

Angiotenzinkonvertáló enzim gátló enalapril csökkenti a növekedési faktorok mRNS-expresszióját a vesetranszplantátum chronicus kilökődése során patkányban

*Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor enalapril
on growth factor mRNA expression
in chronic renal allograft rejection in the rat*

Szabó J Attila^{1,3}, Müller Veronika^{2,3}, Schleimer Karina³, Fekete Andrea¹, Hamar Péter³, Antus Balázs³,
Reusz György¹, Heemann Uwe³

I. sz. Gyermekklinika MTA Kutatólabor¹, Pulmonológiai Klinika², Semmelweis Egyetem,
Nephrologiai Osztály és Labor³, Esseni Egyetem

Levelezési cím:

Szabó J Attila

Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekklinika

1083 Budapest, Bókay J. u. 53.

Tel.: 06-36-13343186 Fax: 06-36-13247795 e-mail: szabat@gyerl.sote.hu

ÖSSZEFOGLALÁS *Háttér.* Az immunsuppressív terápia jelentős fejlődésének ellenére, a vesetranszplantátumok chronicus kilökődésének gyakorisága nem változott. Egyes tanulmányok szerint az angiotenzinkonvertáló enzim (ACE) gátlása lassítja a graftban az arteriosclerosis, a glomerularis sclerosis, illetve a tubularis atrophia kialakulását. ACE-gátlás hatására, a vesetranszplantációt követően, patkányban csökken mind a szisztémás, mind a glomerularis capillaris nyomás. Kísérleteink során az ACE-inhibitor enalapril citokinekre és növekedési faktorokra kifejtett hatását vizsgáltuk a transzplantált vese chronicus kilökődése során patkányban.

Módszerek: Fisher (F344) patkányok veséjét orthotopically transzplantáltuk Lewis (Lew) patkányokba. Az acut rejectio megelőzésére minden recipienst a transzplantációt követő első 10 napban cyclosporinnal kezeltünk. Az egyik csoportban az állatok ivóvizéhez enalapril adtunk, a másik csoportban az állatok csak ivóvizet kaptak. Az átültetést követő 20. héten az állatokat leöltük, a vesékből származó mintákat szövettanilag és immunhisztokémiailag feldolgoztuk. A citokinek és nö-

SUMMARY *Background.* Despite the rapid progress in immunosuppression, chronic renal allograft rejection is still the major cause of graft loss. According to recent studies ACE inhibition ameliorates vascular damages in the graft such as glomerulosclerosis, arteriosclerosis and tubular atrophy. Moreover it has a decreasing effect on systemic and glomerular capillary hydrostatic pressure in rat kidney allografts. In our study we examined the effect of ACE inhibitor, enalapril on cytokine and growth factor expression in a chronically rejecting rat kidney allografts.

Methods. Kidneys of Fisher (F344) rats were orthotopically transplanted into Lewis (Lew) rats. To prevent acute rejection, cyclosporine A (1,5 mg/kg/day) was given to all recipients during the first 10 days after transplantation. Enalapril (60 mg/l) or vehicle was added to the drinking water 10 days after transplantation. Animals were harvested 20 weeks after transplantation for histologic and immunohistologic studies, as well as for evaluation of cytokine and growth factor mRNA by semiquantitative polymerase chain reaction.

növekedési faktorok mRNS-expresszióját a veseszövetből semikvantitatív RT-PCR segítségével határoztuk meg.

Eredmények. A kontrollcsoportban chronicus rejecciónra jellemző szövettani kép fejlődött ki, glomerularis és vascularis károsodással, valamint leukocytainfiltrációval. Az enalaprilal kezelt állatcsoportban a chronicus kilökődés jellemzői és a proteinuria enyhébbek voltak.

A transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β), a thrombocytanövekedési faktor A és B lánc (PDGF A és B), az insulin-like növekedési faktor-I (IGF-I), interleukin-1 (IL-1) és a monocyta kemotaktikus protein-1 (MCP-1) mRNS expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt az enalaprilal kezelt csoportban. A csökkenés az IL-1 és a PDGF-A esetében volt a legkifejezettebb.

Következtetés. Az enalapril-kezelés a transzplantált vese chronicus rejeccións modelljén patkányban gátolta a proteinuria kifejlődését, csökkentette a morfológiai károsodást, leukocytainfiltrációt és a növekedési faktorok, illetve cytokinek mRNS expresszióját.

Kulcsszavak: vesetranszplantáció, chronicus kilökődés, angiotenzinkonvertáló enzim inhibitor

Results. In the controls severe signs of chronic rejection could be detected, such as glomerular and vascular lesions, associated with severe leukocyte infiltration. Enalapril treated animals developed less proteinuria and other signs of chronic rejection. The mRNA levels of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), platelet-derived growth factor A and B chain (PDGF A and B), insulin-like growth factor (IGF-I), interleukin-1 (IL-1), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were significantly reduced in the enalapril group and were most pronounced for IL-1 and PDGF A. Additionally, the renal angiotensinogen mRNA level was increased after enalapril treatment.

Conclusion. Enalapril treatment attenuated the development of proteinuria, decreased the morphological damage, leukocyte infiltration and prevented the rise in renal mRNA levels on growth factors and cytokines in kidney grafts in rat model of chronic renal allograft rejection.

Key-words: renal transplantation, chronic rejection, angiotensin converting enzyme inhibitor

HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 2001; 5 (1): 44–51.

BEVEZETÉS Az elmúlt években a chronicus kilökődés vált a vesetranszplantátum hosszú távú túlélésének egyik legmeghatározóbb tényezőjévé. Bár a chronicus allograft rejecciónért elsősorban az ismétlődő allogéntől függő reakciót teszik felelőssé, az utóbbi időben egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a folyamat kialakításában az alloantigéntől független faktoroknak is (1-7). Ezek közé tartozik maga a műtői beavatkozás, az ischaemia/reperfúziós károsodás, a cytomegalovírus- (CMV) fertőzés, illetve a donor kora is (1-7).

