

Az interleukin-2 által közvetített mechanizmusok szerepet játszanak transzplantált patkányvese chronicus kilökődésében

Interleukin-2-dependent mechanisms have a role in chronic rejection following the rat kidney transplantation

Hamar Péter¹, Szabó Attila², Kovács Gergely¹, Kökény Gábor¹, Heemann Uwe², Rosivall László¹

Kórélettani Intézet¹, Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Budapest,
Nefrológiai Laboratórium², Esseni Egyetemi Klinikák, Essen

Levelezési cím:

Dr. Hamar Péter

Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Kórélettani Intézet

1089, Budapest, Nagyvárad tér 4. Tel.: (36 1) 210 2956 Fax: (36 1) 210 0100 e-mail: hamper@net.sote.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A veseátültetést követő veseelégtelenség oka leggyakrabban a chronicus kilökődés. Az idegen antigéntől függő és független események jelentősége máig sem tisztázott. A chronicusan kilökött transzplantátumokban található nagyszámú IL-2-pozitív T-lymphocytá felveti az IL-2 közvetítette mechanizmusok etiológiai szerepét. A TGF- β_1 chronicus kilökődés folyamatában betöltött szerepe elég jól alátámasztott, ugyanakkor az IL-2-szintézis gátlására használt cyclosporin, illetve tacrolimus fokozza a TGF- β_1 szintézisét, ami megkérdőjelezheti hosszú távú adagolásukat. Jelen kísérletünkben vizsgáltuk, hogy az IL-2-szintézis gátlása hogyan hat a chronicus kilökődés folyamatára, valamint TGF β_1 és PDGF termelődésére.

Metodika: Fisher (F344) állatok veséit ortotop módon mindkét oldalon nephrectomizált Lewis patkányokba ültettük. Az állatok az első 10 napon át cyclosporin A (1,5 mg/kg/nap sc.) kezelésben részesültek, majd a 11. naptól kezdve a kísérlet végéig naponta sc. cyclosporin A-t (1,5 mg/kg) vagy tacrolimust (0,16 mg/kg), vagy vivőanyagot kaptak (n = 15/csoport). Folyamatosan mértük a vizelettel ürített fehérje mennyiségét, majd 16, illetve 24 héttel a műtét után elvégeztük a vesék morfológiai, immunhisztológiai és PCR vizsgálatát.

Eredmények: Az IL-2 és az IL-2-receptor mRNS-szintézis kontroll állatokban megfigyelt jelentős fokozódását a folyamatos cyclosporin A- és tacrolimus-kezelés gátolta. A kontroll állatokban a 16. hétre – a renális T-sejt-infiltratio maximumának idejére – a TGF- β_1 és PDGF szintje jelentősen emelkedett. A 24. hétre a TGF- β_1 -szint normalizálódott, míg a PDGF-szint nem. Tacrolimussal és cyclosporin A-val kezelt csoportokban a 16. héten mind a

SUMMARY Chronic rejection is the major cause of graft loss following kidney transplantation. In particular, the role of antigen-dependent and independent events remains obscure. As infiltrating IL-2+ T-lymphocytes were found in high numbers in chronically rejected allograft samples, the role of IL-2 dependent mechanisms has been suspected. On the other hand, TGF- β_1 is a well established contributor to chronic rejection, and cyclosporin A and tacrolimus both induce TGF- β_1 production. Therefore their long term usefulness has been controversially discussed. Thus, we investigated whether an IL-2 mediated lymphocyte activation influences this process in an established rat model of chronic rejection.

Methods: Fisher (F344) kidneys were transplanted orthotopically into bilaterally nephrectomised Lewis rats. Animals received cyclosporin A (1.5 mg/kg/day, sc.) for the first 10 days and were treated daily with either cyclosporin A (1.5 mg/kg), tacrolimus (0.16 mg/kg) or vehicle from day 11 until the end of the study (n = 15/group). Proteinuria was regularly assessed and kidneys were harvested for morphological, immunohistological and PCR analysis 16 and 24 weeks after transplantation.

Results: Upregulation of mRNA synthesis of IL-2 and IL-2 receptor in controls was inhibited by continuous treatment with cyclosporin A and tacrolimus. TGF- β_1 and PDGF were significantly upregulated in controls at week 16 – the time of peak infiltration. While TGF- β_1 had returned to normal levels by week 24, PDGF did not. Tacrolimus and cyclosporin A prevented the upregulation of TGF- β_1 at both time points. However, PDGF was suppressed only at week 16. In controls, renal function

TGF- β_1 , mind a PDGF, a 24. héten pedig csak a TGF- β_1 szintézise volt jelentősen alacsonyabb, mint a kontrollcsoportban. A proteinuria folyamatos fokozódását mindkét kezelés csökkentette. A morfológiai vizsgálat szerint a kezelt állatokban 16, illetve 24 hét elteltével egyaránt enyhébb volt a glomerulosclerosis, tubularis atrophia és intimaproliferatio mértéke, valamint kevesebb volt a vesét infiltráló ED-1+ macrophagok és CD-5+ lymphocyták száma.

Konklúzió: A fenti eredmények alapján az IL-2-szintézis folyamatos gátlása lassítja a chronicus kilökődés progressióját. Korábbi eredményekkel ellentétben, mind a cyclosporin A, mind pedig a tacrolimus mérsékelte a TGF- β_1 expresszióját, amit magyarázhat a TGF- β_1 -et termelő sejtek infiltrációjára kifejtett gátló hatás.

Kulcsszavak: veseátültetés, chronicus kilökődés, IL-2, patkány, TGF β , PDGF

started to decline at week 12 as indicated by an elevated proteinuria, which was significantly reduced by a continuous suppression of IL-2 synthesis. Morphological analysis supported these functional results: Both, at 16 and 24 weeks, glomerular sclerosis, tubular atrophy and intimal proliferation were less pronounced in treated rats. These morphological parameters were accompanied by a reduced infiltration of ED-1+ macrophages and CD-5+ T-lymphocytes in immunosuppressed hosts.

Conclusions: These results indicated a beneficial effect of continuous immunosuppression targeted at the IL-2 pathway upon the pace of chronic kidney allograft rejection. Contrary to previous results, both cyclosporin A and tacrolimus reduced the expression of TGF- β_1 as compared to controls. A possible explanation might be the effective reduction of the infiltration by TGF- β_1 producing cells.

