

## 3. Einfluß des ACE-Hemmers Enalapril auf die Entstehung einer chronischen Abstoßung nach orthotoper Rattennierentransplantation

### *Influence of the ace-inhibitor enalapril on the development of chronic rejection after orthotopic renal transplantation in the rat*

K. Schleimer<sup>1</sup>, A. Szabó<sup>2</sup>, V. Müller<sup>2</sup>, P. Hamar<sup>2</sup>, U. Heemann<sup>2</sup>, F. W. Eigler<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Universitätsklinik Essen

<sup>2</sup> Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten, Universitätsklinik Essen

## Einleitung

Die chronische Abstoßung verursacht nach dem ersten postoperativen Jahr nach einer Nierentransplantation einen Transplantatverlust von 6-7% jährlich: Es kommt zu einer progredienten Proteinurie und Hypertension mit Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration, Glomerulosklerose, Tubulusatrophie, interstitieller Fibrose und Gefäßobliteration [1]. Dieselben funktionellen und morphologischen Veränderungen werden experimentell nach Nierenmassenreduktion und Isografttransplantation sowie in der Klinik bei chronischen Nierenerkrankungen beobachtet [2, 3]. Als pathophysiologische Grundlage der chronischen Abstoßung werden deshalb neben alloantigenabhängigen vornehmlich alloantigenunabhängige Faktoren wie Perfusions- und Reperfusionsschäden, kalte und warme Ischämieschäden, Trauma, Nebenwirkungen der Immunsuppressiva und Infektionen genannt. Diese führen allesamt zur Destruktion von funktionellen Nephronen, welche zunächst durch ansteigenden intraglomerulären Druck und Hyperfiltration sowie durch Hypertrophie der intakten Nephrone kompensiert wird. Es resultiert eine Proteinurie; Makromoleküle werden im Mesangium abgelagert und unterhalten dort entzündliche Prozesse [2, 3, 4]. Darüberhinaus wird eine Wechselwirkung zwischen vermehrt exprimierten Adhäsionsmolekülen, der Makrophagen/Lymphozyteninfiltration und -aktivierung und der Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren diskutiert [3, 4, 5]. Es resultieren eine Glomerulosklerose, eine interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie mit einer weiteren Reduzierung funktioneller Nephrone.

Klinische Untersuchungen bei chronischen Nierenerkrankungen und experimentelle Untersuchungen nach Nierenmassenreduktion machen einen positiven Effekt der ACE-Hemmer bezüglich einer Reduzierung des intraglomerulären Drucks, der Proteinurie und der Glomerulosklerose wahrscheinlich [2, 6]. In Analogie ist ein positiver Einfluß auf den Verlauf einer chronischen Abstoßungsreaktion denkbar. Wir untersuchten daher im Tierexperiment unter standardisierten Bedingungen den Einfluß des ACE-Hemmers Enalapril auf die Transplantatfunktion und -morphologie in einem Modell der chronischen Abstoßung.

## Methodik

In Ketanest-Rompun-Narkose wurden Fishernieren (F 344, 200–300 g KG) linksseitig orthotop in Lewis-Ratten (Lew, 200–300 g KG) transplantiert. Die Anastomosierung der Nierengefäße sowie des Ureters erfolgte End-zu-End in mikrochirurgischer Technik. Zur Prävention einer akuten Abstoßung erhielten die Tiere in den ersten 10 postoperativen Tagen Cyclosporin A (1,5 mg/kg/d). Dann erfolgte die Eigennephrektomie rechts. In der Versuchsgruppe (n = 10) wurde nun Enalapril verabreicht (60 mg/l Trinkwasser); die Kontrollgruppe (n = 10) erhielt keine Medikation. Monatlich wurde die Proteinausscheidung/24 h bestimmt. Nach 20 Wochen folgte die Tötung der Tiere durch eine Ätherüberdosis. Zur histologischen Untersuchung wurden Biopsien des Transplantates in 10%iger Formalin-Lösung fixiert, standardisiert aufgearbeitet und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Glomeruli wurden ausgezählt und der Anteil der sklerosierten Glomeruli an 100 Glomeruli ermittelt. Zur immunhistochemischen Evaluierung der Makrophagen und T-Lymphozyten sowie der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 wurden Biopsien in flüssigem Stickstoff gefroren; Kryostat-schnitte hiervon wurden mit der APAAP-Methode angefärbt. Die so markierten Makrophagen (ED 1) und T-Lymphozyten (OX 19) wurden ausgezählt (20 Gesichtsfelder/Präparat, 400-fache Vergrößerung) und die mittlere Zellzahl/Gesichtsfeld berechnet. Die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 wurde je nach Anfärbungsgrad semiquantitativ anhand eines 4-gradigen Scores ausgewertet. Die mikroskopischen Auswertungen erfolgten sämtlich ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit der Präparate. Die Mittelwerte und Standardabweichungen des mittleren Fehlers wurden errechnet. Bei Abweichungen erfolgte die Berechnung der Signifikanzen nach dem Student-t-Test.

