

MTA DOKTORI PÁLYÁZAT

Doktori értekezés

Dr. Hamar Péter, PhD

**A VESEÁTÜLTETÉS KÓRÉLETTANA ÉS PROGNÓZISÁT
BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK KÍSÉRLETES VIZSGÁLATA**

Budapest, 2010

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések	5
A TRANSZPLANTÁLT VESE KILÖKÖDÉSÉNEK KÓRÉLETTANA	6
Bevezetés	6
A KILÖKÖDÉSI REAKCIÓK TÍPUSAI	7
Hiperakut kilökődés	7
Akcelerált kilökődés	7
Akut kilökődés	8
Az akut kilökődés definíciója	8
Az akut kilökődés mechanizmusa	9
Az endothel szerepe	12
Akut celluláris kilökődés	13
Akut humorális kilökődés	13
KRÓNIKUS ALLOGRAFT NEFROPÁTIA	14
A krónikus allograft nefropátia kórleltana	15
A kilökődési reakciók kórleltanának összefoglalása	16
„A VESEÁTÜLTETÉS PROGNÓZISÁT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK KÍSÉRLETES VIZSGÁLATA”	18
Alkalmazott módszerek	18
Retrospektív kórlap analízis	18
Állatkísérletek	20
Állatmodellek	20
Kísérleti állatok	20
Kezelések:	21
Fischer-to-Lewis krónikus allograft modell	21
Veseátültetés	21
Veseátültetés egéren (lupus modell)	22
Progressiv glomeruloszklerózis (subtotális nefrektómia modell)	23
A vese szinpatikus denervációja sebészi úton (dorzális rhizotómia)	23
Vese-Ischemia-reperfúzió	23
Állatkísérleti minták feldolgozása	23
Rutin kémiai eljárások	23
Funkcionális mérések	24
Fény és elektronmikroszkópia	24
Szöveti előkészítés	24
Vizsgált epitópok (alkalmazott antitestek):	25
Morfometria	25
Vesekárosodás index (score):	25
Glomeruláris geometria:	26

Glomerulus kapillárisok:	26
Glomeruláris sejtek:	27
Immunhisztológia	27
Molekuláris biológiai módszerek	27
Reverse transzkriptáz és real time-polymeráz láncreakció (PCR)	27
„A veseátültetés prognózisát befolyásoló tényezők: saját kísérleti eredmények”	30
I/ Anyagcsere tényezők szerepe a krónikus allograft nefropátiában.	30
Eredmények	30
Anyagcsere-faktorok.	30
Peritranszplantációs változók.	33
Funkcionális és alloantigén-függő paraméterek.	33
Megbeszélés	34
II/ A vese ischemia-reperfúziós károsodásának gátlása	37
A/ prekondicionálás	37
Eredmények	38
Túlélés különböző időtartamú ischemiás periódusok után	38
Hisztológia és immunhisztokémia	39
RT-PCR	40
Megbeszélés	41
B/RNS interferencia	44
Géncsendesítés RNS interferenciával	45
Az RNS interferencia in vivo alkalmazása	48
Az siRNS-el kiváltott géncsendesítés lehetséges mellékhatásai:	49
Fas elleni rövid interferáló RNS védelmet nyújt egerekben a vese ischemia-reperfúziós károsodásával szemben (9)	50
Eredmények	51
Megbeszélés	57
III/ Alloantigén függő tényezők szerepének vizsgálata	58
Eredmények	62
Fénymikroszkópia	62
Tx állatok	62
Alloimmun-független állatmodellek	62
Elektronmikroszkópia	63
Tx állatok	63
Alloimmun-független állatmodellek	64
Funkcionális vizsgálatok	64
Megbeszélés	65
Szisztémás autoimmunitás vizsgálata lupus nephritis modellben	68
Lymphocita adhézio alloimmun károsodástól mentes (szubtotális nefrektómia) modellben (11,12)	69
Eredmények	69
Megbeszélés	70
IV/ A vesefibrózis progressziójának terápiás befolyásolása	70
A renin angiotensin rendszer szerepe	70
Eredmények	73
Veseátültetést követő ACE-gátlás, F344-to Lew patkány allograft modellben	73
Funkcionális mérések	73
Arteriás középnyomás	73
Testtömeg	73
Szöveti vizsgálat	73
Növekedési faktor mRNS-szintek	76
Eredmények	77
A szinpatikus aktiváció és a RAS kombinált gátlása szubtotális nefrektómia után	77
1. Állatok adatai (12. táblázat)	77
4. Sztereológiai eredmények (15. Táblázat)	80
5. A glomeruláris sejtek analízise (16. Táblázat)	81
6. A vesék immunhisztokémiai és real-time PCR analízise	81
Megbeszélés	84

Veseátültetést követő ACE-gátlás, F344-to Lew patkány allograft modellben	84
A szinpatikus aktiváció és a RAS kombinált gátlása szubtotális nefrektómia után	87
Immunsuppresszió alkalmazása (¹⁶)	90
Eredmények	91
Funkcionális vizsgálatok:	91
Fénymikroszkópia és immunhisztológia	93
Polimeráz láncreakció (PCR)	94
Megbeszélés	96
Mátrix metalloproteinázok szerepe	99
Eredmények:	101
A korai MMP gátlás csökkentette a 24-órás fehérje kiválasztást	101
A korai MMP gátlás csökkentette a CAN és glomeruloszklerózis mértékét.	103
Megbeszélés	104
Nemi hormonok szerepe (⁷)	108
Eredmények	109
Ösztrogének és progeszteron hatásai vese ablációs modellben	109
Kísérleti állatok funkcionális adatai	109
Funkcionális vizsgálatok	110
Szövettani vizsgálat	112
Molekuláris vizsgálat	113
Uninefrektomizált (UNX) Spontán hipertenzív (SHR) patkányok ösztradiol kezelése	114
Funkcionális eredmények	114
Morfológiai vizsgálatok eredményei	115
Immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei	117
Megbeszélés	120
Ösztrogének és progeszteron hatásai vese ablációs modellben	120
Uninefrektomizált (UNX) Spontán hipertenzív (SHR) patkányok ösztradiol kezelése	124
Saját eredmények összefoglalása.	128
Hivatkozások jegyzéke:	130

Rövidítések

ADCC: antitest dependens citotoxicitás
AICD: aktiváció indukálta sejthalál (activation induced cell death)
Ag: antigén (a donor szervén)
APC: antigén bemutató (prezentáló) sejt
APAAP: alkalikus-foszfátáz-anti-alkalikus-foszfátáz reakció
CD: sejtfelszíni jelölő molekula (cluster of differentiation nevezéktan)
CD3: a TCR jelátvivő molekulája
CD4: T_h sejtek jellegzetes markere
CD8: T_c sejtek jellegzetes markere
CD154-CD40, CD28-B-7: kostimulációs molekulapárok (T-limfocita aktiváció)
cDNA: komplementer desoxyribonuklein sav
CMV: citomegalovírus
CSA: Cyclosporin-A (immunszuppresszív gyógyszer)
CTLA: citotoxikus T-limfocita (T_c) asszociálta antigén
CTGF: kötőszöveti eredetű növekedési faktor (connective tissue growth factor)
ED-1: patkány CD-68 ekvivalens szöveti-makrofág marker elleni monoklonális antitest
FADD: Fas által aktivált sejthalált kiváltó adapter fehérje (Fas activated death domain)
GAPDH: glyceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
Granzim: apoptózis indukáló molekula
Fas: apoptózis receptor (APO-1, CD95)
FasL: a Fas molekula ligandja
HLA: humán leukocita antigén
ICAM-1 (CD 54): intercelluláris adhézións molekula-1
IgG: immunglobulin G
IFN: interferon
IL: interleukin
IL-2: interleukin-2
IL-2R: IL-2 receptor (nagy affinitású: $\alpha+\beta+\gamma$ lánc)
IL-2R α (CD 122): Az interleukin-2 receptor 70 kDa béta fehérje (p70) allánca
LFA-1 α (CD11 α): leukocita funkcióval asszociált antigen-1 alfa lánca
MAP: artériás középnyomás (mmHg)
NF- κ B: Nukleáris faktor - κ B (intracelluláris jelátvitel)
NK: természetes ölő (natural killer) sejt
OX-19: A patkány CD5+ ekvivalens pan-T-sejt marker elleni monoklonális antitest
P: peptid (HLA molekulához kapcsoltn bemutatott saját vagy idegen fehérje részlet)
p: a hiba valószínűsége
PDGF: trombocita eredetű növekedési faktor (platelet derived growth factor)
RT-PCR: reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció
SEM: az átlag standard hibája
T_c: citotoxikus T-limfocita
T_h: segítő (helper) T-limfocita
TCR: T-limfocita receptor
TGF- β_1 : transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor)-béta 1-es izoformája
VCAM-1 (CD106): vaszkuláris sejt adhézións molekula-1
VLA-4 α (CD49d): nagyon késői aktivációs fehérje-4 alfa integrin

A transzplantált vese kilökődésének kórélettana (^{12,3})

Bevezetés

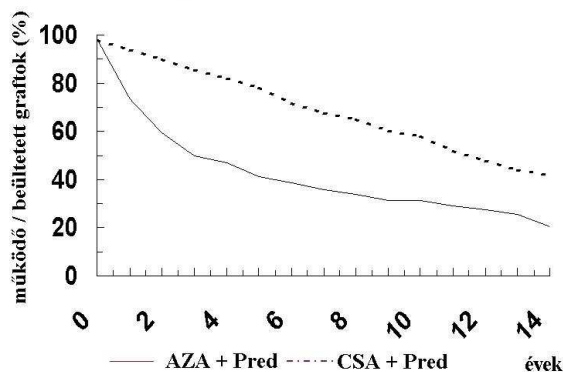
A végstádiumú veseelégtelenség legjobb életminőséget biztosító kezelése a veseátültetés. A Cyclosporin-A bevezetése a rövidtávú túlélést jelentősen javította, de a harmadik év után működésképtelenné vált allograftok száma gyakorlatilag nem változott (1. ábra) (1,2). Ennek oka, hogy a beültetett szerv működése az átültetés során elszenvedett károsodás, valamint a recipiens immunválasza következtében limitált.

A genetikai eltérések minimalizálását szolgálja a donor és a recipiens vércsoportjának és humán leukocita antigén (HLA) típusának egyeztetése. Az egyeztetés ellenére fennálló genetikai eltérések hatására aktiválódó immunrendszer károsítja a graftot. A kilökődési reakció általában elsődleges immunválasz, mely a szokásos immunszuppresszív kezelés (szteroid, calcineurin antagonist és purin antagonist) mellett enyhe, vagy közepes súlyosságú. A betegek kis hányada már korábban találkozott a donorra jellemző (HLA vagy minor) antigénnel (*szenzitizálódott*). Ilyenkor másodlagos (memória) immunválasz lép fel, mely súlyos lefolyású, és nehezen kezelhető.

Kórszövettani, időbeli és kórélettani sajátságok alapján megkülönböztetünk *hiperakut*, *akcelerált*, *akut* és *krónikus kilökődést* (3).

1. ábra

A krónikus kilökődés, és a cyclosporin hatása a graftműködésre



A cyclosporin A jelentősen javította a korai túlélést: a felső görbe meredeksége az 1-3 évben jóval laposabb. A harmadik évtől kezdve a működésképtelenné vált graftok aránya - amint azt a két görbe hasonló meredeksége mutatja - hasonló (4). A cyclosporin alapú immunsuppressio jobb túlélési statisztikájának magyarázata, az akut kilökődés visszaszorításában keresendő.

¹ Hamar P: A transzplantált vese kilökődésének kórélettana" in Nephrologia, Elmélet és klinikum, dialysis, transplantatio. Szerk.: Rosivall L, Kiss I. Medintel Könyvkiadó, Bp. 2003. 323-346. 2003

² Hamar-P: "A veseátültetés kórélettana" in Biophysics 21./Biofizika 21. Tankönyv. Szerk: Vincze János 2006

³ Hamar-P: "Alloantigén-függő és független tényezők szerepe a transzplantált vese krónikus kilökődésében" Semmelweis Egyetem, Doktori értekezések <<60>> 1998

A KILÖKÖDÉSI REAKCIÓK TÍPUSAI

A különböző kilöködési reakciók gyakran egyszerre, vagy átfedéssel jelentkeznek, és klinikai megjelenésük sem különíthető el egymástól minden esetben. A patomechanizmust tekintve sem különülnek el élesen az egyes kilöködési formák: a „humorális” azaz antitest kiváltotta és a „celluláris” azaz T-limfocita vezérelte folyamatok is szorosan összefüggének egymással: az antitesteket is sejtek (B-limfociták) termelik, és az antitest termelést T-limfociták szabályozzák (5).

Hiperakut kilökődés

A hiperakut kilökődés szenzitizált recipiensekben kialakuló másodlagos immunválasz, mely végső soron a graft ereinek elzáródásához és a graft pusztulásához vezet a reperfúziót követően órákon belül (6,7). Gyakorlati szempontból a hiperakut kilökődés klinikai jelentősége - az egyéb kilöködési formákhoz képest – alárendelt, mert a *HLA és ABO vércsoport eltérés* okozta hiperakut kilökődés megelőzhető (8). A HLA eltérést a recipiensben meglévő, keringő anti-HLA antitestek jelenlétére történő szűrés (*panel reaktivitás, PRA*), valamint a transzplantációt megelőző *keresztpróba*: a donor recipienssel szembeni immunológiai válaszkészségének meghatározása kizárja. Hiperakut kilökődést csak a keresztpróba elvégzésében vagy jelentésében vétett hiba okozhat (5).

Hiperakut kilökődés során a recipiens keringésében meglévő (**preformált**) - donor antigén ellenes - IgG **antitestek** kötődnek a graft endotéljéhez (6). Az endotél felszínén található antigének lehetnek **MHC-I** által kódolt HLA antigének, vagy **ABO** vércsoport antigének. Mivel az ellenanyag „készen van”, azonnali immunválasz jelentkezik.

Az antitesttel megjelölt sejteket természetes ölő (natural killer: **NK**) sejtek pusztítják el, vagy **komplement** aktiváció következtében feloldódnak (endotél károsodás: sejt lízis, antitest-függő sejt-közvetítette citotoxicitás (*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity: ADCC*))

A minor hisztokompatibilitási antigének (minor-H Ag)– melyeket a keresztpróba nem mutat ki – általában lassabb és gyengébb immunválaszt indukálnak, mint a HLA antigének.

Akcelerált kilökődés

Az akcelerált kilökődés jelentősége, hogy bár ritkán fordul elő, kezelésre általában nem reagál és graftvesztéshez vezet.

Az akcelerált kilökődés a minor hisztokompatibilitási antigénekkal szemben szenzitizált betegekben az átültetést követő 1-3 napon kialakuló másodlagos (memória típusú) immunválasz (6,7). A rizikócsoportok a hiperakut kilökődéshez hasonlóak: korábbi transzplantáció, transzfúziók, terhesség. Ezek közül a korábbi transzplantáció a legfontosabb rizikótényező.

Az akcelerált kilökődés a hiperakut kilökődésnél később, de az átültetést követően 1 héten belül, azaz korábban lép fel, mint az antigénnel való első találkozás (primer immunválasz) esetén lehetséges, tehát *másodlagos immunválasz*. Mivel a szenzitizáció nem mindig jár együtt kimutatható, keringő, donor ellenes antitestek jelenlétével, és a PRA vizsgálat, és a keresztpróba során limfocita felszíni antigének elleni immunreakciót vizsgáljuk, így ezek a vizsgálatok általában nem jelzik előre az akcelerált kilökődést. Ezért a rizikóbetegek esetén érdemes flow citometriával szenzitív keresztpróbát végezni.

Akut kilökődés

Az akut kilökődés definíciója

Az immunszuppresszió, a sebészi technika, a szövettipizálás, és a donor allokáció fejlődésével az akut kilökődés gyakoriságát sikerült 10% alá csökkenteni, melynek 90%-a visszafordítható (9,10).

Az akut kilökődés az idegen antigénre adott immunválasz okozta sejtnekrózis, melyben a központi szerepet a T-limfociták játsszák.

Az akut kilökődés ritkán jelentkezik a klasszikus *klinikai* formában: láz, oliguria, érzékeny, duzzadt graft. Általában a kreatinin szint enyhe emelkedése az egyetlen tünet.

A *szövettani* diagnózis – klinikai tünetek miatt végzett biopsziában – az enyhe tubulitistól a teljes szövettani képig változhat: gyulladásos beszűrődés

- a glomerulusokban (*glomerulitis*),
- tubulusokban (*tubulitis*),
- és ereken (*endarteritis, endotelialitis*),
- immunglobulin és komplement lerakódással.

Az allograft elleni immunválasz általában már előrehaladott, mire a szérum kreatinin emelkedése a folyamatra felhívja a figyelmet. Ugyanakkor, az utóbbi időkben végzett protokoll biopsziák tanulsága, hogy súlyos intersticiális és tubuláris infiltráció (tubulitis) is előfordulhat klinikailag tünetmentes (normális szérum kreatinin, és GFR) allograftok biopsziás mintájában. Az ilyen „néma” kilökődési epizódok kezelése javítja a prognózist, tehát ezekben az esetekben szintén károsodik a graft annak ellenére, hogy a glomeruláris filtráció nem romlik kimutathatóan (3).

Az akut kilökődés enyhébb esetben a tubulointerstíciumra lokalizálódó parenchima károsodás. Súlyosabb esetben a donor szerv ereinek endotél sejtjei (idegen HLA molekulák) elleni immunitás következtében ér endotél károsodás is kialakul. A Banff beosztás szerinti *tubulointersticiális* és *intimális arteritisszel* járó típusban a *celluláris* (T-limfociták által közvetített) effektor mechanizmusok (ld. „Akut celluláris kilökődés”) túlsúlya jellemző. Amennyiben *humorális* (immunglobulin közvetítette) mechanizmus (ld. „Akut humorális kilökődés”) is részt vesz, az érfal gyulladása az érfal teljes vastagságára kiterjedhet (*transzmurális* típus).

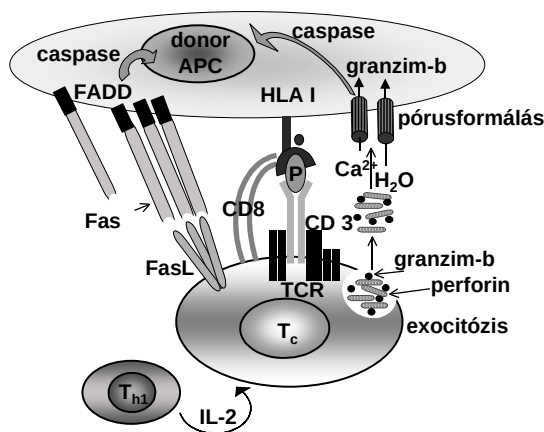
Az akut kilöködés mechanizmusa

Az idegenként vagy sajátként történő felismerést kódoló gén család (fő hisztokompatibilitási komplex /major histocompatibility complex/: **MHC**) emberben a **HLA** (Humán Leukocita Antigén) sejtfelszíni markereket kódolja (11).

A T-limfociták T-sejt receptora (**TCR**) I-es vagy II-es típusú HLA-peptid komplexet ismer fel (2. ábra). A jelátvitelt a TCR-hez kapcsolódó CD3 molekula végzi.

2. ábra

Direkt antigén felismerés, és a T_c-limfociták effektor mechanizmusai

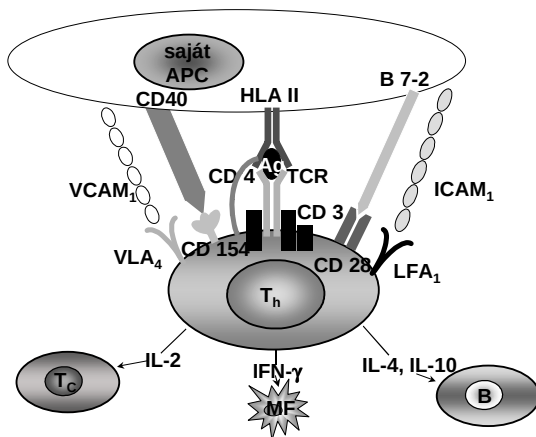


Rövidítések magyarázatát ld. a fejezet elején

A közvetlen (direkt) antigén felismerés során a graft minden sejtjén megtalálható idegen **HLA I** molekulákat a recipiens alloreaktív T_c-limfocitái közvetlenül felismerik (3. ábra) (12). Idegen MHC molekulák csak transzplantációs körülmények között fordulnak elő, így ez a felismerési forma transzplantációra specifikus. A T_c-limfociták aktiválódásához szükség van aktivált T_h-limfociták segítségével. A felismerést követően a T_c-limfociták a célsejtet feloldják (lízis). A direkt antigén bemutatás mindig heves kilöködési reakciót vált ki (13).

3. ábra

Indirekt antigén felismerés, és a T_h-limfociták effektor mechanizmusai.



Rövidítések magyarázatát ld. a disszertáció elején

Indirekt antigén bemutatás során az antigént - fagocitózist követően - saját hivatásos antigén bemutató sejtek (antigen presenting cell) **APC**-k (nyirokcsomói dendritikus sejtek, makrofágok, B-

limfociták) dolgozzák fel, és II típusú HLA (**HLA II**) molekulához kötve mutatják be (3. ábra). A bemutatott antigént **CD4+** azaz segítő (helper): **T_H**-limfociták ismerik fel, így a recipiens immunizálódik (*szenzitizáció*) (5,6).

Az immunizáció következtében klonálisan proliferáló donor antigén specifikus effektor sejtek a graftba visszajutva akut kilökődést okoznak. Ez a fajta antigén bemutatás általában a perifériás (másodlagos) nyirokszervekben (pl. nyirokcsomó, lép) történik. Az indirekt antigén bemutatás jelenségét alátámasztja, hogy az APC-k nyirokcsomóba vándorlásához, ott a T-limfociták klonális elszaporodásához, és az effektor sejtek graftba történő visszavándorlásához szükséges idő 5-7 nap, ami megfelel a beültetéstől az akut kilökődés kialakulásáig minimálisan szükséges időnek. Az indirekt felismerés mind az akut, mind a krónikus allograft nefropátiában fontos szerepet játszik, és a hagyományos immunszuppresszív szerekkel kevésbé befolyásolható, mint a direkt felismerés (5,6).

Az antigén felismerést követően a *T-limfociták* három módon reagálhatnak: *aktiváció*, *apoptózis*, *anergia*.

Az aktivációhoz a T-sejt magjához 2 jelnek kell egyszerre érkeznie. A TCR/CD4, vagy TCR/CD8 komplex jelét a CD3 molekula közvetíti a sejtmag felé (*felismerés: 1. jel*). A felismerési jelet *korai aktivációs jel*-nek is nevezik, mivel a sejtciklus nyugvó (G0) fázisában aktiválja a sejtet. A T-sejt a TCR-CD3 komplexum felől legalább 3 jelátviteli úton aktiválódhat, melyek közül terápiás szempontból az AT és κ B nukleáris faktorok (NFAT, NF κ B) magba történő transzlokációja kiemelkedő fontosságú (gátolható cyclosporinnal). A nukleáris faktorok (NF) sejtmagba történő bejutását követően az interleukin-2 (IL-2) gén promóter régiójához kapcsolódnak, és elindítják az IL-2 és számos más gyulladásos citokin, valamint a nagy affinitású IL-2 receptort kódoló mRNS átírását (transzkripció).

A sejt aktivációjához kostimuláló molekulák (CD28, CD40 ligand (CD40L=CD154)) felől is kell, hogy jel érkezzon (*kostimuláció: 2. jel*). A kostimulációs jel feltétele, hogy a CD28, ill. CD40L molekulák az APC-ken található, specifikus komplementer molekulával kapcsolódni tudjanak, aminek feltétele a T-sejten ill. APC-n jelen lévő *adhéziós molekulapárok* segítségével létrehozott *immunológia szinapszis*. A kostimulációs jelet *késői aktivációs jel*-nek is nevezik, mivel a sejtciklus aktivált (G1) fázisában játszik fontos szerepet. Kostimuláció hiányában, az antigént felismerő sejt apoptózis útján elpusztulhat (*aktiváció indukálta sejthalál: AICD*). A kostimulációs jelet ezért *túlélési jel*nek is nevezik. A T-limfociták apoptózisa az immunválasz egyik alapvető önszabályozó mechanizmusa. Az aktivált T-limfociták az antigén eltűnése, azaz folyamatos antigén bemutatás hiányában is elpusztulnak apoptózis útján.

Amennyiben a T-limfocita magjához csak a T-sejt receptor felől érkezik jel, és a kostimulációs jel elmarad, úgy aktiváció helyett anergia: hosszan tartó válaszképtelenség is kialakulhat. Ilyenkor a T-limfocita nem eliminálódik, csak nem aktiválható állapotba kerül, azaz antigén ingerre nem reagál. A kostimuláció gátlása (pl. CTLA₄Ig) segítségével rágcsálókban a beültetett szervvel szembeni specifikus immuntolerancia alakítható ki.

A T-limfociták nem csak antigén hatására a TCR felől aktiválódhatnak, hanem citokinek (pl. IL-2) hatására a megfelelő citokin receptor felől is. A TCR felől aktiválódott sejt IL-2-t termel és ez autokrín módon az őt termelő sejtre is visszahat (**3. jel**). A jelátvitel eredményeként cyclin molekulák aktiválódásával beindul a sejtciklus. Így a citokin receptor felőli 3. jel az alloreaktív T-limfocita klón proliferációját (*proliferációs jel*) eredményezi (*klonális expanszió*). A klonális proliferáció eredménye citokin termelés robbanásszerű megindulása.

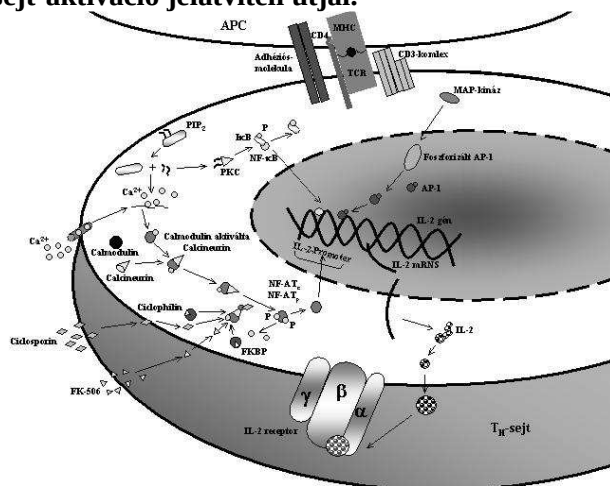
1. Táblázat:

A 3 jeles antigén-felismerés

	Funkció		résztevő molekulák	
			T-limfocitán	APCn
1. jel	antigén felismerés	korai aktiváció	TCR/CD4,8 + CD3	MHC II/I
2. jel	Túlélés	késői aktiváció/ kostimuláció	CD28, CD40L	B7, CD40
3. jel	Proliferáció	klonális expanszió	IL-2R	-

4. ábra

A T-sejt-aktiváció jelátviteli útjai.



A TCR a CD3 molekula segítségével 3 jelátviteli úton⁴ közvetíti az idegen antigén felismerése okozta jelet a sejtmagba (1. jel). A nuclearis faktorok (NF) a sejtmagba jutást követően az IL-2 promotor régióhoz kapcsolódva, elindítják az IL-2 és számos más gyulladásos cytokin átírását (transcriptióját).

⁴ Jelátviteli utak:

1. MAP-kináz - aktivátor fehérje (AP-1),
2. foszfatidil inositol diphosphate (PIP2) - inozitol triphosphate (IP3) - diacyl glycerol (DAG) - protein kinase C (PKC) - NF-κB,
3. Ca²⁺-Calmodulin-Calcineurin- aktivált T-lymphocyták nuclearis factora (NFAT)

Az antigén felismerést követően a limfociták a graft intersticiumba vándorolnak (kitapadás, rolling transendothelialis migráció, lsd. Gyulladás fejezet)

A **T_c-limfociták** a graft sejtjeit közvetlenül támadják. A T_c-limfociták aktivációjához a TCR felől érkező 1. és a kostimulációs molekulák felől érkező 2. jel mellett, az IL-2R felől érkező 3. jel is szükséges. A T_c-limfociták működéséhez tehát T_h funkcióra is szükség van.

A **T_h-limfociták** főleg citokinek termelésével járulnak hozzá az immunválaszhoz:

- serkentik a CD8+ limfociták működését
- makrofágokat,
- NK sejteket
- és B-limfocitákat (antitest termelés) aktiválnak (3. ábra).

A T_h-limfocitáknak citokin termelésük alapján két altípusát ismerjük: a T_{h1}, és a T_{h2} típust (lsd. immunológia).

A T-limfociták mellett az akut kilökődésben szerepet játszhatnak

- a graft vaszkuláris endotél és tubuláris epitél sejtjei valamint
- makrofágok, és dendritikus sejtek: APC szerepben
- antitest termelő B-limfociták (ld. „Akut humorális kilökődés”)
- természetes ölő (natural killer: **NK**) sejtek és polimorfonukleáris (**PMN**) granulociták is (ADCC: ld. „Hiperakut kilökődés”)

Az immuneffektor mechanizmusok közötti határok nem élesek, és a különböző T-limfocita szubpopulációk funkcióiban is átfedés van.

Az endothel szerepe

Mivel az endothel az a vonal, ahol a befogadó szervezet immunrendszere és a beültetett szerv idegen antigénjei legelőször találkoznak, az endothel elleni immunválasznak jelentős szerepe van az akut kilökődés folyamatában.

Az endothelt a kivétel, konzerválás és beültetés során aktiválja a graft mechanikus perfusioja, az ischemia és a reperfusio. Az endothel felszínén található HLA molekulák HLA ellenes antitest kötés esetén aktivációs jelet továbbíthatnak a sejtmag felé (14). Az endothel - aktivációja következtében - adhézión (ld. „T-lymphocyta migráció, Sejtes infiltratio” c. részt) és MHC molekulák jelennek meg a felszínén, ami felerősíti az allogen választ a recipiensben. Halloran magyarázata szerint, az aspecifikus károsító tényezők okozta gyulladás az endothelt aktiválva akut kilökődési reakciót provokálnak (15). Ezt a teóriát alátámasztja, hogy a gyulladásos citokinek (IL-1, IFN- γ , TNF- α) az endothel sejteket aktiválják, azaz fokozzák az MHC és ICAM₁ expressziót (16,17).