Etiológiájuktól függetlenül, ezek a faktorok az átültetett vese nephronszámának csökkenését eredményezik az ép veséhez viszonyítva, kiegyenlített helyzetet teremtve ezzel az allograft nephronzáma és a recipiens igénye között, mely a megmaradt nephronok túl működését és hyperfiltrációját okozza (8). A megmaradt glomerulusoknak alkalmazkodni kell a megváltozott mikrocirkulációhoz, ami a glomerularis capillaris áramlás és nyomás növekedéséhez és a glomerularis filtrációs ráta (GFR) jelentős emelkedéséhez vezet (9, 10). A hyperfiltratio az endothel aktiválódását eredményezheti, ami egyes adhaesiós molekulák: intercellularis adhaesiós molekula-1 (ICAM-1), vascularis adhaesiós molekula-1 (VCAM-1); cytokinek: IL-1, tumornecrosis faktor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), MCP-1; valamint növekedési faktorok: IGF-1, PDGF és TGF- β felszabadulását okozza, mely sejtmigrációt és leukocytá-, illetve simaizom-proliferációt idéz elő és központi szerepet játszik az extracelluláris matrix felszaporodásában (11). Emellett a lokális (endothelialis) és a szisztémás renin-angiotenzin rendszer is aktiválódhat, aminek nagy szerepe van a transzplantációt követő hypertonia kialakulásában.

Angiotenzinkonvertáló enzim (ACE) gátlóval történő kezelés késlelteti a tubulointersticiális fibrosis és a glomerulosclerosis kialakulását hypertoniás, chronicus vesebetegségben szenvedő betegek esetében, illetve vesetranszplantációt

követően (12-14). Az ACE-inhibitorok más vérnyomáscsökkentő szerekkel szemben (kísérletes modellekben és klinikai tanulmányokban egyaránt) tapasztalt nagyobb hatékonyságát, valószínűleg az angiotenzin-II által kiváltott hatások, mint az efferens arteriolák rezisztencianövekedésének (15-17), növekedést és migrációt elősegítő cytokinek termelésének gátlása okozza (18). Az ACE-inhibitorok e terápiás hatásai függetlenek szisztémás vérnyomáscsökkentő tulajdonságaiktól, mivel normotensív egyének esetében is beszámoltak hasonló eredményekről (19, 20). A chronicus vesebetegségekben az ACE-gátlók, hasonló antihypertensív hatás mellett, hatékonyabban csökkentik a proteinuriát, mint a béta-blokkolók vagy a kalciumantagonisták (21).

Az angiotenzin-II növekedési faktorként viselkedik a glomerularis és tubularis sejtekkel szemben (22) és valószínűsíthető, hogy a TGF- β és PDGF-A által mediált kollagénszintézisre közvetlen serkentő hatású (18). Az angiotenzin-II serkenti a mononuclearis és mesangialis sejtek adhaesióját és a macrophagok, illetve lymphocyták kemotaxisát is (18). Az ACE-gátlás kedvező hatásai vesetranszplantáltak esetében feltehetően nem kizárólag a gyógyszer szisztémás vérnyomáscsökkentő mechanizmusának köszönhetők, hanem antimigrációs és antiproliferatív hatások is érvényesülhetnek, valamint gátolhatják a cytokinek és egyes növekedési faktorok felszabadulását (16-25).

Jelen tanulmányunk célja az ACE-gátló enalapril hatásának elemzése a transzplantált vese chronicus kilökődésének progressziója során, melyet a Fisher/Lewis patkánymodellben, mint a vese chronicus rejecciónjának standard állatmodelljén végeztünk.

MÓDSZEREK

ÁLLATOK A kísérleteket beltenyésztett him Fisher (F344) és Lewis (Lew) patkányokon végeztük. Átlagos testsúlyuk

180–250 g volt. Az állatokat a Charles-Rivers cég (Sulzfeld, Németország) szállította. A vizsgálatok során standard körülmények között, állandó hőmérséklet és páratartalom mellett tartottuk őket, normál diétát és igényük szerint, ivóvizet kaptak. A kísérleteket az állatvédelmi törvények betartásával és etikai bizottság engedélyével végeztük.

VESEÁTÜLTETÉS A transzplantáció során a Fisher patkányok szolgáltak donorként, és a Lew állatok voltak a recipiensek. Ketamin (100 mg/tskg) intraperitonealis (Ketamin 10%; cp-pharma, Burgdorf, Németország) és xylacin (10 mg/tskg, ip; Rompun®; Bayer, Leverkusen, Németország) adásával az állatokat elaltattuk. Az F344 patkányok bal veséjét izoláltuk, majd eltávolítottuk és 4 °C-os Ringer-laktáttal perfundáltuk. A veséket ezután orthotopically beültetjük elaltatott, testtömegben a donornak megfelelő Lew recipiensekbe, melyek bal renalis ereit izoláltuk és leszorítottuk, és a bal oldali saját vesét eltávolítottuk. A donor és a recipiens renalis arteriái, venái és az ureterek között 10-0 prolone varrattal vég-a-véghez anastomosist létesítettünk. Az ellenoldali veséket a műtét utáni 10. napon eltávolítottuk.

KÍSÉRLETI PROTOKOLL A műtét és az immunuszuppressio okozta fertőzésveszély kiküszöbölésére az állatok az első 10 postoperatív napban Ceftriaxont (Rocephin, 20 mg/kg/nap; Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen, Németország) kaptak. Az akut rejectiók epizódok megelőzésére a patkányokat a műtét utáni első 10 nap során cyclosporine A-val (Novartis GmbH, Nürnberg, Németország) kezeltük. A transzplantált állatok vagy normál (kontrollcsoport, N=10) vagy 60 mg/l enalapril (MSD, Haar, Németország; enalapril-csoport, N=10) tartalmazó ivóvizet kaptak. Plusz kontrollcsoportként szolgált 12 áloperált Lew patkány, melyek csak cyclosporine A-kezelésben részesültek.

A testsúlyt és a fehérjeürítés mértékét havonta egyszer mértük. 20 hét után az állatokat dietil-éterrel elaltattuk, majd kivérettük és az átültetett vesét eltávolítottuk. A mintákat immunhisztológiai és polimeráz láncreakció (PCR) feldolgozás céljából folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottuk, illetve 4%-os formalinban fixáltuk szövettani vizsgálatok céljára.

FUNKCIONÁLIS PARAMÉTEREK Minden negyedik héten 24 órás vizeletgyűjtést végeztünk. A vizelet fehérje- és kreatininkiválasztását, valamint a serum kreatininkoncentrációját meghatároztuk. A kreatininclearance-t a vizsgálatok végén a mért adatokból számoltuk.