Key-words: kidney transplantation, chronic rejection, IL-2, rat, TGF- β , PDGF

HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 1999; 3 (2):102-109

RÖVIDÍTÉSEK

APAAP	alkalikus foszfatáz-anti alkalikus foszfatáz reakció
cDNA	komplementer dezoxiribonukleinsav
CSA	cyclosporin A
ED-1	patkány CD-68 ekvivalens szöveti macrophag marker elleni monoklonális antitest
GAPDH	glicerinaldehyd-3-foszfat-dehidrogenáz
IL-2	interleukin-2, T-sejt növekedési faktor
IL-2R α (CD-122)	az interleukin-2-receptor 70 kD béta-fehérje (p70) allánca
ICAM-1(CD-54)	intercellularis adhaesiós molekula-1
LFA-1 α (CD-11 α)	leukocytafunkcióval asszociált antigén-1 alfa-lánca
MAP	artériás középnyomás (Hgmm)
OX-19:	a patkány CD-5+ ekvivalens pan-T-sejt-marker elleni monoklonális antitest
p	a hiba valószínűsége
PDGF:	thrombocyta eredetű növekedési faktor
RT-PCR:	reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció
SEM	az átlag standard hibája
TGF- β_1	transzformáló növekedési faktor-béta
1-es izoformája	
VCAM-1 (CD-106)	vascularis sejt adhaesiós molekula-1
VLA-4 (CD-49d)	nagyon késői aktivációs fehérje-4-alfa-integrin

BEVEZETÉS Az új immunosuppressiv gyógyszerek (cyclosporin, poli- és monoklonális antitestek) kifejlesztése forradalmasította a szervátültetést. A fejlődés ellenére a veseátültetést követő hosszú távú prognózis nem javult (1-3). Ennek hátterében elsősorban a chronicus kilökődés folyamata áll, melynek magyarázatára három elképzelés is kialakult. A chronicus kilökődés lehet:

- a jelen lévő idegen (allo-) antigén ellen folyamatosan zajló sejt mediálta immunfolyamat (4, 5),
- visszatérő, önmagát limitáló acut kilökődési epizódok sorozata (2, 6, 7) vagy
- a graft endothelsejtjeinek aktivációját és nem specifikus gyulladáshoz vezető választ indukáló alloantigén-független folyamatok összessége (2, 8).

Még nem tisztázott, hogy ezen mechanizmusok milyen mértékben vesznek részt a chronicus kilökődés folyamatában. Mivel IL-2 és IL-2R-pozitív lymphocyták folyamatosan detektálhatóak chronicus kilökődést mutató vesékben (11, 12), e sejteknek meghatározó szerepük lehet a chronicus kilökődés progressiójában (4, 5). Alátámasztja ez az alloantigén-függő események jelentőségét. Az IL-2 – eredeti nevén T-sejt növekedési faktor (9) – felelős az aktivált T-sejtek proliferációjáért (4). Az IL-2-t és receptorát kódoló gének expressziója idegen antigének vagy citokinek által kiváltott T-sejt-aktiváció során fokozódik (10). A chronicus kilökődésben kialakuló interstitialis fibrosist a localis TGF- β és PDGF termelődésének tulajdonítják (2, 13). Chronicus kilökődést mutató vesék klinikai biopsziáiban a TGF- β_1 izoform volt túlsúlyban (14). Mivel leírták, hogy mind a cyclosporin A, mind a tacrolimus serkenti a TGF- β_1 szintézisét in vivo és in vitro, feltételezhető, hogy az IL-2 út ezen szerekekkel történő gátlása a hosszú távú prognózist tekintve káros lehet.

Kísérleteinkben vizsgálni kívántuk, hogy az IL-2 által mediált folyamatok gátlása hogyan hat a chronicus kilökődés progressiójára, illetve a TGF- β és PDGF termelődésére. Ennek vizsgálatára, patkányvese-transzplantációt követően cyclosporin A, illetve tacrolimus segítségével tartósan gátoltuk az IL-2 szintézisét, és vizsgáltuk az allograftok chronicus kilökődésének progressióját, különös tekintettel a sejt infiltratio mértékére és a növekedési faktorok termelődésére.

FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZER

KÍSÉRLETI ÁLLATOK Kísérleteink során 180–250 g súlyú beltenyésztett him Lewis (LEW) és Fisher (F-344) patkányokat használtunk. Az állatokat standard körülmények kö-

zött tartottuk. A beltenyészett állatok törzsön belül genetikailag azonosnak tekinthetők, ami lehetővé teszi a törzsek közötti transplantatio során az immunológiai eltérések reprodukálását.

VESEÁTÜLTETÉS A donorok Fisher patkányok, a recipiensek Lewis patkányok voltak. A veseátültetés korábban leírt módon történt (8). Röviden, a bal donor vesét 4 °C-os Ringer-laktáttal perfundáltuk, eltávolítottuk és ortotop módon a recipiensbe helyeztük, melynek veseereit előzőleg izoláltuk, leszorítottuk és a saját bal vesét eltávolítottuk. Az arteria renalisokat, vénákat és az uretereket 10-0-ás prolene varrattal vég a véghez anastomizáltuk. A graft össz ischaemiás ideje minden esetben 30 perc alatt volt. A perioperatív infekciók megelőzésére az állatok napi 20 mg/kg ceftriaxont (Rocephine®) kaptak a műtétet követő első 10 napon. A jobb oldali saját vesét a 10. napon távolítottuk el.

KÍSÉRLETI PROTOKOLL A kezdeti akut kilökődés megelőzésére a patkányok 1,5 mg/kg dózisban cyclosporin A-t (Calbiochem biochemicals GmbH, Bad Soden, Németország) kaptak naponta sc. a műtétet követő első 10 napon. A 10. nap után az állatokat 3 kezelési csoportra (n = 15/csoport) osztottuk, és vagy 1,5 mg/kg cyclosporin A-t, vagy 0,16 mg/kg tacrolimust (Fujisawa, Japán) vagy vivőanyagot kaptak minden nap. Mindkét immunosuppresszív szert cremophor-etanoll oldatban szuszpendáltuk, a gyártó utasításainak megfelelően, és subcutan adagoltuk.

A gyógyszer adagját előkísérletben határoztuk meg. Azt a legmagasabb dózist kerestük, amely mellett nem alakulnak ki toxicus mellékhatások. A következő dózisokat próbáltuk: transzplantált állatokon: 5, 3, 2 és 1,5 mg/kg cyclosporin A és 0,32, 0,24, 0,16, 0,08 mg/kg tacrolimus. 1,5 mg/kg/nap cyclosporin A vagy 0,16 mg/kg/nap tacrolimus-dózist meghaladó folyamatos kezelés mellett toxicus mellékhatások (folyamatos testsúlycsökkenés, hasmenés) jelentkeztek. Jelen kísérletben a mellékhatások nélküli legnagyobb dózisokat alkalmaztuk mindkét szerből.

A testsúly proteinuria mértékére gyakorolt hatásának kizárására, a műtét átlagos testsúly a két csoportban azonos volt (260 ± 15 g). A csoportok között a kezelési idő során sem alakult ki statisztikailag szignifikáns testsúlykülönbség.