## Ergebnisse

Die Glomeruloskleroserate lag in der Enalapril-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ( $19 \pm 1,8$  vs.  $26 \pm 1,7\%$ ;  $p = 0,016$ ). Die perivaskuläre und periglomeruläre Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration war in der Enalapril-Gruppe ebenfalls signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Makrophagen:  $32 \pm 2,2$  vs.  $67 \pm 3,4$  Zellen pro Gesichtsfeld,  $p = 3,6 \times 10^{-7}$ , Lymphozyten:  $46 \pm 1,9$  vs.  $58 \pm 2,5$  Zellen pro Gesichtsfeld,  $p = 0,001$ ). Die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 fiel in der Enalapril-Gruppe signifikant niedriger aus als in der Kontrollgruppe (ICAM-1:  $1,89 \pm 0,26$  vs.  $3,0 \pm 0,24$ ,  $p = 0,006$ , VCAM-1:  $1,78 \pm 0,22$  vs.  $3,0 \pm 0,26$ ,  $p = 0,002$ ). In beiden Gruppen betrug die 20-Wochen-Überlebensrate 9/10. In der Enalapril-Gruppe nahmen die Tiere bis zur 20. postoperativen Woche im Mittel 175 g, in der Kontrollgruppe 151 g Körpergewicht zu. Die Proteinausscheidung/24 h war in der Enalapril-Gruppe konstant, nahm in der Kontrollgruppe dagegen nach der 12. postoperativen Woche stetig zu, so daß in der 16. Woche zwischen den beiden Gruppen deutliche Unterschiede vorlagen, die in der 20. Woche signifikant wurden ( $23,2 \pm 2,2$  vs.  $48 \pm 10,9$  mg/24 h,  $p = 0,036$ , s. Abb. 1). Hinsichtlich der Kreatinin-Clearance gab es zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ( $1,6 \pm 0,1$  vs.  $1,5 \pm 0,1$  ml/min,  $p = 0,34$ ).

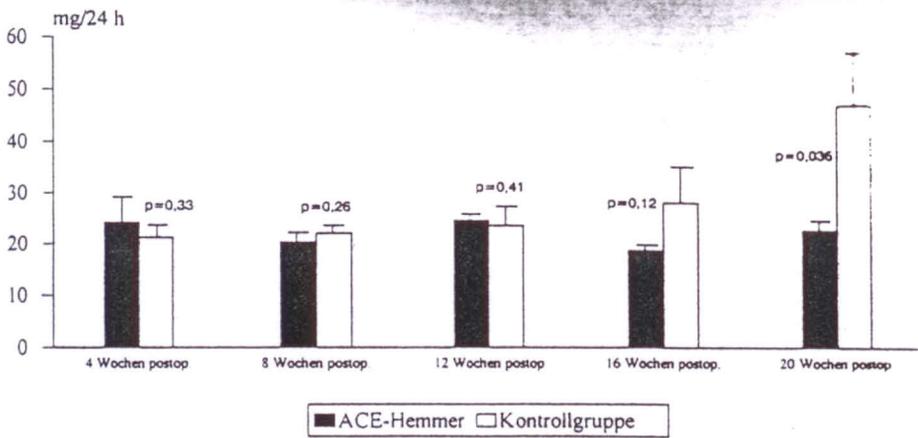


Abb. 1. Proteinurie (mg/24 h) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in der ACE-Hemmer-Gruppe und in der Kontrollgruppe

## Diskussion

Zeichen der chronischen Abstoßung entwickeln sich progressiv in Transplantaten einer Fisher/Lewis Spender/Empfängerkombination: 12 Wochen nach der Nierentransplantation tritt eine progrediente Proteinurie auf; zur selben Zeit ist eine vermehrte ICAM-1-Expression auf den Endothelzellen mit korrelierender Infiltration aktivierter Lymphozyten und Makrophagen zu erkennen, die mit der Entwicklung einer Glomerulosklerose einhergeht [3, 4, 5]. Dieselben Ergebnisse wurden in unserer Kontrollgruppe beobachtet.