Élő, nem rokon (pl. házastárs) esetén végzett átültetések prognózisa sokkal jobb mint a cadaver donorból történő átültetés esetén. Anuria az élő napon élő donor esetén 2%, míg cadaver donor esetén 10%, dialízisre élő donor esetén 6, míg cadaver donor esetén 22 %-ban volt szükség. A jelenség sem jobb HLA egyezéssel (nem vér szerinti rokonból történik az átültetés) sem rövidebb ischémias idővel nem magyarázható (18). A rosszabb prognózis hátterében a donor **agyhalála** állhat. Tillney és munkatársai agyhalott és ép altatott patkány donorból történő veseátültetés során az agyhalott donorból származó vese intenzívebb acut kilökődését figyelték meg (19), melynek hátterében az agyhalál kapcsán nagy mennyiségben felszabaduló cytokint („cytokin vihar”) valószínűsítették (20). Ez a megfigyelés részben magyarázhatja a cadaver donorból történt átültetések élő donoros transzplantációhoz viszonyított rövidebb túlélését (21).

Akut celluláris kilökődés

Az eddig vázolt mechanizmusok az akut kilökődésre általában jellemzőek. A celluláris akut kilökődés enyhébb lefolyású, és kezelésre jobban reagál mint a humorális forma. A kereksejtes beszűrődés (első sorban **T-limfociták**) elhelyezkedése alapján megkülönböztethetünk a tubulusokra és az interstíciumra lokalizált és a kis ereket is érintő (intimális arteritisz) altípust (ld. BANFF felosztás) (3).

Akut humorális kilökődés

Az akut kilökődés fentebb vázolt mechanizmusa mellett akut humorális kilökődésben a **B-limfociták antitest termelése** dominál. IgG típusú antitestek termelődnek endoteliális (MHC vagy nem-MHC) antigének ellen, és az aktiválódó **komplement** az endotelt károsítja. Első sorban az arteriolák károsodása jellemző, de gyakran a vénák gyulladása is megfigyelhető.

Feltételezhető, hogy a hiperakut és akcelerált kilökődéshez hasonlóan, a humorális akut kilökődést is már meglévő – donor specifikus – antitestek okozzák, melyek a keresztpróba idején nem érik el a kimutathatóság alsó határát, esetleg az átültetést követően keletkeznek (másodlagos v. memória típusú immunválasz) (22).

Ez az akut kilökődés ritka, de súlyos formája, mely szteroid kezelésre gyakran nem reagál, így az akut kilökődés okozta graft vesztes fő oka. Szövettani képe fibrinoid nekrozissal járó transzmurális arteritisz.

A komplement részvételét alátámasztja a komplement 4d faktor (*C4d*) jelenléte a peritubuláris és glomeruláris kapillárisokban, mely immunhisztokémiai módszerrel kimutatható. A *C4d* faktor jelenléte kb. 9x-esére növeli a graftvesztés rizikóját (23).

Az érfal elhúzódó humorális károsodása figyelhető meg krónikus allograft nefropátia során is.

KRÓNIKUS ALLOGRAFT NEFROPÁTIA

A krónikus allograft nefropátia a szervátültetés hosszútávú sikerének legfőbb akadálya, és terápiásan alig befolyásolható, így klinikai jelentősége igen nagy (24,25,26,27).

A krónikus allograft nefropátia az allograft szöveteinek folyamatos, lassú károsodása, mely a krónikus gyulladás és a párhuzamosan fennálló gyógyulási folyamatok révén a transzplantált szerv kötőszövetes átépüléséhez vezet.

A krónikus allograft nefropátia klinikopatológiai entitás: Klinikailag hónapokkal, évekkel a műtét után a vese funkció fokozatosan romlik: a glomeruláris filtráció (GFR) csökken (*szérum kreatinin emelkedik*), és fokozódó *proteinúria* jelentkezik. Legtöbbször *magas vérnyomás* is kialakul. Morfológiailag, fénymikroszkóposan: a kis artériák, glomerulusok, és a tubulointerstícium folyamatosan előrehaladó strukturális károsodása észlelhető. Specifikus morfológiai eltérések: *transzplantációs arteriopátia, transzplantációs glomerulopátia, transzplantációs kapillaropátia* (definíciók: lsd. Kórbonctan). További, nem specifikus elváltozások lehetnek: *artériák intima proliferációja, arteriola hialinizáció, glomeruloszklerózis, tubulus atrófia, és intersticiális fibrózis*. Az allograftot *mononukleáris* sejtek (makrofágok és T-limfociták) *infiltrálják*. Ezen nem specifikus elváltozások nem csak krónikus allograft nefropátiában, hanem egyéb okból kialakult krónikus allograft nefropátiában, korábbi akut kilökődés, és a vese öregedése következtében is megfigyelhetők.

Krónikus allograft nefropátiáról a fenti szövettani kép és klinikai tünet együttes fennállásakor beszélünk, amennyiben a *krónikus allograft nefropátia* egyéb lehetséges okait kizártuk.

Bár az alloantigéntől függő mechanizmusok szerepet játszanak az allograftok krónikus allograft nefropátiájának folyamatában is, az alloantigén kiváltotta immunreakciótól független folyamatoknak is szerepe van a szöveti szerkezet és funkció késői, progresszív hanyatlásában. A krónikus allograft nefropátia során elkülöníthetünk egy korábbi – sejtes infiltráció, és aktív citokin (IL-2, TGF- β) termeléssel jellemezhető szakaszt, és egy későbbi – kötőszöveti mátrix felszaporodással, kiterjedt glomeruláris hegesedéssel, és intersticiális fibrózissal jellemezhető szakaszt, melyben a trombocita eredetű növekedési faktor (PDGF) termelés meghatározó. Az alloantigénnek a krónikus allograft nefropátia folyamat megindításában lehet meghatározó szerepe, míg a későbbi progresszióban az antigéntől független tényezők is szerepet játszanak. A krónikus allograft nefropátia során megfigyelhető alloantigén ellen irányuló immunológiai kilökődési reakció során memória jellegű mechanizmusoknak is része lehet. Szélesebb spektrumú T- és B-limfocita válasz és antitest-termelés jellemző, ami – mint a memória sejtek irányította immunválasz általában – kezelésre rezisztens.

A krónikus allograft nefropátia kórélettana

A krónikus allograft nefropátia kialakulásával kapcsolatban számos rizikó tényező szerepét felvetették (2. Táblázat).

2. Táblázat

A krónikus allograft nefropátia rizikótényezői

Alloantigén Függő tényezők:	HLA eltérés
	antitest termelés (pl. anti-HLA antitest)
	Akut kilökődési epizódok száma és intenzitása
	késői akut kilökődés
	elégtelen – nem megfelelő hatékonyságú – immunszuppresszió
	Alloszenzitizáció mértéke (PRA: panel-reaktivitás)
Alloantigén- független tényezők:	Alloszenzitizációt fokozó tényezők: ismételt transzplantáció, korábbi terhességek, korábbi transzfúziók
	Transzplantáció körüli tényezők: agyhalott (kadáver) donor; donor és recipiens életkora, neme; hideg és meleg ischémia időtartama; elsődleges allograft funkció késői megindulása (delayed graft function)
	Metabolikus tényezők: szérum lipid és glukóz értékek, az elhízottság mértéke, cukorbetegség, magas szisztémás vérnyomás transzplantáció előtt és után, proteinúria
	Fertőzések, különösen citomegalovírus (CMV) fertőzés
	Immunszuppresszív szerek mellékhatásai
	A recipiens genetikai adottságai: génpolimorfizmusok
	Dohányzás

Mint a rizikótényezők nagy számából is kitűnik, a krónikus allograft nefropátia multifaktoriális eredetű folyamat. Lefolyása egyértelműen nem tisztázott. Mivel az akut kilökődési epizódok száma és súlyossága valamint a donor és a recipiens közötti immunológiai különbségek szoros korrelációt mutatnak a krónikus allograft nefropátia incidenciájával és progressziójával, az alloantigén-függő folyamatok fontos szerepet játszhatnak a krónikus allograft nefropátia beindításában.

Krónikus allograft nefropátiára a T_{H2} -lymfocita szubpopuláció citokin profilja jellemző. A 2-es típusú T_{H2} , és az általuk stimulált B-limfociták közvetítette *immunválasz* kerül előtérbe. Ezen elképzelés értelmében a krónikus allograft nefropátia alapvetően *humorális szövetkárosodás*. A graftban zajló folyamatos immunválasz az erek endotéljét károsítja. Mindez magyarázhatja a graft kis ereiben (arkuáta és interlobuláris artériák) és a peritubuláris és glomeruláris kapillárisokban kialakuló bazálmembrán és intima elváltozásokat (transzplantációs arteriopátia, glomerulopátia, kapillaropátia).

Az alloantigén független mechanizmusok jelentőségét alátámasztja, hogy

- az immunszuppresszív szerek egyre bővülő arzenálja ellenére sem tudjuk jelenleg a krónikus allograft nefropátiát gyógyítani
- bizonyos ponton túl, az allogén környezet megszüntetése ellenére is változatlan sebességgel tovább progrediál a krónikus allograft nefropátia folyamata

A beültetett vese, károsító hatásokra (ischémia, akut kilökődési epizódok, toxikus hatások) adott válaszként, és adaptációs mechanizmusok révén fokozatosan átépül. A krónikus gyulladásos folyamat fenntartásában az alloantigéntől független tényezőknek az allograft endotéliumának folyamatos aktiválásán keresztül juthat fontos szerep. Az alloantigén-független tényezők krónikus allograft nefropátiában betöltött szerepét magyarázza a *hiperfiltrációs* teória. Újabban a donor életkorának jelentőségét felismerve a krónikus allograft nefropátiát *felgyorsult öregedési* folyamatként is magyarázzák.

A krónikus allograft nefropátia folyamatában antitest közvetítette, sejt közvetítette, és citokinek és növekedési faktorok irányította szövetátépülési mechanizmusok vesznek részt. Az egyáltalán, a reperfüzió és egyéb rizikótényezők hatására aktiválódó ér endotélén fokozódik a HLA molekulák, és gyulladásos citokinek expressziója. Mononukleáris sejtek tapadnak ki, és akut vagy később krónikus kilökődési reakció alakul ki. Az első fázisban az alloantigén-függő folyamatok dominálnak, azaz egy T_{H1} és/vagy T_{H2} típusú limfociták irányította immunválasz során károsodik a beültetett szerv endotéliuma, és parenchimája. Az ér endotél ellen termelődő antitestek, és T_C -limfociták következtében károsodik az endotél (transzplantációs arteriopátia). A humorális mechanizmusok jelenlétét C4d, és anti-HLA antitest kimutatása a graftból igazolja.

A folyamat végső fázisában valószínűleg az alloantigén-független tényezők dominálnak. Az endotél károsodáshoz hozzájárulhat vírusfertőzés (CMV), hiperlipidémia, magas vérnyomás. A korábbi sérülések következtében beindult és önmagát fenntartó károsodás-hegesedési (injury-repair) folyamat a beültetett szerv elégtelenségéhez vezet. Jelentős szerepet töltenek be különböző pro-fibrotikus növekedési faktorok (PDGF, TGF- β , CTGF).

A kilökődési reakciók kórélettanának összefoglalása

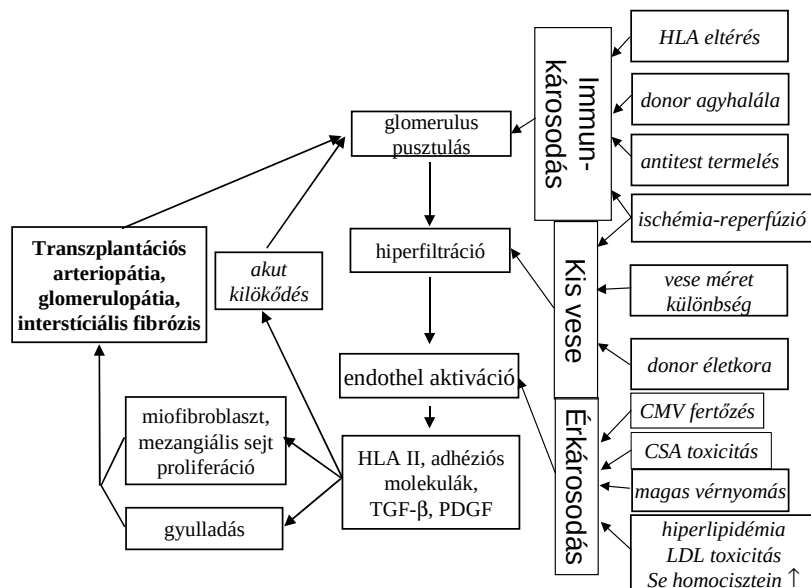
A kilökődési reakció különböző rizikó tényezői (5. ábra, *dőlt* betűvel) közvetve, vagy közvetlenül aktiválják az endotelt, ami adhéziós molekulákat expresszál, és leukociták infiltrálnak (perivaszkuláris gyulladás). Az aktivált leukociták és endotél sejtek citokineket és növekedési faktorokat termelnek, melyek miofibroblasztok és mezangiális sejtek serkentése révén transzplantációs arteriopátiát, glomerulopátiát és intersticiális fibrózist - a krónikus allograft nefropátia tipikus szövettani jellemzőit (5. ábra, *félkövér* betűvel) - indukálják.

Az idegen antigén elleni humorális vagy celluláris válaszreakció a kilökődés beindításában alapvető. Az alloantigén-független tényezők fokozzák az idegen antigéntől-függő mechanizmusok hevesességét. A gyulladásos és hiperfiltrációs tényezők aktiválják a graft endotéliumát. Ennek következtében egyrészt az idegen antigén prezentációja kifejezettebben érvényesül, másrészt adhéziós molekulák és szöveti mediátorok termelődnek, melyeknek akár az idegen antigénre specifikus akár az aspecifikus (alloantigéntől független) gyulladásos reakció fenntartásában fontos szerep jut. Az akut kilökődés korai, súlyos (vaszkuláris, vagy szteroid rezisztens forma) vagy halmozott előfordulása, a krónikus allograft nefropátia legfontosabb kiváltója különösen, ha gyógyítása nem tökéletes. Szubklinikai akut kilökődési reakciók krónikus kilökődésben

kulminálódhatnak. Végso soron minden, a graftot ért károsító hatás hozzájárul a graft működésének megszűnéséhez.

5. ábra

A kilöködés patomechanizmusának összefoglalása.



Rizikótényezők: *dőlt betű*, krónikus kilöködés szövettani jellegzetességei: **félkövér**.

Rövidítések magyarázatát ld. a fejezet elején

„A veseátültetés prognózisát befolyásoló tényezők kísérletes vizsgálata”

Az átültetett vese funkcionális beszűkülésének, és végül a működés megszűnésének komplex kórélettanát – melyet és számos tényező külön-külön vagy együttesen okoz - a bevezetőben ismertettem. Az értekezésben bemutatott kísérletek során a következő tényezőkkel foglalkoztunk:

I/ Anyagcsere tényezők szerepe krónikus allograft nefropátiában, különös tekintettel a szisztémás vérnyomás emelkedés (hypertónia) szerepére.

II/ A vese ischemia-reperfúziós károsodásának csökkentése prekondicionálás vagy génterápia alkalmazásával.

III/ Alloantigén függő kilökődési reakciók szerepe

IV/ A veseelégtelenséghez vezető vesebetegségek (end stage renal disease: ESRD) végső közös útja a vese hegesedése, fibrózisa, glomeruloszklerózissal, mely minden ma ismert terápiás beavatkozás ellenére a vese működésének megszűnéséhez vezet. Kísérleteink jelentős részében a vese fibrózis terápiás befolyásolásának lehetőségeit vizsgáltuk.

Alkalmazott módszerek

Retrospektív kórlap analízis

Humán vese allograftok hosszútávú prognózisát meghatározó tényezők azonosítása céljából retrospektív vizsgálatot végeztünk. A késői graft elégtelenséget előre jelző paraméterek vizsgálatára azokat a vesetranszplantált betegeket vizsgáltunk, akikben a graft potenciális túlélése 15 évnél hosszabb volt. Ezért az 1980 előtt transzplantált betegek adatait analizáltuk. 1972 és 1980 között 347, 18 évnél idősebb beteg kapott cadaver vesét az Esseni Egyetemi Klinikán. Azon betegeket, akiknek műtét előtti adatai hiányoztak, kivettük a vizsgált csoportból (n=35). A kezdettől nem működő vese graftok, a hiperakut vagy felgyorsult kilökődések valamint a sebészeti szövődmények kizárására csak azon betegek adatai szerepelnek a dolgozatban, akiknek új veséje egy hónapnál hosszabb ideig működött (n=184). A betegek és graftok együttes túlélése egy évvel a transzplantációt követően 49% volt, ami meghaladja az ezen időszakra jellemző átlagot (28).

Az összes beteget azathioprinnel (1-2 mg/ tskg, a fehérvérsejt szám <5000/μl) és prednizolonnal (500 mg/nap kezdeti dózist, fokozatosan 10 mg/nap dózissá csökkentve) kezelték. (A cyclosporin-A bevezetése után 4 beteget a kontrol és 1 beteget a tartós graft funkciójú csoportból azathioprin-ről cyclosporin-A kezelésre állítottak át.) A betegeket két csoportra osztottuk az analízishez: 1) azok a betegek, akikben a graft több, mint 15 évig működött (tartós graft funkció, n=32) és 2) azon betegek, akikben a graft a műtétet követő

1 hónaptól 10 évig terjedő időszakban tönkrement (kontrol, n=152). A kontrol csoportban a graftok átlagos túlélési ideje 2.6 ± 0.2 év volt (1 hónaptól 9.5 évig). A két csoport között a hideg és meleg ischémias idő, életkor és nem tekintetében nem volt különbség (4. táblázat). A kontrol csoportban a transzplantációt megelőző dialízis ideje valamivel rövidebb volt, és több volt a „panel reaktív antitest” -el rendelkező betegek száma is, de ezek a különbségek statisztikailag nem voltak szignifikánsak. A szervek konzerválása mindkét csoportban főként Eurocollins oldattal történt. Ismert, hogy az allograftok hosszú távú túlélését a HLA eltérések befolyásolják, és a legszorosabb összefüggést a HLA-DR antigének különbözősége esetén írták le (26,29,30). A dolgozatban szereplő betegek transzplantációja idején azonban a HLA meghatározás még kevésbé volt fejlett, és a HLA altípusok meghatározása sem történt meg minden esetben, ezért ezen faktornak a graft hosszú távú túlélésében játszott szerepét nem tudtuk vizsgálni.

A következő változók lehetséges szerepét vizsgáltuk a beültetett vese késői túlélése szempontjából: metabolikus paraméterek (szérum koleszterin, triglicerid és glukóz szintek, szisztémás vérnyomás és testtömeg index (body mass index - BMI)), transzplantáció ideje körüli változók (donor és recipiens életkora, nemi megoszlása, és a műtétet megelőző dialízis ideje), funkcionális (szérum kreatinin szintek, elsődleges graft funkció) és alloantigén függő faktorok (retranszplantáció, akut kilökődési epizódok).

3. Táblázat

	tartós graft funkció	kontrol csoport	p
életkor években (szélső értékek)	38 (20-51)	37 (16-59)	n.s.
Nem	16 nő 16 férfi	69 nő 83 férfi	n.s.
a transzplantációt megelőző dialízis időtartama (évek)	3.1 ± 0.2	2.9 ± 0.5	n.s.
Panel reaktív antitest (PRA)	20	26.1 ± 18.7	n.s.
Hideg ischemia (órák)	17.3 ± 1.4	15.6 ± 0.7	n.s.
meleg ischemia (min.) *	34.9 ± 2.6	35.8 ± 1.2	n.s.
Eurocollins perfúzió (%)	91	90	n.s.

A vizsgált betegek általános jellemzői: Az életkor, a nem, a transzplantációt megelőző dialízis időtartama, a PRA, a hideg és meleg ischemia ideje, és a perfúziós oldat tekintetében nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. (* 2. meleg ischemia, azaz a beültetés/éransztomózis varrás ideje, ns: nem szignifikáns)

A graft túlélését Kaplan-Meier módszerrel számoltuk, cenzúrázott adatként figyelembe véve azon betegek adatait, akik működő vesével haltak meg. Első lépésként a graft késői elvesztéséhez kapcsolódó rizikó faktorok megállapítására több változós analízist (ANOVA) végeztünk. Eredményeinket átlag $\pm$ átlag szórása (standard error of mean-SEM) formában közöljük. A kockázati tényezők azonosítása után, az egyes rizikótényezők független prognosztikus értékének meghatározására cox-analízist (31) végeztünk. Végül regressziós analízis segítségével ezen faktorok és a graft túlélése közti lehetséges korrelációt vizsgáltuk.

Állatkísérletek

Állatmodellek

Kísérleti állatok

Kísérleteink során a következő állattörzseket alkalmaztuk:

Krónikus allograft nefropátia modell: beltenyésztett hím Lewis (LEW) és Fisher (F-344) patkányok.

Lupus nephritis veseátültetés: Az autoimmun genetikai környezet vizsgálatára lupus prone MRL/MpJ-*Tnfrsf6*^{lpr} (korábban: MRL/MpJ-*Fas*^{lpr}); LPR egerek és vad típusú MRL/MpJ; (MRL) (forrás: Jackson Laboratory (/JAX/ Bar Harbor, ME, USA) egerek között végeztünk veseátültetést.

Krónikus vese fibrózis modell: Sprague Dawley (SD,CD1) patkányok: nefron-redukcióval indukált vesefibrózisra érzékeny törzs. A vesefibrózisra rezisztens patkánytörzs a Rowett „black hooded” törzs vizsgálatával kerestük a fibrózis iránti rezisztencia okát.

Vese ischemia-reperfúziós modell: A vese ischemia-reperfúziós kísérleteket egereken végeztük, mivel több patkánytörzs (Wu, SD, F344) esetében is kudarcot vallottunk az ischemia-reperfúziós károsodás standardizálásával. Kísérleteinket C57Bl6 (endotoxin kereszttolerancia kísérletek), és NMRI (Naval Medical Research Institute) kültenyésztett (outbred) egereken (RNS interferencia kísérletek) végeztük.

Az állatokat a Charles River-től (München, Németország, ill. Budapest, Magyarország) szereztük be, és standard körülmények között tartottuk. A beltenyésztett állatok törzsön belül genetikailag azonosnak tekinthetők, ami lehetővé teszi a törzsek közötti transzplantáció során az immunológiai eltérések reprodukálását.

Minden állatot standard körülmények (fény: 08.00- 20.00 óra, 40-70%-os relatív páratartalom, 20-21°C) között tartottunk, korlátlan (ad libitum) táp és ivóvíz felvétel mellett (Altromin standard diéta, Lage, Németország). Minden kísérleti beavatkozást az Egyetemi Állatvédelmi Szabályzat irányelveinek megfelelően végeztünk.

Kezelések:

Zsírban oldódó szereket (imunszuppresszív készítmények: CyclosporinA, Tacrolimus, Mycophenolate mofetil, Prednisolone) subcutan (sc) vagy intraperitoneális (ip) oltással adtuk alkohol+tween80 vagy oliva olaj oldószerben.

Az ivóvízben (po) oldott gyógyszer (Quinpril, Spironolactone) koncentrációját az elfogyasztott folyadék mennyisége alapján állítottuk be.

Az intravénás (iv) kezeléseket (RNS interferencia) valamelyik farok v. penis vénán keresztül vagy medián laparotómiát követően közvetlenül a vese vénába adva végeztük.

Az Endotoxin kezeléseket intraperitoneális oltással (ip) végeztük.

A perioperatív infekciók megelőzésére az állatok napi 20 mg/kg ceftriaxont (Rocephine®) kaptak a műtétet követő első 10 napon.

A műtéti beavatkozásokhoz intraperitoneális nembutál (5.3 mg/100g Nembutal + 0.02 mg/100g Atropin-sulphate), vagy ketamin+xylasin (Ketanest 100 mg/kg bw; Rompun 2 mg/kg bw) anesztéziát, az állatok ip., iv, kezeléséhez, ill. leöléséhez dietil-éter kábítást alkalmaztunk.

A kísérletek végén, az aortát kanüláltuk és vért vettünk laborvizsgálat céljából. Vérnyomás kontrollált retrográd perfúziót végeztünk, korábban már leírt módon [32], a maradék és kontroll veséket feldolgoztuk.

Fischer-to-Lewis krónikus allograft modell

Veseátültetés

A CAN egyik leggyakrabban alkalmazott állati modellje a Fischer (F344, RT1^{1u1}) patkányból, mint donorból származó vese transzplantációja Lewis (LEW, RT1¹) patkány recipiensbe (F344-to-LEW). Ezt a modellt 1968-ban vezette be White és Hildemann (33,34), majd a modellt később, 1992-ben, Tilney és munkatársai módosították (35). Az irodalomból ismert, hogy e CAN modell az iniciális alloimmun károsodásokon alapul (36). Azonban, körülbelül a 16. héttől, a CAN hasonló sebességgel tovább folytatódik még

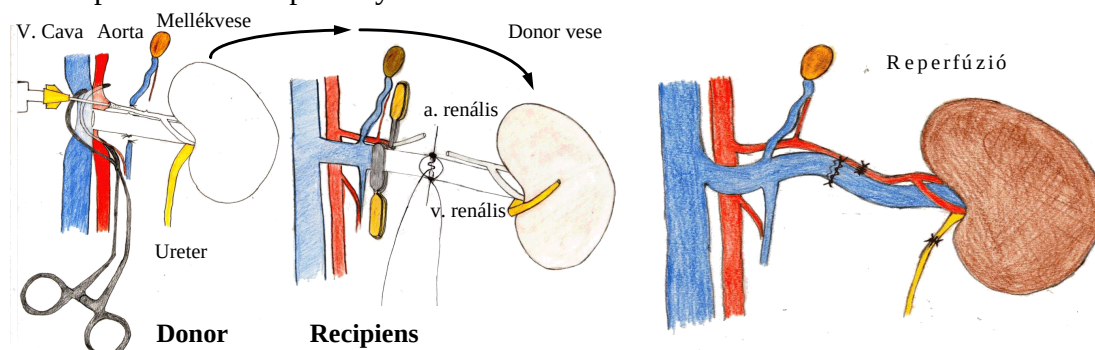
akkor is, ha a graftot közben visszatranszplantálták az eredeti donortörzsbe és emiatt az alloantigének a továbbiakban nem játszanak szerepet (37).

A donorok Fisher patkányok, a recipiensek Lewis patkányok voltak. Az veseátültetés korábban leírt módon történt (37). Röviden, a bal donor vesét 4 °C-os ringer laktáttal perfundáltuk, eltávolítottuk és ortotóp módon a recipiensbe helyeztük, melynek vese ereit előzőleg izoláltuk, leszorítottuk, és a saját bal vesét eltávolítottuk. Az artéria renalisokat, vénákat és az urétereket 10-0-s prolene varrattal vég a véghez anasztomizáltuk. A graft össz ischemiás ideje minden esetben 30 perc alatt volt. A jobb oldali saját vesét a 10. napon távolítottuk el.

A krónikus allograft nefropátia prognózisát, progresszióját befolyásoló tényezők állatkísérletes vizsgálatának legáltalánosabb modellje a F344-to-Lew krónikus allograft modell. Ezért modellünket megvizsgáltuk elektronmikroszkóppal, a humán krónikus allograft nefropátiara jellemző ultrastrukturális elváltozásokat keresve (ldd később: alloantigén függő tényezők szerepének vizsgálata).

6. ábra

Ortotóp veseátültetés patkányban



A bal donor vese izolálását követően azt 4 °C-os ringer laktáttal perfundáltuk. A recipiens saját veséjének eltávolítását követően az artéria és véna renalist, és a reperfúzió után az urétert vég-a-véghez anasztomizáltuk

Veseátültetés egéren (lupus modell)

Az MRL-LPR ortotóp veseátültetést korábban közölt módon végeztük (38). Röviden median laparotómia feltárásban, a bal vesét transzplantáltuk aorta és vena cava patch-el 10.0 prolene atraumatikus varrattal (Ethicon/Johnson and Johnson, Brussels, Belgium). Az uretert végét a recipiens hólyagjába behúзва rögzítettük.

Progressiv glomeruloszklerózis (subtotális nefrektómia modell)

A szubtotális nefrektómia modellt korábban leírtaknak megfelelően végeztük (152). Röviden, ketamin+xylazin anesztéziában az állatokat uninefektómizáltuk, azaz a jobb oldali vesét decapsuláció után medián laparotómiával eltávolítottuk. Egy héttel később a decapsulált bal vese 2/3-ad részét is eltávolítottuk a kortikális állomány meghatározott mennyiségének resectiójával, megkímélve a velőállomány és a hilus épségét, valamint a mellékvesét. Véralvadás elősegítéséhez Gelaspon®-t (Chauvin Ankerpharm GmbH, Rudolfstadt, Németország) használtunk. Az eltávolított vese szövet súlyát analitikai mérlegen mértük, ez átlagban a kompenzatórikusan hipertrófizált vesekéreg $81 \pm 2\%$ -a volt. A sham operált állatok veséjét csak decapsuláltuk.

A vese szinpatikus denervációja sebészi úton (dorzális rhizotómia)

A Campese és Kogosov által leírt dorzális rhizotómiát (150) az uninefektómiával egy ülésben hajtottuk végre. Röviden, dorzális bemetszésből a bal vese felett az izmok óvatos elhúzásával feltártuk a lumbális gerincoszlopot. A dorzális gyököket láthatóvá tettük, majd éles ollóval átvágtuk. A rhizotómiát a T10-L2 gyökökön végeztük, amelyek a legnagyobb sűrűségben tartalmazzák a veséből az agytörzsbe futó afferens rostokat. Az állatokat csak abban az esetben használtuk fel ebben a kísérletben, ha mind az 5 dorzális gyököt a gerinc mindkét oldalán azonosítani tudtuk. 5 állatot hagytunk ki a kísérletből inkomplett rhizotómia miatt.

Vese-Ischemia-reperfúzió

Medián laparotómiát követően, izoláltuk a bal vese artériát és vénát és atraumatikus érfogóval leztorítottuk. A túlélő kísérletekben az ischemiás vese patológiai és molekuláris analíziséhez 15 vagy 30 perc, a túlélési kísérletekben 45 perc ischemiát alkalmaztunk.

