimmung anhand einer validierten automatisierten LC/LC-MS/MS Methode. Das HPLC System bestand aus Komponenten der Agilent 1100 Serie (Waldbronn, Deutschland), welches mit einem „Triple Quadrupole“ Massenspektrometer (API 4000, Applied Biosystems, Foster City, CA) verschaltet war. Die Methode zeigte im Bereich 0,04 bis 80ng/mL lineare Meßwerte. Tagesschwankungen lagen bei max. 91.1 bis 106.2%. Die „Recovery“-Rate der 15-F2t-Isoprostane lag nach Proteinpräzipitation im Urine bei 96.7±8.1%.

¹H-NMR Die Urin-Analyse erfolgte mit einem Varian INOVA NMR 600MHz Spektrometer, welches mit einem 5-mm HCN PFG Messkopf ausgestattet war. Vor der Messung, wurde der Urin mit 0.2M Kaliumphosphat in D₂O gepuffert. Alle ¹H-NMR Spektren wurden manuell hinsichtlich möglicher Phasenverschiebungen und Grundlinienschwankungen korrigiert, und derart Normalisiert, dass das jeweilige Gesamtintegral eines jeden Spektrums den gleichen Wert ergab.

Ergebnisse

		Kreatinin im Serum [mg/dL]	Harnstoff im Serum [mg/dL]	Körpergewicht [% Veränderung/Zeit]
6 Tage	Kontrolle	0.4±0.1	17±3	7±1 (Tag 6) 27±3 (Tag 28)
	CsA10	0.8±0.0	17±2	8±4
	CsA25	1.0±0.1*	25±5	1±3*
	Rapa1	0.4±0.1	16±4	9±5
	CsA10/Rapa1	0.8±0.5	48±31*	-7±3*
	CsA25/Rapa1	1.8±0.9*	86±26*	-11±5*
28 Tage	CsA10	0.7±0.1	34±6	36±5*
	Rapa1	0.6±0.1	19±1	23±12
	CsA10/Rapa1	0.8±0.2	42±13*	4±7*

Tabelle 1. Veränderungen von Harnstoff, Kreatinin und Körpergewicht in den einzelnen Behandlungsgruppen. Alle Werte als Mittelwert ± Standardabweichung. One-way ANOVA p<0.001 für jeden Parameter. *p<0.05 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Holm-Sidak post-hoc test).

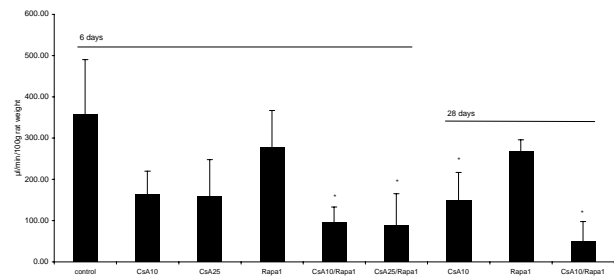


Abbildung 1. Veränderungen der glomerulären Filtrationsraten in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Alle Werte in Relation zum Körpergewicht (Mittelwert + Standardabweichung, (n=6)). One-way ANOVA: p<0.001, *p<0.05 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Holm-Sidak post-hoc test)

Diskussion

In dem dargestellten Toxizitätsmodell konnte eine Calcineurin Inhibitor vermittelte Nierenschädigung anhand konventioneller Parameter (GFR, Kreatinin) bestätigt werden. Es zeigte sich dabei der bekannte Effekt einer Verstärkung der Nephrotoxizität durch simultane Gabe von Sirolimus.

Als neuer Aspekt, konnten wir zeigen, dass Veränderungen der von uns gemessenen Metabolite mit dem Ausmaß einer renalen Funktionsstörung einhergehen. Ein Vergleich dieser NMR Spektren mit den sog. Isoprostanen weist auf eine zeitabhängige Verschlebung von zunächst reinem oxidativen Stress (Tag 6) zu einer strukturellen Schädigung der proximalen Tubuluszellen (Tag 28) hin.

Unter Cyclosporin (verstärkt unter zusätzlicher Sirolimusgabe) kommt es nach 28 Tagen zu einer Zunahme von Laktat und Glukose im Urin sowie zu einer Abnahme seiner Krebszyklusmetabolite (Abb. 4). Ein möglicher Mechanismus hierfür wäre, dass die Tubuluszellen nicht mehr Glukose/Laktat als Energiesubstrat verwerten können, und dies durch eine vermehrte Aufnahme der Krebszyklusmetabolite kompensieren. Dieser Vorgang wird wahrscheinlich in erster Linie durch (Natrium-Dicarboxylat Symporter NaDC-3) Transporter in den proximalen Tubuluszellen vermittelt. Träfe unsere Hypothese zu, dann wären die Veränderungen von Urinmetaboliten unter Cyclosporin (und Sirolimus) in erster Linie Folge von aktiven Kompensationsmechanismen der geschädigten Tubuluszellen. Diese Hypothese würde auch erklären, warum die heute angewendeten klinischen Parameter, die in erster Linie die Funktion der Glomeruli widerspiegeln, sich erst zu einem späten Zeitpunkt verändern, da diese in der Frühphase einer Schädigung noch intakt sind.