Die Verabreichung von Enalapril reduzierte in unserer Studie die Proteinurie, Adhäsionsmolekülexpression, Leukozyteninfiltration und Glomerulosklerose. Eine mögliche Erklärung ist die Hemmung der Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion der afferenten und besonders der efferenten Arteriolen und somit die Verminderung des intraglomerulären Drucks und der Hyperfiltration [2, 6].

In ersten klinischen Studien (*Traindl, Rell, Oppenheimer*) wurde der Effekt von ACE-Hemmern nach Nierentransplantation untersucht: Durch Enalapril-Gabe konnten der intraglomeruläre Druck und die Proteinurie gesenkt werden, die Kreatinin-Clearance wurde nicht signifikant reduziert. *Oppenheimer* fand bei den Patienten, die mit sinkender Proteinurie gut auf den ACE-Hemmer ansprachen, histologisch lediglich Zeichen einer Glomerulonephritis, bei den Non-Respondern eher Zeichen einer chronischen Abstoßung. Kritisch anzumerken ist, daß *Traindl* und *Rell* keine morphologischen Untersuchungen durchführten und *Oppenheimer* ein inhomogenes Patientengut (unterschiedliche Grunderkrankungen, Immunsuppression, keine Kontrollgruppe) untersuchte [7, 8, 9]. In unserem Experiment konnte die Senkung der Proteinurie unter standardisierten Bedingungen bestätigt werden, wir fanden ebenfalls keinen signifikanten Einfluß auf die Kreatinin-Clearance; darüberhinaus wurden bei unseren histologischen und immunhistologischen Untersuchungen deutlich we-

niger Korrelate der chronischen Abstoßung bei Enalapril-behandelten Transplantaten gefunden. Insgesamt wirkt sich die Behandlung mit ACE-Hemmern günstig auf die Reduzierung der chronischen Abstoßung nach Nierentransplantation aus.

## Zusammenfassung

Nach einer Nierentransplantation kommt es aufgrund multipler alloantigenabhängiger und -unabhängiger Faktoren zu einer Destruktion funktioneller Nephrone. Nach einer initialen Phase kompensatorischer Hypertrophie der verbliebenen Nephrone resultiert langfristig die Ausbildung einer Glomerulosklerose mit interstitieller Fibrose, Tubulusatrophie und Proteinurie, dem Korrelat einer chronischen Abstoßung. Neuere Untersuchungen bei chronischen Nierenerkrankungen und experimentelle Untersuchungen nach Nierenmassenreduktion, denen ein zumindest ähnlicher Pathomechanismus zugrunde liegt, belegen einen positiven Effekt der ACE-Hemmer. In Analogie untersuchten wir die Auswirkung eines ACE-Hemmers in einem Rattenmodell der chronischen Abstoßung: Fisher-Nieren wurden in linksseitig nephrektomierte Lewis-Ratten orthotop transplantiert. Nach 10-tägiger Therapie mit Cyclosporin A (1,5 mg/kg KG) wurde die verbliebene Eigenniere entfernt. Danach erhielt eine Gruppe (n = 10) Enalapril (60 mg/l Trinkwasser), die Kontrollgruppe (n = 10) keine Medikation. Monatlich wurde die Proteinausscheidung/24 h bestimmt. Nach 20 Wochen wurden die Tiere getötet und die Transplantate histologisch und immunhistologisch untersucht. Die Glomeruloskleroserate lag in der Enalapril-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (19 vs. 26%). Die perivaskuläre und periglomeruläre Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration war in der Enalapril-Gruppe ebenfalls signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Makrophagen: 32 vs. 67 Zellen pro Gesichtsfeld, Lymphozyten: 46 vs. 58 Zellen pro Gesichtsfeld). Die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 fiel in der Enalapril-Gruppe signifikant niedriger aus als in der Kontrollgruppe (ICAM-1: 1,89 vs. 3,0; VCAM-1: 1,78 vs. 3,0). Die Proteinausscheidung/24 h war nach 20 Wochen in der Enalapril-Gruppe ebenfalls signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (23,2 vs. 48 mg/24 h). Zusammenfassend führte die Verabreichung von Enalapril zu einer geringeren Ausbildung der chronischen Abstoßung.