Állatkísérleti minták feldolgozása

Rutin kémiai eljárások

Minden 4. héten meghatároztuk 24 óra alatt ürített fehérje mennyiségét, gyűjtött vizeletből. A vizelet fehérje koncentrációját standard triklórecetsavas kicsapást követő fotometrálassal, a serum és vizelet kreatinin koncentrációját Jaffé módszerrel határoztuk meg. A kreatinin clearance-t a kísérlet végén számítottuk. A serum és vizelet kreatinine és urea koncentrációját Reflotron automata és tesztcsík segítségével kvantifikáltuk. Számos

kísérletben a vizelettel ürített összfehérje meghatározás helyett, a vizelettel ürített albumin mennyiségét határoztuk meg.

Funkcionális mérések

A kísérlet kezdetén és végén 24 órás vizeletgyűjtést végeztünk anyagcsereketreben (Tecniplast, Buguggiate, Olaszország). A kísérlet végén farok-vérnyomást mértünk minden állatnál farok-vérnyomásmérővel éber állapotban (IITC, USA ill. TSE GmbH., Bad Homburg, Németország) (39). Továbbá csoportonként 2 állatnál telemetriás módszerrel is megmértük a vérnyomást a Data Sciences International, St. Paul, MN, USA rendszerét használva. A rádió-adó egységet (TA11PA-C40) a hasi aortába ültettük be, lásd: (152). A rádió-vevő készüléket a ketrec alá helyeztük. Átlagos, szisztolés, diasztolés vérnyomás és a szívfrekvencia a mért csúcs szisztolés vérnyomásból származott. Az eredmények a 3 egymást követő nap kapott 150 perces mérés átlagából adódtak. A vizelet albumin kiválasztás meghatározásához módosított microplate albumin ELISA (40) módszert alkalmaztunk nyúl anti-patkány albumin peroxidáz konjugátummal.

Fény és elektronmikroszkópia

Szövettani vizsgálat céljából a 4%-os formalinban fixált vese mintákat paraffinba ágyztuk, majd hematoxilin/eosin és perjód-savas Schiff festés segítségével meghatároztuk a glomeruloszklerosis mértékét. A glomeruloszklerózist a glomeruláris kapillárisok kollapszusa, kitapadás a Bowman-tokhoz és hialin kicsapódása alapján definiáltuk. A metszeteket vizsgáló patológus előtt a csoportbeosztás ismeretlen volt. A szklerotikus glomerulusok arányát az épek százalékában fejeztük ki. Veséenként legalább 200 glomerulust vizsgáltunk.

Szövettani előkészítés

A morfometriai analízishez csoportonként 7 állatot 3%-os glutáraldehiddel retrográd úton perfundáltunk a hasi aortán keresztül (152). A maradék bal vesét (vagy sham állatokban az intakt bal vesét) morfológiai és sztereológiai mérésekhez fixáltuk. A veséket felszeleteltük az interpoláris tengelyre merőleges síkban 1mm széles szeletekre. A veséből 10 kis részt kiválasztottunk terület-súlyozásos módszerrel. A mintának Epon-Araldite-ba ágyztuk. Félvékony (1 μ m) és ultravékony (0.08 μ m) metszeteket készítettünk és egyenként metilén kék / bázikus fukszin vagy ólom citrát / uranyl acetát festékekkel festettük meg. A

megmaradt szövetszeleteket paraffinba ágyztuk; 4 µm-es szeleteket megfestettük hematoxin/eosin (HE) és perjód sav Schiff (PAS) festéssel.

Immunhisztokémiai analízishez megismételtük a kísérletet és 4°C-os NaCl-al perfundáltuk a veséket. A só oldattal perfundált vesék egyik felét 4%-os pufferolt formaldehidben immerziósan fixáltuk, paraffinba ágyztuk és 4µm vastag szeletekre vágtuk. A vese másik felét mRNS expresszió vizsgálatához folyékony nitrogénnel hűtött isopentánban hirtelen lefagyasztottuk.

A paraffin metszeteket elkészítettük és antitestekkel inkubáltuk, az avidin-biotin metodikát alkalmazva.

Vizsgált epitópok (alkalmazott antitestek):

- TGF-β1 (anti-TGF-β1 nyúl IgG poliklonális antitest, 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA),
- kollagén IV (anti- kollagén IV nyúl poliklonális antitest, 1:40, Biotrend Chemicalien GmbH, Cologne, Germany),
- endotheliális nitrogén monoxid szintáz (NOS-3 (eNOS), anti-eNOS nyúl poliklonális antitest, 1:400; ABR-Affinity BioReagents, Golden, CO, USA),
- neuronális nitrogén oxid szintáz (NOS-1 (nNOS), anti-nNOS nyúl poliklonális antitest, 1:50, BD Pharmingen, Heidelberg, Germany) és
- nitrotyrosine (birka poliklonális antitest, 1:400, Oxis Research, Portland, OR, USA).
- CD5+ patkány T-limfociták (OX19), (Serotec Camon Labor-Service GmbH-től (Németország)
- makrofágok (ED-1), (Serotec Camon Labor-Service GmbH-től (Németország)
- ICAM-1 (CD-54), (Serotec Camon Labor-Service GmbH-től (Németország)
- VCAM-1 (CD-106), (Serotec Camon Labor-Service GmbH-től (Németország)
- VLA-4α (CD49d) (Serotec Camon Labor-Service GmbH-től (Németország)
- LFA-1α (CD-11a) (Serotec Camon Labor-Service GmbH-től (Németország).

Morfometria

Vesekárosodás index (score):

A goleruloszklerózis indexet El Nahas és mtsai (41) pontozó rendszere (scores: 0-4) alapján becsültük meg PAS festett paraffin metszeteken. Fénymikroszkópot használtunk 400x-os nagyítással. A glomeruláris score minden állatnál 100 glomerulus értékének

számtani közepéből származott. A tubuláris, vasculáris és intersticiális károsodás értékeket hasonlóan, PAS festett metszeteket használva hasonló pontozási rendszer segítségével (score 0-4), 100x-os nagyítással becsültük meg.

Glomeruláris geometria:

A glomeruláris tuft terület sűrűségét (A_{AT}) és a glomerulusok térfogat sűrűségét (V_V) egy pontszámlálási metodikával mértük, miszerint a pont denzitás=terület denzitás=térfogat denzitás ($P_P=A_A=V_V$). Ehhez 100 pontos Zeiss okulárt (Integration-plate II; Zeiss Co., Oberkochen, Germany) használtunk 400x-os nagyítással PAS festett metszeteken. Továbbá megszámoltuk a területegységekre eső glomerulusok számát (N_A). A glomeruláris geometria analízisének részletes leírását lásd: (32). Röviden, a fenti adatokból a következő paramétereket képletek alapján számítottuk: a térfogategységre eső glomerulus számból ($N_V=(1/1.382) \times (N_A^{1.5} \times V_V^{0.5})$) (szöveti zsugorodás korrekciója: 45%) és a vese tömegből (K_W) származó teljes kéreg térfogatot, és a vese fajsúly (SW_K) segítségével a kéreg térfogat sűrűségét: $V_{Cortex} = K_W / SW_K \times V_{VCortex}$ ($V_{Cortex} = (1/1.382) \times (N_A^{1.5} \times V_V^{0.5})$). Ezekből a paraméterekből számítottuk a teljes glomerulus számot: ($N_{Glom} = N_V \times V_{Cortex}$). Végül a glomerulus tuft teljes területből és a kéreg területből ($A_T = A_{AT} \times A_{cortex}$) számolt átlagos glomerulus tuft térfogatot: $mV_{Glom} = (1/1.382) \times A_T^{1.5}$ képlet alapján számítottuk. A vesére számított teljes glomerulus számot (N_{Glom}) a sebészi nefron redukció és az átlagos glomerulus tuft térfogat (mV_{Glom}) alapján becsültük, amikre a glomerulus térfogat növekedése alapján következtettünk. A glomeruláris mezangiális mátrix térfogatot (V_{Matrix}) százalékban adtuk meg és a glomerulus kapilláris tuft frakcionális mezangiális mátrix térfogatából (mátrixra eső pontok / egész glomerulus tuftra eső pontok) számoltuk.

Glomerulus kapillárisok:

Állatonként 5 félvékony metszeten elemeztük a glomerulus sejt számot és térfogatot, pontszámlálásra alkalmas okulárral (lásd. fent), 1000x-es nagyítást (olaj immerzió) használva. Röviden, a glomerulus kapillárisok hosszúság denzitását (L_V : mm kapilláris /mm³ glomerulus tuft térfogat) meghatároztuk a standard sztereológiai formula segítségével ($L_V=2Q_A$: a kapilláris tuft kapilláris átmetszeteinek terület-egységre eső száma). Ez a paraméter adja a glomerulus térfogatra normalizált átlagos kapilláris hosszát – kizárva a hipertrofia hatását, így ez a paraméter alkalmas a glomerulus kapilláris obliteráció becslésére (42). Ezen kívül, az egész vese teljes kapilláris hosszát, azaz a teljes kapilláris hosszt (L_C) is meghatároztuk. A glomeruláris kapilláris tuft térfogatot (V_{Tuft}) az

egész glomerulus frakcionális kapilláris tuft térfogatából (tuftra eső pontok / egész glomerulusra eső pontok) számoltuk és százalékban adtuk meg.

Glomeruláris sejtek:

A glomeruláris sejtek (podocyta, mezangiális és endothel sejt) átlagos térfogatát, valamint számát glomerulusonként, állatonként 15 glomerulus alapján határoztuk meg. Az átlagos sejt szám/glomerulus (N_C) értéke a sejt denzitás per térfogat (N_{CV}) és a megfelelő sejtípus térfogat denzitása (V_{CV}) alapján a következő egyenlettel: $N_{CV} = k/\beta \times N_{CA}^{1.5} / V_{CV}^{0.5}$, ahol $k=1$ és $\beta = 1.5$ podocyta esetén és 1.4 mezangiális és endothel sejt esetén számoltuk ki. A megfelelő sejtek átlagos sejt térfogatát a következő egyenletből: $mV_C = V_{CV} \times V_{glom}$ (43) számoltuk.

Immunhisztológia

Immunhisztológiai vizsgálatra fagyasztott metszeteket (4 μ) acetonban fixáltuk és egyenként kezeltük alkalikus-foszfataz-anti-alkalikus-foszfataz (APAAP) technika szerint Mayer féle hemalaun (Merck, Darmstadt, Németország) festéssel adva meg a háttérrel. A pozitívan festődő sejteket az okulárba épített rácson keresztül számoltuk és a látóterenkénti sejtszámot feljegyeztük (sejt/lt). Állatonként és metszetenként legalább 20 látóteret számoltunk 400x-os 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.

TGF- β_1 , kollagén IV, NOS-1 (nNOS), NOS-3 (e-NOS) és nitrotirozin immunhisztokémiai reakcióképességét fénymikroszkóp 400x-os nagyításával vizsgáltuk. A pontozás (score-ok 0-4; 0: nem festődött, 1: gyenge, 2: közepes, 3: erős, 4: nagyon erős festődés) menetét és leírását lásd. máshol (41).

Molekuláris biológiai módszerek

Reverse transzkriptáz és real time-polymeráz láncreakció (PCR)

Reverz transzkriptáz 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 (44). 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 (44).

Röviden, patkány TGF- β_1 , IL-2, IL-2 receptor β (p70) (CD122) és glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) (Euro Gentec (Belgium)) mRNS szekvenciáival komplementer cDNS amplifikáció történt polimeráz láncreakció (PCR) segítségével. A törzsoldat pufferből, magnézium kloridból, dezoxinukleozid trifoszfátból és Taq DNS polimerázból állt (DIANOVA). Minden törzsoldathoz specifikus primert és cDNS mintát adtuk. 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 gén töredékeket UV-fényben tettük láthatóvá. A PDGF-AB, TGF- β_1 , IL-2 és IL-2 receptor cDNS mennyiségét ugyanazon mintából származó GAPDH-val (belső kontrol) való számítógépes denzitometriás összehasonlítás segítségével becsültük meg, a gél pozitív képének digitalizálását követően.

5. Real time PCR

Az egész vese teljes RNS tartalmát izoláltuk az SV Total RNA Isolation System (Promega, Mannheim, Németország) felhasználásával, a gyártó utasításait követve. Az RNS koncentrációt fotometriásan határoztuk meg. A reverz transzkripcióhoz cDNS szintézis Kit-et (AMV) (Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)), 1 μ g RNS-t és random primereket (végső koncentráció: 3.2 μ g) használtunk.

A real time PCR reakciókat Lightcycler-ben (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) LighCycler-Faststart DNA Master SYBR Green I Kit –el (Roche) végeztük. A mintákat kvantifikáltuk, és glycerilaldehyde-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) expresszióra normalizáltuk. A primer szekvenciák a következők voltak: TGF- β_1 forward 5CACCATCCATGACATGAACC-3, reverse 5-TCATGTTGGACAACTGCTCC-3; NOS-3 (eNOS) forward 5-TGACCCTCACCGATACAACA-3, reverse 5CTGGCCTTCTGCTCATTTTC-3. A PCR reakció specificitását olvadáspont görbe analízissel igazoltuk. Minden mintát gén specifikus görbét használva kvantifikáltunk és három különböző PCR futtatás átlagos értékét statisztikai módszerekkel értékeltünk ki.

Statisztikai analízis (45)

A csoportok adatait átlag $\pm$ átlag szórása (SEM) formájában adtuk meg. Kísérleteink során alkalmazott statisztikákat az eredmények bemutatásánál tüntetjük fel.

Az adatok közlésekor az átlag $\pm$ standard deviáció (SD) formát használtuk. A morfometriai analízishez az állatokat (n=7) véletlenszerűen választottuk ki. A normál eloszlás vizsgálata után a Kruskal Wallis tesztet vagy egy utas ANOVA-t használtuk a variancia analízishez,

különböző csoportok összehasonlításához pedig Duncan's multiple range teszt-et. Három kísérleti csoport esetén a csoportok közti különbség kiértékelése a Fisher féle legkisebb négyzetes távolságok próbával történt, a kezelt és kontrol csoport illetve a két kezelt csoport eredményeit a megfelelő T-próbával hasonlítottuk össze. A nem metrikus paramétereket, mint az adhézios molekulák festődési intenzitását Fisher féle egzact test segítségével határoztuk meg.

Ha a hiba valószínűsége (p) kisebb volt, mint 0,05, a null-hipotézist elvetettük.

„A veseátültetés prognózisát befolyásoló tényezők: saját kísérleti eredmények”

I/ Anyagcsere tényezők szerepe a krónikus allograft nefropátiában (⁵).

A krónikus allograft nefropátiára ható faktorok csak részlegesen ismertek. A graftokban megfigyelt szövettani sajátságok a fibrosis, az intima proliferáció és a vascularis occlusio (46). E jelenségek sokban hasonlítanak az arteriosclerosishoz (47). Mivel az olyan anyagcsere-paraméterek, mint a szérum lipid és glükóz szintjei, és a szisztémás vérnyomás fontos szerepet töltenek be az arteriosclerosis kifejlődésében, feltételeztük, hogy ezek szintén hatással lehetnek a hosszabb távú graft-túlélésre (48).

Retrospektív vizsgálatunk célja az volt, hogy analizáljuk az anyagcsere-faktorok és a vérnyomás predikciós értékét a graft hosszú távú túlélésére.

Eredmények

Anyagcsere-faktorok.

A transzplantáció előtt, és az utánkövetési időszak alatt mindvégig, a hosszabb graft-túlélést mutató betegekben a szérum összkoleszterin, triglicerid, és az éhgyomri vér glükóz szint szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontrollokban (4. Táblázat). A graft elégtelenségének kockázata is szignifikánsan megnőtt a magasabb szisztolés vérnyomás- és különösen a magasabb diasztolés vérnyomásértékeket mutató betegeknél: a teljes utánkövetési időszak alatt, a diasztolés vérnyomás szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoportban, mint abban a csoportban, ahol a graft hosszabb ideig működött. A szisztolés vérnyomás e magasabb diasztolés értékekkel párhuzamosan alakult.

Az akut rejekció, és késleltetett graftműködés adta lehetséges torzítás kiküszöbölése érdekében olyan primer graftműködésű betegeket analizáltunk, akiknek csak egy vagy 0 akut rejekciós epizódjuk volt. Ebben az alcsoportban, a transzplantáció előtti szérum koleszterin (179 ± 8 mg/dl vs. 221 ± 18 mg/dl; $P < 0.05$), és triglicerid is (131 ± 11 mg/dl vs. 244 ± 16 mg/dl; $P < 0.01$) szignifikánsan alacsonyabb volt a hosszabb graft-túlélésű csoportban ($n=13$), mint a kontrollokban ($n=50$). Bár a hosszabb graft-túlélésű csoportban a szisztémás vérnyomás ($150 \pm 12/87 \pm 5$ mmHg vs. $151 \pm 4/88 \pm 2$ mmHg) és az éhgyomri vércukorszint (78 ± 4 mg/dl vs. 79 ± 4 mg/dl) is alacsonyabb volt, ezek a különbségek nem voltak statisztikailag szignifikánsak.

⁵ **Hamar P**; Müller V; Kohnle M; Witzke O; Szabó A; Albrecht KH; Philipp Th; Heemann U: Metabolic factors have a major impact on kidney allograft survival. Transplantation **1997** 64: 1135-9

4. Táblázat

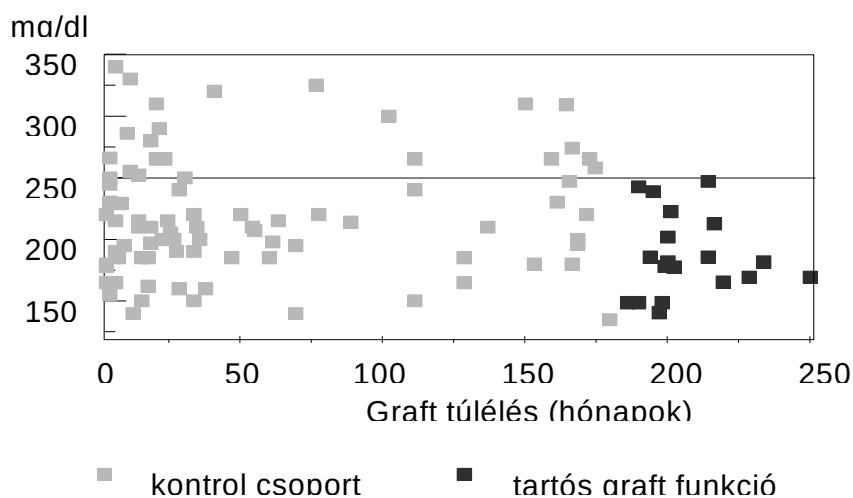
Metabolikus paraméterek a transzplantáció előtt és után

	transzplantáció előtt			5 évvel a transzplantáció után			10 évvel a transzplantáció után		
	tartós graft funkció (n=32)	kontrol csoport (n=167)	p	tartós graft funkció (n=32)	kontrol csoport (n=108)	p	tartós graft funkció (n=32)	kontrol csoport (n=96)	p
SeChol (mmol/l)	4,9±0,2	5,7±0,4	<0.01	5,9±0,2	6,8±0,2	<0.05	6,8±0,4	7,1±0,1	<0.05
SeTG (mmol/l)	1,6±0,24	2,3±0,43	<0.01	1,7±0,27	2,2±0,09	<0.05	2±0,2	2,4±0,06	<0.05
Glukóz (mmol/l)	4,1±0,2	4,7±0,2	<0.01	4,4±0,2	4,6±0,1	<0.05	4,5±0,1	4,7±0,1	<0.05
SysRR (Hgmm)	144±7	151±5	<0.05	135±3.6	140±1.9	<0.05	138±3.7	143±1.4	<0.05
DiaRR (Hgmm)	84±3	90±1	<0.01	78±1.2	86±2.1	<0.01	80±0.9	84±1.3	<0.05
SeKrea (mmol/l)	-	-	-	106±3,5	168±8,8	<0.01	115±6,2	292±18	<0.01
BMI (kg/m ²)	20.52 ±0.42	20.5±0.4	Ns	22.3±0.4	22.5±0.2	Ns	23.1±0.5	22.8±0.3	Ns

A koleszterin (SeChol), a triglicerid (Se TG), a vércukor, a szisztolés (Sys) és diasztolés (Dia) vérnyomás (RR), és a szérumban kreatinin szint (SeKrea) a követési idő során növekedett, és a kontrol csoportban szignifikánsan magasabb volt, mint a tartós graft funkció csoportban. A testtömeg index (BMI) tekintetében nem volt szignifikáns különbség a 2 csoport között.

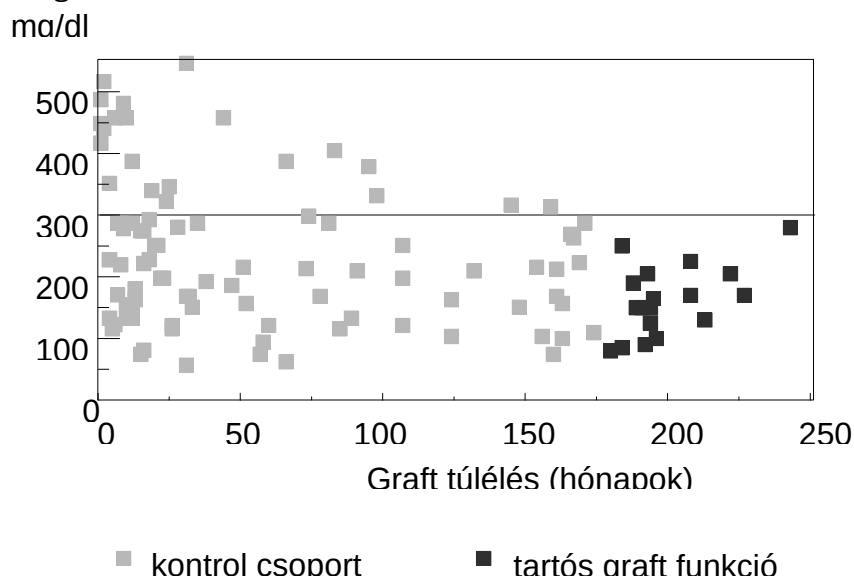
Ezen metabolikus paraméterek transzplantáció előtt végzett Cox regressziós analízise szerint a koleszterin- (P=0,045) és triglicerid-szintek (P=0,02) független prognosztikus meghatározói a transzplantátum késői elégtelenségének, míg a vércukorszintet és a szisztémás vérnyomást, a Cox modell mint a graft túlélési idejét szignifikánsan nem magyarázó változókat azonosította. Transzplantáció előtt mért 250 mg/dl-nél magasabb szérumban koleszterin és 300 mg/dl-nél magasabb szérumban triglicerid-szintek rövidebb graft-túléléssel társultak (7. ábra, 8. ábra). Az olyan betegekben, akiknél 250 mg/dl-nél magasabb szérumban koleszterin és 300 mg/dl-nél magasabb szérumban triglicerid-szinteket mértek, a graft túlélési ideje 4±1.5 év, míg azokban, akiknél a transzplantáció előtt a szérumban lipidszintek alacsonyabbak voltak, a túlélési idő elérte a 8±0.8 évet (P<0.01). Lineáris regressziós analízis demonstrálta, hogy a szérumban triglicerid-szintek (r=-0.34) még a koleszterinszinteknél (r=-0.32, P=0.0095) is jobban korreláltak a graft túléléssel (P=0.0036). Ezzel szemben, az éhgyomri vércukorszint és a szisztémás vérnyomás értékek nem korreláltak szignifikánsan a graft-túléléssel.

7. ábra
Szérum koleszterin.



Transzplantáció előtt a szérum koleszterinszintek szignifikánsan magasabbak voltak a kontroll csoportban. A koleszterinszintek korreláltak a graft-túléléssel, és a 250 mg/dl-nél magasabb szérum koleszterin rövidebb graft-túléléssel járt együtt. [pontosított négyzet], kontrollok, [kis fekete négyzetek], hosszabb graftműködés.

8. ábra
Szérum trigliceridek.



Transzplantáció előtt a szérum triglicerid-szintek szignifikánsan magasabbak voltak a kontroll csoportban. A triglicerid-szintek még a koleszterinszinteknél is jobban korreláltak a graft-túléléssel. A 300 mg/dl-nél magasabb szérum trigliceridszintek rövidebb graft-túléléssel jártak együtt. [pontosított négyzet], kontrollok, [kis fekete négyzetek], meghosszabbodott graftműködés.

Meglepetésünkre a transzplantáció előtti testtömeg index (body mass index: BMI)-ben nem találtunk különbséget a csoportok között. Az átlagos BMI a transzplantáció után megnőtt,

és hosszabb időtartamra vonatkoztatva, ez a növekedés kissé még fokozódott a hosszabb graftműködésű csoportban, de a különbség nem volt szignifikáns.

Peritranszplantációs változók.

A 10 évnél fiatalabb, vagy 45 évnél idősebb donor életkor rövidebb graft-túléléssel járt együtt, és ezen betegek túlélése, a 10 és 45 év közötti donorok esetében tapasztalt 7.2 ± 1.6 év ($P < 0.01$) helyett csak 3.5 ± 0.4 év volt. Bár a hosszabb graftműködésű beteghez képest a kontrollokban mutatkozott némi tendencia a donorok magasabb átlagos életkora irányában (26.7 ± 5.3 vs. 23.5 ± 4.5 év), de ez a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns.

A recipiensek átlagos életkorát, a nemek megoszlását, és a transzplantáció előtti dialízis időtartamát illetően nem találtunk különbséget az egyes csoportok között (4. Táblázat).

Az beültetési adatok értékelésével kimutattuk, hogy a két csoport között a hideg és meleg ischaemiás idő tekintetében csak kis különbség mutatkozott (4. Táblázat).

Funkcionális és alloantigén-függő paraméterek.

A primer graftműködés – ami azt jelenti, hogy a transzplantáció utáni első 7 napon kevesebb, mint két dialízisre volt szükség – jól korrelált az allograft-túléléssel: primer graftműködés volt megfigyelhető 32 hosszú graftműködéses beteg közül 19-nél (59,4%), míg a kontrol csoportban lévő 152 beteg közül 53-nál (34,9%) ($P < 0,01$).

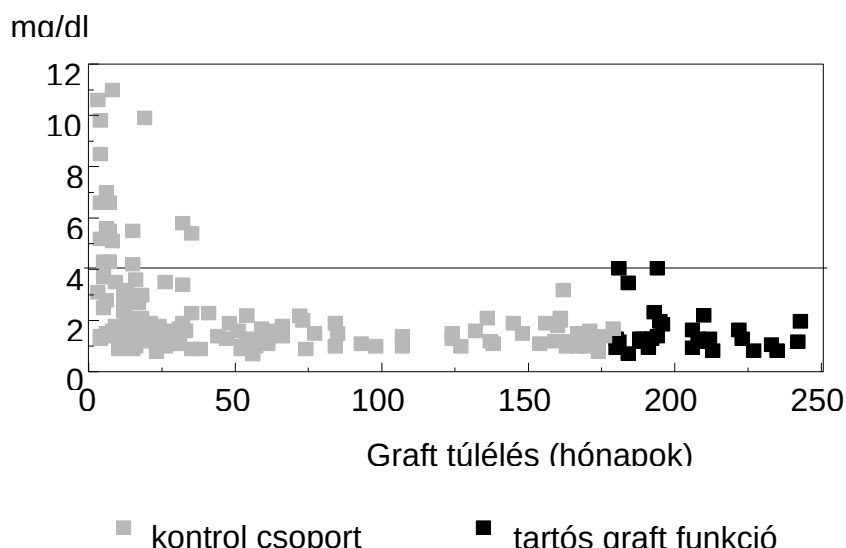
A graft károsodásának kockázata magasabb volt az akut rejekciós betegek körében: a hosszabb graftműködésű csoportban a betegek összesen 40,6%-a volt olyan, aki legalább egy akut rejekciós epizódon átesett, míg a kontroll csoportban ez az arány 67,7% volt ($P < 0,01$). A 32 hosszabb graftműködésű beteg közül 9 (28,1%) betegnek egy, 4-nek (12,5%) kettő, viszont egy betegnek sem volt három akut rejekciós epizódja. A kontrol csoportban a 152 beteg közül 60-nak (39,5%) volt egy, 31-nek (20,4%) kettő és 12 betegnek (7,8%) pedig három akut rejekciós epizódja.

Általában, azoknál a betegeknél, akik első transzplantátumukat kapták, szignifikánsan hosszabb ($6,5 \pm 0,5$ év) volt a graft túlélése, szemben azokkal, akik már a második vagy harmadig graftot kapták ($4,5 \pm 1,5$ év; $P < 0,01$).

A teljes utánkövetési időszak alatt, a kreatininszint szignifikánsan alacsonyabb volt a hosszabb graftműködésű csoportban, mint a kontrollokban. A Cox analízissel kapott eredmények szerint a transzplantáció után 1 hónappal mért szérum kreatininszintek a transzplantátum késői elégtelenségének legszignifikánsabb ($P = 0,001$) előrejelzői. A transzplantáció után 1 hónappal mért 4 mg/dl-nél magasabb szérum kreatinin rövidebb

graft-túléléssel társult. Ha 1 hónappal az átültetés után a szérumban a kreatinin 4 mg/dl-nél alacsonyabb volt, akkor az átlagos graft-túlélés $6,7 \pm 0,5$ év volt, míg a 4 mg/dl értéket meghaladó esetekben $4,1 \pm 1$ évnek bizonyult ($P < 0,01$) (9. ábra). Regressziós analízissel kimutattuk, hogy a szérumban a kreatinin szintek szignifikánsan korreláltak ($r = -0,36$) a graft túlélésével ($P < 0,0001$).

9. ábra
Szérumban a kreatinin.



A szérumban a kreatinin transzplantáció után 1 hónappal mért szintjei szignifikánsan magasabbak voltak a kontroll csoportban. A graft-túlélés vonatkozásában a legerősebb korrelációt a szérumban a kreatinin esetében találtuk. A 4 mg/dl-nél magasabb kreatininszintek esetében a transzplantátum elégtelenségének esélye megnőtt. [pontosított négyzet], kontrollok, [kis fekete négyzetek], hosszú graftműködés.

Megbeszélés

Vesetranszplantációt követő krónikus allograft nefropátia folyamatában az anyagcsere-faktorokra, mint például hyperlipidaemia, diabetes mellitus és magas vérnyomás, csak a 90-es években fordult figyelem (46).