SZÖVETTAN A szövettani vizsgálatokhoz a veseszövetdarabokat 4%-os formalinban fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, végül hematoxilin-eosinnal (HE) festettük. A glomerulosclerosis perijódsavas Schiff- (PAS) reakcióval festett metszeten vizsgáltuk. A scleroticus területen a capillarisk összeesése, Bowmann-tok atrophias segmentumainak adhaesiója és a hialin megvastagodása volt megfigyelhető. Minden vesedarbából, legalább 200 glomerulust vizsgáltunk, a scleroticus glomerulusok számát az összglomerulus-mennyiség arányában fejeztük ki.

ANTITESTEK Monoclonalis antitesteket használtunk a Serotec Camon Labor-Service GmbH-től (Wiesbaden,

Németország) macrophagok (ED1), CD5+ T-lymphocyták (OX19), ICAM-1 (CD-54) és VCAM-1 (CD-106) adhaesiós molekulák ellen. A másodlagos egérelles nyúl antitesteket és az alkalikus foszfatáz antialkalikus foszfatáz (AAP) komplexet a Dako A/S (Hamburg, Németország) szállította.

IMMUNHISZTOLÓGIA A vesegraftok egy darabját folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottuk, cryostatral met-szeteket készítettünk, 4 °C-os acetonban fixáltuk, levegőn szárítottuk, majd a megfelelő antitestekkel kezeltük. Az elsődleges antitestkezelést követően, a szövetmintákat egérelles nyúl IgG-vel és AAP komplexszel inkubáltuk. Az ICAM-1 és VCAM-1 immunreakció erősségét 1-3-as skálán értékeltük (1 = enyhe, 2 = közepes, 3 = erős). A macrophag (ED1) és T-lymphocyt (OX19) immunpozitív sejteket átlag ± standardszórás sejt/látóter (S/LT) fejeztük ki; legalább 20 látóteret számolva mintánként, 400x-os nagyításnál.

TELJES RNS-IZOLÁLÁS A mintából teljes RNS-t izoláltunk és ezt használtuk a reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakcióhoz (RT-PCR). A veseszövetet 500 ml; 4 mol/l guanidin isothiocyanat (GITC) (Sigma, St. Louis, MO, USA), 25 mmol/l sodium citratot, (pH = 7,0), 0,1 mol/l β -mercaptoetanolt, 0,5%-os sarcosylt tartalmazó hideg lysis oldatban tettük, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. A teljes RNS-t a veseszövetből egy módosított guanidin isothiocyanat extrakciós protokoll alapján izoláltuk. Röviden, a fagyasztott szövetet 4 ml GITC puffert (4 mol/l guanidin isothiocyanat; Sigma) és fenolkloroformot (pH = 4,0, Roth) tartalmazó oldatban homogenizáltuk. A mintákat 10 percig 1500 g fordulatszámra 20 °C-on centrifugáltuk. A felülúszót megegyező mennyiségű isopropanolhoz pipettáztuk. Az RNS-t Rneasy, Total RNS Isolations Kit (Quiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével tisztítottuk és további feldolgozásig -80 °C-on tároltuk. Az RNS-koncentrációt spektrofotométerrel mértük.

REVERZ TRANSZKRIPCIÓ Az RNS-t Oligo (dt) 12-18 primerrel (GIBCO BRL, Karlsruhe, Németország) RT reakcióval amplifikáltuk. 1 mg teljes RNS-t adtunk 0,5 mg primerhez. A reakciós elegy tartalmazott még pufferoldatot [(50 mmol/l, pH = 8,3 TRIS hidroklorid-puffer, 75 mmol/l KCl, 5 mmol/l $MgCl_2$) GIBCO BRL], adenosin-trifoszfátot, timidin-trifoszfátot, guanosin-trifoszfátot és citozin-trifoszfátot 0,2 mmol/l koncentrációban (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Németország), 0,5 ml 40 U/ml-es rekombináns ribonukleáz inhibitor (Promega, Madison, WI, USA) és 0,5 ml 200 U/ml-es M-MLV reverz transzkriptázt (GIBCO BRL). Az első láncreakció 36 °C-on 1 óráig futott, majd 5 perces 95 °C-ra hevítéssel a reakciót leállítottuk és a mintákat ezután jégén hűtöttük.

SPECIFIKUS KOMPLEMENTER DNS-AMPLIFIKÁCIÓ TGF- β_1 (28), PDGF-A és B lán (29), MCP-1 (30), IGF-1 (31), IL-1 (32) és glicerinaldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) (33) mRNS-nek megfelelő specifikus komplementer DNS-t amplifikáltunk PCR-reakció segítségével. Az RT reakcióból származó termékből 1 ml-t, PCR puffert (750 mmol/l Tris hidroklorid, pH = 9,0, 200 mmol/l $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% (wt/térfogat) Tween, 20, 20 mmol/l magnézium-diklo-

rid (Dianova, Hamburg, Németország)), mindegyik deoxinuleozid-trifoszfáttól 0,2 mmol/l-t, 1 mmol/l-t mindkét primerből (Eurogentec, Köln, Németország) és 2,5 U Taq DNS-polimerázt (Dianova, Hamburg, Németország) használtunk a PCR-reakcióhoz. Az amplifikációhoz Perkin Elmer Thermal Cycler-t használtunk a következő protokoll szerint: kezdeti denaturáció 94 °C-on három percig, utána 30–35 ciklus három hőmérsékleten (denaturálás 94 °C 30 s, annealing 55 °C, 30 s és extension 72 °C, 30 s) végül 72 °C-on hét percig, majd hűtés 4 °C-on.

GÉL-ELEKTROFORÉZIS Az amplifikált PCR-terméket 10 ml minta-aliquotok elektroforézisével azonosítottuk 5%-os, 0,5 mg/ml ethidium-bromiddal dúsított agaróz gélen futtatva. A terméket ultraviola fénnel átvilágítva tettük láthatóvá, majd a gél lefényképeztük. A specifikus termék nagyságát ismert nagyságú, 1 kb oligonukleotid DNS-létrához (GIBCO BRL) hasonlítottuk, amit minden gélen a mintákkal egyszerre futtattunk. A cytokin-DNS-t szemikvantitatíven értékeltük, a minta GAPDH-vel (belső kontroll) történő denzitometriás összehasonlításával, miután a keletkezett képet videóval digitalizáltuk a komputeres denzitometriához. Az eredményeket a növekedési faktorok vagy a citokinek és a GAPDH mRNS intenzitás arányában $\pm$ standardszórást adtuk meg.