Ergebnisse

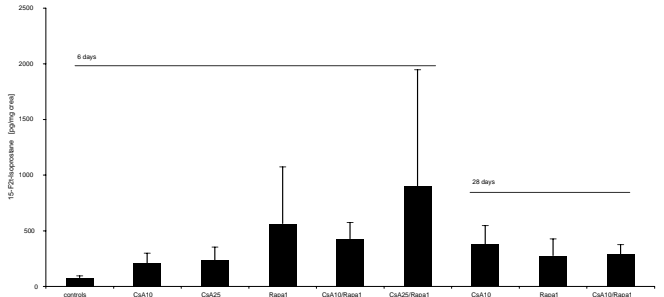


Abbildung 2. 15-F2t-Isoprostane im Urin nach 6 und 28 Behandlungstagen. Alle Konzentrationen in Relation zur Kreatininkonzentration, Mittelwert + Standardabweichung (n=6/Gruppe). (One-way ANOVA p<0.054)

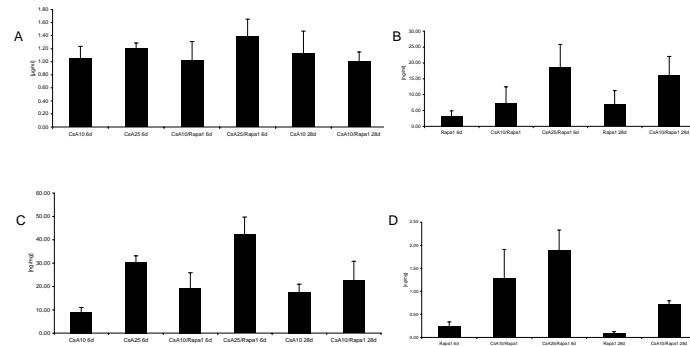


Abbildung 3. Blut- und Gewebespiegel von Sirolimus und Cyclosporin (4 Stunden nach letzter Einnahme). A) Cyclosporin-Blutspiegel, p<0.031; B) Sirolimus-Blutspiegel, p<0.001 C) Cyclosporin-Nierengewebespiegel p<0.001; D) Sirolimus-Nierengewebespiegel, p<0.001. Alle Werte als Mittelwert + Standardabweichung (n=6/Gruppe). Statistischer Gruppenvergleich anhand multivariater Analyse (one-way ANOVA)

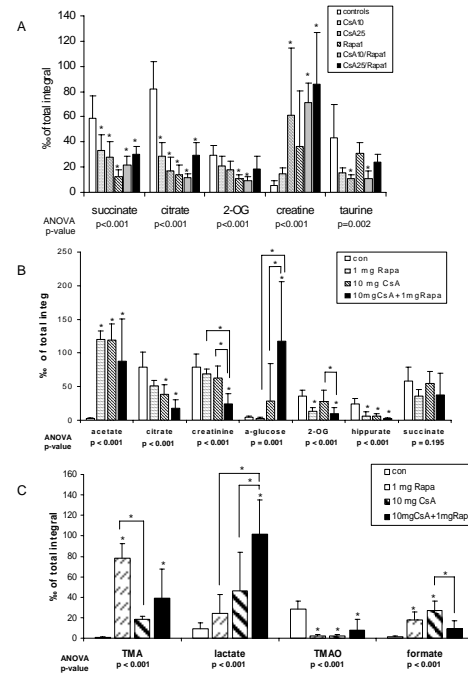


Abbildung 4. ¹H-NMR

Spektroskopie des Urins.

Alle Urinmetabolite wurden semiquantitativ bestimmt, und auf das Gesamtintegral normalisiert. Daten-Darstellung als Mittelwert + Standardabweichung. (n=6/ Gruppe), p-Werte (=one-way ANOVA); *p<0.05, Signifikanzniveau wurden anhand eines posthoc paarweise Vergleichs ermittelt (Holm-Sidak) method. [2-OG: α-ketoglutarate]

A. Metabolitenmuster im Urin nach 6 Behandlungstagen. deren Muster auf einen Vorliegen freier Radikale hinweisen.

B. Metabolite nach 28 Tagen, deren Muster auf einen Tubuluschaden hinweist.

C. Weitere Metabolite mit signifikanter Veränderung nach 28 Behandlungstagen

Schlußfolgerungen

Zusammenfassend haben wir

- ein Modell zur Untersuchung einer Immunsuppressiva-induzierten Nephrotoxizität etablieren können, welches an normal (nicht salzarm) ernährten Ratten und mit Blutspiegeln ähnlich derer von Patienten umgesetzt wurde,
- zeigen können, dass die biochemische Signatur von Cyclosporin/Sirolimus eine Zeitabhängigkeit aufweist, bei der oxidativer Stress in der Frühphase und tubulärer Schaden in der Spätphase dominieren,
- zeigen können, dass sowohl toxikodynamische als auch -kinetische Mechanismen als Ursache einer Verstärkung der Toxizität von Cyclosporin durch Sirolimus eine Rolle spielen und
- als wichtigster Aspekt mit unseren Daten die Hypothese unterstützen können, dass sich eine Calcineurin Inhibitor/Immunsuppressiva induzierte Nephrotoxizität anhand von Veränderungen von Metaboliten im Urin frühzeitig nachvollziehen lässt.