Műteti komplikáció (vesekő, hydronephrosis) két kontroll és egy tacrolimussal kezelt állatban fordult elő. Ezeket az állatokat a további vizsgálatból kizártuk. A patkányokat 16, illetve 24 héttel a műtét után dietiléterrel elaltattuk és megmértük az aortán belüli vérnyomást DPT 3003-S/3cc artériás transducer (Peter von Berg Medizintechnik GmbH, Németország) segítségével. Ezután az állatokat elvéreztettük, és az átültetett vesét eltávolítottuk. A szövetszövetmintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk, immunhisztológiai és PCR analízisre, illetve pufferolt formalinban (4%) fixáltuk fénymikroszkópos vizsgálathoz.

RUTIN KÉMIAI ELJÁRÁSOK Minden 4. héten meghatároztuk a 24 óra alatt ürített fehérje mennyiségét gyűjtött vizeletből. A vizelet fehérje koncentrációját standard triklórecetsavas kicsapást követő fotometrálassal; a serum és vizelet kreatininkoncentrációját Jaffé-módszerrel határoztuk meg. A kreatinin clearance-t a kísérlet végén számítottuk.

ANTITESTEK A CD-5+ patkány T-lymphocyták (OX-19), macrophagok (ED-1), ICAM-1 (CD-54), VCAM-1 (CD-106), VLA-4 α (CD-49d) és LFA-1 α (CD-11a) elleni monoklonális antitesteket a Serotec Camon Labor-Service GmbH-től (Németország) vásároltuk.

SZÖVETTAN ÉS IMMUNHISZTOLÓGIA Szövettani vizsgálat céljából a 4%-os formalinban fixált vesemintákat paraffinba ágyasztuk, majd hematoxilin/eozin és perjódsvas Schiff-festés segítségével meghatároztuk a glomerulosclerosis mértékét. A glomerulosclerosis a glomerularis kapillárisok collapsusa, kitapadás a Bowman-tokhoz és hialin kicsapódása alapján definiáltuk (15). A metszeteket vizsgáló patológus előtt a csoportbeosztás ismeretlen volt. A scleroticus glomerulusok arányát az épek százaléklában fejeztük ki. Vesénként legalább 200 glomerulust vizsgáltunk.

Immunhisztológiai vizsgálatra fagyasztott metszeteket (4 μ l) acetonnal fixáltuk, és egyenként kezeltük alkalikus-foszfátáz-anti-alkalikus-foszfátáz (APAAP) technika szerint (16), Mayer-féle hemalaun- (Merck, Darmstadt, Németország) festéssel adva meg a hátteret. A pozitívan festődő sejteket az okulárba épített rácson keresztül számoltuk és a látóterenkénti sejtszámot feljegyeztük (sejt/látóterenként). Állatonként és metszetenként legalább 20 látóteret számoltunk 400-szoros nagyítás mellett. A szöveti festődés intenzitását (ICAM-1, VCAM-1) 1–4-ig terjedő skálán vakon értékeltük, ahol az 1 minimális, a 4 erős festődést jelöl.

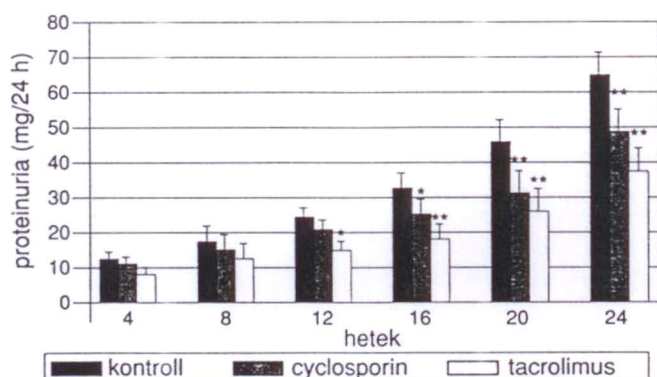
REVERZ TRANZKRIPTÁZ POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (RT-PCR) A fagyasztott vesékből származó RNS-mintákat guanidin-izotiocianát/fenol/kloroform izolációs módszerrel (Rneasy, Total RNA Isolations Kit; Quiagen GmbH, Németország) készítettük elő (17). A teljes RNS-mintából 1 μ g-ot használtunk fel az első szál cDNS szintézisére, oligo(dT) 12–18 primerrel a gyártó által megadott feltételek mellett (GIBCO/BRL). A specifikus komplement cDNS amplifikációját már előzőleg leírták (17). Röviden, patkány TGF- β_1 , IL-2, IL-2-receptor- β (p70) (CD-122) és glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) (Euro Gentec, Belgium) mRNS-szekvenciáival komplementer cDNS amplifikáció történt polimeráz láncreakció (PCR) segítségével (12). A törzsoldat pufferből, magnézium-kloridból, dezoxinukleozid-trifoszfátból és Taq DNS polimerázból állt (DIANOVA). Minden törzsoldathoz specifikus primert és cDNS-mintát adtunk. Az amplifikációhoz egy Perkin-Elmer Thermal Cycler 2400-as modellt használtunk. Az amplifikált PCR terméket 1,5%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk, etidium-bromiddal festettük és a géntörzsedékeket UV-fényben tettük láthatóvá. A PDGF-AB, TGF- β_1 , IL-2 és IL-2 receptor cDNS mennyiségét ugyanazon mintából származó GAPDH-val (belső kontroll) való számítógépes denzitometriás összehasonlítás segítségével becsültük meg a gél pozitív képének digitalizálását követően.

STATISZTIKAI ANALÍZIS A csoportok adatait átlag $\pm$ szórása (SEM) formájában adtuk meg. A három csoport közti különbség kiértékelése a Fisher-féle legkisebb négyzetes távolságok próbával (18) történt, a kezelt és kontrollcsoport, illetve a két kezelt csoport eredményeit a megfelelő T-próbá-

val hasonlítottuk össze. A nem metrikus paramétereket, mint az adhaesiós molekulák festődési intenzitását Fisher-féle egzakt teszt (17) segítségével határoztuk meg. A 0,05-nál kisebb p-értéket tekintettük szignifikánsnak.

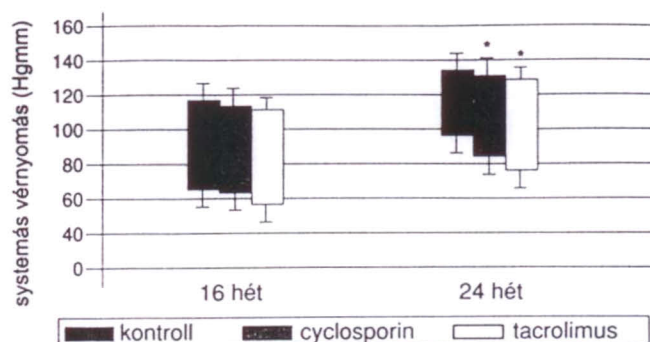
EREDMÉNYEK

FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATOK Ebben a modellben a vizelettel ürített fehérje mennyisége jó funkcionális mutatója a chronicus kilökődés progressiójának. A kísérlet ideje alatt minden recipiensben progressiv proteinuria alakult ki (1. ábra). A vizelettel ürített fehérje mennyisége kifejezetten növekedett a kontroll állatokban, mint a kezelt csoportokban. A kontroll állatokban a 16., a cyclosporinnal kezeltekben a 20. és a tacrolimussal kezeltekben a 24. hétre fejlődött ki 30 mg/nap-ot meghaladó proteinuria.