STATISZTIKAI ANALÍZIS Az eredményeket átlag $\pm$ standard szórás értékben adtuk meg. A statisztikai analízishez t-próbát használtunk. A nem számszerű adatokhoz – mint az adhaesiós molekulák expressziójának intenzitása – Fisher egzakt tesztet alkalmaztunk. A $p < 0,05$ értéket fogadtuk el statisztikusan szignifikánsnak (34).

EREDMÉNYEK

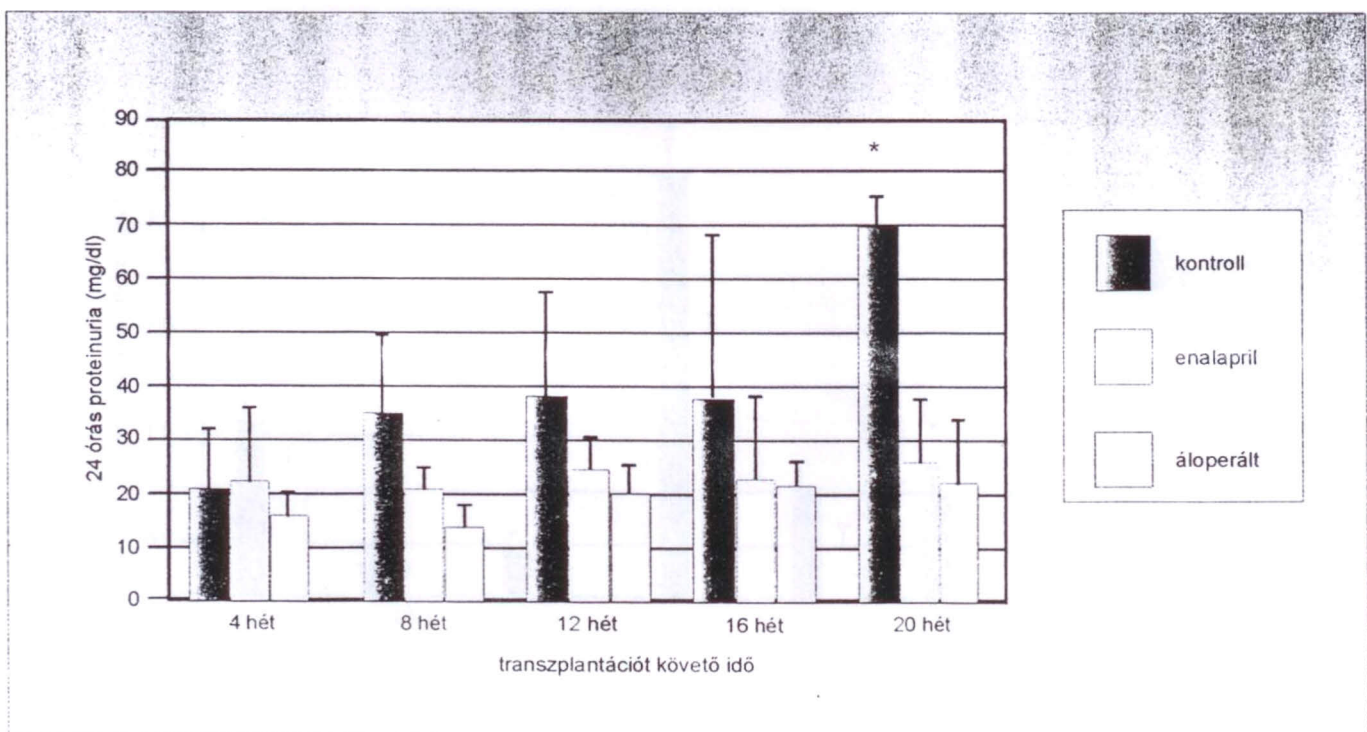
FUNKCIONÁLIS MÉRÉSEK A 20 hetes követési időszak alatt a kontrollállatokban a 16 héttől kezdve szignifikáns és progresszív proteinuria fejlődött ki, ezzel szemben az enalaprillal kezelt recipiensek minimális mennyiségű fehérjét ürítettek (20. héten; $48 \pm 3,6$ vs. $23 \pm 0,73$ mg/24 óra, $p < 0,05$; 1. ábra). A kreatininclearance nem különbözött szignifikánsan a két csoportban a vizsgálat végén (kontroll $1,5 \pm 0,1$ ml/perc vs. kezelték $1,6 \pm 0,1$ ml/perc). Az áloperált állatokban nem alakult ki proteinuria.

ARTERIÁS KÖZÉPNYOMÁS Az arteriás középnyomás nem volt szignifikánsan különböző a kontroll és az enalaprillal kezelt csoportok között ($94 \pm 10,2$ vs. $90 \pm 8,9$ Hgmm).

TESTSÚLY A testsúly a kontrollállatokban alacsonyabbnak bizonyult, mint az enalaprillal kezeltéké (419 ± 15 vs. 429 ± 11 g), de a különbség nem volt szignifikáns.

SZÖVETTAN A vizsgált időszak alatt az összes recipiensben kifejlődtek a chronicus rejectio szövettani jellemzői, mint a glomerulosclerosis, az interstitialis fibrosis, a tubularis atrophia, illetve a graft arteriáiban az intima proliferációja (11, 35, 36). A károsodás mértéke azonban különbözött a csoportok között. Az enalaprillal kezelt állatokban szignifikánsan enyhébb mértékben jelentkeztek a chronicus rejectióra jellemző elváltozások, elsősorban a glomerulosclerosis.

Glomerulosclerosis. A glomerulosclerosis szignifikánsan magasabb volt a kontrollokban ($26 \pm 1,7\%$), mint az enalaprillal kezelt csoportban ($19 \pm 1,8\%$; $p < 0,05$).



1. ábra. A proteinuria a transzplantációt követően 4 hetenként mérve progresszíven emelkedett a kontrollállatokban (* $p < 0,05$ vs. enalapril és áloperált)

Interstitialis fibrosis. A kontrollcsoport állataiban az interstitialis fibrosis kifejezettebb volt, mint az enalaprillal kezelt állatok esetében ($p < 0,05$). A kontrollcsoportban, egy állatban egyáltalán nem fejlődött ki interstitialis fibrosis, három állatban 1-es fokú, hat állatban 2-es fokú fibroticus elváltozásokat láttunk, 3-as fokú interstitialis fibrosist sehol nem tapasztaltunk. Az enalaprillal kezelt patkányok közül öt esetében nem volt kimutatható interstitialis elváltozás. Öt állatban találtunk 1-es fokú fibrosist, 2-es és 3-as fokú interstitialis károsodás egyetlen állatban sem fejlődött ki.