Bizonyos kutatók a vesetranszplantáción átesett betegek körében összefüggést találtak a hyperinsulinaemia, az inzulin hatása elleni rezisztencia, elhízottság, magas arteriális vérnyomás, és különösen a magas szérumban a lipidértékek és a transzplantátum hosszú távú elégtelensége között (48). A mi adataink szerint, a szérumban a lipidek transzplantáció előtti és utáni szintjei korrelálnak a transzplantátum hosszú távú túlélésével. A szérumban a koleszterin 250 mg/dl-nél és a szérumban a trigliceridek 300 mg/dl-nél magasabb szintjei rövidebb allograft-túléléssel társultak. Ez az összefüggés a koleszterinhez ($r = -0,32$) képest a trigliceridek esetében erősebb volt ($r = -0,34$), de az előbbi is szignifikáns volt. A meghosszabbodott graftműködésű csoportban, a transzplantáció előtt mért alacsonyabb glükózszint arra utal, hogy a glükóznak valamilyen szerepe van a folyamatban. Ez a

korreláció azonban statisztikailag nem volt szignifikáns a Cox regressziós analízisben. A glükóz feltehetően nem független előrejelző, hanem inkább az egyébként megváltozott anyagcsere-paraméterek következménye. Adataink alátámasztják azt az elképzelést, hogy az arteriosclerosisos folyamatok fontos szerepet töltenek be a késői transzplantátum-elégtelenség kifejlődésében (46).

Számos kutató (25,49) kiemeli a szisztémás vérnyomás fontosságát a graft túlélésére. Analízisünkben, a transzplantáció előtti és utáni alacsony szisztolés, és különösen, az alacsony diasztolés vérnyomás meghosszabbodott graft-működéssel társult. A szisztémás magas vérnyomás kórtani szerepének egy lehetséges magyarázata, hogy a vese ereiben az arteriosclerosis folyamata felgyorsult, és az ellátott glomerulusok hipoxiás károsodása, valamint a sclerotikus erek csökkent autoregulációja miatt fokozott intraglomeruláris nyomás vezet az érintett glomerulusok korai sclerosisához (50,51).

Peritranszplantációs változók. 1975 előtt, a hideg ischaemiás idő kifejezett prognosztikai hatásáról számoltak be (52). 1975 után azonban, a hideg ischaemia hatása eltűnt. Az 1975 előtti vese-prezerváló eljárások alacsony hatéfsoka lehet e változás magyarázata (52). A konzerváló oldatok, a hideg ischaemiás idő és a graft túlélése közötti kapcsolatra először a konzerváló oldatok bevezetése után mutattak rá. Analízisünkben csak néhány olyan beteg vett részt, aki 1975 előtt kapott transzplantátumot így a szerv-konzerváció során alkalmazott oldat a betegek legnagyobb részénél Euro-Collins oldat volt (4. Táblázat). Ezért, az esetszámok nem voltak elégségesek ahhoz, hogy a szerv-prezervációs eljárások között differenciálni lehessen.

A transzplantáció előtti dialízis hossza hasonló volt mindkét csoportban, ami jelzi, hogy e faktor nincs hatással a graft kimenetelére. E feltételezést támasztja alá Opelz közleménye (30), aki szerint a dialízis típusának és hosszának nincs hatása a graft túlélésére.

Felvetődött annak lehetősége, hogy a donor magasabb életkora (53) negatív hatással van a graft túlélésére, viszont a recipiensé nem (54). A mi betegeinknél, a két csoport közötti különbség nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet. A donorok kora valamelyest alacsonyabb volt a hosszabb graft-működésű csoportban, és a 10 évnél fiatalabb, vagy 45 évnél idősebb donorokból származó graftok túlélése rövidebb volt. Cecka leírta, hogy gyermekgyógyászati, illetve 55 évnél idősebb donorokból származó vesék esetében a vesetranszplantátumok fél-életideje rövidebb volt (55). Brenner és munkatársai (56) is magasabb graft-vesztést írtak le olyan esetekben, amikor a donorok nagyon fiatalok vagy nagyon idősök voltak. E megfigyelést a szerző azzal magyarázta, hogy e vesék működési kapacitása alacsonyabb.

Működési paraméterek és alloantigén-függő változók. Eredményeink szerint, szoros korreláció van a megemelkedett szérumszintű kreatininszintek és a csökkent graft-túlélés között, és

a kezdeti szérumszint (>4 mg/dl) az előrejelzés szempontjából igen értékes adat. Ezt a megfigyelést különféle más kutatók eredményei is alátámasztják. A graft késői elvesztését tanulmányozó csaknem minden kutató szoros összefüggést talált a kezdeti szérumszintek és a hosszú idejű graft-túlélés között. Kahan és munkatársai (12) leírták, hogy a transzplantáció után 1 hónappal mért szérumszintű kreatinin a hosszú távú graft-kimenetel jó prognosztikai indexe. Ebben a vonatkozásban a kreatinin az általános vesekárosodás indikátoraként alkalmazható. A kiváltó októl függetlenül - akut rejekeció, sebészeti trauma, vagy fertőzés - bekövetkezett vesekárosodás esetén a kreatinin szint megemelkedik (57). Így, ezen megfigyelés az állatkísérletekben már kimutatott hiperfiltrációs elméletet támasztja alá.

Általánosan elfogadott, hogy a korábbi graftot már kilökött betegeknél nagyobb az immunológiai kockázata annak, hogy a következő graft is rejekeció áldozata lesz. Így, nem volt meglepő, hogy az első transzplantátumoknak sokkal jobb a túlélési aránya, mint a második transzplantátumoké, és analízisünkben a harmadik transzplantátumnak volt a legrosszabb túlélési aránya.

A primer graft-működés hatása a graft kimenetelére nem teljesen tisztázott. Azonban, számos szerző (58) negatív hatásúnak tartja a hosszú idejű graft-túlélésre a graftfunkció késői megindulását. Megfigyeléseink alátámasztják e megfigyeléseket, azaz a késleltetett graft-működés kontrolljainkban szignifikánsan gyakrabban fordult elő.

Az akut rejekeciós epizódok száma a csökkent graft-túlélés szignifikáns, független kockázati tényezője (59). A jelen vizsgálatban, a kontroll csoportban lévő betegek 67.7%-ának volt legalább egy akut rejekeciós epizódja, míg a hosszabb graft-működésű csoportban ez az arány 40.6% volt.

Következtetésül, eltekintve az antigéntől függő kockázati tényezőktől, az anyagcsere-faktorok, mint például magas szérumszintű lipidszintek, illetve magas vérnyomás, fontos meghatározói a vesetranszplantációt követő graftvesztésnek. Transzplantáció utáni 4 mg/dl-nél magasabb szérumszintű kreatinin, 300 mg/dl-nél magasabb triglicerid és a transzplantáció előtti 250 mg/dl-nél magasabb koleszterin fontos szerepet töltenek be a korai graft-elégtelenség előrejelzésében.

II/ A vese ischemia-reperfúziós károsodásának gátlása

Az ischemia és a reperfúzió szöveti károsodást eredményez számos szervben, többek között a szívben (60), az agyban (61), a vesében (62) és a gasztrointesztinális traktusban (63), jelentős mértékben hozzájárulva a betegek morbiditásához és mortalitásához. Az akut vesekárosodás kezelése költséges, és kórházi ápolást igényel. Az ischemiás akut vesekárosodás még jelenleg is körülbelül 50%-os mortalitási aránnyal társul (64). Az akut ischemiás vesekárosodáshoz vezető kórélettani mechanizmusok nem teljesen ismertek. Nem áll rendelkezésre olyan, klinikailag hatásos terápia, amely teljes mértékben meggátolja az ischemiás károsodást (65). Ráadásul az úgynevezett „ischemia/reperfúziós károsodás” hozzájárul a vesekárosodáshoz transzplantáció (66), a revaszkularizációs folyamatok és a hipoperfúziós időszakok (67) során.

A vese véráramának súlyos mértékű csökkenése sejtkárosodáshoz vezet a nagyenergiájú foszfátok kiürülése és a sejtmembránon keresztüli fiziológiai iongradiens ezt követő elégtelensége miatt. A károsodás súlyossága az ischemia időtartamától és a kollaterális perfúzió hozzáférhetőségétől függ, azonban paradox módon a véráramlás helyreállása maga is további szöveti károsodással jár. Az oxigendús vérrel történő reperfúzió szabadgyökök keletkezésével, és így lipid-peroxidációval, poliszacharid-depolimerizációval és dezoxiribo-nukleotid degradációval jár. A sérült endothelsejtek nem képesek az érfal simaizom ellazítására, potens vazokonstriktorok szabadulnak fel és az endothelsejtek megduzzadnak; a kapilláris permeabilitása nő, és végül leukociták és vérlemezkék tapadnak ki, és akkumulálódnak a mikrocirkulációban és a szövetben. Ez végső soron a perfúzió progresszív kieséséhez és további szöveti károsodáshoz vezet (66,67).

A/ prekondicionálás ^(6,7)

Lipopoliszacharidok alacsony dózisainak rágcsgálóknak történő beadása megvédi az állatokat az ezt követően beadott, rendszerint letális dózisú endotoxinok vagy LPS hatásától.

A szepszis, és az endotoxémia az ischemia-reperfúziós károsodáshoz hasonlóan destruktív folyamatok (68). Endotoxinnal végzett prekondicionálás adaptációhoz, toleranciához vezet,

⁶ Heemann U; Szabó A; **Hamar P**; Müller V; Witzke O; Viklicky O; Philipp Th: LPS pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury: possibly connected to an IL-6 dependent pathway. *Am J Pathol* **2000** 156: 287-93

⁷ Losonczy G. Kriston T. Szabo A. Muller V. Harvey J. **Hamar P**. Heemann U. Baylis C. Male gender predisposes to development of endotoxic shock in the rat. *Cardiovasc Res* **2000** 47: 183-91.

amelyre a homológ vagy heterológ endotoxin nagy dózisára adott, csökkent mértékű szisztémás válaszreakció jellemző (68). Endotoxint sikerrel alkalmaztak ismételt, azonos jellegű inzultus elleni rezisztencia kiváltására, de az endotoxin képes kereszttoleranciát is kiváltani károsodások más formáival szemben is. Leírtak ischemia/reperfúziós károsodás elleni endotoxinfüggő védelmet miokardiumban (69) és májban (70).

Kutatásaink során a vese ischemia/reperfúziós károsodással szembeni, endotoxin indukálta kereszttolerancia új modelljét állítottuk fel. Az alapfolyamatok feltárása céljából egy másik kísérletsorozatban vizsgáltuk a sejtinfiltrációt és citokintermelést.

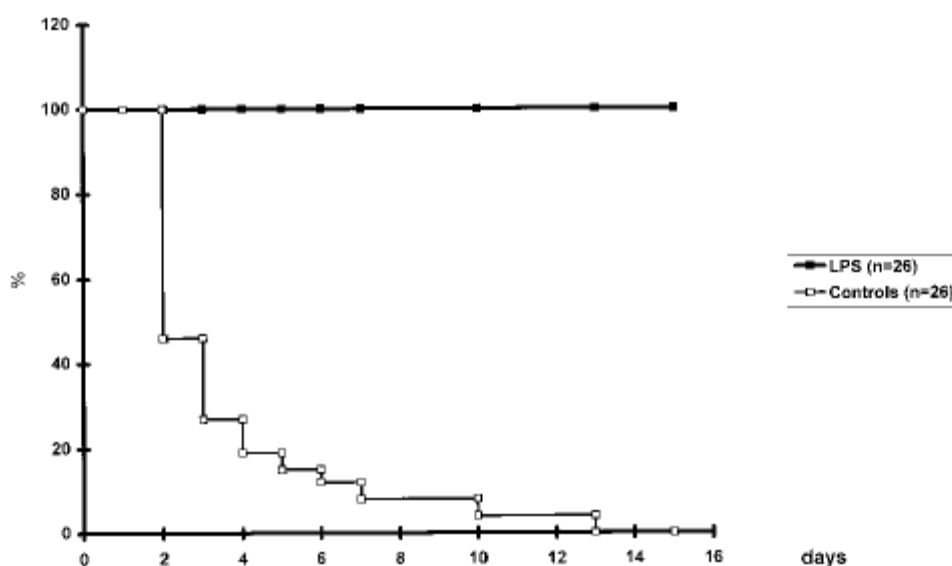
Eredmények

Túlélés különböző időtartamú ischemiás periódusok után

30 perces vese ischemia után minden állat ($n = 26$) életben maradt a követési időszak végéig (15 nap). Negyvenöt perces vese ischemia után ($n = 21$) 20 állat (74%) elpusztult 48 ± 18 órán belül. Egy állat életben maradt 13 napig (10. ábra).

10. ábra

LPS-előkezelés hatása a 45 perces, letális vese iszkémiát követő túlélésre.



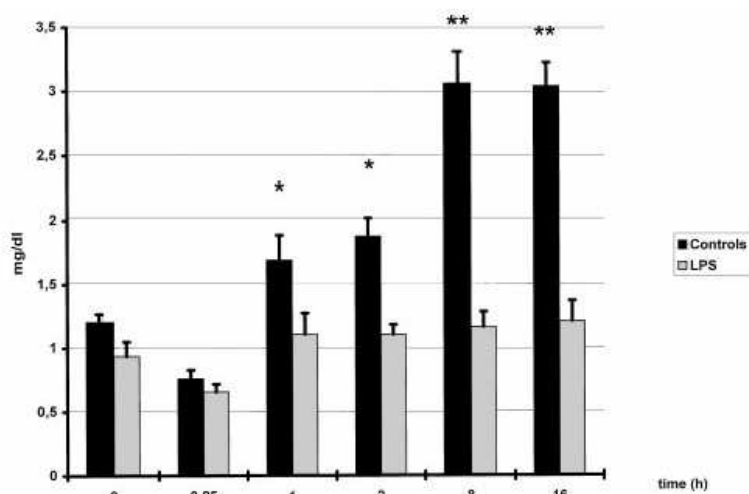
LPS-előkezelést követően az LPS beadási protokolltól függetlenül minden állat ($n = 35$) életben maradt több mint 50 napig. Ezért a következő kísérletekben az ischemia időtartamát 45 percre változtattuk.

Míg a hatóanyag-hordozóval kezelt állatok testtömege állandó maradt a megfigyelési időszak alatt, az LPS-kezelt egereknél a tömeg csökkent az első beadás után körülbelül 10%-kal, majd ezután visszaállt az eredeti értékre.

A szérumkreatinin szint hasonló volt a reperfúzió előtt és 15 perccel utána mindkét csoportnál (kontrollok: $1.2 \pm 0,06$ és $0,76 \pm 0,07$ versus LPS: $0,94 \pm 0,11$ és $0,65 \pm 0,06$ mg/ml). Ischemia után egy órával a kreatinin szint mindkét csoportban növekedett (kontrollok: $1,69 \pm 0,19$ versus LPS: $1,11 \pm 0,17$ mg/ml). Ez a növekedés azonban még kifejezettebb volt a kontrolloknál. Ezt követően a kreatinin szint állandó maradt az LPS-csoportnál ($1,21 \pm 0,16$ mg/ml), míg a kontrolloknál növekedett ($3,03 \pm 0,18$ mg/ml). Az ischemia után egy órával a csoportok közötti különbségek statisztikailag szignifikáns értéket értek el (11. ábra).

11. ábra

Az LPS-előkezelés hatása a szérumkreatinin-szintre



ischemia előtt („0”) és a reperfúzió után 15 perccel, valamint 1, 2, 8 és 16 órával (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Hisztológia és immunhisztokémia

Közvetlenül az ischemia előtt kis mértékű tubuláris károsodást figyeltünk meg az LPS-csoportnál, míg a kontrollcsoportból származó veséken nem volt látható morfológiai elváltozás. 15 perccel a reperfúzió után a tubuláris károsodás mértéke hasonló volt az LPS-sel és hordozóval kezelt állatoknál. A károsodás azonban az LPS-előkezelteknél csak enyhén súlyosbodott a reperfúzió után 2 órán át, és 8 óra elteltével már a vesék normális megjelenése volt újra látható. A leukocita-infiltráció mértéke alacsony volt ezekben az állatokban. A hordozóval kezelt állatok veséinek állapota drámai módon romlott az idő előrehaladtával, erős leukocita-infiltrációval kísérve. Az infiltrátum túlnyomóan neutrofilekből állt. A reperfúzió után 8 órával az ilyen állatokból származó veséknek közel a fele elpusztult (5. Táblázat, 12. ábra). Ezen túlmenően, a kontroll állatok veséiben kiterjedtebb volt az apoptózis mértéke, mint az LPS-előkezelteknél. A TUNEL-festés szerint, $1,80 \pm 0,64$ sejt/látómező festődött pozitívan az LPS-sel előkezelteknél.

állatoknál, szemben a kontrolloknál megfigyelt $0,53 \pm 0,17$ sejttel, 16 órával az ischemia után ($P < 0,01$).

5. Táblázat

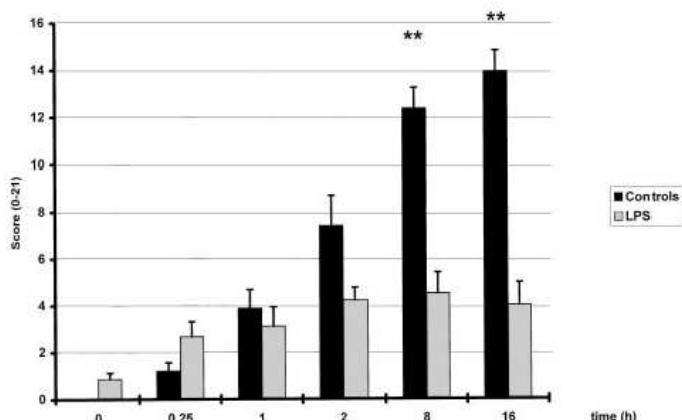
A vesekárosodás kvantitatív meghatározása az ischemia/reperfúziós károsodás előtt és után

Idő (h)	Csoportok	Kritériumok							
		Leukocita infiltráció	Nukleusz atípiá	Vakuolizáció a tubuláris sejtekben	Hialinizáció a tubuláris sejtekben	A tubuláris sejtek feloldódása	A tubuláris sejtek leválása	A tubuláris sejtek hiánya	Hialin a tubulusokban
0	Kontroll LPS	$0,0 \pm 0,0$ $0,0 \pm 0,0$	$0,00 \pm 0,00$ $0,58 \pm 0,20$	$0,00 \pm 0,00$ $0,14 \pm 0,14$	$0,00 \pm 0,00$ $0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$ $0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$ $0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$ $0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$ $0,14 \pm 0,14$
0,25	Kontroll LPS	$0,5 \pm 0,15$ $0,3 \pm 0,15$	$0,40 \pm 0,16$ $0,88 \pm 0,22$	$0,10 \pm 0,01$ $0,50 \pm 0,19$	$0,00 \pm 0,00$ $0,25 \pm 0,16$	$0,00 \pm 0,00$ $0,00 \pm 0,00$	$0,60 \pm 0,16$ $0,88 \pm 0,12$	$0,10 \pm 0,01$ $0,13 \pm 0,14$	$0,00 \pm 0,00$ $0,38 \pm 0,18$
1	Kontroll LPS	$1,1 \pm 0,26^{**}$ $0,6 \pm 0,15$	$1,13 \pm 0,10$ $1,00 \pm 0,24$	$0,50 \pm 0,19$ $0,66 \pm 0,24$	$0,50 \pm 0,19$ $0,44 \pm 0,17$	$0,13 \pm 0,12$ $0,33 \pm 0,24$	$1,13 \pm 0,12$ $0,77 \pm 0,22$	$1,00 \pm 0,18$ $0,33 \pm 0,24$	$0,13 \pm 0,12$ $0,22 \pm 0,22$
2	Kontroll LPS	$0,8 \pm 0,14^{**}$ $0,2 \pm 0,15$	$1,6 \pm 0,24$ $1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,32$ $0,75 \pm 0,25$	$0,80 \pm 0,20$ $0,50 \pm 0,29$	$0,80 \pm 0,20$ $0,00 \pm 0,00$	$1,60 \pm 0,24$ $1,00 \pm 0,00$	$0,80 \pm 0,20$ $0,50 \pm 0,29$	$0,80 \pm 0,20$ $0,75 \pm 0,25$
8	Kontroll LPS	$1,4 \pm 0,2^{**}$ $0,3 \pm 0,15$	$2,22 \pm 0,15^{**}$ $0,67 \pm 0,16$	$1,67 \pm 0,17^{**}$ $0,44 \pm 0,17$	$1,22 \pm 0,15^{**}$ $0,78 \pm 0,13$	$1,78 \pm 0,15^{**}$ $0,22 \pm 0,13$	$2,11 \pm 0,20^{**}$ $0,89 \pm 0,20$	$1,67 \pm 0,17^{**}$ $0,44 \pm 0,17$	$1,67 \pm 0,24^{*}$ $0,78 \pm 0,22$
16	Kontroll LPS	$1,2 \pm 0,2^{**}$ $0,3 \pm 0,15$	$2,44 \pm 0,17^{**}$ $1,00 \pm 0,17$	$2,00 \pm 0,16^{**}$ $0,78 \pm 0,22$	$1,33 \pm 0,16^{**}$ $0,22 \pm 0,13$	$1,78 \pm 0,15^{**}$ $0,22 \pm 0,13$	$2,44 \pm 0,17^{**}$ $0,89 \pm 0,11$	$1,78 \pm 0,15^{**}$ $0,22 \pm 0,13$	$2,11 \pm 0,26^{**}$ $0,56 \pm 0,24$

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

12. ábra

Az LPS-előkezelés hatása a vesekárosodásra



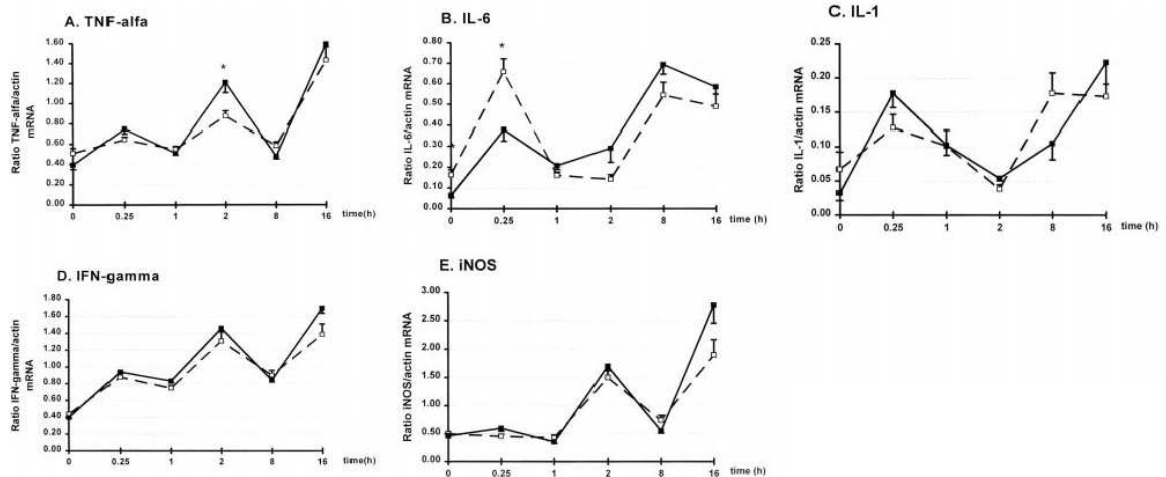
az ischemia előtt („0”) és 15 perccel, valamint 1, 2, 8 és 16 órával a letális vese ischemia után (** $P < 0,01$).

RT-PCR

2 óra elteltével a TNF- α mRNS-szintje szignifikánsan magasabb volt az LPS-előkezelte csoportban a kontrollokhoz viszonyítva. Ráadásul, az LPS-kezelte állatoknál, a makrofág-asszociált IL-6 mRNS-szintje háromszor alacsonyabb volt ischemia előtt, mint a kontrollok esetében, és szignifikánsan alacsonyabb maradt 15 perccel a reperfúzió után. A későbbi időpontokban a TNF- α és IL-6 szintek magasabbra emelkedtek, mint a kontrollok állatokban. Ugyankor, az IL-1 termelése fokozódott mindkét csoportban 15 percnél, alacsony volt 2 óráig, és erősödött 8 és 16 óránál. Az IFN- γ , az IL-1 és az iNOS mRNS-mintázatai nem különböztek a két csoportban (13. ábra).

13. ábra

LPS-előkezelés hatása a citokin génexpresszióra a károsodott vesében.



A: TNF- α , B: IL-6, C: IL-1, D: IFN- γ , E: iNOS, ■ LPS-csoport, □ kontroll; * $P < 0,05$.

Megbeszélés

Az ismételt stressz hatására bekövetkező szöveti adaptáció régóta ismert. Azt a megfigyelést azonban, hogy sejtek akut módon adaptálódhatnak inzultushoz, és ezután visszatérhetnek a nyugvó, vagy *steady-state* fenotípushoz, csak az utóbbi időben tisztázták. Az akut adaptáció egyik első leírását *HeLa*-sejteken közölték (71), ahol szubletális hipertermikus stressz toleranciát idézett elő az ismételt hipertermikus inzultus iránti. A sejtek termális inzultussal szembeni kondicionálása nem csak konzerválódhat sok sejttypuson át, hanem kereszt-toleranciát is indukálhat más káros behatásokkal szemben is. Kísérleteink során elsőként mutattuk ki, hogy ismételt LPS-előkezelés megvédi az egereket az egyébként letális ischemia/reperfúziós károsodástól. Brown és munkatársai (72), valamint Colletti és munkatársai (70) korábban leírták, hogy endotoxinok védelmet nyújtanak a miokardiális és máj ischemia/reperfúziótól. Nem vizsgálták azonban a citotoxikus mintázatot, és ischemia/reperfúzió ehhez hasonló modelljét sem tanulmányozták.

Az elvégzett kísérletek ellenére, az endotoxinnal összefüggő, ischemia/reperfúziós károsodással szemben mutatott kereszt-tolerancia alapmechanizmusa és a tolerancia celluláris mediátorai nem tisztázottak. Ismert tény, hogy a polimorfonukleáris sejtek szerepet játszanak ebben a folyamatban. Az *in vitro* és *in vivo* kísérletek eredményei alátámasztják azt a következtetést, hogy a makrofág-asszociált citokinek, mint például a TNF- α , az IL-1, az IL-6 és az IFN- γ , fő szerepet játszhatnak a folyamatban (73). Az endotoxin-tolerancia kifejlődésében a legtöbbet vizsgált citokin a TNF- α . LPS-előkezelt állatokban vese ischemia után a TNF- α -mRNS-expresszió emelkedett szintjét mutattuk ki.

A megnövekedett TNF- α -mRNS-szintje ellenére a vesekárosodás mértéke csökkent. Ezek az eredmények a TNF- α szerepére utalnak, és különösen utalnak a hiányzó TNF- α -válaszreakcióra. Ismert tény, hogy a TNF- α szinte azonnal megjelenik az egerek LPS-injektálását követően. Az LPS ismételt injektálása azonban a válaszreakció elmaradását okozta, és a TNF- α -termelés napokon át nem detektálható (66). Kísérleteinkkel ellentétben, ezek az eredmények a TNF- α közvetlen szerepét jelzik, mivel a TNF- α -szint az LPS-válasz hiányával függ össze.

Egy másik kísérletben azonban a TNF- α -szint szintén növekedett az endotoxin-előkezelés és máj ischemia/reperfúziós károsodás után, és ez a növekedés is összefüggött a tüdőszérüléssel szembeni védelemmel, máj reperfúzió után (70).

Az LPS-sel kezelt és ezt követően ischemiának kitett állatokban a TNF- α -termelés növekedésének mechanizmusát nehéz megmagyarázni. A nem letális LPS-kezeléssel indukált védőhatás magyarázatára a legvalószínűbb hipotézis a TNF- α tranzienst indukciója. A TNF- α szintjének korai növekedése TNF-receptorok expressziójának csökkentése (receptor downregulation) révén nyújt védelmet a szervkárosodás ellen (74). Nehéz másképp megmagyarázni azt, hogy miért csökkent a károsodás mértéke az LPS-előkezelés hatására, nagyobb TNF- α -mRNS-expresszió ellenére.

Ezen eredményekhez hasonlóan, nem tudtunk semmilyen különbséget kimutatni az IL-1- és IFN- γ -mRNS-expresszió kinetikájában a csoportok között. Az IL-6 mRNS-szintje azonban szignifikáns mértékben csökkent az ischemia előtt, és röviddel a reperfúzió után az LPS-előkezelte állatoknál. Egy *in vivo* vizsgálatban Hewitt és munkatársai bizonyították, hogy megszakított (intermittens) ischemia (prekondicionálás) szignifikánsan csökkentette az IL-6- és TNF- α -expressziót folyamatos ischemiához (kondicionálás nélkül) képest (75). Továbbá leírták, hogy LPS naponkénti injektálása patkányokba a TNF- α és az IL-6 mérhető felszabadulását csak az első néhány napon eredményezte, amely hatás ezt követően megszűnt (75). Adataink azt jelzik, hogy endotoxinnal történő, ismételt kezelés gátolhatja az IL-6-expressziót a károsodott szervben. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a csökkent IL-6-expresszió a makrofágok válaszképtelen állapotát tükrözhetik, aminek hátterében a TNF-receptorok downregulációja állhat. Másrészt, az IL-6 önmaga erős kemoattraktáns, és a leukociták infiltrációját, és ezt követő aktivációját okozhatja. Ezzel a hipotézissel magyarázható az LPS-csoportnál megfigyelt, csökkent infiltráció. Az IL-6 által vonzott leukociták csökkent infiltrációja további magyarázatul szolgálhat az (LPS-kezelt) állatoknál megfigyelt, kisebb mértékű károsodásra és apoptózisra.

Felállíthatunk azonban egy másik elméletet is. A hipoxia maga az egyik legjellegzetesebb nekrozis/apoptózis promóter. A nekrozis/apoptózis eredményeként a leukociták infiltrálnak a károsodott szövet fagocitózisa céljából. Ha az LPS-előkezelés csökkenti a szöveti sejtek hipoxia iránti érzékenységet *per se*, a szöveti károsodás mértéke csökken, és kevesebb leukocita infiltrálódik az érintett szervekbe.