1. ábra. 24 óra alatt vizelettel ürített fehérje [Uprot (mg)/24 óra] (*p < 0,05, ** p < 0,01 vs. kontroll)

A vesefunkció romlása a csökkent kreatininclearance-ben, illetve ezzel párhuzamosan emelkedett serumkreatinin-szintben is megmutatkozott. Az IL-2 által közvetített mechanizmusok mind cyclosporinnal, mind tacrolimussal történő gátlása javította a vesefunkciót. Ezek a változások a 24. hétre váltak szignifikánsná. Ekkor a tacrolimussal kezelt állatokban volt a legmagasabb a clearance és legalacsonyabb a serumkreatinin (p < 0,01 a kontrollhoz képest). A cyclospo-



2. ábra. IL-2 és IL-2Ra mRNS-szintézis: 16 és 24 héttel a transzplantációt követően. IL-2 és IL-2R sávok denzitometriás összehasonlítása GAPDH-sávokkal (p < 0,05 vs. kontroll)

rin jótékony hatása kevésbé volt kifejezett (p < 0,05 a kontrollhoz képest) (1. táblázat).

A 16. és a 24. hét között a graft funkció romlásával párhuzamosan, az artériás középnyomás is gyorsabban növekedett a kontroll állatokban, mint a kezeltekben (2. ábra). Ezek a különbségek a 24. hétre váltak szignifikánsná (p < 0,05).

FÉNYMIKROSZKÓPIA ÉS IMMUNHISZTOLÓGIA A chronicus kilökődésre jellemző szövettani paraméterek: a glomerulosclerosis, a leukocytainfiltratio, az interstitialis fibrosis és az intimaproliferatio mértéke jó korrelációt mutattak a vesefunkcióval.

A kontrollokban a 16. héten a glomerulusok több mint 40%-a sclerotizált. A sclerotizált glomerulusokat körülvevő interstitiumot és érfalakat, valamint magukat a glomerulusokat nagyszámú leukocytá infiltrálta, melyek immunhisztokémiai festéssel ED-1+ macrophagoknak és CD-5+ T-sejteknek bizonyultak. A sejtek egy része ezen felül sejtfel-színi adhaesiós molekulákra (LFA-1α és VLA-4α) pozitív is volt (2. táblázat). Az IL-2-termelés gátlása csökkentette a glomerulosclerosis (p < 0,01; lásd 1. táblázat) és a sejt infiltratio mértékét. Az ED-1+ macrophagok (p < 0,01) és különösen CD-5+ T-lymphocyták infiltrációja (p < 0,001), valamint az LFA-1α+ és VLA-4α+ sejtek száma is szignifikánsan alacsonyabb volt az immunsupprimált csoportok-

1. táblázat. Kreatininclearance, serumkreatinin-szint és glomerulosclerosis (a scleroticus glomerulusok az ép glomerulusok százalékos arányában) 16 és 24 héttel veseátültetés után. A statisztikai szignifikanciát az egyes sorokon belül Fisher's least square distance test segítségével állapítottuk meg (25). A p-értékek a kezelt és kontrollcsoport Student's T test szerinti összehasonlításából adódnak (* p < 0,05 vs. kontroll, ** p < 0,01 vs. kontroll)

Csoport	Hetek	Kontroll		Cyclosporin A		Tacrolimus	
		átlag ± szórás	n	átlag ± szórás	n	átlag ± szórás	n
glomerulosclerosis (% ± SEM)	16	42 ± 1,5	13	30 ± 0,6**	15	22 ± 1,6**	14
	24	51 ± 2,1	8	39 ± 0,9**	10	29 ± 1,5**	9
kreatininclearance (ml/min ± SEM)	16	1,8 ± 0,1	13	2 ± 0,1	15	1,9 ± 0,1	14
	24	1,0 ± 0,2	8	1,5 ± 0,1*	10	1,7 ± 0,1**	9
serumkreatinin (mg/dl ± SEM)	16	1,5 ± 0,2	13	1,3 ± 0,1	15	1,3 ± 0,2	14
	24	2,1 ± 0,2	8	1,7 ± 0,2*	10	1,4 ± 0,1**	9

2. táblázat. Infiltráló sejtek és adhaesiós molekulák immunhisztológiai festése, 16 és 24 héttel veseátültetést követően. A statisztikai szignifikanciát az egyes sorokon belül Fisher's least square distance test segítségével állapítottuk meg (25). A p-értékek a kezelt és kontrollcsoport student's T test szerinti összehasonlításából adódnak. *** Az ICAM-1 és VCAM-1 festődés intenzitását Fisher's exact test for ordinal data segítségével adtuk meg (lt.: látótér 400x nagyítás mellett, * $p < 0,05$ vs. kontroll, ** $p < 0,01$ vs. kontroll)

Csoport	Hetek	Kontroll		Cyclosporin A		Tacrolimus	
		átlag±szórás	n	átlag±szórás	n	átlag±szórás	n
macrophagok (ED-1) (sejt/lt)	16	80 ± 8,4	5	60 ± 3,3*	5	48 ± 4,4**	5
	24	68 ± 4,1	13	47 ± 4,6**	10	37 ± 2,3**	
lymphocyták (CD-5) (sejt/lt)	16	65 ± 6,6	5	45 ± 4,9	5	40 ± 4,4**	5
	24	49 ± 3,3	13	33 ± 4,2**	10	27 ± 4,6**	
VLA-4a (sejt/lt)	16	11 ± 1,6	5	8 ± 0,3*	5	7 ± 0,9*	5
	24	9 ± 0,8	13	7 ± 0,7**	10	5 ± 0,2**	9
LFA-1a (sejt/lt)	16	8 ± 0,4	5	6 ± 0,9*	5	6 ± 0,5**	5
	24	7 ± 0,5	13	6 ± 0,4*	10	5 ± 0,3	5
ICAM-1*** intenzitás (1-4)	16	3,2 ± 0,5	5	2,5 ± 0,6	5	2 ± 0,1*	5
	24	2,5 ± 0,6	13	2,2 ± 0,5	10	1,5 ± 0,4	9
VCAM-1*** intenzitás (1-4)	16	3,5 ± 0,6	5	2,5 ± 0,6	5	2,2 ± 0,5*	
	24	2,7 ± 0,5	13	2 ± 0,8	10	1,5 ± 0,6	9