Tubularis atrophia. A tubularis atrophia a kontrollcsoportban az enalaprillal kezelt állatokhoz viszonyítva súlyosabbnak bizonyult. A kontrollcsoportból három állatban egyáltalán nem alakult ki tubularis atrophia. Négy állat mutatott 1-es és három állat 2-es fokú tubularis károsodást. Ezzel szemben az enalaprillal kezelt állatok esetében ötnek volt 1-es fokú tubularis atrophiaja, 2-es és 3-as fokú atrophia egyetlen állatban sem alakult ki. A két csoport eredményei között a különbség nem volt szignifikáns.

Intimaproliferatio. A kontrollcsoportban kifejlődött intimaproliferatio kifejezettebb volt, mint az enalaprillal kezelt állatok esetében észlelt elváltozások. A kontrollállatok közül kettőnél nem találtunk intimaproliferációt. Hat állatban 1-es és 2 állatban 2-es fokú volt az elváltozás. Az enalaprillal kezelt csoportban 1-es fokú károsodást négy állat mutatott, míg a többiben egyáltalán nem volt intimaproliferatio. A két csoport eredményei nem különböztek szignifikánsan.

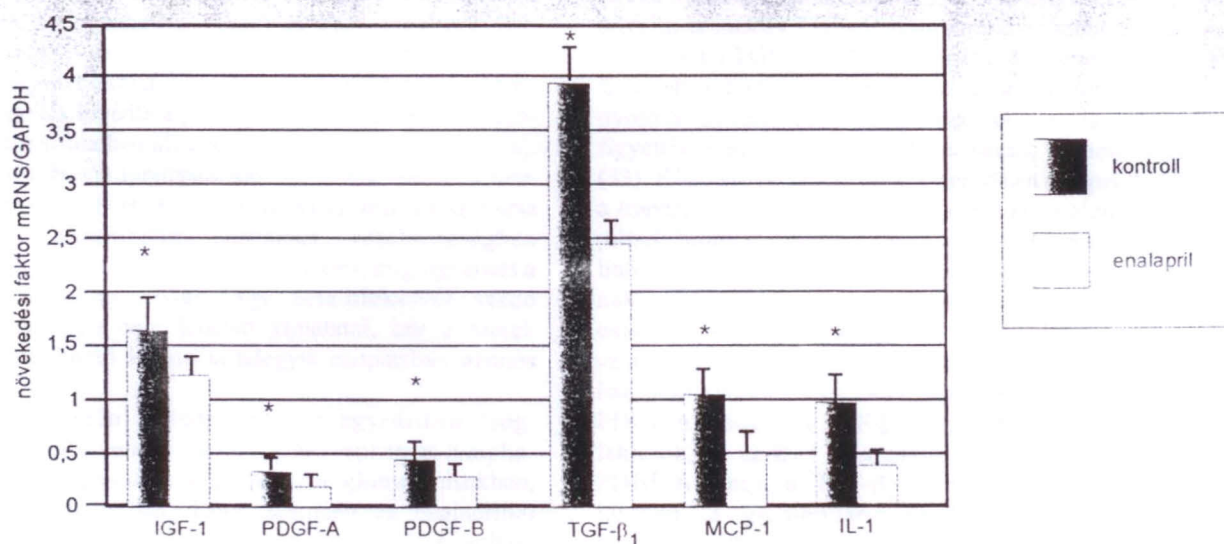
Immunhisztológia. 20 hét elteltével mononuclealis leukocytainfiltrációt figyelhattunk meg mindkét csoportban. A sejtes beszűrődés az interstitialis területeken, elsősorban az erek és glomerulusok környékén volt a legkifejezettebb. A lymphocyták a Bowman-tok környezetében halmozódtak fel és

a glomerulusban nem voltak láthatók. A glomerulusokban a sejtes elemek közül csak macrophagokat találtunk. A lymphocyták és a macrophagok száma szignifikánsan alacsonyabb volt a kezelt csoportban, mint a kontrollállatok között.

A leukocyták jelenléte kapcsolatban áll az adhaesiós molekulák (ICAM-1, VCAM-1) erős immunreaktív szignáljával. Az ICAM-1 expressziója egyértelműen kifejezettebb volt az endothelialis sejteken, kisereken, a mesangialis sejteken és a tubularis epithelialis sejteken, míg a VCAM-1 főleg a tubularis epithelialis sejteken jelent meg. Az enalapril-kezelés hatására csökkent mindkét adhaesiós molekula immunreaktív szignálja ($p < 0,01$). Az áloperált állatokban a chronicus rejectióra jellemző elváltozások sem szövettanilag, sem immunhisztológiailag nem voltak kimutathatók.

NÖVEKEDÉSI FAKTOROK mRNS-SZINTJE A növekedési faktorok mRNS-ének szintje az interstitialis fibrosis és a glomerulosclerosis kialakulásával és progressziójával párhuzamosan változott (37, 38). A transzplantációt követően a PDGF-A lánc mRNS-szintje négyszer magasabb volt a kontrollcsoportban, mint a kezelt állatokban. A TGF- β_1 mRNS-szintje a kontrolloknál 1,6-szor volt magasabb, mint az enalaprillal kezelt állatokban. Az enalapril-kezelés továbbá szignifikánsan (1,5x) csökkentette a PDGF-B láncának és az IGF-I-nek a mRNS-szintjét is (2. ábra).

Az MCP-1 egy, a monocytákra és macrophagokra ható – a chronicus gyulladásos folyamatokban is szerepet játszó (38) – kemotaktikus faktor mRNS-szintje szintén alacsonyabb volt az enalaprillal kezelt csoportban (2. ábra). Az MCP-1 mRNS-szintje követte a graftot infiltráló monocyták számának változását.