A citokinek iNOS-gén-expressziót indukálnak (76), és így növelik az NO-szintet. Ischemia és reperfúzió után a károsodott vaszkuláris sejtek és a kitapadt leukociták szabadgyököket termelnek és inaktiválják a nitrogén-monoxidot, amely vazokonstrikticiót indukál és növeli a permeabilitást, a lokális ödémát és a leukocitaadhéziót. Semmilyen különbséget sem találtunk a kísérleti csoportok között az iNOS-mRNS-expresszióban, ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a NOS (nitrogénoxid-szintáz) az ischemia/reperfúzió szempontjából kisebb jelentőségű modellünkben. A citokin-mRNS-expressziót azonban csak szervekben vizsgáltuk, vérben és különösen az endotheliumban nem. Így lehetséges, hogy adott sejtípusra, például az endothelsejtre jellemző különbségeket nem detektáltunk. Ráadásul RT-PCR-t alkalmaztunk a citokinek mRNS-szintjeinek detektálása céljából, ezzel szemben mások a vér, vagy az endotoxin-tolerancia vizsgálata során a peritoneális makrofágok fehérjeszintjét vizsgálták. A teljes vér vizsgálata bizonyosan célszerű sepszis esetében, azonban a folyamatokban szerepet játszó mediátorok rövid fél-életidejét figyelembe véve ezek a mérési eljárások kevésbé tükrözik egy különálló szervben, mint például vesében végbemenő folyamatokat, ezért nem végeztünk ilyen méréseket. Ráadásul a peritoneális makrofágok az LPS-tolerancia kétségtelenül jó modelljét képezik, azonban funkciójuk és vesekárosodásban betöltött szerepük nem ismert. Ráadásul, a legtöbb kísérletet *in vitro* és nem *in vivo* hajtották végre.

Továbbra is tisztázatlan marad, hogy az LPS-előkezelés milyen módon nyújt védelmet a vese ischemia/reperfúzió ellen, azonban ez bizonyosan többtényezős jelenség. Régebben azt feltételezték, hogy az alacsony LPS-dózis úgy stimulálja a retikulo-endoteliális rendszert, hogy az ezt követő, nagyobb LPS-dózisok hatékonyabban kitisztulnak. Az újabban előtérbe került, lényegesnek tartott mechanizmus szerint az LPS alacsony dózisa megváltoztatja a monociták számos gyulladásokkeltő mediátor, többek között a proteolitikus enzimek, az arachidonsav-metabolitok, reaktív oxigénvegyületek és citokinek szekrécióját (77). Másrészt alacsony dózisú LPS direkt módon képes lehet az endothelsejt adhéziós receptorok expresszójának gátlására, ami magyarázatul szolgálhat a neutrofilok szöveti szekvesztrációjának csökkenésére (78). Az ilyen endothelsejt – neutrofil adhézióban kulcsszerepet játszó molekulák az 1. intracelluláris adhéziós molekula (ICAM-1) (79) és az E-szelektin (80). Mindkettő ideális molekuláris indikátora az ischemia/reperfúzióra

valásreakcióként bekövetkező endothelsejt-aktiválódásnak. *In vivo* modellekben a hipoxia/reoxigenáció stimulálta az endothelsejtek adhézíós molecula-expresszióját, és növelte neutrofilok endothelfelszínhez való adhézíóját (81). Egyes vizsgálatokban kimutatták, hogy a neutrofil-depléciónak védelmet nyújt a vese ischemia/reperfúzióval szemben patkányoknál (82). Így a neutrofilok szöveti invázióját megelőző események komplexitásának ismeretében feltételezhetjük, hogy az LPS-előkezelés gátolhatja az endothelsejtek aktiválódását.

Az ischemia és reperfúzió utáni veseelégtelenség kezelhető dialízissel, azonban az ilyen károsodás hatással van a transzplantáció, a revaszkularizációs folyamatok és a hipoperfúzió epizódok kimenetelére is. Kísérleteink során a vese ischemia/reperfúziós károsodással szembeni, endotoxinnal indukált kereszttolerancia új modelljét fejlesztettük ki. Ez a modell szélsőségesnek tűnhet, azonban hasonló károsodások következhetnek be klinikai körülmények között *non-heart-beating* donorok esetében. A TNF α és az IL-6 központi szerepet játszhat ebben a folyamatban. További vizsgálatok szükségesek azonban a modellben megfigyelt nagyobb arányú túlélés pontos okainak tisztázására.

B/RNS interferencia (^{8,9})

A génterápia lehetősége jelenleg az orvostudomány egyik legizgalmasabb kérdése. A DNS szerkezet felfedezésének ötven éves évfordulóján Watson azt nyilatkozta a *Time* magazinnak, hogy, ötven évvel ezelőtt a humán örökítő anyag szerkezetének megfejtése volt a legizgalmasabb tudományos kérdés (83). A génterápia mára tudományos-fantasztikus lehetőségből reális kezelési alternatíva lett. Ugyan az első klinikai kipróbálást leállították, (84) jelenleg az FDA több mint 169 génterápián alapuló klinikai vizsgálatot tart nyilván (85). A génterápia egyik legígéretesebb ága lehet az úgynevezett siRNS-ek (short interfering = rövid interferáló) segítségével kiváltható RNS interferencia.

A siRNS-el történő géncsendesítés lehetséges klinikai alkalmazásai között első sorban vírusfertőzések, malignus és autoimmun betegségek valamint genetikai rendellenességek szerepelnek (86).

⁸ Rácz Zs, Hamar P, Can siRNA technology provide the tools for gene therapy of the future? *Curr Med Chem (CMC)* **2006** 13 (19): 2299-2307

⁹ Hamar P, Song E, Kökény G, Chen A, Ouyang N, Lieberman J: Short interfering RNA targeting Fas protects mice against renal ischemia-reperfusion injury *P Natl Acad Sci USA* **2004** 101: 41 14883–14888

Géncsendesítés RNS interferenciával

Az RNS interferencia a géncsendesítés (silencing) egy típusa, melyet elsőként növényekben (87), és gerinctelen szervezetekben (88) írtak le. Az RNS interferencia egy, a növényekben fontos vírus elleni védekezési mód, és bár még nem teljesen tisztázott, valószínűleg emlős sejtek antivirális válaszában is szerepet játszik (89).

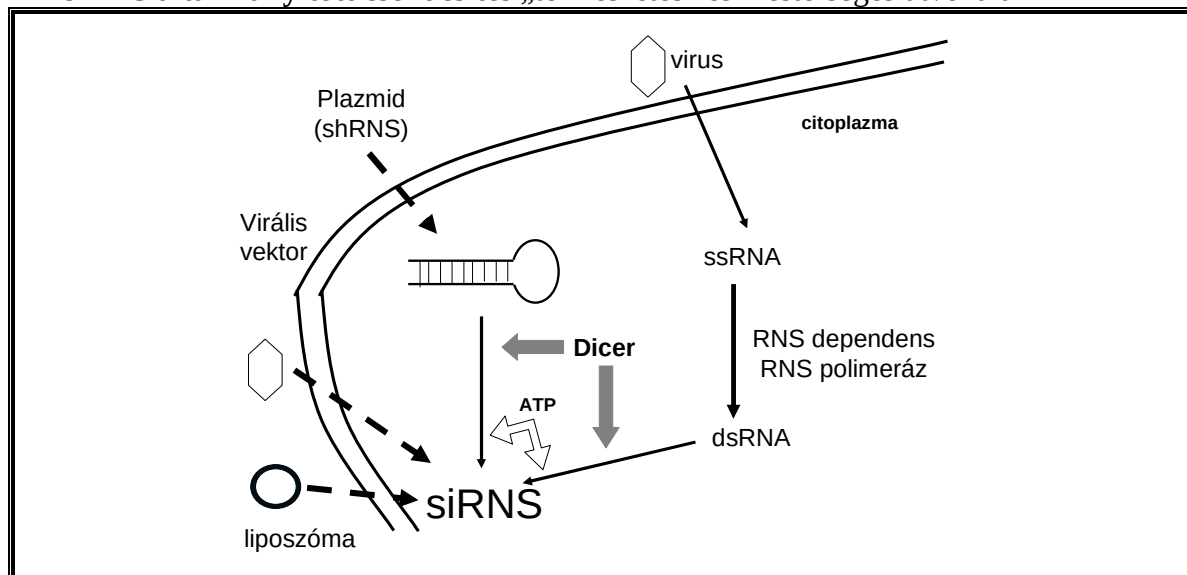
Élettanilag az RNS interferencia a gazdaszervezet védekező képessége a vírusok, idegen gének ellen, ugyanis kettős szálú (ds = double stranded) RNS gyakran keletkezik a vírusok életciklusa folyamán (90). Az RNS irányította Transzkripció Utáni Gén Csendesítés (Post-Transcriptional Gene Silencing = PTGS) e módját először petúniában figyelték meg (91). Jorgensen és társai írták le, hogy külső eredetű molekulák képesek megváltoztatni a saját gének expresszióját. Ezt a folyamatot „koszuppresszió” nevezték el. Az RNS interferencia első leírói az állatvilágban Mello és kollégái voltak, akik géncsendesítés céljából antiszensz RNS-t használtak a *C. elegans* nevű hengeresféregben (92). Megfigyelték, hogy a szensz és antiszensz RNS-ek együttes beadása tízszer hatásosabbnak bizonyult, mint a szálak külön-külön adagolása. Mindezek után az RNS által irányított géncsendesítést azonosították a korábban növényekben, gombákban és *Drosophilában* megfigyelt koszuppresszióval (93). Az RNS interferencia alacsonyabb rendű szervezetekben való előfordulását és megismerését követően fontos áttörést jelentett a génterápia számára az RNS interferencia jelenségének megfigyelése emlős sejtekben. Tuschl és kollégái fedezték fel, hogy RNS interferencia siRNS-ekkel emlős szövetkultúra sejtekben is kiváltható (94). A gerinctelen szervezeteket (hengeresféreg (95), *Drosophila* (96), *Trypanosoma* (97), hidra (98), méh (99)) és az emlős szövetkultúrát követően siRNS – eket sikerrel alkalmaztak géncsendesítésre állatkísérletekben zebradánióban (100), egérben (101,102) és patkányban (103).

A hosszú dsRNS-t egy Dicer-nek nevezett enzim darabolja fel kisebb, 19-21 nukleotidból álló dsRNS-ekké (104). Ez az úgynevezett rövid interferáló RNS (short interfering = siRNA), melyet az RNS Indukálta Csendesítő Komplex (RNA Induced Silencing Complex = RISC, lásd később) felismer és megkeresve a vele homológ cél *hírvivő* (messenger) RNS-t (mRNS), feldarabolja azt (105). Tehát az információ DNS→mRNS→fehérje átalakulása, azaz a transzkripció- transzláció folyamata a *hírvivő*_mRNS lebomlásával megszakad. Más szóval *a genom intaktsága mellett* elmarad az adott fehérje szintézise. In vivo, emlőssejtekben, a prokarióta sejtekhez hasonlóan a hosszabb kettős szálú RNS-ekből szintén az Rnáz III családba tartozó Dicer képezi a rövid siRNS-t. A Dicer megkötö a

prekurzor, hosszú dsRNS-t és feldarabolja azt 19-21 nukleotidból álló szensz és antiszensz szálból álló dsRNS-ekre (¹⁰⁹).

14. ábra

Az siRNS által irányított csendesítés „természetes” és mesterséges útvonala

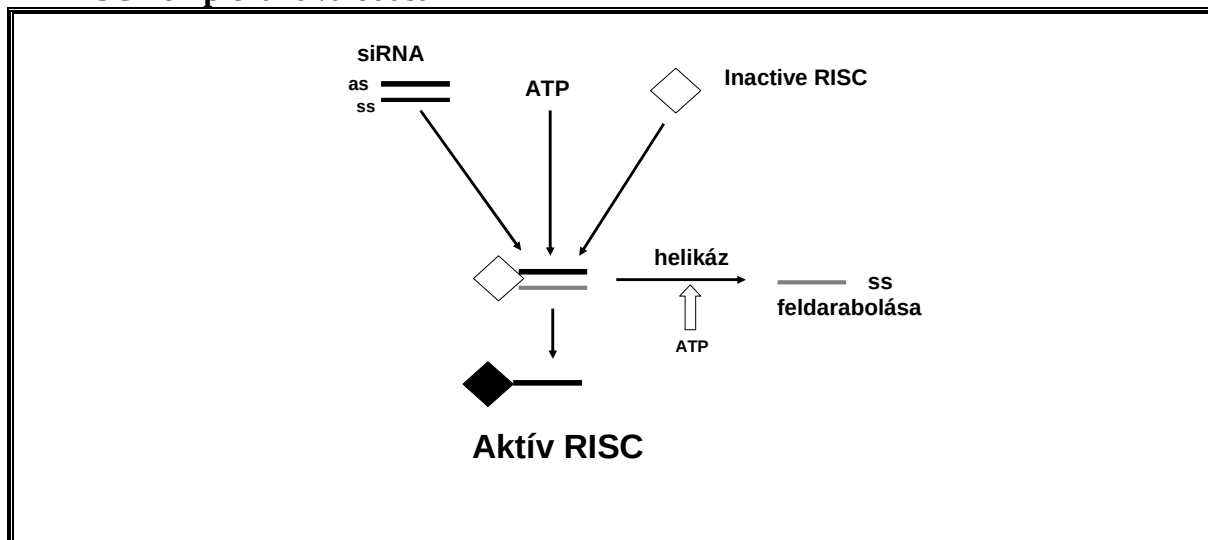


magyarázat a szövegben (106)

(ssRNS= egyszálú /single stranded/ RNS, dsRNS= duplaszálú /double stranded/ RNS, siRNS=rövid interferáló /short interfering/ RNS, RISC= RNS indukálta silencing complex, mRNS=hírvivő /messenger/ RNS, asRNS= a siRNS molekula antiszensz szála, RNáz= ribonukleáz)

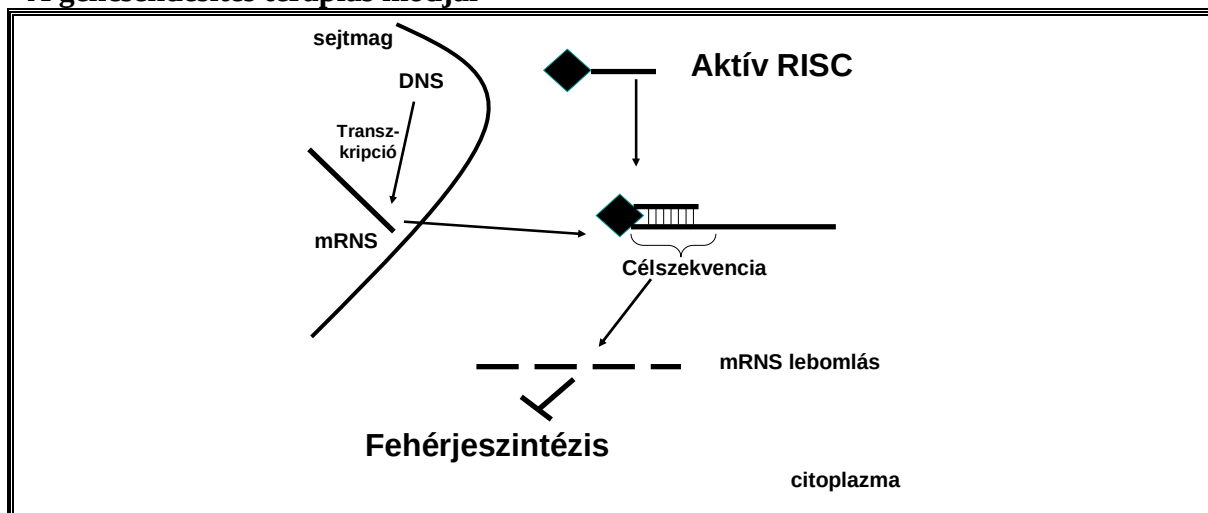
A 19-21 bázispárból álló siRNS tökéletes homologitás esetén párosodik a gazdasejtben található cél mRNS-sel, ami így a RISC-ben lebomlik, azaz végül az adott gén expressziója csökken. A minta és a target RNS minden bázishelyen meg kell feleljen egymásnak, mert a szakaszok közti egyetlen bázispárosodási eltérés (mismatch) esetén a mRNS nem bomlik le, így tehát a folyamat meglehetősen specifikus, ami a terápiás alkalmazásban nagy előny. Igaz, ez a nagyfokú specifititás úgy tűnik nem mindig áll fenn (lásd off-target silencing).

15. ábra
A RISC komplexaktiválódása



as = antiszensz szál, ss = szensz szál, ATP = adenosine trifoszfát, RISC = RNS által indukált csendesítő komplex

16. ábra
A géncsökkentés terápiás módjai



Az RNS interferenciát mesterségesen szintetizált siRNS molekulákkal is kiválthatjuk. Ezek a molekulák 19-21 bázispár hosszúságú RNS molekulák, melyek homológok a célszekvenciával.

Mesterségesen szekvencia specifikus siRNS juttatható célsejtbe, melynek segítségével a célzott génnek megfelelő fehérje szintézise gátolható. Az siRNS-ben a kb. 19 nukleotid hosszúságú dupla szálú szakaszt a 3' végen két-két párosítatlan nukleotid követi („lelógó” szakasz). Az 5' végen hidroxilcsoport található melyhez a sejtekben elhelyezkedő kinázok foszfátcsoportot kapcsolnak. Ennek a foszfátcsoportnak döntő jelentőséget tulajdonítanak a géncsökkentés mechanizmusában, mivel amennyiben a hidroxilcsoport kémiai blokkolásával megakadályozzuk a foszforilációt a csendesítés elmarad (107). Az siRNS a RISC komplexbe jutva irányítja a feldarabolandó mRNS kiválasztását. A RISC komplex aktiválódásához az siRNS megkötése szükséges (15. ábra). A komplex helikáz

aktivitásának köszönhetően a megkötött kettősláncú siRNS szétcsavarodik, a szensz szál lebomlik, míg az antiszensz szál a komplexhez kötötten marad és aktiválja azt (108). Ennek eredményeként indul el a homológ mRNS feldarabolása (16. ábra). Az aktív komplex tartalmaz egyéb fehérjéket is, mint például a növényekben megtalálható Argonaute géncsalád fehérjetermékét (rde-1 *Caenorhabditis elegans* esetén, AGO2 *Drosophilában*, GERP95 emberi sejtekben), valamint más, jelenleg tisztázatlan szerepű faktorokat (109).

Energetikailag a folyamat négy fő lépése (dsRNS átalakítása siRNS-sé, ennek beépítése az RISC-be, az siRNS szétcsavarása és a cél mRNS felismerése, illetve feldarabolása) közül kettő igényel ATP-t, mégpedig a dsRNS átalakítása egyszálúvá, valamint az siRNS helikáz katalizálta szétcsavarása. Az ATP-nek továbbá szerepet tulajdonítanak az 5' foszfát-vég megtartásában is (110).

Az siRNS – ek nagy előnye a csupasz nuleotidszekvenciákkal szemben, hogy azoknál jóval stabilabbak, illetve nagyobb biológiai hozzáférhetőséggel rendelkeznek. A molekula további kémiai módosításaival (111) tovább csökkenthető a vesén át történő veszteség, vagy a plazma RNáz – ainek bontó hatása.

Az RNS interferencia in vivo alkalmazása

Az siRNS sejtbe juttatására számos módot ismertettek. Az RNS interferencia gyakorlati, terápiás célú hasznosításának egyik lehetősége siRNS közvetlen bejuttatása az élő szervezetbe. Tekintettel a molekula kis méretére képes átjutni biológiai membránokon, így az élő sejtek kis mértékben képesek felvenni környezetükből (112). Ezért natív (naked) siRNS az élő szervezet sejtjeibe juttatható **hidrodinamikus** módon mely állatkísérletekben az egyik leghatásosabb módszer. Hidrodinamikus kezelés során a narkotizált rágcsáló egy, a vena cava ellátási területébe tartozó vénájába, például az állat farok vénájába (vagy a hímvessző vénájába) egy alkalommal a lehető legrövidebb idő alatt olyan nagy folyadékmennyiséget fecskendezünk (a keringő vértérfogattal megegyező volument vagy annak minimum a felét, kb. 10 másodperc alatt), amit a szív nem tud azonnal továbbítani, így a beadott folyadék (siRNS) felhalmozódik a vena cava gyűjtőrendszerében (109). Az így megnövekedett hidrosztatikus nyomás következtében a siRNS a gazdag érellátással rendelkező szervek interstíciumába jut. A kis siRNS molekula a parenchyma sejtek membránján átjutva éri el a célsejtek intracelluláris terét. A módszer eredményeként géncsendesítés figyelhető meg a májban, lépben, szívben, vesében és a tüdőben.

Az siRNS természetesen más módon is bevihető; például közvetlenül a vizsgált szerv vénájába például vesevénába, a portális vénába (113), az agyba (114), a csontvelőbe (115), a retina alá (115), vagy akár daganatokba a szerv/szövet artériás vagy vénás kivezetésén keresztül. A hidrodinamikus kezelés természetesen a klinikai gyakorlatban nem alkalmazható. A lokális vénás bevitel elméletileg lehetséges lehet, azonban itt is fennáll – az siRNS molekulák intracelluláris térbe juttatásához szükséges túlnyomás következtében – a parenchyma mechanikus károsodásának veszélye.

Az siRNS-el kiváltott géncsendesítés lehetséges mellékhatásai:

Az siRNS-t magas koncentrációban adagolva két ún. off-target mechanizmus jelentkezhet: egyrészt aktiválódhat az interferon válasz, másrészt olyan gének expressziója is lecsökkenhet, melyekkel az siRNS csak részleges homológiával rendelkezik.

Az interferon válasz: A hosszú dsRNS, mely gyakran keletkezik vírusok életciklusa során, aktiválja a dsRNS-dependens protein kinázt (PKR), amely foszforilálja az Elongáció Iniciációs Faktor α -láncát (EIF2 α), gátolva ezzel a sejt fehérjeszintézisét. Az antivirális válasz részeként, az aktív PKR emellett serkenti az IFN termelést és aktiválja a ribonukleáz L-et (RnázL) is, mely egy RNS lebontásért felelős enzim. A rövid 19-21 bp-ból álló siRNS-ről kezdetben úgy gondolták, hogy a sejt antivirális védekezést szolgáló IFN-választ nem váltja ki. Egy újabb közlemény azonban arról számol be, hogy *in vitro* 5 különböző – géncsendesítésre gyakran használt siRNS szekvencia – különböző sejttípusokban az IFN-válaszra jellemző géncsoport aktiválódását okozta (116).

Off target silencing: Az idegen RNS és az mRNS között tökéletes bázispárosodás esetén az expressziócsökkenés az siRNS molekulánál leírt mechanizmus szerint következik be, tehát a megfelelő enzimek feldarabolják az mRNS-t, aminek következtében az expresszió szintje lecsökken. Néhány (117, 118) kísérletben leírták, hogy az siRNS-t magas koncentrációban adagolva kiváltható az off target hatás, amely esetében az idegen RNS molekula olyan mRNS-hez is hozzákötődhet, mellyel nem teljesen komplementer, így nem célzott mRNS-ek lebomlása is előfordulhat. Jackson és mtsai az Insulin – like Growth Factor 1 – es típusú receptora (IGF1R) és Mitogen Activated Protein Kinase 14 (MAPK14) génekről termelődött mRNS – eket célzó többféle, eltérő szekvenciájú siRNS – eket vittek be HeLa sejtekbe, és összehasonlították a különböző siRNS – ek azonos génre kifejtett csendesítő hatását, továbbá a következőkben azon legkisebb siRNS koncentrációt próbálták (titrálással) meghatározni, amely még kiváltja az off target géncsendesítést. A várttal ellentétben, a mérések azt igazolták, hogy az siRNS – ek ezen nem specifikus hatása kis

koncentrációk mellett is megfigyelhető. Az off target silencing tehát nem egyszerűen a magas siRNS koncentráció következménye (119).

Összefoglalva: a génterápia humán alkalmazása számos akadályba ütközik. Jelenleg a legfőbb akadályt a terápiás molekula célsejtbe történő bejuttatása jelenti. A hidrodinamikus kezelés főemlősökre történő kiterjesztése egyelőre megvalósíthatatlan. Kliniailag alkalmazható alternatíva lehet, a magas koncentrációjú siRNS lokális vénába történő beadása, de mechanikus parenchyma károsodás itt is felléphet. A génterápia klinikai alkalmazásának viszont nemcsak gyakorlati akadályai vannak, hiszen számos etikai érv/ellenérv is felmerül. Mindezen problémák leküzdése és megoldása a jövő feladata.

***Fas* elleni rövid interferáló RNS védelmet nyújt egerekben a vese ischemia-reperfúziós károsodásával szemben (9)**

Mint azt korábban, a vese ischemiás károsodásáról írt általános részben összegeztem, a vese ischemiás-reperfúziós károsodását követő akut veseelégtelenség gyakori oka intenzív osztályokon fekvő betegek morbiditásának és mortalitásának. A veseelégtelenség leggyakoribb végső oka a tubuláris epitheliális sejthalál. Egyre több bizonyíték utal a *Fas*-mediálta apoptózis szerepére az infarktus méretének kiterjedésében különböző szövetekben, így az agyban, szívben, vesében és gyomorban (120). A vesetubulusok epithelsejtjei bőségesen expresszálnak *Fas*-t, és ez az expresszió az ischemia időtartamával arányosan fokozódik, különösen a disztális tubulusokban, amelyek a vese ischemiás károsodásra leginkább érzékeny része. Lpr egerek, amelyekből a *Fas* expressziója hiányzik, ischemia-reperfúziót követően a vese szövet kisebb mértékű károsodását mutatják, mint a vad típusú egerek (121). Reperfúzió alatt *Fas* ligandumot expresszáló limfociták halmozódnak fel, és hozzájárulhatnak a *Fas*-mediálta szövetkárosodáshoz (122). Korábban kimutattuk, hogy a *Fas*-expresszió duplex, rövid interferáló RNS hidrodinamikus injektálásával történő csendesítése védelmet nyújt egerekben autoimmun hepatitis ellen (101). A hidrodinamikus injekció nagy térfogatú anyag gyors injektálását jelenti, melynek során átmenetileg magas vénás nyomást keletkezik, amely megkönnyíti a siRNS-ek bejuttatását az interstitiumba és a sejtekbe. siRNS hidrodinamikus injektálása hatékonyan csendesít reporter-gén expressziót olyan, magas véráramlású szervekben, mint a tüdő és vese (123). Ennek megfelelően azt vizsgáltuk, hogy *Fas* elleni siRNS

hydrodinamikus bejuttatása gátolja-e az egérvese *Fas* expresszióját *in vivo*, és védelmet nyújt-e posztischemiás akut veseelégtelenséggel szemben.

Eredmények

Először szintetikus siRNS duplexeket (50 µg, 2,0 – 2,5 mg/kg) adtunk be farokvénába egyetlen hidrodinamikus injekció formájában, azt a *Fas*-szekvenciát alkalmazva, amely hatékonyan és specifikusan csendesített a májban (115). Huszonnégy óra múlva a vesében a *Fas* mRNS $74 \pm 8\%$ -kal csökkent, amint azt teljes vese homogenizátumon végzett reverz transzkriptáz (RT)-PCR vizsgálattal meghatároztuk (17. ábra/a). A *Fas* mRNS csökkenése hasonló volt az ugyanazon siRNS 50 µg-os adagjának háromszori hidrodinamikus injektálásával a májban kiváltott *Fas* csendesítéshez, (86%, RNáz protekció vizsgálattal) (101).