## Summary

During the course of renal transplantation, nephrons are destroyed by alloantigen-dependent and -independent factors. After an initial phase of compensatory hypertrophy of the remaining nephrons, glomerular sclerosis, interstitial fibrosis, tubular atrophy and increasing proteinuria result. A variety of studies in chronic renal disease indicated a positive effect of ace-inhibitors upon hyperfiltration. Therefore we examined the effect of an ace-inhibitor in a rat model of chronic rejection. Fisher-kidneys were transplanted orthotopically in Lewis rats, whose left kidney had been removed. For the first 10 days each allograft recipient was treated with low dose cyclosporine (1,5 mg/kg/day), then the remaining right kidney was nephrectomized. Rats were treated either with enalapril (60 mg/l drinking water) or vehicle (n = 10/group).

Urinary protein excretion was determined monthly. After 20 weeks rats were harvested and the transplants were examined histologically and immunohistologically. The degree of glomerulosclerosis in the enalapril treated recipients was significantly lower than in controls (19 vs. 26%). Numbers of macrophages and T-lymphocytes, present in perivascular and periglomerular areas, were also significantly lower in the enalapril-group than in the control-group (macrophages: 32 vs. 67 cells/field of view, lymphocytes: 46 vs. 58 cells/field of view). ICAM-1 and VCAM-1 were significantly less expressed in the enalapril-group as compared to the control-group (ICAM-1: 1,89 vs. 3,0; VCAM-1: 1.78 vs. 3,0). The protein excretion was significantly lower in the enalapril-group (23,2 vs. 48 mg/24 h). In summary enalapril significantly reduced the pace of chronic renal rejection.

## Literatur

1. Häyry P, Mennander A, Yilmaz S, Ustinov J, Räisänen A, Miettinen A, Lautenschlager I, Lemström K, Bruggeman CA, Paavonen T (1992) Towards understanding the pathophysiology of chronic rejection. *Clin Investig* 70:780-790
2. Brunner FP, Thiel G, Hermle M, Bock A, Mihatsch MJ (1989) Long-term enalapril and verapamil in rats with reduced renal mass. *Kidney International* 36:969-977
3. Tullius SG, Heemann U, Hancock WW, Azuma H, Tilney NL (1994) Long-term kidney isografts develop functional and morphologic changes that mimic those of chronic allograft rejection. *Annals of Surgery* 220:425-435
4. Heemann UW, Azuma H, Tullius SG, Mackenzie H, Brenner BM, Tilney NL (1994) The contribution of reduced functioning mass to chronic kidney allograft dysfunction in rats. *Transplantation* 58:1317-1322
5. Hancock WH, Whitley WD, Tullius SG, Heemann UW, Wasowska B, Baldwin WM, Tilney NL (1993) Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation* 56:643-650
6. Risler T, Erley CM (1993) Beeinflussung der renalen Hämodynamik und der Proteinurie bei Patienten mit arterieller Hypertonie und Nierenerkrankungen. *Z Kardiol* 82:39-44
7. Traindl O, Falger S, Reading S, Banyai M, Liebisch B, Gisinger J, Templ E, Mayer G, Kovarik J (1993) The effects of lisinopril on renal function in proteinuric renal transplant recipients. *Transplantation* 55:1309-1313
8. Rell K, Linde J, Morzycka-Michalik M, Gacjong Z, Lao M (1993) Effect of enalapril on proteinuria after kidney transplantation. *Transpl Int* 6 (4):213-217
9. Oppenheimer F, Flores R, Cofán F, Campistol JM, Ochs J, Ricart MJ, Vilardell J, Torregrosa JV, Darnell A, Carretero P (1995) Treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors in renal transplantation with proteinuria. *Transplant Proc* 27:2235-2236

Dr. med. Karina Schleimer, Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Universitätsklinik Essen, Hufelandstraße 55, 45122 Essen