2. ábra. Cytokinek és növekedési faktorok mRNS-expressziója. Az összes vizsgált faktor mRNS-expressziója szignifikánsan nagyobb volt a kontrollállatok veséjében az enalaprillal kezelt állatokéhoz képest (* $p < 0,05$ vs. enalapril)

A monocyta/macrophag rendszer által termelt IL-1 β mRNS expressziója is szignifikánsan (2,5x) csökkent a kezelt állatokban a kontrollokhöz viszonyítva (2. ábra). Ez a faktor jelentős szerepet játszik a sclerosis és az interstitialis fibrosis kialakulásában. Akárcsak az MCP-1 esetében, az IL-1 β mRNS-szintjének változása is korrelált a macrophagok csökkenő számával.

MEGBESZÉLÉS Az ACE-gátlás, chronicus vesebetegségek progressziójában és chronicus allograft rejectióban gyakorolt jótékony hatását különböző állatmodelleken már igazolták (25, 39–41). A folyamat hátterében álló pontos mechanizmusok azonban még tisztázatlanok. Ebben a tanulmányban, ACE-kezelést követően, a növekedési faktorok mRNS expressziójának csökkenését mutattuk ki veseátültetést követően patkányban, melyet a veseallograft chronicus kilökődésének csak enyhe jelei kísérték. A kísérlet során alkalmazott nagyon rövid idejű és kis dózisú cyclosporine A kezelés valószínűleg teszi, hogy a megfigyelt szövettani elváltozásokat a cyclosporine A vesekárosító hatásai okozzák. Ezt támasztja alá az is, hogy az áloperált állatokban, a chronicus rejectio semmilyen jelét nem találtuk. Ezek a megfigyelések megerősítik korábban publikált kísérleti eredményeinket is (42, 43).

Kísérleteink során a kontrollállatokban masszív proteinuria fejlődött ki 20 héttel a transzplantációt követően. Az enalapril-kezelés eredményeképpen szignifikánsan alacsonyabb fehérjeürítést regisztráltunk ebben a csoportban. A megfigyelés hátterében az ACE glomerularis sejtekre kifejtett közvetlen és/vagy intraglomerularis gátló hatása feltételezhető. Patkányok esetében már a glomerulosclerosis kifejlődését megelőzően, az intraglomerularis hypertensio miatt átalakul a glomerulusfal, nagy pórusúvá válik és nem szelektív fehérje áteresztése miatt, proteinuria alakul ki (44). Egyes vizsgálatok szerint az ACE gátlásával csökkentve a glomerularis capillaris hidrosztatikus nyomást, csökken a glomerulusfalban a nagy átmérőjű pórusok száma, ami a fehérjeürítés mérséklődését eredményezi (14, 45). Ez a mechanizmus védő hatással lehet a további károsodással szemben és megelőzheti a vesebetegségek progresszióját. Emellett Amann és mtsa által ismertetett állatmodellen, subtotalis nephrectomiát követően patkányokban, az ACE-inhibitor kezelés kivédte a podocyta károsodását, ami szintén szoros kapcsolatban áll a proteinuria kialakulásával (46). Ezt a hatást más vérnyomáscsökkentő szerek esetében nem sikerült leírni. Lewis és mtsa is kifejezett proteinuria csökkenést regisztráltak chronicus vesebetegségben szenvedő betegeken ACE-kezelést követően, míg ugyanezt a hatást kalciumantagonistát vagy béta-blokkolót szedő páciensek esetében nem lehetett kimutatni, bár a szerek vérnyomáscsökkentő hatása mindegyik csoportban azonos volt (21).

Kísérleteink során a kontrollcsoport egyedeiben progresszív glomerulosclerosist és súlyos macrophag és lymphocytainfiltrációt figyeltünk meg, mind a glomerulusokban, mind az intersticiumban. Ezzel szemben az enalaprilal kezelt állatokban az elváltozások mérsékeltebbek voltak. Ezek az eredmények az angiotenzin-II proliferatív és immunmoduláló szignáljainak megváltozásával magyarázhatók. Az angiotenzin-II immunreguláló, a leukocytaadhesiót és a kemotaxist befolyásoló hatása ismert jelenség (47,

48). Ruiz-Ortega és mtsa immunkomplex nephritisben, ACE-inhibitor quinalapril-kezelést követően a glomerularis és interstitialis infiltratio masszív csökkenését regisztrálták (41). Az ACE-kezelés angiotenzin-II adhaesiós és kemoattraktáns tulajdonságaira gyakorolt közvetlen hatása azonban még ismeretlen.

Az MCP-1 és a TGF- β_1 a monocyta/macrophag rendszer kemotaktikus faktorai közé tartoznak. Mindkettő központi szerepet játszik a chronicus allograft-rejectióban (38) és a chronicus gyulladásos folyamatokban, mint az a transzplantációs vasculopathiákban is megfigyelhető (38). Emellett az MCP-1 valószínűleg aktiválja vagy növeli egyes adhaesiós molekulák expresszióját, elősegítve ezzel a monocyta-adhaesiót. Kísérleteink során, Nadeau, Azuma és Tilney (38) megfigyeléseire hasonlóan, a vese allograftokban – a monocyták infiltrációjával párhuzamosan – az MCP-1 mRNS progresszív emelkedését regisztráltuk. Vizsgálatainkban a hosszú távú enalapril-kezelés szignifikánsan csökkentette az MCP-1 és TGF- β_1 expresszióját. A TGF- β_1 immunreaktív aktivitást elsősorban a graft interstitiumán belül figyeltük meg. Ezzel párhuzamosan az enalaprilal kezelt csoportban, a kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan alacsonyabb volt az ICAM-1 és VCAM-1 expressziója is. Ezeket az eredményeket szintén magyarázhatja az ACE-kezelés hatására megváltozott angiotenzin-II mononuclearis sejtek adhaesiójára, migrációjára és proliferációjára gyakorolt hatása (49).