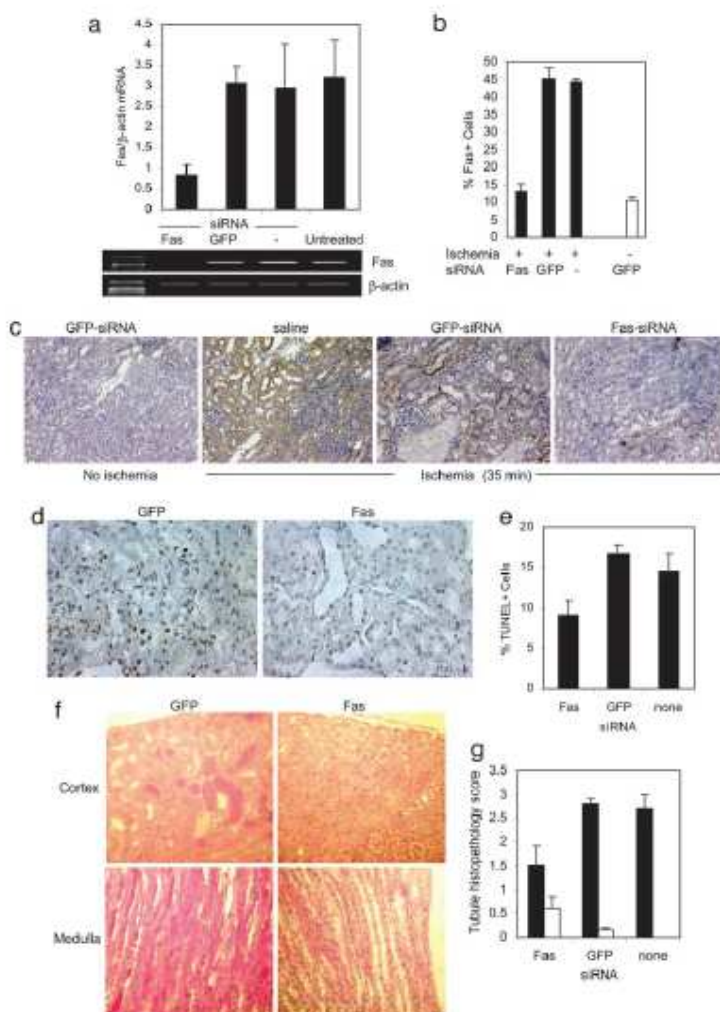
Ezt követően meghatároztuk, hogy a *Fas* siRNS csendesíti-e az ischemiás károsodást követő, fokozott *Fas* expressziót. Előkísérleteinkben, amelyekben a kontralaterális vesét eltávolítottuk, vagy elszorítottuk, 15 perces ischemia az egerek 16%-ában (hatból egy esetben) vezetett elhulláshoz, 30 perces ischemia az egerek 40 – 60%-át ölte meg, míg 35 – 45 perces ischemia után az állatok 80 – 100%-a pusztult el. A 15 perces ischemia után bekövetkezett egyetlen végzetes eset más miatt következhetett be, mint akut tubuláris nekrozis, mert a 15 perces ischemiát tipikusan követő BUN emelkedés csekély volt és átmeneti (lásd alább, és a 18. ábra/a-t). Ezek a túlélési adatok arra utalnak, hogy a kísérletekhez használt egértörzs érzékenyebb ischemiás vesekárosodásra, mint néhány beltenyésztett laboratóriumi törzs. A további kísérletek során 15, illetve 35 percen át tartottuk elszorítva a vesekocsányt. *Fas* vagy *GFP* siRNS egyetlen, 50 µg-os hidrodinamikus injekcióját követően a bal vesekocsányt (artériát és vénát) 35 percre elszorítottuk (a jobb vesét érintetlenül hagytuk) és az egereket egy nap múlva leöltük, renális *Fas* expresszió és apoptózis vizsgálata céljából. A *Fas* csendesítése ischemiás elrendezésben is hatékony volt. A *Fas* mRNS-nek a *GAPDH* mRNS-hez viszonyított aránya real time PCR-al vizsgálva 4 – 5-ször alacsonyabb volt azokban az egerekben, amelyek *Fas* siRNS-t kaptak, összehasonlítva azokkal az állatokkal, amelyek *GFP* siRNS-t ($P < 0,001$), vagy fiziológiás konyhasóoldat hidrodinamikus injekcióját ($P < 0,001$) kapták (nem közölt adatok). A *Fas* mRNS ischemiát követő termelődése *Fas* siRNS-t kapott egerekben hasonló volt a nem ischemiás elrendezésben megfigyelt mRNS expresszióhoz (17. ábra/a). A mindkét veséből készült szövettani metszeteket *Fas* protein expresszióra és TUNEL-re festettük apoptózisos sejtek kimutatására, és vak eljárással értékeltük a vesekárosodás szövettani jellemzőit (17. ábra/b-e). Ischemia nélkül, *GFP* siRNS

hidrodinamikus injekcióját követően, a tubulus-epithelsejtek $10 \pm 1\%$ -a festődött Fas-ra. A *GFP* siRNS-sel vagy fiziológiás konyhasóoldattal kezelt kontroll egerek elszorított veséjében a tubulus-epithelsejtek közel fele ($45 \pm 3\%$, illetve $44 \pm 1\%$) tartalmazott kimutatható Fas proteint. A *Fas* siRNS-sel kezelt egerekben azonban a tubulussejtek mindössze $13 \pm 2\%$ -a festődött Fas-ra. Ez a százalékos érték statisztikailag nem volt megkülönböztethető a kontroll egerek Fas festődésétől, amelyekben a vesekocsányt nem szorítottuk el ($P = 0,13$). A *Fas* siRNS-sel kezelt egerek elszorított veséje szintén szignifikánsan kevesebb apoptózisos tubulus-epithelsejtet tartalmazott (17. ábra/d,e). Míg a *Fas* siRNS-sel kezelt egerekből származó vesetubulus-epithelsejtek $9 \pm 2\%$ bizonyult TUNEL⁺-nak, a *GFP* siRNS-t ($P < 0,001$) kapott egerekből származó sejtek $17 \pm 1\%$ -a, a fiziológiás konyhasóoldatot ($P < 0,01$) kapott egerekből származó sejtek $14 \pm 2\%$ -a volt TUNEL⁺. A *Fas* siRNS az ischemiás károsodástól is megvédte a veséket, amint az a kéreg tubulus-epithelsejt károsodás kórszövettani értékelésével megállapítható volt (17. ábra/f,g). Mindegyik fiziológiás konyhasóoldattal és *GFP* siRNS-sel kezelt egér kiterjedt corticalis tubulus-károsodást mutatott, masszív tubuláris atrófiával és sejtpusztulással, és tubulointerstitialis gyulladásos infiltrációval. A túlélő tubulus-epithelsejtek többsége duzzadt volt, és gyakori volt az apoptózisra utaló, nukleáris kromatin-kondenzáció. A medullában a tubulus lumenek hialinnal voltak kitöltve, ami a felső szegmensekben végbement súlyos sejtpusztulásra utalt. Ezzel szemben, a *Fas* siRNS-sel történt előkezelés megakadályozta a tubulus-epithelsejtek pusztulását és csökkentette a gyulladásos infiltrációt. A kontroll, siRNS-sel kezelt egerekben ischemiás beavatkozás nélkül a tubulus szövettani pontszáma <1 volt (0-tól 3-ig terjedő skálán); a fiziológiás konyhasóoldatot kapott egerek ischemiás veséjében $2,7 \pm 0,3$ -ra, és a *GFP* siRNS-sel injektált egerekben $2,8 \pm 0,1$ -re emelkedett, azonban a *Fas* siRNS-sel kezelt egerekben fele ekkora mértékű károsodást ($1,5 \pm 0,4$ pontszám) tapasztaltunk ($P < 0,01$ vs. fiziológiás konyhasóoldat, $P < 0,003$ vs. *GFP* siRNS).

Ezt követően egereket kezeltünk a fentiek szerint, *Fas* siRNS egyetlen hidrodinamikus injekciójával, majd ezt követően két nappal később kis-térfogatú injekciót ($50 \mu\text{g}$ $0,1 \text{ ml}$ -ben) adtunk a bal vesevénába, és újabb két nap múlva a bal vesekocsány leszorításával 15 perces szubkritikus ischemiát váltottunk ki.

17. ábra

Egyetlen hidrodinamikus *Fas* siRNS injekció csendesíti a *Fas* expresszióját 35 perces ischémiának kitett vesékben.



(a) *Fas* mRNA csendesítése *Fas* és β -aktin expressziójának RT-PCR próbával végzett vizsgálata szerint, kezeletlen, vagy PBS, *Fas* siRNS vagy *GFP* siRNS egyetlen hidrodinamikus injekciójával kezelt egerek veseszövet-homogenizátumában. Feltüntetünk egy reprezentatív mintát. Ezek az egerek nem voltak kitéve vese-ischémiának. Károsodott egerekben azonban hasonló eredményeket kaptunk RT-PCR vizsgálattal (nem közölt adatok). (b és c) *Fas* protein csendesítése immunhisztokémiai eljárással (c). Az egereket két nappal korábban PBS-sel, *Fas* siRNS-sel vagy *GFP* siRNS-sel injektáltuk, 35 percig veseischémiának tettük ki, majd egy nappal később leöltük. A kontroll egereket nem tettük ki ischémiás hatásnak. A diagramm a Fas^+ sejtek százalékos arányát mutatja (az összes állat átlaga $\pm$ SD, csoportonként 3 – 5 állat). (d) Ischémiára adott csökkent válasz, TUNEL festéssel vizsgálva (400-szoros nagyítás). (e) A (d) ábra szerinti eredmények grafikai ábrázolása. (f és g) Csökkent corticalis hialin necrosis *Fas* siRNS-sel előkezelt egerekben, összehasonlítva a *GFP* siRNS-t kapott egerekkel. (f) Reprezentatív hematoxylin és eosin festődés (200-szoros nagyítás). (g) A szövettani pontszámot (átlag $\pm$ SD) vak módszerrel határoztuk meg ischémiának kitétt (tele oszlopok), és nem kitétt (üres oszlopok) egerek 3 – 5 egyedből álló csoportjában.

Ha a vese injekcióval egyidejűleg a jobb vesét eltávolítottuk, a kontroll egerekben átmeneti veseelégtelenség fejlődött ki (18. ábra/a). Másnapra a BUN 71 ± 4 mg/dl-re emelkedett, szemben az ischemia nélküli, 33 ± 1 mg/dl normál értékkel. Két nap múlva a BUN normalizálódott. A *Fas* siRNS hidrodinamikus és vesevénába adott injekciókkal kezelt egerekben a BUN normális értéken maradt (33 ± 4 mg/dl egy nappal, és 36 ± 6 mg/dl két nappal az elszorítást követően). Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy milyen hatékonysággal

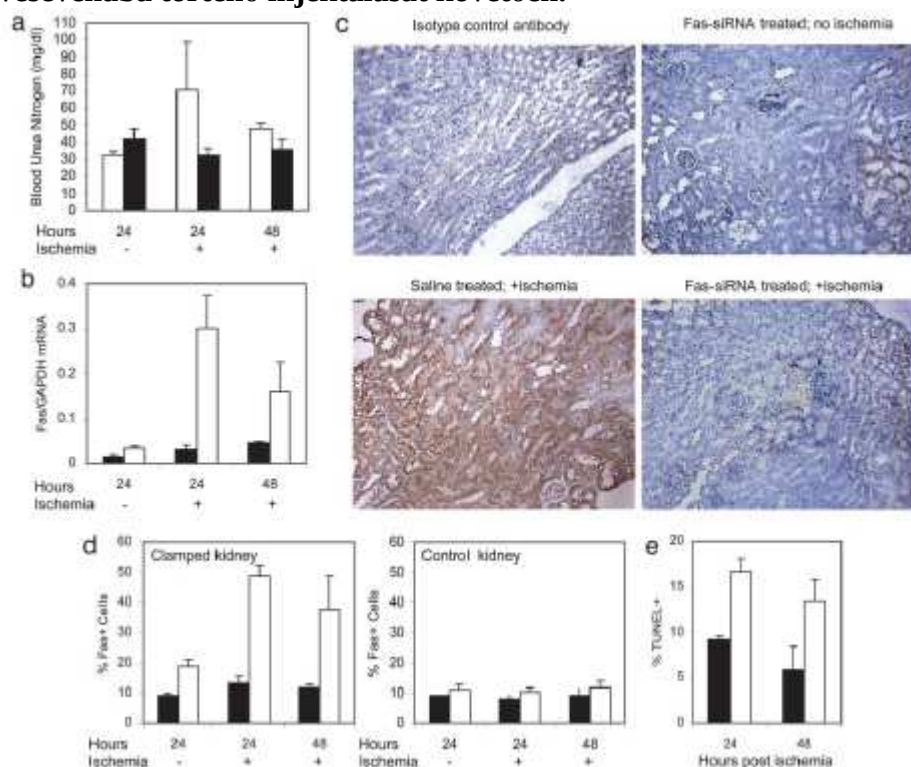
némul el a *Fas* 15 perces szubkritikus ischémias kísérleti elrendezésben. Fiziológiás konyhasóoldattal ál-kezelt egerekben, a vesekocsány leszorítása nélkül, a *Fas/GAPDH* mRNS arány RT-PCR vizsgálattal meghatározva $0,03 \pm 0,01$ volt, amely *Fas* siRNS-t kapott egerekben $0,015 \pm 0,01$ -re csökkent (18. ábra/b). Szubkritikus ischémiát követően, ez az arány 10-szeresére emelkedett, egy nappal később $0,30 \pm 0,07$ értéken tetőzött, és két nap múlva $0,16 \pm 0,07$ értéken emelkedett maradt. Azokban az egerekben azonban, amelyek *Fas* siRNS-t kaptak, a *Fas/GAPDH* mRNS arány az ischémias vesében alig emelkedett az ischémia ki nem tett kontroll egerek értékei fölé. A *Fas/GAPDH* mRNS arány az elszorítás utáni első napon $0,032 \pm 0,01$, a második napon $0,046 \pm 0,003$ volt (az első napon a kontrollal összehasonlítva $P < 0,001$). Ráadásul, a *Fas*-protein expressziója, amelyet a *Fas*-festődésű tubulussejtek immunhisztokémiai eljárással történő számolásával határoztunk meg, szintén lényegesen csökkent a károsodott vesében (18. ábra/c,d). A *Fas* siRNS-sel kezelt egerekben az ischémias vesében a tubulussejtek $13 \pm 2\%$ -a vált Fas^+ -vá az első napon tetőző válasz során, míg az ischémias, kontroll egérvesékben a tubulussejtek $49 \pm 4\%$ -a festődött *Fas*-ra. A *Fas* siRNS-t kapott egerek ischémias veséjének *Fas*-festődése nem tért el szignifikánsan a kizárólag fiziológiás konyhasóoldatot kapott kontroll egerek nem ischémias jobb veséjétől. Amikor az elszorítást követő 1. és 2. napon a TUNEL⁺ apoptózis sejtet megszámoltuk, körülbelül fele annyi TUNEL⁺ sejtet találtunk a *Fas* siRNS-sel kezelt egerekben, mint a kontrollokban (18. ábra/e, az 1. napon $P < 0,002$, a 2. napon $P < 0,05$). A *Fas* expresszió csendesítését követően, a hematoxylin festéssel észlelt kóros elváltozások szintén szignifikáns mértékben csökkentek az ischémias vesékben, (tubulus kórszövettani pontszám, *Fas* siRNS-sel kezelt egerekben $1,4 \pm 0,5$ vs. $2,2 \pm 0,3$ a kontroll egerekben, $P < 0,05$).

Mivel a vesében a *Fas* expresszióját, a tubuláris apoptózist és az ischémias károsodást kezelésünk gátolta, ezt követően azt vizsgáltuk, hogy védelmet nyújt-e a *Fas* siRNS kritikus ischémiával szemben olyan egerekben, amelyekben a bal vesekocsányt 35 percen át leszorítottuk, és a kontralaterális vesét eltávolítottuk. A jobb vesét medián laparotómiával távolítottuk el, 2 nappal fiziológiás konyhasóoldat, *GFP* siRNS vagy *Fas* siRNS egyetlen hidrodinamikus injekciójának beadását megelőzően. Két nap múlva a megmaradt vesekocsányt 35 percre leszorítottuk, majd az egereket megfigyelés alatt tartottuk (19. ábra/a). A hidrodinamikus farokvéna-injekció formájában fiziológiás konyhasóoldatot kapott öt egérből négy, és minden *GFP* siRNS-t kapott egér 2 napon belül akut veseelégtelenségben elhullott. A *Fas* siRNS-sel injektált 10 egérből azonban 8 túlélte ($P < 0,0001$ vs. *GFP* siRNS, $P < 0,005$ vs. fiziológiás konyhasóoldat). A túlélő egerekben a vesefunkció, BUN követésével értékelve, kevésbé volt zavart a *Fas* siRNS-sel kezelt

állatokban, mint a hidrodinamikus injekcióban csak fiziológiás konyhasóoldatot kaptakban (19. ábra/b). Míg a túlélő kontroll egerekben a tetőző BUN érték 646 ± 77 mg/dl volt, a *Fas* siRNS-sel kezelt egerekben ennek harmada (232 ± 33 mg/dl, $P < 0,0001$), összehasonlítva a 33 ± 1 mg/dl normál értékkel.

18. ábra

FAS csendesítés (FAS expresszió) FAS siRNS hydrodinamikus és közvetlen vesevénába történő injektálását követően.

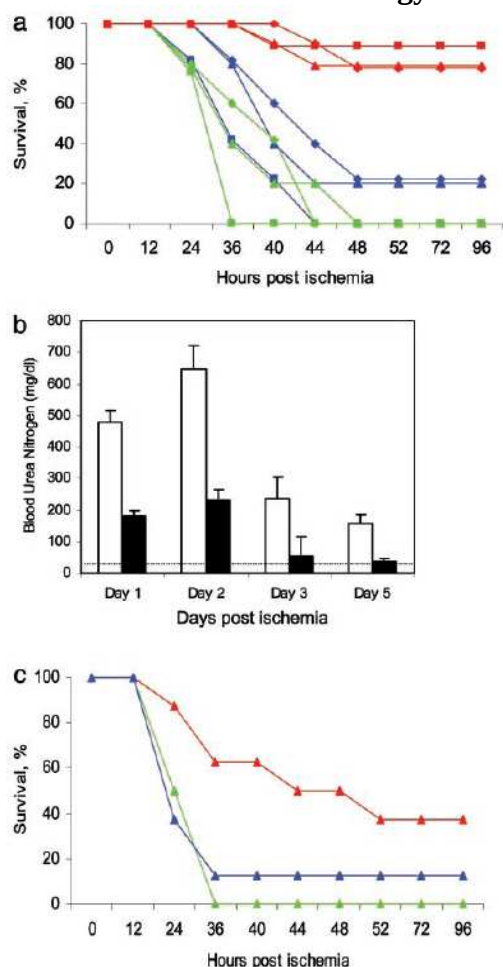


Az egerek egyszeri adagban kaptak hydrodinamikusan Fas csendesítő siRNS (teli oszlopok), vagy vivőanyagot (üres oszlopok) 4 nappal, és direkt vese vénába injektálva 2 nappal 15 perces vese ischémiát vagy sham ischémiát megelőzően. A mintákat 1 vagy 2 nappal az ischémiát követően vettük ki az egerekből analízisre (a) BUN értéke emelkedett kontroll egerekben, de nem emelkedett *Fas* mRNS csendesítést követően (b) a real-time PCR-éál meghatározott FAS mRNS GAPDH mRNS-hez viszonyított expressziója jelentős mértékben fokozódott ischémiát követően. Ezt a postischémiás expresszió-növekedést *Fas* siRNS-sel végzett előkezelés meggátolta (c és d) a Fas fehérje postischémiás expresszió-növekedését szintén gátolta a *Fas* siRNS-sel végzett előkezelés. (c) Reprezentatív metszetek (400x-os nagyítás). (d) Az ischémiás bal vese és leszorítás nélkül hagyott kontroll vese Fas festése (átlag±szórás). (e) A TUNEL+ tubulusok részaránya szintén csökkent *Fas* siRNS-sel végzett előkezelést követően.

Vizsgáltuk továbbá, hogy siRNS-ek bal vesevénába (a jobb vese eltávolításával egy időben) adott kis-térfogatú injekciója (100 µl), amelyet az állatok jól toleráltak korábbi kísérleteinkben, segíti-e vagy helyettesíti-e a hidrodinamikus injekciót.

19. ábra

Fas siRNS hidrodinamikus vagy vesevéna injekciója véd letális ischemiával szemben



Túlélés, és túlélő egerek BUN szintjei 35 perces vese-ischemiát és reperfúziót követően. (a) Az egereket fiziológiás konyhasóoldattal (kék) ($n = 5$), *GFP* siRNS-sel (zöld) ($n = 5$) vagy *Fas* siRNS-sel kezeltük, hidrodinamikus injekció formájában (♣), vesevéna injekció formájában (◆), vagy mindkét módon (♠). A BUN szintje csökkent a túlélő, *Fas* siRNS-sel kezelt egerekben (tele oszlopok), szemben a fiziológiás konyhasóoldattal kezelt kontrollokkal (üres oszlopok). A vesevéna át történt intraoperatív (poszt-ischemiás) kezelés szintén nyújtott némi védelmet (színek mint az a panelen).

A csak vesevéna infúzióval, vagy mind hidrodinamikus, mind vesevéna injekcióval egyaránt kezelt egerek túlélési görbéi nem voltak megkülönböztethetők azokétól, amelyek csak egyetlen hidrodinamikus injekciót kaptak (19. ábra/a). A vesevéna injekció szignifikáns túlélési előnyt biztosított a kritikus ischemia-reperfúziós károsodással szemben ($P < 0,001$ vs. *GFP* siRNS, $P < 0,01$ vs. fiziológiás konyhasóoldat). Bár a hidrodinamikus injektálás nem valószínű, hogy embereken alkalmazható, a vesevéna katéterezése kivitelezhető terápiás lehetőség.

Bár bizonyos helyzetekben, például operáció előtt, számítani lehet ischemia-reperfúziós károsodásra, a klinikai helyzetek többségében az ischemiás károsodás figyelmeztetés nélkül lép fel. Ennek megfelelően vizsgáltuk a túlélést olyan esetben, amikor a *Fas* siRNS kezelés az ischemiás esemény után történt. A *Fas* siRNS-t 100 μ l-ben

injektáltuk a vesevénába a reperfúzió alatt, 5 perccel azután, hogy felengedtük a vesevérédekények leszorítását, amikor a vese visszanyerte vörös színét. A posztischemiás vesevéna-injekció nyolc egérből hármat védett meg 35 perces ischemiát követően, míg mind a nyolc *GFP*-siRNS-sel kezelt egér, és a nyolc fiziológiás konyhasóoldattal kezelt egér közül hét elpusztult ($P < 0,01$ vs. *GFP* siRNS, $P < 0,07$ vs. fiziológiás konyhasóoldat) (19. ábra/c). A 19. ábra/a,c szerint az összes *GFP* siRNS-sel kezelt egér elpusztult, míg a fiziológiás konyhasóoldattal kezelt csoportban egy egér túlélte. Bár a 19. ábra, és a fiziológiás konyhasóoldat- és *GFP* siRNS-kezelések közötti eltérések statisztikailag nem voltak szignifikánsak, nem zárhatók ki a *GFP* siRNS által kiváltott, enyhe célponton kívüli ('off-target') hatások.

Megbeszélés

Vizsgálatunk megerősíti a Fas-mediált apoptózis jelentőségét a renális ischemia-reperfúziós károsodásban, mert a *Fas* csendesítése megvédte az egereket a letális akut ischemiás veseelégtelenségtől. A *Fas* csendesítésével más szervek szövetei, például a szívé, vagy agyé, szintén megvédhetők lehetnek ischemia-reperfúziós károsodástól. Védelmet nem csak a hidrodinamikus injekció nyújtott, hanem a vesevénába juttatott egyetlen, kis-térfogatú injekció is. Nem teljesen tisztázott, hogyan hat a hidrodinamikus injekció. Feltételezik, hogy az intravasculáris térfogat hirtelen emelkedése által kiváltott, fokozott hidrosztatikai nyomásnak kitett parenchimalis sejtek transzdukálódnak. Nem valószínű, hogy ez a megközelítés alkalmazható a humán terápiában. A vesevéna katéterezése azonban embereken kivitelezhető, és az valószínűleg a vese ischemiás károsodásra leginkább érzékeny részét célozza meg, a tubulointerstitiumot. Vizsgálatunk során azonban nem mértük közvetlenül, hogy mely vesesejtek vették fel a siRNS-t akár a hidrodinamikus, akár a vesevéna injekciót követően. Hasznosak lesznek olyan jövőbeni vizsgálatok, amelyek fluoresceinnel jelölt siRNS-ek eloszlását detektálják a különböző vesesejtekben, ezáltal támpontot nyújtva a vese terápiás stratégiájának fejlődéséhez. Vizsgálatunkban olyan injekciós térfogatot választottunk, amely durván megfelel egyetlen egérvese térfogatának (124). Ezek az injekciók valószínűleg az intravasculáris nyomás átmeneti, lokalizált fokozódását váltották ki, ami tubusejtek siRNS-sel történő transzdukációjával járó, retrográd folyást eredményezett, a hidrodinamikus injekcióhoz hasonló mechanizmus révén, azonban a jobb szívfél elégtelenségének kockázata nélkül. További vizsgálatok szükségesek a helyi és szisztémás intravasculáris nyomás mérésére.

Egy korábbi vizsgálatunkban azt tapasztaltuk, hogy ez a *Fas* siRNS-szekvencia specifikusan csendesítette a *Fas*-t, azonban nem csendesítette az apoptózis más génjeit

(101). Újabb *in vitro* vizsgálatok azonban arra utalnak, hogy néhány duplex siRNS-szekvencia célponton kívüli („off-target”) hatással rendelkezik, és IFN-választ válthat ki, különösen nagyobb koncentrációkban (116). További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy ezek a problémák fennállnak-e *in vivo*, és az adott szekvencia esetében. *In vitro* előkísérleteinkben, amelyek során sejteket a jelen tanulmányban alkalmazott *Fas* siRNS-sel transzfektáltunk, nem tapasztaltuk IFN által indukálható gének indukcióját (nem közölt adatok). Adataink arra utalnak, hogy a renális tubulus-epithelsejtek *Fas* expressziójának csendesítése az a mechanizmus, amely révén a *Fas* siRNS injekció védelmet nyújt. Nem zárhatjuk azonban ki azt a lehetőséget, hogy a *Fas* expressziójának máshol történő csendesítésével járó, gyulladásgátló hatások hozzájárulnak a védelem kimeneteléhez.

Az ischémiát követően beadott *Fas* siRNS helyi injekció némi védelmet nyújtott, amely azonban nem volt teljes. A *Fas* siRNS-sel kezelt egerek túlélése szignifikánsan jobb volt, a *GFP* siRNS-sel kezelt egerekénél, vagy a *GFP* siRNS-sel és fiziológiás konyhasóoldattal kezelt, összevont egércsoporténál ($P < 0,02$), azonban a fiziológiás konyhasóoldattal kezelttel összehasonlítva nem, bár a védelem irányába mutató trend megfigyelhető volt. Ha a duplex siRNS-ek felezési ideje és bejuttatási hatékonysága kémiai módosítással javítható lesz (125), a védelem hatékonyabbá tehető. A posztischémiás védelem azért lehetséges, mert ischémiát követően a *Fas* expressziója fokozódik, ami lehetőséget jelent a terápiás beavatkozás számára.

III/ Alloantigén függő tényezők szerepének vizsgálata (¹⁰, ¹¹, ¹², ¹³)

A progresszív glomeruloscleoris kialakulása hiperfiltráló vesékben számos humorális és hemodinamikai faktorra vezethető vissza, például adhézis molekulák fokozott expressziójára, majd a leukocyták károsodott szövetbe történő infiltrációjára. A mikofenolát mofetil (MMF), egy új immunszuppresszáns hatóanyag, szelektív módon gátolja a lymphocyták proliferációját, továbbá, *in vitro* csökkenti az adhézis molekulák expresszióját (126). Tanulmányunkban azt vizsgáltuk, miként befolyásolja a rövidtávú

¹⁰ Hamar P, Lipták P, Heemann U, Iványi B Ultrastructural analysis of the fisher to lewis rat model of chronic allograft nephropathy Transplant Int **2005** 18: 863-870

¹¹ Müller V; Hamar P; Szabó A; Vogelsang M; Philipp Th; Heemann U: In-vivo migration of lymphocytes in chronically rejecting rat kidney allografts. Transplant Int **1999** 12: 145-151

¹² Müller V; Hamar P; Szabó Attila; Knust E; Vogelsang M; Heemann U: Effect of Mycophenolate Mofetil on the in-vivo infiltration of lymphocytes in the rat remnant kidney. Transplant P **1998** 30:982

¹³ 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. Transpl Immunol **1996** 4: 64-67

MMF előkezelés hiperfiltrációs patkánymodellben a lymphocyták *in vivo* migrációs mintázatát.

Feltételezések szerint, a CAN-t a jelenlévő alloantigén ellen folyamatosan zajló - sejtközvetítette kilökődési reakció, szakaszosan vissztérő akut rejekciós események, vagy a graft endothelsejteket aktiváló és nem specifikus gyulladásos választ indukáló, alloantigéntől független folyamatok okozzák. Azonban, a CAN-ban az alloantigéntől függő és attól független események relatív részvétele nem tisztázott.

A CAN kialakulásában résztvevő, vagy azt leginkább okozó egyik faktor az alloimmun károsodás. Emberi CAN-on végzett megfigyelések felvetik, hogy lehetséges lehet a CAN alloantigéntől független folyamatait a krónikus alloimmun károsodásra jellemző változásokat valamint a veseallograft egyéb betegségeit egymástól elkülöníteni. Három, külön-külön, vagy kombináltan jelentkező laesio jelzi az alloimmun károsodás jelenlétét: transzplantációs capillaropathia (126), transzplantációs glomerulopathia (127), és transzplantációs arteriopathia (a meghatározásokat lásd az 6. Táblázatban, illusztrációk: a **20. ábra/a-d**) (128). A transzplantációs capillaropathiát és a transzplantációs glomerulopathiát legjobban elektronmikroszkóppal (EM) lehet azonosítani. Az allograft veseszövetek ultrastrukturális vizsgálatának meg van az az előnye, hogy így fel lehet ismerni az endothelsejtek és/vagy tubuláris epithelsejtek érintkezéstől függő (contact dependent) T-sejt citotoxicitásának előfordulását (**20. ábra/e**). A folyamatban lévő, vagy ismétlődő alloimmun károsodásnak egyik fő célpontja a graft erezete. A transzplantációs capillaropathia, transzplantációs glomerulopathia és a transzplantációs arteriopathia kimutatásának alapján különbséget lehet tenni az alloantigéntől függő és más, alloantigéntől nem függő események között, és ennél fogva előre lehet jelezni, legalábbis bizonyos mértékig, az immunsuppressziós stratégiák hatékonyságát.

6. Táblázat

Krónikus rejectio morfológiai jelei emberi vese allograftokban

Artériák

- Transzplantációs arteriopátia
- Intima fibrózis elasztózis nélkül
- ± habosejtek/mononukleáris sejtek az intimában
- ± törések a belső elasztikus laminában
- ± neo-media kialakulása

Glomerulusok

- Transzplantációs glomerulopathia
- A kapilláriskacsok $\leq 10\%$ ában látható dupla körvonalak vagy a GBM duplikációja/multiplikációja legalább három kacsban, EM vizsgálattal látható mesangliális sejt-közbeékelődéssel, vagy anélkül

Peritubuláris kapillárisok:

- Transzplantációs kapillaropátia
- Legalább három profil öt, vagy annál több kerületi bazálmembrán-réteggel (EM vizsgálattal)

EM: elektronmikroszkóp, ± jelen lehet, GBM: glomeruláris bazálmembrán

A krónikus rejectio diagnosztizálható a transzplantációs arteriopathia és/vagy transzplantációs glomerulopathia és/vagy transzplantációs capillaropathia meglétével.