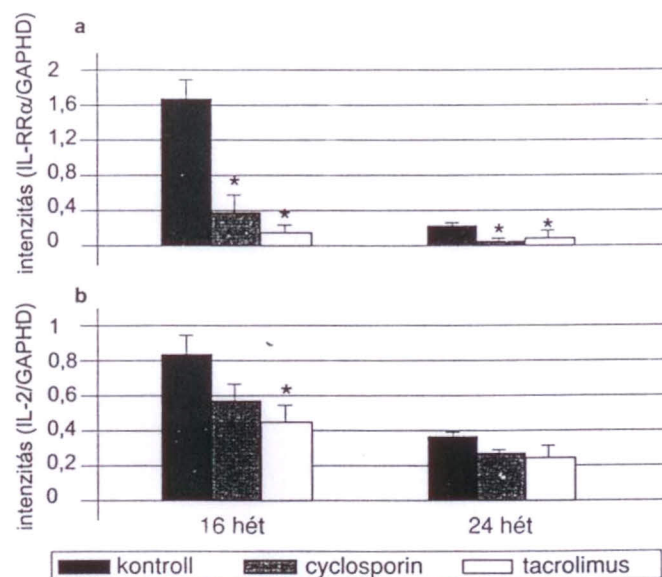
ban (2. táblázat). A kontrollokban a 24. hétre a sejtes infiltratio mértéke feltűnően csökkent. Ugyanakkor, az interstitialis fibrosis és az artériák intimaproliferációja sokkal kifejezettebbé válik. Ezzel párhuzamosan a sclerotizált glomerulusok száma is nőtt a 16. és a 24. hét között (lásd 1. táblázat). Az IL-2 által közvetített mechanizmusok gátlása szignifikánsan csökkentette a glomerulosclerosis, az intimaproliferatio, az interstitialis fibrosis és a leukocytainfiltratio mértékét.

A kontroll állatokban az érfalak és a tubulointerstitium intenzíven festődött a fehérvérsejtek kitapadását szolgáló adhaesiós molekulák (ICAM-1 és VCAM-1) elleni antitestekkel. A festődés mértéke a 24. hétre csökkent (lásd 2. táblázat). Mind a cyclosporin, mind a tacrolimus mindkét időpontban csökkentette ezen molekulák expresszióját.

POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (PCR) A kontroll állatokban az IL-2 mRNS szintézise a tubulointerstitiumot infiltráló mononuclearis sejtek számával párhuzamosan változott. A 16. héten az IL-2 mRNS-szintézis intenzív volt, azonban a 24. hétre lecsökkent. Mint várható volt mind a cyclosporin-, mind a tacrolimus-kezelés mindkét időpontban szignifikánsan gátolta az IL-2 szintézisét ($p < 0,05$ a kontrollhoz képest). Érdekes módon a tacrolimus-kezelés szignifikánsan ($p < 0,05$) hatékonyabb volt, mint a cyclosporin-kezelés (3a ábra).

Az IL-2-receptor β -láncának (IL-2R β) (p70) mRNS-szintjei az IL-2-szintézissel párhuzamosan változtak: a kontroll állatokban a receptorszintézis a 16. héten érte el a maximumát, majd ezután szignifikánsan csökkent ($p < 0,05$). Az IL-2-szintézis gátlása mellett, a tacrolimus és a cyclosporin A az IL-2R β mRNS-szintézisét is csökkentette minimális mértékben, de ezek a különbségek csak a tacrolimus-csoportban voltak statisztikailag szignifikánsak, és csak a 16. héten (3b ábra). A kontrollcsoportban a TGF- β_1 szintézise 16. héten a jelentősen fokozott volt (4. ábra).

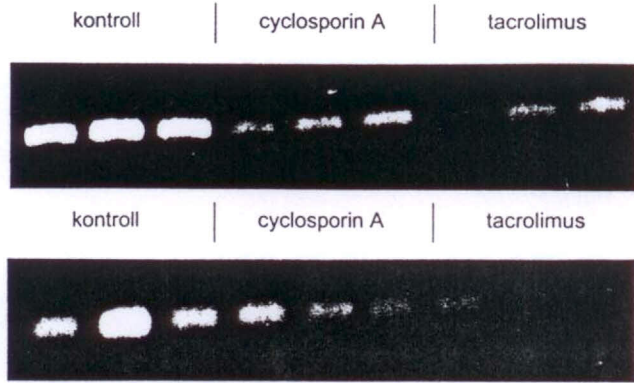
A 24. hétre, amikor a sejtes infiltrációt interstitialis fibrosis és glomerulosclerosis váltotta fel, a TGF- β_1 mRNS-szint-



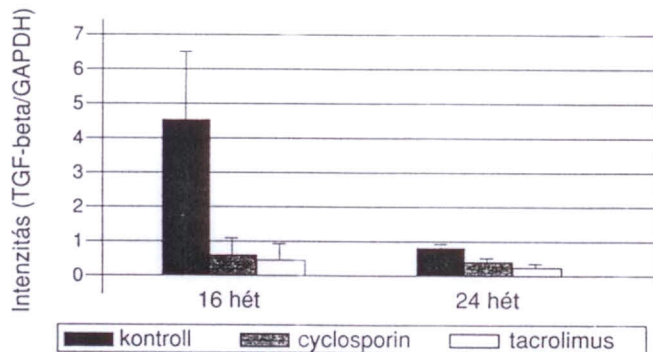
3. ábra. Systemás vérnyomás 16 és 24 héttel a transplan-tatio után (* $p < 0,05$ vs. kontroll). A keretek felső széle az aortában mért systolés, alsó széle a diastolés vérnyo-mást reprezentálja

je jelentősen csökkent. Az IL-2 szintézisének folyamatos gátlása mindkét csoportban szignifikánsan csökkentette a TGF- β_1 -szintézist mind a 16. ($p < 0,05$ a kontrollhoz képest), mind a 24. héten ($p < 0,01$) (5. ábra).

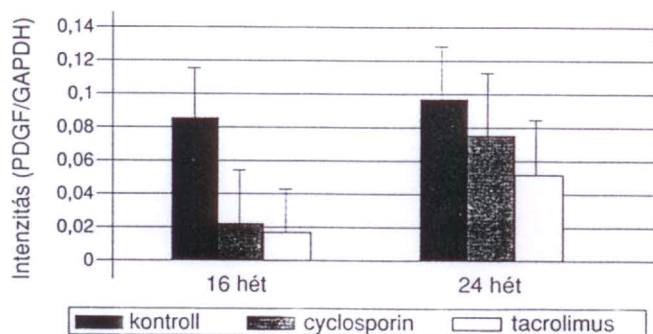
Ellentétben a TGF- β_1 -gyel, a PDGF szintézise a kontroll állatokban majdnem ugyanolyan kifejezett volt a 16., mint a 24. héten. Míg a 16. héten a PDGF expresszióját szignifikánsan gátolta mindkét kezelés, a 24. hétre a PDGF szintézisében nem mutatkozott szignifikáns különbség a csoportok között, sőt az RNS-szint mindkét kezelt csoportban tendenciálisan fokozódott (6. ábra).