Az ACE-gátlás in vivo hatásai közül több is magyarázható az angiotenzin-II-termelés gátlódásával (50, 51). Az angiotenzin-II simaizomsejtek (SMC) proliferációjában kifejtett szerepe ismert jelenség. Az SMC-sejtek növekedése és migrációja az intimahyperplasia és a korai atherosclerosis kialakításában meghatározó jelentőségű. Az IGF-I, PDGF, TGF- β_1 és az IL-1 az SMC fontos növekedési faktorai. Az angiotenzin-II PDGF-A láncára és TGF- β_1 mRNS-re gyakorolt indukáló hatását vascularis sejt-kultúra SMC-ben már leírták (52). Az angiotenzin-II gátlása megakadályozta ezeknek a változásoknak a kialakulását és a TGF- β neutralizáló antitestekkel történő ko-inkubáció hatására gátlódott az extracellularis mátrix szintézis is. Az angiotenzin-II megnövelte az inaktív TGF- β_1 aktív formába történő átalakulását és fokozta a TGF- β_1 mRNS-szintjét a glomerulusokban (45). Emellett infantilis patkányoknál a glomerularis capillaris nyomás növekedését és glomerulosclerosis kifejlődését figyelték meg angiotenzin-II chronicus bevitelét követően (53). Kísérleti eredményeink ismeretében elképzelhető, hogy a transzplantált vesékben a megnövekedett glomerularis capillaris hidrosztatikus nyomás és a következményes endothelialis sejt aktiváció, a glomerularis angiotenzin-II aktivitásának növekedését és ezen keresztül fokozott TGF- β_1 expressziót és bioaktivitást okoz. Egy másik tanulmányban az angiotenzin II PDGF-A lánc mRNS-expresszióját fokozó hatásáról számolnak be vascularis SMC-sejteken (54). Míg a PDGF-A lánc és a TGF- β_1 önmagában befolyásolja egyes faktorok, pl. az IL-1 expresszióját, e tanulmányok szerint a PDGF-A lánc, a TGF- β_1 és az IL-2 patkány glomerulusában, a glomerularis capillaris által szabályozott, angiotenzin-II aktivitásától függ. Kísérleteink során az enalapril-kezelés hatására a chronicus allograft rejectióban létrejövő növekedési faktor mRNS-szint-csökkenés, szintén alátámasztja az előbbi feltételezéseket. Kimutattuk továbbá, hogy enalapril-kezelés hatására az IGF-I mRNS expresszió-

ja is lecsökken, amely kemotaktikus fibrotikus aktivitással bír az SMC-sejtekre.

Az angiotenzin-II képződésének csökkentésén kívül, az ACE gátlása növeli a bradikinin-koncentrációt, következményes nitrogén-oxid- és prosztaglandinszintézist idézve elő. Ezáltal az ACE-gátlás jótékony hatásai nem korlátozódnak kizárólag a vesére.

Összegezve megállapíthatjuk, hogy az ACE-gátló enalapril a chronicus rejectio folyamata során redukálta a súlyos proteinuria kialakulását, mérsékelte a morfológiai károsodást, csökkentette a leukocytainfiltrációt és egyes növekedési faktorok, illetve cytokinek mRNS-szintjét. A jövőben ez a gyógyszer-csoport remélhetőleg kedvezően befolyásolhatja a chronicus rejectio folyamatát, meghosszabbítva ezzel a vese allograftok hosszú távú túlélését.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS Ez a munka a DFG He 1906/3-1, OTKA F029782, F029779, T031986, ETT 157/2000 pályázatok segítségével jött létre. Szabó Attila, Müller Veronika, Hamar Péter a Német Akadémiai Csereszolgalat (DAAD) ösztöndíjasa volt. Szabó Attila a Magyarországi Orvostudományi Ösztöndíj, Müller Veronika és Hamar Péter a Bolyai János Ösztöndíj segítségével végezte a magyarországi munkát. Antus Balázs Soros ösztöndíjas.

Külön köszönet illeti Vogelsang Magdalenet a szövettani munkák során végzett technikai segítségért.