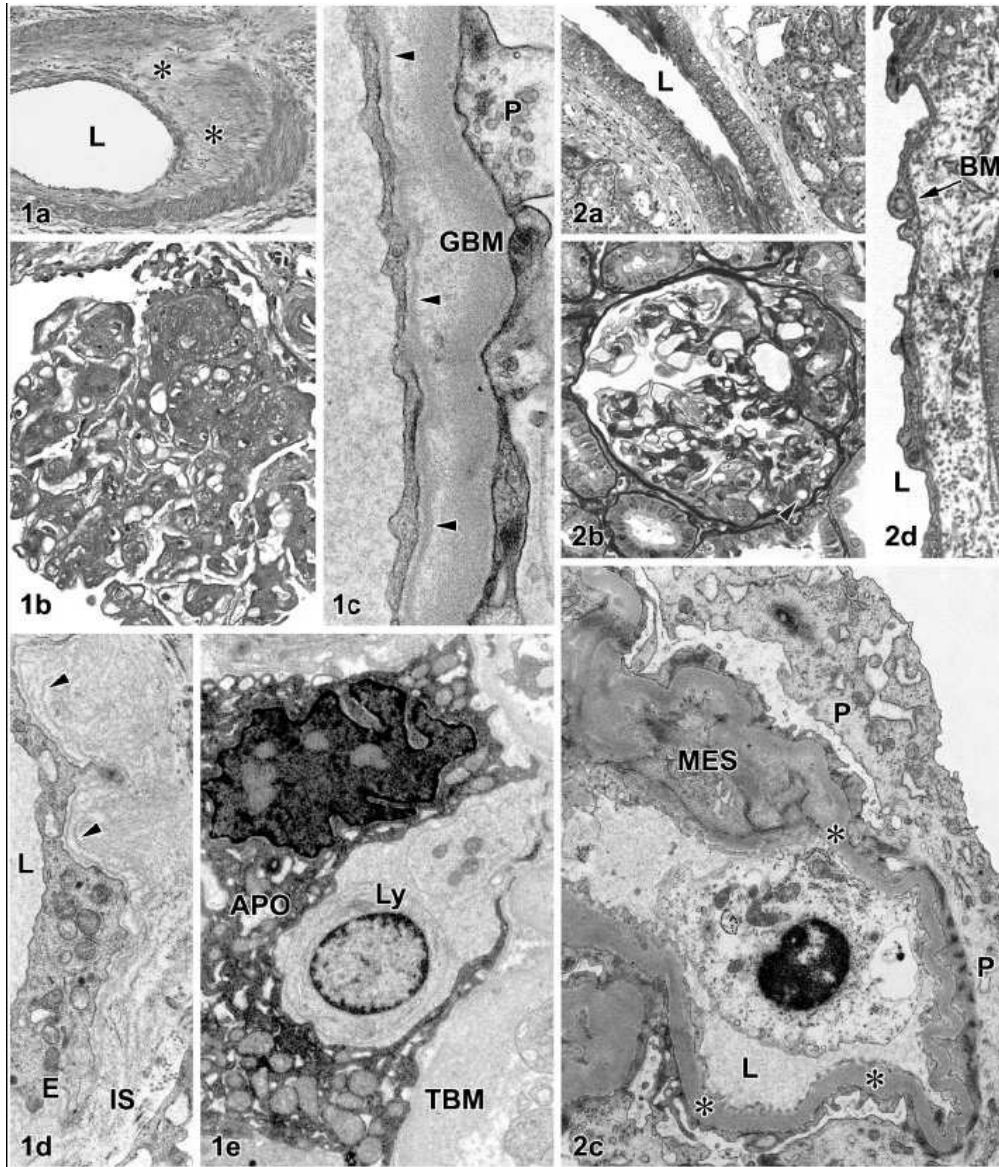
A F344-to-Lew krónikus allograft nefropátia patkánymodelljének ultrastrukturális vizsgálata során célunk az volt, hogy tisztázzuk az alloimmun károsodás részvételét a hosszú időtartamú léziókban. Az F344-to-LEW modellen végzett kísérleteket általában az átültetés utáni 16. és 32. hét között fejezik be. Az átültetés utáni 32. és 53. hét között leölt állatokban szisztematikus ultrastrukturális keresést végeztünk a transzplantációs capillaropathia, transzplantációs glomerulopathia és a T-sejtek által közvetített citotoxicitás jeleit keresve. Kontrollként olyan F344 patkányok szolgáltak, amelyek bal veséjét a jobboldali nefrektómia előtt 30 perces ischemiának vagy álműtétnek tettük ki, majd a jobb veséjüket eltávolítottuk (uninefektómia).

20. ábra (1)

Krónikus veseallograft rejectio léziója emberben.

21. ábra (2)

Az F344-to-Lew modell morfológiája 52 héttel az átültetés után.



20. ábra (1/a) Transzplantációs arteriopathia: az a. arcuata lumenje (L) intima-fibrosis miatt erősen beszűkült (csillagok, trikróm). (1/b) Transzplantációs glomerulopathia: elvékonyodott, kettős kontúrú kapilláris-kacsok, a mesangialis mátrix felszaporodása, és a mesangialis sejtek proliferációja. Megfigyelhető a teljes érintettség (perjód-sav-Schiff, PAS). (1/c) Transzplantációs glomerulopathia: a glomerulusok bázismembránja (GBM) kiszélesedett; új subendothel bázális lamina (nyílhegyek) alakult ki (L, lumen; P, podocyták). (1/d) Transzplantációs capillaropathia: a peritubuláris kapilláris endotheliuma (E) elvékonyodott és nem fenestrált, sejtalakja az interstitium felé fogazott. A bázismembrán (nyílhegyek) több, mint 7 rétegű (L, lumen; IS, peritubuláris interstitium). (1/e) Apoptózisos (APO) tubuláris sejtek a tubulus falához rögzült lymphocyták mellett (Ly; TBM, tubuláris bázismembrán).

21. ábra (2/a) Az arteria intima-fibrosistól mentes (perjód-sav-Schiff, PAS; L, lumen). (2/b) Nem specifikus göcs-szegmentális glomerulosclerosis; a nyílhegy subendothel hyalinlerakódásra mutat (PAS). (2/c) A glomerulus bázismembránja (csillagok) normálisnak tűnik; a podocyták lábnyúlványai (P) nem látszanak (L, lumen; MES, mesangium). (2/d) Normális peritubuláris kapilláris (L, lumen; BM, kapilláris bázismembrán).

Eredmények

Fénymikroszkópia

Tx állatok

Sem transzplantációs artheriopathiát sem transzplantációs glomerulopathiát nem találtunk (21. ábra (2)/a,b). FSGS-t (21. ábra (2)/b) figyeltünk meg, amelyben subendotheliális vagy luminalis hyalinlerakódások és a podocytaiban hyalincseppek voltak láthatók. A mezangium (MES) enyhe-mérsékelt szaporlutatot mutatott, amely elsődlegesen a Bowman-tokhoz gócosan letapadt glomeruláris kapillárisok területére lokalizálódott. Enyhe, gócos-szegmentális mesangialis hipercellularitást is megfigyeltünk. Nagy mennyiségű hyalincseppeket vettünk észre a proximális tubulusok epithelsejtjeiben. Gócos, a corticalis interstitium akár 25%-át érintő, főként periarterialis interstitialis mononuklearis infiltrátumokat, néhány tubulus-metszeten tubulitist, a tubulusfalban egy-öt limfocitával, a corticalis terület 25%-át meg nem haladó, gócos interstitialis fibrosist, és a cortex tubuláris profiljai területének kevesebb, mint 25%-át érintő gócos tubuláris atrófiát találtunk (7. táblázat).

7. táblázat

Szöveti paraméterek.

Csoport	Idő (hetek)	GH (%)	FSGS (%)	MES (%)	TI pontszám
Tx/32 hét	32	72 ± 21*	58 ± 15*	29 ± 9*	8 ± 2.4*
preterminális					
Tx	52	70 ± 19*	47 ± 5*	17 ± 5*	5 ± 1*
	40	12 ± 7**	15 ± 2*	5 ± 2*	3 ± 1*
Rnx + bal	52	27 ± 5	17 ± 7	3 ± 2	2 ± 0
ischaemia					
	40	7 ± 5	2 ± 2	3 ± 4	1 ± 1
RNx	52	8 ± 2	3 ± 5	2 ± 2	1 ± 1
	40	3 ± 3	0	0	0

* $P < 0.05$ versus mindkét kontrolcsoport, ** $P < 0.05$ versus RNx, de nem szignifikáns, versus jobb Nx + bal ischaemia.

Tx: transzplantált vesék 32, 40 és 52 héttel az átültetés után; Tx/32 hét preterminális: Tx/32 állatok, preterminális betegség funkcionális és morfológiai jelei; RNx + bal ischaemia: patkányok, amelyek jobb veséjét eltávolítottuk és a bal veséjüket 30 perces ischaemiának tettük ki; RNx: jobb oldali nephrectomiás patkányok; GH: glomerulus hyalosis; FSGS: gócos-szegmentális glomerulosclerosis; MES: mesangliális mátrix kiterjedése; TI pontszám: tubulointerstitialis változások: tubulitis, tubuláris sorvadás, interstitialis beszűrődés, és fibrosis.

Alloimmun-független állatmodellek

A Tx állatokhoz képest a két csoportban talált morfológiai elváltozások enyhébbek voltak (7. táblázat).

Elektronmikroszkópia

Tx állatok

A 32., 40. és 52. héten a glomeruláris profilok száma vizsgált állatonként 13, 13 és 6 (medián; tartomány: 4-13), és az egy vizsgált állatra eső peritubuláris profilok száma 21 (medián; tartomány: 20-22), 17 (medián; tartomány: 11-21) és 37 (medián, tartomány: 25-50) volt.

Glomerulusok: Számos profil mutatott gócos-szegmentális elváltozást, MES-expanzióval, a mesangialis sejtek cytoplasma nyúlványainak számbeli növekedésével (2c. Ábra), a kapilláris kacsok Bowman-kapszulához való kitapadásával, esetenként a kapilláris kacsok solidificációjával, a Bowman-tok bazálmembránjának multilamellációjával, és az összeomlott szegmensek felett a podocyt lábnyúlványok elválásával (footprocess effacement). A podocyták cytoplasmájában proteinszerű anyaggal töltött vacuolumokat találtunk. Bizonyos területeken nagy, subendotheliális, homogén, mérsékelten denz, elszigetelt lerakódások voltak megfigyelhetők, és a lerakódásokhoz közeli sejtek nagy, lipid- és proteincseppekből álló vacuolumokat tartalmaztak. Újonnan kialakult, a transzplantációs glomerulopathiánál megfigyeltekhez hasonló, a kapilláris kacs teljes kerületét érintő, subendothelialis bazális laminát nem találtunk.

Peritubuláris kapillárisok: A legtöbb profilban nem volt figyelemreméltó változás (21. ábra (2)/d). Igen ritkán a kapillárisok bazális membránja szegmentálisan megkettőződött a kapillárisprofil széles, interstitiális külseje mentén, amely egyébként emberekben a peritubuláris kapillárisok normálisnak tekintett mintázata. Transzplantációs capillaropathiát nem találtunk. Folyamatban lévő gyulladásos választ, azaz a peritubuláris kapillárisok endothesejtjeinek aktiválódását (129) – amely sejtes hypertrophiaként jelenik meg - a fenestratio eltűnését, a lymphocyták és mononucleáris sejtek fokozott kitapadását az endothel réteghez, és a gyulladásos sejtek transzkapilláris vándorlását, nem figyeltünk meg.

Interstitium, tubulusok, arteriolák és artériák: Lymphocyták és mononucleáris sejtek részvételével zajló enyhe és gócos interstitiális gyulladást találtunk. A tubulusok falán belül nem volt gyakori a lymphocyták előfordulása (egy sejt/profil). A szomszédos epithelsejtekben nem találtunk T-sejt által közvetített citotoxicitásra utaló jeleket. Proteincseppek voltak jelen a proximális tubulusok epithelsejteiben. Az elváltozásokat nem specifikus gócos tubuláris sorvadás és az interstitiális kollagénrostok gócos felszaporodása tette teljessé. A kis artériák és arteriolák profiljai normálisnak látszottak.

Alloimmun-független állatmodellek

A 40. és 52. héten, állatonként legalább 3 glomerulus- és 15 peritubuláris kapilláris profilt analizáltunk. A glomerulusokban és TI-ban bekövetkezett változások megfeleltek a fénymikroszkópos vizsgálatban találtaknak. A glomerulusokban nem voltak subendotheliális lerakódások, és a Tx állatokban megfigyeltekhez képest a gócos-szegmentális változások szignifikánsan kevésbé voltak gyakoriak. A peritubuláris kapillárisok, arteriolák és kis artériák normálisnak tűntek.

Funkcionális vizsgálatok

A teljes követési periódus alatt a csoportok közötti testsúly-különbség nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét (8. Táblázat). A veseműködés is (a vizsgálat végén a szérum-kreatinin és a kreatinin clearance meghatározásával) hasonló volt. Ezek az értékek a normális tartomány felső részébe estek. Egyedül a BUN szint mutatott kóros értékeket, azaz szignifikánsan magasabb volt a Tx állatokban, mint az alloantigéntől függetlenül károsodott csoportokban. Az idő előrehaladtával az összes állatban fokozódott a proteinuria (22. ábra). A Tx állatokban azonban az 50 mg/24 h proteinuria-szint a 12. hétre már kialakult, és a vizsgálat hátralévő időszakában szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollokban. A vizsgálat végén a Tx állatokban a proteinuria szintje meghaladta a 250 mg/24 h csúcserőértéket, míg ezzel szemben a kontroll csoportokban 100 mg/24 h alatt maradt ($P < 0.01$). A vérnyomás a felső-normális értéken maradt az 52. hétig. Az átlagos arteriális vérnyomás a Tx állatokban volt a legmagasabb, azonban a csoportok közötti eltérések nem voltak szignifikánsak (8. Táblázat).

8. Táblázat

Funkcionális adatok az operáció után 32, 40 és 50 héttel.

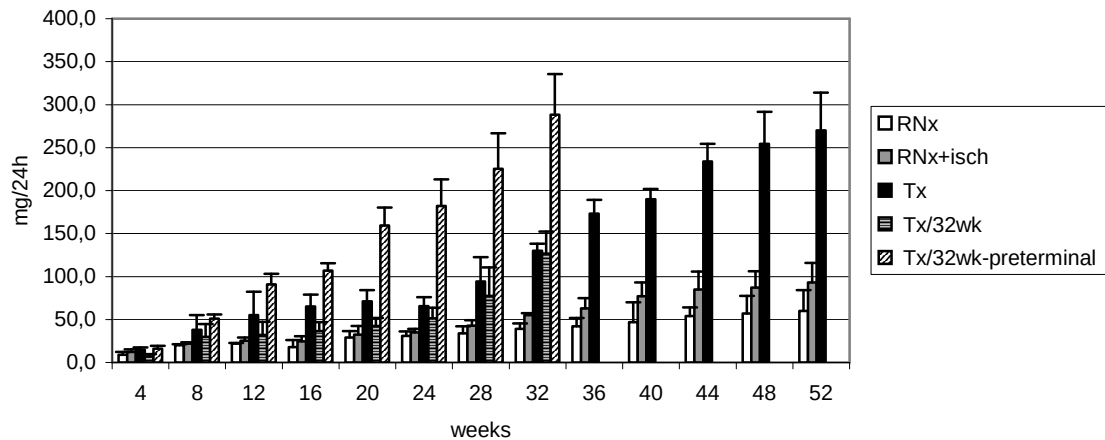
Paraméter	Csoport					
	Tx/32 Hetek	Tx/32 hét preterminalis	Tx/40 hetek	Tx/52 Hetek	Rnx + bal ischaemia	RNx
Testsúly (g)	418 ± 33	432 ± 1245	432 ± 12	455 ± 24	447 ± 6	474 ± 31
Vérnyomás (Hgmm)	107 ± 11.2	120 ± 21	110 ± 7.9	114 ± 13.3	108 ± 13.9	108 ± 13.9
Szérum kreatinin (mg/dl)	1.4 ± 0.08	2.1 ± 0.09*	1.4 ± 0.01	1.2 ± 0.051.2	1.2 ± 0.05	1.2 ± 0.07
Kreatinin clearance (ml/min)	0.8 ± 0.08	0.5 ± 0.06*	0.9 ± 0.04	1.0 ± 0.02	1.0 ± 0.05	1.0 ± 0.02
Vér urea nitrogén (mg/dl)	22 ± 3.3	32 ± 4.6*	20 ± 1.8	24.1 ± 2.3*	18 ± 2.1	15.4 ± 1.2

* $P < 0.05$.

Tx: transzplantált állatok 32, 40 és 52 héttel az átültetés után; Tx/32 hét preterminalis: preterminalis állapotban lévő állatok a Tx/32-ből; Rnx + bal ischaemia: patkányok, amelyek jobb veséjét eltávolítottuk, és a bal veséjüket 30 perces ischaemiának tettük ki; RNx: jobb oldali nephrectomián átesett patkányok

22. ábra

Vizeletbe kiválasztott protein 24 órás vizeletminták esetében (U_{prot} (mg)/ 24 h;



$P < 0.05$ transzplantált állatok vs. 12. héten vizsgált kontrollok. Tx, F344-to-LEW allograftok; Tx/32 hetek, a 32. héten leölt állatok; Tx/32 preterminális, a legsúlyosabban érintett állatok a Tx/32-es csoportból; RNx, jobb nephrectomia; RNx + isch, jobb nephrectomia és a bal vesét ért 30 perces ischaemia.

Megbeszélés

A krónikus allograft nephropathia (CAN) a veseátültetés utáni graftvesztés vezető oka. A folyamatban alloantigéntől függő faktorok mellett az alloantigénnel szembeni immunválasztól független faktorok is részt vesznek. Munkánk célja az volt, hogy a CAN F344-to-LEW allograft modelljében tisztázzuk az alloimmun károsodás jelentőségét. E modell az alloantigénekre nézve jól egyező törzsek közötti vesetranszplantációt tükrözi vissza. Az átültetés után a recipiens állatok folyamatos immunszuppressziója nem szükséges.

A modellben vizsgálatunk során megfigyelt sajátságok közé tartozik a jelentős mértékű proteinuria, enyhén megemelkedett BUN szint, normális szérum-kreatinin szint, normotensio, és gócos-szegmentális glomerulopathia. Emberekben a CAN folyamatos immunszuppresszió mellett, rossz HLA (emberi leukocita antigén) egyezést mutató recipiensekben alakul ki. Az allograft-biopsziában ki lehet mutatni a transzplantációs capillaropathiát, transzplantációs glomerulopathiát és a transzplantációs arteriopathiát, vagy ezek kombinációját. E léziók a folyamatban lévő, szubklinikai alloimmun károsodás klinikopatológiailag igazolt indikátorai (130,131). A F344-to-Lew modellen a szervátültetés után rövid idővel végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a graft pusztulásában alloantigéntől függő folyamatok vesznek részt. Eszerint, az átültetés utáni első 12 hét során a graftba beszűrődő, aktivált lymphocyták figyelhetők meg (132). Alloantigén-specifikus antitesteket a közelmúltban írtak le, és a kezdeti immunszuppresszió megszüntetése

felgyorsítja a graft elvesztését (130), míg a donortörzsbe történő korai visszaültetés megakadályozza a krónikus rejekciót. A 16. hét után végzett visszaültetés azonban nem változtatja meg a CAN klinikai lefolyását (37). Így, feltételezhető, hogy bár az alloantigéntől függő folyamatok fontos szerepet töltenek be a CAN beindításában, a késői fázisban valószínűleg mégsem vesznek részt a folyamatban.

Míg a F344-to-LEW modellben a peritubuláris és glomeruláris kapillárisokat korábban nem vizsgálták a fent említett microvascularis marker léziók jelenlétére vagy hiányára, jelen tanulmányunk célja olyan, meggyőző erejű bizonyítékok kimutatására irányult, amely az F344-to-LEW modellben alátámasztja az alloimmun kérosodás részvételét a CAN késői fázisában.

A rejekciót jelző patológiai leletek gócos eloszlásúak; ezért a vizsgálat során a mintavételi hibák elkerülésére különös figyelmet fordítottunk. Félvékony metszeteken transzplantációs capillaropathiát kerestünk, és nagyszámú peritubuláris kapillárist vizsgáltunk ultrastrukturálisan. Zajló peritubuláris kapilláriskárosodásra utaló transzplantációs capillaropathiát, vagy három-négy körkörösén megtöbbszöröződött bazálmembránréteggel rendelkező peritubuláris kapillárisprofilt nem találtunk. További erőfeszítéseket tettünk elegendő számú glomerulus vizsgálatára azért, hogy ne maradhasson észrevétlenül a transzplantációs glomerulopathia: a glomeruláris bazálmembrán (GBM) megkettőződése. Az eredmények negatívak voltak. Továbbá, a teljes veséket fénymikroszkóppal is átvizsgáltuk transzplantációs arteriopathiát keresve, de az eredmények itt is negatívak voltak. Enyhe intersititalis beszűrődések, és alkalmanként, tubulitis volt található a szövetmetszeteken. Annak meghatározására, hogy ezen elváltozások zajló celluláris alloimmun-válasz részét képezi-e, T-sejt citotoxicitásra utaló jeleket kerestünk, de az eredmény ekkor is negatív volt. Az adatok jelzik, hogy a 32. és 52. hét között nem volt krónikusan aktív alloimmun károsodás. Az elváltozások leginkább a glomeruláris hiperfiltrációs károsodásnál megfigyeltekre emlékeztettek (133). A funkcionális és morfológiai károsodások azonban a Tx állatokban súlyosabbak voltak, mint az RNx állatokban, vagy az ischaemiát követően a F344 patkányok veséiben, ami jelzi, hogy az allograftokkal kapcsolatos kezdeti károsodás súlyosabb volt, mint önmagában az ischaemia és reperfusio.

Tilney és munkatársai által közöltek szerint, akut rejectio miatt a CSA-val nem kezelt állatokban 100%-os pusztulás, míg a CSA-val kezeltékben 80%-os túlélés volt megfigyelhető (130). Az általuk végzett áramlási citometriás vizsgálatban az immunglobulin (IgM) és az IgG alloantitestek 2-4. héten érték el legmagasabb szintjüket, majd fokozatosan az alapvonalra csökkentek vissza (132). Hasonlóképpen, Joosten és

mtsai a közelmúltban írták le, hogy immunszuppresszióban nem részesült patkányokban az átültetést a donor elleni antitestek megjelenése követte, majd az antitestek a 8. héten eltűntek. CSA-val végzett kezdeti immunszuppresszió lecsökkentette a sejtes alloimmun károsodás mértékét, és teljes mértékben megakadályozta az antitestképződést (130). Így ebben a modellben, feltehetően, a kezdeti immunszuppresszív terápia megakadályozza az alloimmun károsodást a késői fázisban. Továbbá, a F344-to-LEW modellen végzett kísérleteikben – amelyek során különböző időpontokban a graftot visszatranszplantálták a donortörzsbe - Tullius és munkatársai kimutattak egy korai visszafordítható- és egy késői már nem reverzibilis allograft károsodást is (132).

Korábban megfigyeltük, hogy alloantigéntől függő folyamatok interleukin (IL)-2 gátlása révén történő blokkolása F344-to-LEW állatokban egészen a 16. hétig jelentősen lassította az allograft betegség progresszióját, azonban azt követően nagyrészt hatástalan volt (134). Ezen adatok és a jelen vizsgálat megfigyelései felvetik, hogy az F344-to-LEW modellnek két, részben átfedő fázisa van: egy korai fázis, amelyben rejectiók és alloantigéntől független faktorok károsítják a graftot, és ezzel párhuzamosan egy késői fázis, amelyben főként glomeruláris hiperfiltráció működik.

A késői fázisban jelentkező alloimmun károsodás kisebb jelentőségét alátámasztó irodalmi adatok egyre szaporodnak. Ebben a modellben az alloantigéntől független, patogén faktorok közé tartozik az ischaemia (135), fertőzés (134), proteinuria (35), magas vérnyomás (133), agyhalál (19), és leállt szívműködésű donorok (133). A F344-to-LEW allograftokkal kapcsolatos elváltozásokhoz hasonlóak alakulnak ki a F344-to-LEW izograftoknál jelentkező hiperfiltráció eredményeként (20), és a natív postischaemiás F344 veséknél, viszont ilyen elváltozások a Brown-Norway izograftokban nem fordulnak elő (136), ami bizonyíték a törzsspecifikus, alloantigéntől független faktorok szerepére. A hiperfiltrációs károsodás csökkenthető a renin-angiotensin rendszer gátlásával (137). Eszerint, Tilney és munkatársai azt a következtetést vonták le, hogy a F344-to-LEW modellt nagyrészt angiotensin II-től függő mechanizmusok közvetítik (137). Az általunk megfigyelt patológiai változások teljes mértékben alátámasztják ezt a nézetet.

Végeredményben, bár az alloimmun válasz az átültetést követően korán megjelenhet a CAN F344-to-LEW modelljében, a graft erezetében a krónikus alloimmun-károsodás emberi mintákban megfigyelt, jellemző morfológiai jeleit nem tudtuk kimutatni, és a már zajló/aktív alloimmun választ jelző, T-sejtes citotoxicitásra utaló jelet nem találtunk az átültetés utáni 32-52. hét során. A F344-to-LEW allograftokban glomeruláris hiperfiltrációra emlékeztető léziók, és funkcionálisan főként a proteinuria dominált. Ezért felvetjük annak lehetőségét, hogy a CAN F344-to-LEW modelljében az alloantigéntől

függő faktorok nem játszanak fő szerepet a késői fázisban. Így, a modell, a jelenlegi formájában, alkalmas a CAN alloantigéntől független folyamatainak tanulmányozására. A már folyamatos alloimmun-károsodás részvételének tekintetében, az emberi CAN patofiziológiáját illetően kellő óvatossággal lehet következtetéseket levonni.

Szisztémás autoimmunitás vizsgálata lupus nephritis modellben ⁽¹⁴⁾

Az immunválasz fokozott szerepét szisztémás lupus erythematoses egérmodelljében MRL és LPR egerek között végeztünk ortotóp átültetéseket mindkét törzset használva donornak és recipiensnek.

Eredmények

Az LPR recipiens törzsben a donor törzstől függetlenül kifejezettebb gyulladásos beszűrődés (**9. Táblázat**) és keringő antitest szint (**10. Táblázat**) volt megfigyelhető mint MRL kontroll recipiens egerekben. LPR donor vese enyhén fokozta a keringő antitest szintet.

9. Táblázat

Vese szövettani fénymikroszkópos pontozás átültetés után 2 hónappal

Csoport	glomeruláris gyulladás	vasculitis	Intersticiális gyulladás
MRL -> MRL N=6	0.5±0.5	0.1±0.1	0.0±0.0
MRL -> LPR N=6	1.75±0.4	2.1±0.3	2.0±0.3
LPR -> MRL N=6	0.75±0.5	0.75±0.4	0.5±0.5
LPR -> LPR N=6	1.4±0.5	1.6±1.2	1.2±0.5

Pontozási skála: 0-3 (átlag±SEM).

10. Táblázat

SLE antites panel

Csoport	Anti-Sm	Anti-DNS	Anti-histone
mMRL -> mMRL	0.03 ± 0.2	0.2 ± 0.03	0.04 ± 0.01
mMRL -> mLPR	4.9 ± 1.8 ⁺	4.6 ± 0.5 ⁺	2.7 ± 0.9 ⁺
mLPR -> mMRL	0.06 ± 0.1 ⁺	0.5 ± 0.02 ⁺	0.1 ± 0.04 ⁺
mLPR -> mLPR	4.6 ± 0.4 ⁺	4.8 ± 0.6 ⁺	2.8 ± 1.3 ⁺

Átlagos optikai denzitás (OD ±SD) 2 hónappal az átültetést követően Referencia értékek nem lupusos (NMRI) egerekben: Anti-Sm: 0.01 ± 0.1 Anti-DNA: 0.1 ± 0.02 Anti-histone: 0.02 ± 0.01. *: p<0.01 vs. fMRL -> fMRL. ⁺: p<0.05 vs. mMRL -> mMRL

¹⁴ **Hamar P**, Wang M, Godó M, Kökény G, Ouyang N, Heemann U Lupus nephritis reoccurs following transplantation in the lupus prone (lpr) mouse. *Lupus* **2009 nov 27**. [Epub ahead of print]

Megbeszélés

Az LPR vese eltávolítása az autoimmune környezetből jelentősen csökkentette a vese gyulladásos beszűrődését. Ugyanakkor az MRL vesékben az LPR környezetben nefritis alakult ki. Mindezek alapján modellünk alkalmas a szisztémás autoimmun folyamatok tanulmányozására, de a lupus nephritis vese-specifikus folyamatai nem befolyásolják számottevően a gyulladásos folyamatokat ebben a modellben.

Lymphocyta adhézió alloimmun károsodástól mentes (szubtotális nefrektómia) modellben (11,12)

Mivel aF344-to-LEW allograft modellben nem láttunk folyamatos alloimmun károsodásra utaló jelet, ugyanakkor a krónikus allograft nephropátia ezen modelljében folyamatosan kimutatható a graft lymphocytás beszűrődése, kíváncsiak voltunk az infiltráló lymphocyták sorsára, alloimmun folyamattól biztosan mentes modellben. Ezért 5/6 nephrectomiát követően tizenhat héttel vizsgáltuk a lymphocyták elhelyezkedését radioaktív jelöléssel és immunhisztokémia segítségével a maradékvesében, a jelölt lymphocyták beadását követő különböző időpontokban, Vizsgáltuk továbbá, a lymphocyta adhéziót gátló mycophenolat mofetil (MMF) és egy a lymphocyta adhéziót nem befolyásoló immunszuppresszáns (tacrolimus: FK506) kezelés hatását a lymphocyta maradvány vesébe vándorlására.

Eredmények

Valamennyi állatban szignifikáns proteinuria volt kimutatatható a naiv kontrollokhöz képest (116 ± 17 mg/nap vs 22 ± 8 mg/nap). A jelölt lymphocyták nagyobb számban vándoroltak a maradványvesébe, mint a naiv kontrollok vesékbe ($0,59 \pm 0,14\%$ vs $0,55 \pm 0,07\%$). MMF előkezelést követően, a lymphocyták akkumulációjának csökkenése volt megfigyelhető a vesékben ($0,56 \pm 0,12\%$), míg az FK 506 értékelhetően nem befolyásolta a folyamatot ($0,59 \pm 0,12\%$).

A vesék immunhisztokémiai analízise a radioaktivitás alapján meghatározott lymphocyta-infiltrációs mintázatot alátámasztotta. A maradványvesékben nagyobb számban voltak lymphocyták ($19,0 \pm 1,6$ vs $11,3 \pm$ sejt/FV) valamint monocyták/makrofágok ($14,0 \pm 1,6$ vs $7,4 \pm 1,4$ sejt/FV) megfigyelhetőek, mint a naiv állatokéban. Bár az infiltráló leukocyták teljes száma az 5/6 nephrectomizált csoportokban nem különbözött, az MMF előkezelés az infiltráló sejtek megoszlásának megváltozásához vezetett; a leukocyták perivascularis és periglomerularis infiltrációja az FK 506-al vagy vehikulummal kezelt állatokhoz képest szignifikánsan csökkent. Ezen felül, az ICAM-1- és VCAM-1-expresszió az 5/6

nephrectomizált vesékben fokozódott a naiv kontrollokban megfigyelt minimális szintekhez képest. Az MMF előkezelés az ICAM-1-expressziót az FK 506-al vagy vehikulummal kezelt csoportokban tapasztaltakhoz képest szignifikánsan csökkentette, a VCAM-1-expressziót azonban nem befolyásolta.