4. ábra. Vese allograft minták RT-PCR segítségével meghatározott TGF- β_1 mRNS-expressiója 16 és 24 héttel a transzplantatio után. A PCR terméket az agaróz gélen ethidium bromid festés segítségével tettük láthatóvá



5. ábra. TGF- β_1 mRNS-szintézis: 16 és 24 héttel a transzplantatio után. TGF- β_1 sávok denzitometriás összehasonlítása GAPDH-sávokkal (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. kontroll)



6. ábra. PDGF mRNS-szintézis: 16 és 24 héttel a transzplantatio után. PDGF-sávok denzitometriás összehasonlítása GAPDH-sávokkal (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. kontroll)

MEGBESZÉLÉS A chronicus kilöködés nehezen értelmezhető folyamata jelenleg a legjelentősebb oka a transzplantatiót követő allograftvesztésnek. A chronicusan kilökődő transzplantált vesék immunhisztokémiai analízise során intenzív sejtes infiltrációt figyeltek meg. Az infiltráló sejtek macrophagoknak és T-sejteknek bizonyultak (16, 19, 20). A

chronicus kilöködés – mai elképzeléseink szerint – vagy az idegen antigén folyamatos felismerésén alapuló T-sejtek irányította immunválasz (4, 5), vagy sorozatosan ismétlődő, de önmagát limitáló akut kilöködési epizódok (6, 7), vagy alloantigén független események következménye. Az alloantigéntől független tényezők: sérülés, localis hemodinamikai változások, mint a hyperfiltratio, aktiválhatják a graft endothelsejtjeit, aminek következtében mononukleáris sejtek (lymphocyták, macrophagok) vándorolnak az allograftba (12, 15, 21). Minthogy a lymphocyták az érpályából való kilépés során aktiválódnak, mindhárom teória felveti, hogy a chronicus kilöködésben az IL-2 által közvetített mechanizmusoknak is szerepe lehet.

Az IL-2 a T-sejtek proliferációjának legfontosabb serkentője, régi nevén T-sejt növekedési faktor (22). Nyugalmi állapotban humán T-lymphocytákban IL-2 mRNS nem detektálható (23, 24), és az IL-2-receptor β -lánc is csak nyomokban van jelen (4). A T-sejtek aktivációjakor az IL-2 és az IL-2R szintézise jelentősen fokozódik (4, 10, 23–25). Jelen kísérletünkben, az IL-2 és receptorának a szintézise a kontrollokban a 16. héten érte el legmagasabb értékét, amikor a mononuclearis sejtes infiltratio is maximális volt. Az IL-2R chronicus kilöködésben betöltött szerepét alátámasztja Krams és mtsainak azon munkája, melyben leírták, hogy humán nephrectomiás mintákban a szövettanilag igazolt chronicus kilöködés eseteiben IL-2R mRNS is kimutatható volt (26).

Jelen tanulmányunkban azt vizsgáltuk, hogy az IL-2 szintézisének gátlása akár cyclosporinnal, akár tacrolimussal képes-e lassítani a chronicus kilöködés folyamatát.

A cyclosporin és a tacrolimus gátolja a T-sejt-receptor intracellularis jelátviteli útját, és így gátolja a T-sejt aktivációja következtében kialakult génexpressiót, beleértve az IL-2 (4, 7, 11, 27) és az IL-2R (23, 28) gének expressióját is. Jelen kísérletünkben mind a tacrolimus, mind a cyclosporin A gátolta az IL-2, valamint az IL-2R β szintézisét. Az IL-2 szintézisének gátlása lassította a vesefunkció (proteinuria, kreatininclearance) hanyatlásának ütemét. Néhány újabb tanulmány szerint a cyclosporinnal történő folyamatos kezelés lassíthatja a chronicus kilöködés folyamatát, kísérletes (29–31) és klinikai (32, 33) transzplantatiót követően. Ugyanakkor ezen tanulmányok egyike sem fókuszál a vesetranszplantatiót követő IL-2-közvetített mechanizmusok folyamatos gátlásának hosszú távú hatásaira. Az IL-2 út gátlásával foglalkozó klinikai tanulmányok eredményei ellentmondásosak. A chronicus kilöködés biopsiával bizonyított eseteiben az Azathioprin + Prednisolon kezelésről cyclosporin A + Prednisolon kezelésre (32) való áttérés, vagy a terápia cyclosporin A-val történő kiegészítése (33) lassította a hanyatlás ütemét. Ugyanakkor más tanulmányok a cyclosporin A-ról Azathioprin-kezelésre történő átállás jótékony hatásairól számoltak be (34, 35). Jelen kísérletünkben az IL-2-közvetített mechanizmusok gátlása szignifikánsan kifejezettebb volt tacrolimus esetében, mint cyclosporinnal kezelt recipiensekben. Klinikai adatok arra mutatnak, hogy a tacrolimussal történő suppressio hatásosabb az akut kilöködés megelőzésében, mivel a tacrolimus képes cyclosporin A kezelés mellett előforduló szteroidrezisztens akut kilöködési reakciók viszszafordítására (38).

Eredményeink alátámaszthatják azt a hipotézist, mely szerint a chronicus kilöködés – legalább is részben – az idegen antigén folyamatos felismerésén alapulna. Ugyanakkor, az

IL-2 által közvetített mechanizmusok, nem specifikus (az idegen antigéntől független) gyulladásos reakció részeként is értelmezhetőek. Ezen kérdés tisztázására még további tanulmányok szükségesek.

A szöveti átépülési folyamatokat – így a vese allograftok chronicus kilökődését is – localisan termelt növekedési faktorok irányítják (39). A TGF- β_1 kulcsszerepet játszik a fibrinogenesisben és a chronicus fibrosis fontos mediátora (40). A chronicusan kilökődő vese allograftok biopsiájában (19, 41) és chronicusan kilökődő patkányvese allograftokban (14) a TGF- β_1 expresszióját emelkedettnek találták, ami arra mutat, hogy ez a faktor jelentős szerepet játszhat a chronicus kilökődésben folyamatában (14, 19). A TGF- β -át különböző sejttípusok termelik, többek között a graftot infiltráló macrophagok és T-lymphocyták (2, 19).