IRODALOM

- Schweitzer EJ, Matas AJ, Gillingham KJ. Causes of renal allograft loss: Progress in the 1980s, challenges for the 1990s. *Ann Surg* 1991; 214:679-688.
- Tilney NL, Whitley WD, Diamond JR, Kupiec-Weglinski JW, Adams DH. Chronic rejection- an undefined conundrum. *Transplantation* 1991;52:389-398.
- Paul LC. Chronic renal transplant loss. *Kidney Int.* 1995; 47:1491-1499.
- Connolly JK, Dyar PA, Martin S. Importance of minimizing HLA-DR mismatch and cold preservation time in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1996; 61:709-713.
- Heemann UW, Azuma H, Tullius SG, Schmid C, Philipp T, Tilney NL. Infection and reduced functioning mass induce chronic rejection in rat kidney allografts. *Clin Nephrol* 1996; 46:34-38.
- Burke JF, Pirsch JD, Ramos EL. Long-term efficacy and safety of cyclosporine in renal transplant patients. *N Engl J Med* 1994; 331:358-363.
- Paul LC, Benediktsson H. Post-transplant hypertension and chronic renal allograft failure. *Kidney Int* 1995; (Suppl 52):34-37.
- Brenner BM. Hemodynamically mediated glomerular injury and the progressive nature of glomerular disease. *Kidney Int* 1983; 23:647-652.
- Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalan NA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: A potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 1981; 241:F85-F93.
- Heeman UW, Azuma H, Tullius SG, Mackenzie HS, Brenner BM, Tilney NL. The contribution of reduced functioning mass to chronic kidney allograft in rats. *Transplantation* 1994; 58:1317-1322.
- Hancock WH, Whitley WD, Tullius SG, Heemann UW, Wasowska B, Baldwin WN III, Tilney NL. Cytokines, adhesion molecules and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation* 1993; 56:643-650.
- Ritz E, Nowacek R. Detrimental and beneficial effects of converting enzyme inhibitors of the kidney. *J Cardivasc Pharmacol* 1990; 16(Suppl14):S70-S75.
- Obsahl JA, Abraham PA, Keane WF. Angiotensin converting enzyme inhibitors in chronic renal failure. *Drugs* 1990; 39 (Suppl2):23-32.
- Traindl O, Falger S, Reeding S, Banyai M, Liebisch B, Gisinger J et al. The effects of lisinopril on renal function in proteinuric renal transplant patient Transplantation 1993 55:1309-1313.
- Brunner FP, Thiel G, Hermle M. Long-term enalapril and verapamil in rats with reduced renal mass *Kidney Int* 1989; 36:969-977.
- Curtis JJ, Luke RG, Whelchel JD. Inhibition of angiotensin converting enzyme in renal transplant recipients with hypertension *N Engl J Med* 1983; 308: 377-381.
- Anderson S, Jung FF, Ingelfinger JR. Renal renin-angiotensin system in diabetes: Functional, immunohistochemical and molecular biological correlation *Am J Physiol* 1993; 265:F477-F486.
- Itoh H, Mukoyama M, Prett RE, Gibbons GH, Dzau WJ. Multiple autocrine growth factor modulate vascular smooth muscle growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1993; 91: 2268-2274.
- Müller GA, Schettler W, Müller CA, Strutz F. Prevention of progression of renal fibrosis: How far we are? *Kidney Int* 1996; 49 (Suppl 54): 75-82.
- Remuzzi A, Puntorieri S, Battaglia C. Angiotensin converting enzyme inhibition ameliorates glomerular filtration of macromolecules and water and lessens glomerular injury in the rat. *J Clin Invest* 1990; 85:541-549.
- Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rhode RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1990; 329: 1456-1462.
- Wolf G, Neilson EG. Angiotensin II as a renal growth factor. *J Am Soc Nephrol* 1993; 3:1531-1540.
- Hilgers KF, Mann JFE. Role of angiotensin II in glomerular injury: Lessons from experimental and clinical studies. *Kidney Blood Press* 1996; 19:254-262.
- Mimran A, Ribstein J. Angiotensin converting enzyme inhibitors in renal function. *J Hypertens* 1989; 7 (Suppl 5): S3-S9.
- Benediktsson H, Chea R, Davidoff A, Paul LC. Antihypertensive drug treatment in chronic renal allograft rejection in the rat. *Transplantation* 1996; 62:1634-1642.
- Rennke HG. Pathogenesis and significance of non primary focal and segmental glomerulosclerosis *Am J Kidney Dis* 1989; 13:443-456.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Ann Biochem* 1987; 162:156-161.
- Ando T, Okuda S, Tamaki K, Yoshitomi K, Fujisima M. Localization of growth factor- β and latent transforming growth factor- β binding protein in rat kidney. *Kidney Int* 1995; 47:733-739.
- Feng L, Xia Y, Tang WW, Wilson CB. Cloning a novel form of rat PGDF A-chain with a unique 5'-UT: regulation during development and in glomerulonephritis. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194:1453-1459.
- Russell ME, Adams DH, Wyner LR, Yamasita Y, Halnon NJ, Karnovsky MJ. Early and persistent induction of monocyte chemoattractant protein-1 in rat cardiac allografts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:6086-6092.
- Cheng W, Reiss K, Kaistura J, Kowal K, Quaini F, Anversa P. Down-regulation of the IGF-I system parallels the attenuation in the proliferative capacity of rat ventricular myocytes during postnatal development. *Lab Invest* 1995; 72: 646-655.
- Siegling A, Leemann M, Platzer C, Emmrich F, Volk HD. A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats. *J Immunol Methods* 1994; 177:23-28.
- Tso JY, Sun XH, Kao TH, Reece KS, Wu R. Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acid Res* 1985; 13:2485-2497.
- Hartung J. Lehr und Handbuch der angewandten Statistik (6th ed). München, Wien, R. Oldenburg Verlag, 1987.
- Häyry P, Isoniemi H, Yilmaz S, Mennander A, Lemström K, Räisä-Shokolowski A et al. Chronic allograft rejection *Immunol Rev* 1993; 134:33-81.
- Felström BC, Larsson E. Pathogenesis and treatment perspectives of chronic graft rejection (CVR) *Immunol Rev* 1993; 134:83-98.
- Shihab FS, Tanner AM, Shao Y, Weffer MI. Expression of TGF- β 1 and matrix proteins is elevated in rats with chronic rejection. *Kidney Int* 1996; 50:1904-1913.
- Nadeau KC, Azuma H, Tilney NL. Sequential cytokine dynamic in chronic rejection of rat renal allografts: roles for cytokine RANTES and MCP-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:8729-8732.
- Brunner HR. ACE inhibitors in renal disease *Kidney Int* 1992; 42:463-479.

40. Savage S, Schrier RW. Progressive renal insufficiency: the role of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Adv Intern Med* 1991; 37:85-101.
41. Ruis-Ortega M, Gonzalez S, Sheron D, Condom E, Bustos O, Largo R. ACE inhibition reduced proteinuria, glomerular lesions and extracellular matrix production in a normotensive rat model of immunocomplex nephritis. *Kidney Int* 1995; 48:1778-1791.
42. Mackenzie HS, Tullius SG, Heemann UW, Azuma H, Brenner BN, Tilney NL. Nephron supply is a major determinant of long-term renal allograft outcome in rats. *J Clin Invest* 1994; 94:2148-2152.
43. Tullius SG, Heemann UW, Wyne WH, Azuma H, Tilney NL. Long-term kidney isografts develop functional and morphological changes that mimic those of chronic allograft rejection. *Ann Surg* 1994; 220:425-435.
44. Yoshioko T, Shiraga H, Yoshida Y. „Intact nephrons” as a primary origin of proteinuria in chronic renal disease: Study in rat model of subtotal nephrectomy. *J Clin Invest* 1988; 82:1614-1620.
45. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- β expression in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 1994; 93:2431-2437.
46. Amman K, Nichols J, Törnig U, Schwartz M, Zieger G, Ritz E. Effect of ramipril, nifedipin and momoxidin glomerular morphology and podocyte structure in experimental renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11:1003-1011.
47. Defraissy JF, Galanaud P, Balawoine JF, Wallon C, Dormann J. Captopril and immune regulation *Kidney Int* 1990; 25:925-929.
48. Weinstock JV, Blumm AM, Kassabb JT. Angiotensin II chemotactic for T-cell subset, which can express migration factor acting in murine *Schistosomiasis mannsoni*. *Cell Immunol* 1987; 107:180-188.
49. Ichikawa I, Harris RC. Angiotensin action in the kidney: new insight in to the old hormone *Kidney Int* 1993; 40:583-596.
50. Janiak P, Pillon A, Prost JF, Willaine JP. Role of angiotensin subtype II receptor in neointimal formation after vascular injury. *Hypertension* 1992; 20:737-745.
51. Daemen MJAP, Lombardi DM, Boschmann FT, Schwarz SM. Angiotensin II includes smooth muscle cell proliferation in the normal and injured arterial wall. *Circ Res* 1991; 68:450-456.
52. Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type I receptor action: An in vitro gene transfer study. *Life Sci* 1998; 63: PL289-PL295.
53. Miller PL, Rennke HG, Meyer TW. Glomerular hypertrophy accelerates glomerular injury in rats. *Am J Physiol* 1991; 261:459-465.
54. Naftalin AJ, Prati RE, Dzau VJ. Induction of platelet derived growth factor A chain and c-myc gene expression by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83:1419-1424.