Mivel a TGF- β ún. latens asszociált peptidhez kovalensen kötött pro-TGF- β formájában szekretálódik (43), az aktív fehérje szöveti szintjéről nincs információnk. Tanulmányunkban a TGF- β mRNS-szintézisének fokozódása a kontrollcsoportban időbeli kapcsolatot mutatott a sejt infiltratio intenzitásával. Ezen túlmenően az immunosupprimált állatokban a TGF- β -termelés minimálisra csökkenésével párhuzamosan a glomerulosclerosis és interstitialis fibrosis mértéke is minimális volt. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a TGF- β mRNS szintje a szöveti hatásról is nyújt információt.

A cyclosporinról kimutatták, hogy stimulálja a TGF- β termelését izolált T-sejteken (31), tubularis sejteken (21) és fibroblastokon *in vitro* (42) és kezeletlen állatokban a serum TGF- β szintjét emeli *in vivo*. Arra vonatkozólag azonban nincsenek adatok, hogy hogyan hat a cyclosporin a TGF- β_1 szintézisére chronicus kilökődés során. Mivel a cyclosporinnal kezelt csoportban a vese össz-TGF- β_1 mRNS tartalma jelentősen alacsonyabb volt a kontrollcsoporténál, a cyclosporin localis TGF- β -termelésre gyakorolt stimuláló hatása valószínűleg elhanyagolható a sejt infiltratiót gátló, és így a TGF- β -t termelő mononuclearis sejteket elimináló hatáshoz képest.

Egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a TGF- β mellett a PDGF szintézise is jelentős a szövetátépülési folyamatokban, így a progressiv glomerulosclerosisban is (44). A PDGF a mesangialis sejtek, biztosan a legtöbbet vizsgált és feltehetően leghatásosabb mitogénje (45). Serkenti a mesangialis sejtek TGF- β termelését (46) és a fibroblastok proliferációját. Ezen felül a PDGF a glomerularis hemodinamika regulációjában is szerepet játszhat (45). Bár a PDGF-AB normál vesében nem mutatható ki (45), a vesebetegségek számos fajtájában – köztük a vese allograftok chronicus kilökődésében is (39, 48, 49) – fokozott expressziót sikerült igazolni (44, 46). Paul és mtsai chronicusan kilökődő patkányvese-transplantatumokban a PDGF-receptor mRNS-szintjét szignifikánsan emelkedettnek találták (39). Más patkányvese allotransplantációról szóló tanulmányokban sejt infiltratio maximuma a 16. héten, összefüggést mutatott a graft artériás simaizomsejtjeinek PDGF immunhisztokémiai festődésével (48, 49). Bár kísérletünkben mind a cyclosporin, mind a tacrolimus gátolta a PDGF szintézist, hatásuk idővel csökkent. Kezelt és nem kezelt állatokban a PDGF-szintézis a 16. hétről a 24. hétre fokozódott, annak ellenére, hogy az infiltráló sejtek száma nagymértékben csökkent. Mivel nemcsak a vérlemezék termelnek PDGF-et, hanem más sejtek is (pl. a glomerularis mesangialis sejtek), elképzelhető, hogy a glomeru-

laris sejtproliferatio okozta mesangialis PDGF-termelés közvetítésében önmagát erősítő folyamat alakul ki (50). Ennek értelmében a PDGF-termelés a chronicus kilökődés késői progressiójában valószínűleg fontosabb, a TGF- β -nál. Ugyanakkor míg a tacrolimus és a cyclosporin előnyös a chronicus kilökődés korai fázisában, ha egyszer a vese heges átépülése megkezdődött, az alloantigéntől független folyamatok válnak dominánssá az öngerjesztő folyamatban, és ezért az IL-2 suppressiótól nem sok további eredmény várható.

Összegzőképpen az IL-2 által közvetített mechanizmusok folyamatos gátlása lassítja a patkányvese allograftok chronicus kilökődésének progressióját, azaz a macrophagok mellett az IL-2 aktiválta T-lymphocyták is biztosan szerepet játszanak a folyamatban. A progressio szempontjából a folyamat első felében fontos mediátor a TGF- β , melynek szintézise az infiltráló, IL-2 aktiválta T-lymphocyták számának csökkentése révén jól gátolható. Előrehaladottabb stádiumban a PDGF szerepe kerül előtérbe, és ilyenkor az IL-2-termelés gátlására irányuló terápiától már nem sok hatás várható.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS A szerzők ezúton mondanak köszönetet Godó Mária asszisztensnek. A kísérletekhez az OTKA (F 024040), az MKM 1996/286 és az OMFB D-93/96 nyújtottak támogatást.

Hamar Péter Bolyai János ösztöndíjas

IRODALOM

1. Isoniemi H, Nurminen M, Tikkanen MJ, et al. Risk factors predicting chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* 1994; 57:68-72.
2. Paul LC. Chronic renal transplant loss. *Kidney Int* 1995; 46:266-279.
3. Pabico RC, Yarger J, Byer B, Kremer M, McKenna BA, Cerilli GJ. Effects of Cyclosporin A on Chronic Renal Transplant Rejection. *Transplant Proc* 1994; 26:2577-2579.
4. Abbas AK, Lichtmann AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. WB Saunders Co 1991; Chapter 11:226-243.
5. Orosz CG. Local cellular immunology of experimental transplant vascular sclerosis. *Clin Transplant* 1996; 10:100-103.
6. Lowry RP, Takeuchi T, Cremisi H, Konieczny B, Someren A. Chronic rejection of organ allografts may arise from injuries sustained in recurring foci of acute rejection that resolve spontaneously. *Transplant Proc* 1993; 25:2103-2105.
7. Jiang H, Fujitsu T, Sakuma S, et al. Immunosuppressive Effects of FK 506 on Rat Renal Allograft Survival, in Comparison With Cyclosporin Transplant Proc 1995; 27:367-369.
8. Heemann UW, Azuma H, Tullius SG, Mackenzie HS, Brenner BM, Tilney NL. Contribution of reduced functioning kidney mass to chronic renal allograft dysfunction in rats. *Transplantation* 1994; 58:1317-1322.
9. Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 1988; 240:1169-1176.
10. O'Neil EA, Tocci MJ. Transcriptional activation of the IL-2 gene. *Transplantation Science* 1993; 3:77-82.
11. Hancock W, Whitley WD, Tullius SG, et al. Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation* 1993; 56:643-650.
12. Nadeu KC, Azuma H, Tilney NL. Sequential cytokine dynamics in chronic rejection of rat renal allografts: Roles for cytokines RANTES and MCP-1. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92:8729-8733.
13. 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.
14. Shihab FS, Yamamoto T, Nast C, et al. Transforming growth factor- β and matrix protein expression in acute and chronic rejection of human renal allografts. *JASN* 1995; 6:286-294.
15. Rennke HG. Pathogenesis and significance of nonprimary focal and segmental glomerulosclerosis. *Am J Kid Dis* 1989 13:443.

16. Heemann U, Azuma H, Hamar P, Schmid C, Tilney N, Philipp T. Mycophenolat mofetil inhibits lymphocyte binding and the upregulation of adhesion molecules in acute rejection of rat kidney allografts. *Transplant Immunol* 1996; 4:77-80.
17. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem* 1987 162:156-161.
18. Hartung J. *Lehr und Handbuch der angewandten Statistik*. 6. Ed. R Oldenburg Verlag, München, Wien, 1987. 612, 859-900.
19. Heemann U, Tullius SG, Tamatani T, et al. Infiltration patterns of macrophages and lymphocytes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transplant Int* 1994; 7:349-355.
20. Frishberg Y, Meyers CM, Kelly CJ. Cyclosporin A regulates T cell epithelial cell adhesion by altering LFA-1a (and ICAM-1 expression. *Kidney Int* 1996; 50:45-53.
21. Schleimer K, Szabó A, Müller V, Hamar P, Heemann UW. Influence of the ace-inhibitor enalapril on the development of chronic rejection after orthotopic renal transplantation in the rat. *Langenbecks Arch Chir I* 1997 Forumband:1-5.
22. Dendorfer U, Maslinski W, Remillard B, Strom TB. Interleukin-2 and the interleukin-2 receptor. *Transplantation Science* 1993; 3:77-82.
23. Li B, Sehajpal PK, Khanna A, et al. Differential regulation of Transforming growth factor- β and Interleukin 2 genes in human T-cells: demonstration of usage of novel competitor DNA constructs in the quantitative polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1991; 174:1259-1262.
24. Li B, Sehajpal PK, Subramaniam A, et al. Inhibition of Interleukin-2 receptor expression in normal human T-cells by cyclosporin. Demonstration at the mRNA, protein, and functional levels. *Transplantation* 1992; 53:146-151.
25. Dallman MJ, Shiho O, Page TH, Wood K, Morris PJ. Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the Interleukin-2 pathway. *J Exp Med* 1991; 173:79-87.
26. Krams SM, Falco DA, Villaneuva JC, et al. Cytokine and T-cell gene expression at the site of allograft rejection. *Transplantation* 1992; 53:151-156.
27. Halloran PF. Molecular mechanisms of new immunosuppressants. *Clin Transpl* 1996; 10:118-123.
28. Yoshimura N, Oka T, Amagai T, Horii Y, Imanishi J. Interleukin-2 receptor gene expression in kidney transplant recipients treated with Cyclosporin A. *Clin Exp Immunol* 1991; 85:326-330.
29. Lemström-KB, Räisänen-Sokolowski-AK, Häyry PJ, Koskinen PK. Triple drug immunosuppression significantly reduces aortic allograft arteriosclerosis in the rat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:553-564.
30. Vischjager M, VanGulik TM, DeKleine RHJ, et al. Experimental arterial allografting under low and therapeutic dosages of Cyclosporin for immunosuppression. *Transplantation* 1996; 61:1138-1142.
31. Koskinen PK, Lemström KB, Häyry PJ. How cyclosporin modifies histological and molecular events in the vascular wall during chronic rejection of rat cardiac allografts. *Am J Pathol* 1995; 146:972-980.
32. Rosenblum ND, Harmon WE, Levey RH. Treatment of chronic renal allograft rejection with Cyclosporin and prednisolone. *Transplantation* 1988; 45:232-233.
33. Abbud Filho M, Ramalho HJ, Barberato JB et al. Inhibition of chronic kidney allograft rejection by Cyclosporine. *Transplant Proc* 1989; 21:1660-1662.
34. Agarwal SK, Dash SC, Tiwari SC, et al. Results of conversion from triple-drug to double-drug therapy in living related renal transplantation. *Transplantation* 1995; 59:27-31.
35. Hollander AA, van Saase JL, Kootte AM, et al. Beneficial effects of conversion from cyclosporin to azathioprine after kidney transplantation. *Lancet* 1995; 345:610-614.
36. Gjertson DW, Cecka JM, Terasaki PI, et al. The relative effects of FK 506 and cyclosporin on short- and long-term kidney graft survival. *Transplantation* 1995; 60:1384-1388.
37. Schleibner S, Krauss M, Wagner K, et al. FK 506 versus cyclosporin in the prevention of renal allograft rejection – European pilot study: six week results. *Transpl Int* 1995; 8:86-90.
38. Becker G, Witzke O, Friedrich J, et al. Rescue therapy with Tacrolimus in simultaneous pancreas/kidney transplantation. *Transpl Int* 1997; 10:51-4.
39. Paul LC, Saito K, Davidoff A, Benediktsson H. Growth factor transcripts in rat renal transplants. *Am J Kid Dis* 1996; 28:441-450.
40. Border WA, Noble NA, Kettler M. TGF- β . A cytokine mediator of glomerulosclerosis and a target for therapeutic intervention. *Kidney Int* 1995; 49:s59-s61.
41. Horvath LZS, Friess H, Schilling M, et al. Altered expression of transforming growth factor- β s in chronic renal rejection. *Kidney Int* 1996; 50:489-498.
42. Wolf G, Thaiss F, Stahl RA. Cyclosporin stimulates expression of transforming growth factor- β in renal cells. *Transplantation* 1995; 60:237-241.
43. Horvath LZ, Friess H, Schilling M, et al. Altered expression of transforming growth factor-beta S in chronic renal rejection. *Kidney Int* 1996; 50:489-498.
44. Ostendorf T, Burg M, Floege J. Cytokines and glomerular injury. *Kidney Blood Press Res* 1996; 19:281-89.
45. Abboud HE. Platelet derived growth factor and mesangial cells. *Kidney Int* 1992; 41:581-583.
46. Floege J, Alpers CE, Burns MW, et al. Glomerular cells, extracellular matrix accumulation, and the development of glomerulosclerosis in the remnant kidney model. *Lab Invest* 1992; 66:485-489.
47. Muchaneta Kubara EC, Sayed Ahmed N, El Nahas AM. Subtotal nephrectomy: a mosaic of growth factors. *Nephrol Dial Transpl* 1995; 10:320-327.
48. Azuma H, Binder J, Heemann U, Schmid C, Tullius SG, Tilney NL. Effects of RS61443 on functional and morphological changes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transplantation* 1995; 59:460-466.
49. Heemann U, Azuma H, Tullius SG, Schmid C, Philipp Th, Tilney NL. Infections and reduced functioning kidney mass induce chronic rejection in rat kidney allografts. *Clin Nephrol* 1996; 46:34-38.
50. Floege J, Burns MW, Alpers CE, et al. Glomerular cell proliferation and PDGF expression precede glomerulosclerosis in the remnant kidney model. *Kidney Int* 1992; 41:297-309.