Megbeszélés

A leukocyták vesekárosodást előidőző hatása ismert. Okozhatnak glomeruláris diszfunkciót, stimulálhatják a gyulladásos választ, és döntő szerepük lehet a glomeruláris károsodás mértékének meghatározásában (138). Az 5/6 nephrectomiával indukált hiperfiltráció aktiválja a vasculáris endotheliumot, stimulálja több adhézis molekula szintézisét, következésképp, leukocytá-infiltrációt idéz elő a szövetben (139). A fentieknek megfelelően, a működőképes veseszövet mennyiségének csökkenése a vesefunkció romlásához vezetett, és mononukleáris sejtek fokozott infiltrációjával társult. Eredményeink szerint, akár rövidtávú MMF kezelés is csökkenti az ICAM-1-expressziót a patkány maradányvesében, következésképp, mérsékli a lymphocyták migrációját a szövetbe.

IV/ A vesefibrózis progressziójának terápiás befolyásolása

A krónikus allograft nefropátia, a vesefibrózis egy speciális formája. Átaltalánosságban, a végstádium-vesét eredményező progresszív vesebetegségek során legtöbbször megfigyelhető a vese krónikus hegesedése, fibrózisa, amit glomeruláris szklerózis is kísér. A vesefibrózis egyetlen széles körben elfogadott, és klinikai gyakorlatban alkalmazott kezelése, mely képes a folyamat lassítására a renin-angiotensin rendszer gátlása.

A renin angiotensin rendszer szerepe ^(15, 16, 17, 18, 19)

A krónikus allograft nefropátiát rendszerint az allogén szövetre adott ismételt, enyhe válaszreakciónak tekintik, mint azt a bevezetőben ismertettem, alloantigéntől független

¹⁵ Kökény G; Németh Z; Godó M; **Hamar P** The Rowett rat strain is resistant to renal fibrosis. Nephrol Dial Transpl **2009 dec. 22** [Epub ahead of print]

¹⁶ **Hamar P**; Kökény G; Lipták P; Krtül J; Adamczak M; Harbi NA; Groß ML; Ritz E Reduction of sympathetic activity provides further benefit in subtotally nephrectomised animals treated with ACE inhibitors. Nephron (Exp Neph) **2007** 105: 124-136

¹⁷ Szabó A; Lutz J; Schleimer K; Antus B; **Hamar P**; Philipp Th; Heemann U: Effect of ACE inhibition on growth factor mRNA in chronic renal allograft rejection in the rat. Kidney Int **2000** 57: 982-991

¹⁸ **Hamar P**; Peti Peterdi J; Rázga Zs; Kovács G; Heemann U; Rosivall L: Coinhibition of immune and renin-angiotensin systems, reduces the pace of glomerulosclerosis in the rat remnant kidney J Am Soc Nephrol **1999** 10: s234-238

¹⁹ Schleimer K; Szabó A; Müller V; **Hamar P**; Heemann U; Eigler FW: Effect of the ACE inhibitor enalapril on development of chronic rejection after orthotopic rat kidney transplantation. Langenbecks Arch Surg **1997** 114: 279-83

faktorok szintén hozzájárulhatnak a krónikus allograft nefropátia patogeneziséhez. Ilyen faktorok többek között a sebészeti trauma, iszkémiás/reperfúziós sérülés, citomagalovírus-fertőzés és a donor életkora (17,24).

Az etiológiától függetlenül, ezek a tényezők hozzájárulnak a nefronok számának pusztuláshoz az átültetett vesében, ami a maradék nefronok hiperfiltrációjához vezet (51). A glomeruláris kapilláris véráram és kapilláris nyomás emelkedése a glomeruláris filtrációs ráta (GFR) kifejezett növekedését eredményezi. A hiperfiltráció endoteliális aktiválódáshoz vezet. A lokális (endoteliális) és szisztémás renin-angiotenzin rendszer aktiválódása poszt-transzplantációs hipertenziót okoz.

Az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) gátlószereivel történő kezelés késlelteti a vese tubulo-intersticiális fibrózist és glomeruloszklerózist krónikus vesebetegségben hipertenziós betegeknél (hipertenzív nefropátiában), vagy vese-transzplantáció után (140). A renin-angiotenzin rendszer (RAS) vérnyomástól független szerepe a veseműködés progresszív károsodásában jól alátámasztott állat kísérletekben [141,142]. Továbbá, vesebetegben az angiotenzin convertáló enzim (ACE) gátlók, valamint az angiotenzin receptor blokkolók (ARB) javítják a progressziót [143,144,145].

A kísérleti modellekben és klinikai vizsgálatokban az ACE-inhibitorok más, antihipertenzív hatóanyagokhoz viszonyított nagyobb hatásosságának valószínű okai, egyrészt az efferens arteriolák angiotenzin-II indukálta ellenállásnövekedés gátlása, másrészt a növekedést és migrációt elősegítő citokinekre gyakorolt hatása (146). Az ACE-inhibitorok terápiás hatása független a szisztémás antihipertenzív hatástól, mivel normotenzív egyéneknél is megfigyelhető (147). Ráadásul krónikus vesebetegségben β -blokkolóknál és kalcium-antagonistáknál hatásosabban csökkentik a proteinuriát, noha vérnyomáscsökkentő hatásuk azonos (144).

A II. angiotenzin a glomeruláris és tubuláris sejtekre növekedési faktorként hat (148), és közvetlenül képes kollagénszintézist indukálni, amely hatást a TGF- β 1 és a PDGF-A közvetíti (146). Ráadásul az angiotenzin-II stimulálja a mononukleáris sejtek mezangiális sejtekhez való adhézióját, és a makrofágok és limfociták kemotaxisát (149). Ezáltal a vesetranszplantált recipiensekben az ACE-gátlás nemcsak hatásosan csökkentheti a szisztémás vérnyomást, de lehet anti-proliferatív és migrációt gátló hatása is, mivel gátolja a citokinek és növekedési faktorok felszabadulását (140,146).

Vizsgálataink célja az volt, hogy meghatározzuk az ACE-inhibitor *enalapril* hatását a krónikus allograft nefropátia előfordulására és progressziójára a *Fischer-to-Lewis* modellben, amely a vese krónikus allograft nefropátiájának standard transzplantációs patkánymodellje. Ezt a modellt tubuláris atrófia, intersticiális fibrózis, a graft artériák

intimájának megvastagodása és súlyos proteinuriával kísért glomeruloszklerózis jellemzi. Továbbá vizsgáltuk az ACE-gátlás növekedési faktorok és citokinek mRNS-expressziójára gyakorolt hatását a krónikus allograft nefropátia patkány modelljén.

Azonban renin-angiotensin rendszer maximális gátlása sem képes megállítani a vesefibrózis progresszióját, ezért újabban a RAAS gátlást más módszerekkel kombinálva igyekeznek hatékonyabbá tenni.

Campese és mtsai (150,151) bizonyították a szimpatikus idegrendszer (SNS) aktivációját vesekárosodás modellben. A dorzális rhizotómia megszakítja felszálló aktiváló jelkiáramlást a veséből, mérsékli a vérnyomás emelkedést és a progressziót. Továbbá a szimpatikus aktivitás gátlása centrális szimpatikus gátlóval (152) vagy β -blokkolóval (153) a vérnyomástól függetlenül gátolja a progressziót maradék vese modellben.

A szimpatikus idegrendszer egyik fő hatása a vesében a juxtaglomeruláris-apparátus (JGA) aktiválása (154). Bizonytalan, hogy a csökkent szimpatikus aktivitás jótékony hatása a juxtaglomeruláris-apparátus csökkent renin szekréciója útján vagy renintől függetlenül következik-e be.

Mostanában hangsúlyozzák, hogy az érvényes kezelési módok közül (beleértve a RAS- és az SNS-gátlást) egyik sem képes a progressziót teljesen hatékonyan, folyamatosan gátolni (155). Ezért úgy gondoljuk, hogy a jövő kezelési stratégiái valószínűleg a kombinált kezelések lesznek, például RAS és SNS vagy ARB (156).

Korábbi kísérleteink során vizsgáltuk, hogy az ACE gátlás milyen adhézios molekula, citokin és növekedési expresszió változtatásával képes a krónikus allograft nefropátia folyamatának befolyásolására. Később az IL-2 szitnéziséét gátló immunszuppresszív terápia és az ACE-gátlás kombinációjának hatékonyságát teszteltük. Újabb kísérleteink során pedig arra kerestük a választ, hogy az ACE gátlás (Quinaprillal) és a dorsalis rhizotómia kombinációja hatékonyabb-e, mint az egyes kezelési módok monoterápia formájában.

Kérdéseink megválaszolására vizsgáltuk a vese morfológiát, a fibrózissal kapcsolatos citokinek (IL-1, TNF- α), növekedési faktorok (TGF- β , PDGF), a nitro-oxidatív stresszt (nitogén-oxid-szintáz izoformák, nitro tirozin) mediátorokat F344-to-Lew illetve maradékvese patkánymodelljén.

Eredmények

Veseátültetést követő ACE-gátlás, F344-to Lew patkány allograft modellben

Funkcionális mérések

A kontrollok esetében szignifikáns és progresszív proteinuria fejlődött ki 16 héttel a veseátültetés után, ezzel szemben az enalaprillal kezelt recipiensekben minimális proteinuria jelentkezett a teljes, 20 hetes utókövetési időszakban (20 hétnél 48 ± 3.6 illetve 23 ± 0.73 mg/24 h, $P < 0.05$; 1. táblázat). A kreatinin-clearance nem különbözött a két csoport között szignifikáns mértékben a 20 hetes utókövetési időszakban (kontroll: 1.5 ± 0.1 ml/min, illetve kezelt: 1.6 ± 0.1 ml/min). Az áloperációnak kitett állatoknál nem fejlődött ki szignifikáns mértékű proteinuria.

11. Táblázat

Proteinuria kontroll- és enalapril-kezelt patkányoknál a transzplantáció után 4-20 héttel

	24 órás fehérjeürítés mg/dl				
Csoport	4 hét	8 hét	12 hét	16 hét	20 hét
Kontroll $N = 10$	$23 \pm 9,2$	$34 \pm 15,7$	$37 \pm 19,8$	$37 \pm 28,9$	$71 \pm 7,3$
Enalapril $N = 10$	$24 \pm 13,7$	$20 \pm 5,7$	$26 \pm 5,7$	$24 \pm 15,1$	$27 \pm 12,2^a$
Áloperált $N = 10$	$16 \pm 4,1$	$13 \pm 2,9$	$19 \pm 4,8$	$23 \pm 3,3$	$25 \pm 8,9$

^a $P < 0,05$ kontroll vs. enalapril

Arteriás középnyomás

Az artériás középnyomás nem volt szignifikáns mértékben eltérő a kontroll- és az enalapril-kezelt állatok között ($94 \pm 10,2$; $90 \pm 8,9$ Hgmm),

Testtömeg

A kontrollok testtömege kissé alacsonyabb volt az enalapril-kezelt állatok tömegénél (419 ± 15 illetve 429 ± 11 g).

Szövettani vizsgálat

Minden graftban a krónikus allograft nefropátiára jellemző elváltozások alakultak ki a megfigyelési időszak alatt, azaz glomeruloszklerózis, intersticiális fibrózis, tubuláris atrófia és a graft artériák intimaproliferációja. A csoportok között azonban a kilökődés jeleinek súlyossága különböző volt; az enalapril-kezelés szignifikáns mértékben enyhítette a krónikus allograft nefropátia tüneteit, különösen a glomeruloszklerózis mértékét (12. Táblázat és 23. ábra).

Glomeruloszklerózis. A glomeruloszklerózis szignifikánsan kifejezettebb volt a kontrolloknál ($26 \pm 1,7\%$), mint az *enalapril*-kezelt állatoknál ($19 \pm 1,8\%$, $P < 0,05$).

Intersticiális fibrózis. A kontroll csoportba tartozó állatok szignifikánsan kifejezettebb fibrózist mutattak, mint az *enalapril*-kezelt állatok ($P < 0,05$). A kontroll csoportban egy állatnál nem jelentkeztek az intersticiális fibrózis jelei. Háromnál 1. fokú, hatnál 2. fokú volt a fibrózis, és egy állatnál sem volt 3. fokú fibrózis. Az *enalapril*-kezelt csoportban öt állatnál nem jelentkeztek az intersticiális fibrózis jelei. Ötnél volt 1. fokú fibrózis, és egy állatnál sem figyeltünk meg 2. vagy 3. fokú fibrózist (12. Táblázat).

Tubulusatrófia. A kontroll csoport tubulusatrófiája súlyosabb tendenciát mutatott mint az *enalapril*-kezelt csoporté. A kontroll csoportban három állatnál nem jelentkezett tubuláris atrófia. Négynél 1. fokú és háromnál 2. fokú volt a tubuláris atrófia. Az *enalapril*-kezelt csoportban öt állatnál nem volt tubuláris atrófia. Ötnél 1. fokú volt, és egynél sem volt 2. vagy 3. fokú tubuláris atrófia (12. Táblázat). Ezek az eredmények a két csoport között statisztikailag nem különböztek.

Intimaproliferáció. A kontroll csoportnál az intimaproliferáció súlyosabb tendenciát mutatott mint az *enalapril*-kezelt csoportban. A kontroll csoportban két állatnál nem jelentkezett intimaproliferáció. Hatnál 1. fokú, és kettőnél 2. fokú intimaproliferációt tapasztaltunk. Az *enalapril*-kezelt csoportban négy állatnál egyértelműen 1. fokú volt az intimaproliferáció, míg a többi graftban nem fejlődött ki. Ezek az eredmények nem voltak statisztikailag szignifikánsak (12. Táblázat).

Immunhisztológia. A 20. héten mindkét csoportban mononukleáris sejt-infiltráció volt látható. A celluláris infiltráció az intersticiális területeken volt a legintenzívebb, különösen a véredények és a glomerulusok körül. Limfociták láthatóak voltak a Bowmann tok körül, de a glomerulusok területén limfociták nem fordultak elő csak makrofágok. Szignifikánsan kevesebb makrofág és limfocita volt a kezelt csoportban, a kontrollokhöz képest (13. táblázat).

A leukociták jelenlétét az adhézións molekulák (ICAM-1, VCAM-1) erős immunreaktív jelei kísérték. Az ICAM-1-szerű immunreaktív szignál túlnyomóan a kiserek, a mezangiális sejtek és a tubuláris epitélsejteken volt kifejezett, míg a VCAM-1-szerű immunreaktivitás a tubuláris epitélsejteken volt a legkifejezettebb. Az *enalapril*-kezelés szignifikánsan csökkentette mindkét adhézións molekula immunreaktív jelét ($P < 0,01$, 3. táblázat). A TGF- β -ra jellemző immunreaktivitást főképp az intersticiális sejteken találtunk a graftban. A TGF- β -immunreaktivitású sejtek száma alacsony volt a kezelt és a kontroll állatoknál; a mérsékelt fibrózist mutató állatoknál több immunreaktív sejt volt a tendencia, és az immunreaktivitás az intersticiális sejtekre korlátozódott a graftban.

Az áloperált állatoknál nem fejlődtek ki krónikus allograft nefropátia szövettani vagy immunhisztológiai jelei.

12. Táblázat

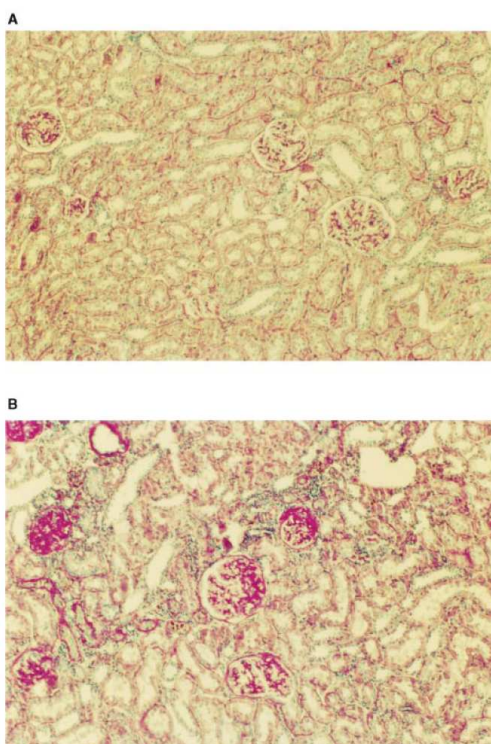
Glomeruloszklerózis, intersticiális fibrózis, vaszkulopátia és tubuláris atrófia a Banff'97 osztályozás szerint

Csoport	Glomeruloszklerózis %	intersticiális fibrózis	Tubuláris atrófia	intimális proliferáció	glomerulopátia
		Grade = N			
Kontroll N = 10	26 ± 1,7	Grade 0 = 1 grade 1 = 3 grade 2 = 6 grade 3 = 0	grade 0 = 3 grade 1 = 4 grade 2 = 3 grade 3 = 0	grade 0 = 2 grade 1 = 6 grade 2 = 2 grade 3 = 0	grade 0 = 4 grade 1 = 4 grade 2 = 2 grade 3 = 0
Enalapril N = 10	19 ± 1,8 ^a	Grade 0 = 5 grade 1 = 5 grade 2 = 0 grade 3 = 0	grade 0 = 5 grade 1 = 5 grade 2 = 0 grade 3 = 0	grade 0 = 6 grade 1 = 4 grade 2 = 0 grade 3 = 0	grade 0 = 5 grade 1 = 5 grade 2 = 0 grade 3 = 0
Áloperált N = 10	5 ± 0,4 ^a	Grade 0 = 9 grade 1 = 1 grade 2 = 0 grade 3 = 0	grade 0 = 10 grade 1 = 0 grade 2 = 0 grade 3 = 0	grade 0 = 10 grade 1 = 0 grade 2 = 0 grade 3 = 0	grade 0 = 9 grade 1 = 1 grade 2 = 0 grade 3 = 0

^a $P < 0,05$ kontroll vs. *enalapril*

23. ábra

Enalapril hatása a glomeruloszklerózis és a sejtinfiltráció kialakulására.



Veseallograft reprezentatív metszetei az *enalapril*-kezelt (A) és kezeletlen (B) állatokból (PAS-festés; x100).

13. táblázat

Limfocita és makrofág infiltráció, és adhéziós molekula (ICAM-1 és VCAM-1) expresszió

	Limfocita	Makrofág	ICAM-1	VCAM-1
Csoport	sejt/látómező		grade = N	
Kontroll N = 10	58 ± 2,5	67 ± 3,4	grade 1 = 1 grade 2 = 2 grade 3 = 7	grade 1 = 1 grade 2 = 2 grade 3 = 7
<i>Enalapril</i> N = 10	46 ± 1,9 ^a	32 ± 2,2 ^a	grade 1 = 4 grade 2 = 4 grade 3 = 2	grade 1 = 4 grade 2 = 5 grade 3 = 1
Áloperált N = 10	12 ± 3,8	15 ± 4,3	grade 1 = 8 grade 2 = 2 grade 3 = 0	grade 1 = 7 grade 2 = 3 grade 3 = 0

^a $P < 0,01$ kontroll vs. *enalapril*; az ICAM-1 és az ICAM-1 közötti eltérések statisztikailag különböznek ($P < 0,01$)

Növekedési faktor mRNS-szintek

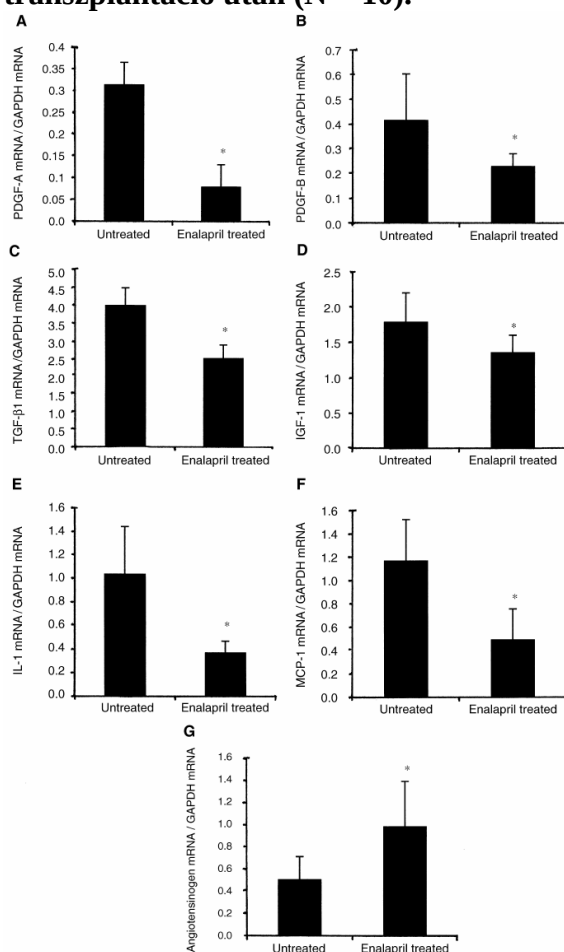
A növekedési faktor mRNS szintek az intersticiális fibrózis és a glomeruloszklerózis kialakulásával és progressziójával párhuzamosan változtak 20 héttel a transzplantáció után. A PDGF-A lánc mRNS-szintje négyszer magasabb volt a kontrolloknál, mint az *enalapril*-kezelt állatoknál. A TGF- β_1 mRNS-szintje az *enalapril*-kezelt csoportban 1,6-szor alacsonyabb volt, mint a kontrolloknál. Ráadásul az *enalapril*-kezelés szignifikánsan (1,5x) csökkentette a PDGF-B-lánc és az IGF-I mRNS-szintjeit is (24. ábra).

Az MCP-1 (a monocita/makrofágokra ható kemotaktikus faktor, amely hozzájárul a krónikus gyulladásos válaszreakciókhoz) mRNS-szintjei szintén szignifikánsan alacsonyabbak voltak az *enalapril*-kezelt csoportban (24. ábra). Az MCP-1 mRNS-szintjei a graftba infiltráló mononukleáris sejtek számával párhuzamosan változott.

A monocita/makrofág termék, az IL-1 β (mely szintén szerepet játszik a szklerózis és a fibrózis kialakulásában) mRNS-ének expressziója szignifikáns mértékben csökkent (2,5x) az *enalapril*-kezelt csoportban, a kontrollokhoz viszonyítva (24. ábra). Amint az MCP-1 esetében is láttuk, a csökkent IL-1 β mRNS-szint a makrofágok alacsonyabb számával függött össze. Az angiotenzinogén mRNS-szintjei szignifikánsan magasabbak voltak az *enalapril*-kezelt állatokban, kontrollokhoz viszonyítva ($P < 0,05$, 24. ábra).

24. ábra

Növekedési faktor és citokin mRNS-szintek allograft vesében 20 héttel a transzplantáció után (N = 10).



(A) vérlemezke-eredetű növekedési faktor (PDGF) A-lánca; (B) PDGF B-lánc; (C) β_1 transzformáló növekedési faktor (TGF- β_1); (D) I. inzulinszerű növekedési faktor (IGF-I); (E) interleukin-1 (IL-1); (F) 1. monocita kemoattraktáns fehérje (MCP-1); (G) angiotenzinogén (* $P < 0,05$).

Eredmények

A szinpatikus aktiváció és a RAS kombinált gátlása szubtotális nefrektómia után

1. Állatok adatai (14. táblázat)

Az operáció időpontjában az állatok súlya mindegyik csoportban hasonló volt. A kísérlet végén az átlagos testsúly szintén hasonló volt. A szubtotális nephrektómi (SNX) állatok szérum kreatinin és urea értékei szignifikánsan magasabbak voltak, az ál-operált állatokhoz képest. A kombinált kezelést kapott állatokban ezek az értékek alacsonyabbak voltak. A két monoterápiával kezelt csoportot összehasonlítva, a rhizotómizált állatok retenciós paraméterei alacsonyabbak voltak. Az SNX állatoknál alacsonyabb hematokrit és magasabb koleszterin értékeket találtuk, az utóbbi főleg a magasabb szérum LDL-koleszterin eredménye volt. Kombinált kezelés mellett mindkét paraméter szignifikánsan

javult. A kísérlet közben egy Sham állat sem pusztult el. A 18 kezeletlen SNX állatból 6, a kezelt csoportokból pedig csak 1-1 állat pusztult el.

14. táblázat

Labor mérések és testsúly a kísérlet végén

	Rhizotomia	Creatinine mg/dl	Urea mg/dl	Hematocrit %	Cholesterol mg/dl	LDL-C mg/dl	HDL-C mg/dl	Testsúly (kezdeti), g	Testsúly leöléskor, g
<i>Sham</i>									
Víz	– (n = 12)	0.4±0.1	40.0±4.3	42.7±3.1	68.8±15.7	9.1±7.1	48.9±8.9	399±12.9	588±46.8
	+ (n = 12)	0.4±0.1	41.8±4.9	44.3±3.4	72.9±10.0	7.4±4.8	51.4±8.5	387±27.8	562±33.1
Quinapril	– (n = 12)	0.4±0.0	51.6±9.1	44.6±3.4	74.3±14.0	10.9±6.8	50.8±10.2	385±14.6	548±21.6
	+ (n = 12)	0.4±0.1	49.6±6.0	40.3±3.3	72.0±18.6	6.1±6.3	53.1±12.3	385±21.4	589±42.9
<i>SNX</i>									
Víz	– (n = 12)	1.0±0.2 ^a	113.1±7.9 ^a	36.1±5.1 ^a	131.3±13.9 ^a	19.1±6.3 ^a	97.9±13.4 ^a	391±12.7	557±27.4
	+ (n = 17)	0.7±0.4 ^b	97.1±15.0 ^b	36.9±3.4	113.3±41.0	16.6±16.6	80.1±28.0	394±26.6	573±33.8
Quinapril	– (n = 17)	0.9±0.01 ^a	123.4±13.9 ^a	37.0±1.5	109.1±21.7	16.4±7.6	80.4±17.4	394±10.3	546±18.6
	+ (n = 17)	0.75±0.3 ^b	106.6±13.4 ^b	38.9±4.4 ^b	100.1±28.7 ^b	13.4±5.0 ^b	77.7±12.9 ^b	382±16.9	522±42.3
ANOVA		p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	n.s.	n.s.

^a p < 0.01 vs. sham + kezeletlen; ^b p < 0.05 vs. SNX + kezeletlen. + = Rhizotomia; – = sham rhizotomia.

2. Albuminuria és vérnyomás (15. Táblázat, 25. ábra)

A kísérlet végén a kezeletlen SNX állatok albuminuriája feltűnően magas volt és szignifikánsan alacsonyabb a csak rhizotómizált állatoknál. Szintén alacsonyabb értéket kaptunk Quinaprillal kezelt SNX állatokban, míg az albuminuria kombinált kezelést (Q+rhizotómia) kapott állatokban volt a legalacsonyabb.

A farokvérnyomás mérő a valósánál magasabb vérnyomásértékeket mér. Korlátozott számú állatnál a vérnyomást telemetriás úton monitoroztuk. A vérnyomás magasabb (25. ábra) volt a kezeletlen SNX és alacsonyabb értékeket a kezelt SNX csoportokban.

15. Táblázat

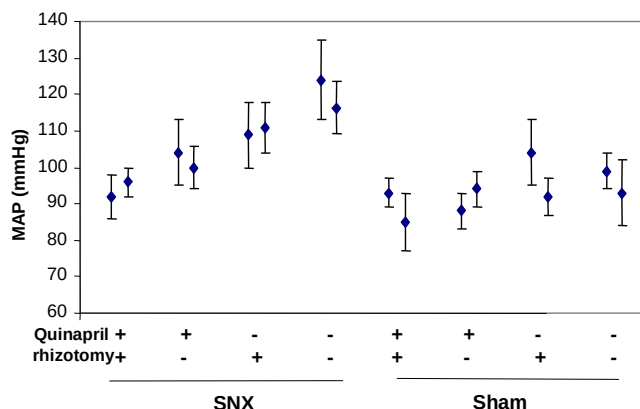
Albuminuria, vérnyomás és testsúlyra vonatkozott vesesúly a kísérlet végén

	Rhizotomia	Albuminuria mg/24 h	Systolés vérnyomás (farok plethysmográfia) Hgmm	vesesúly/ testsúly %
<i>Sham</i>				
Víz	– (n = 12)	4±2	129±12	0.36±0.02
	+ (n = 12)	2±1	125±30	0.41±0.04
Quinapril	– (n = 12)	2±1	115±13	0.33±0.03
	+ (n = 12)	1±1	114±10	0.39±0.03
<i>SNX</i>				
Víz	– (n = 12)	169±75 ^a	162±13 ^a	0.49±0.1 ^a
	+ (n = 17)	86±45 ^b	138±28 ^b	0.45±0.07
Quinapril	– (n = 17)	15±23 ^c	115±12 ^c	0.44±0.09
	+ (n = 17)	5±4 ^{c,d (n.s.)}	112±14 ^{c (n.s.)}	0.42±0.05
ANOVA		p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001

^ap<0.05 vs. sham + kezeletlen; ^bp<0.05 vs. SNX + kezeletlen; ^cp<0.01 vs. SNX + kezeletlen; ^dp < 0.05 vs. SNX + quinapril + sham Rhizotomia. + = Rhizotomia, – = sham Rhizotomia; n.s. = SNX +

25. ábra

Telemetriásan mért vérnyomás



3. Vesekárosodás indexek (16. Táblázat, 26. ábra)

Kezeletlen SNX állatokban a glomeruláris (GSI), tubuláris (TDI), intersticiális (IDI) vaszkuláris (VDI) indexek szignifikánsan magasabbak voltak, mint Sham állatokban. A rhizotómia hatása észrevehető volt a VDI kivételével minden index esetében. A Quinapril monoterápia hatása még inkább feltűnő volt (VDI kivételével), de a kombinált kezelés esetében láttuk a legjobb eredményt ($p < 0.05$).

16. Táblázat

A vesekárosodás morfológiai indexei

	Rhizotomia	Glomerulosclerosis Index	Tubuláris károsodási index	Intersticiális károsodási index	Vaszkuláris károsodási index
<i>Sham</i>					
Víz	– (n = 7)	0.14±0.04	0.55±0.31	0.11±0.14	0.20±0.28
	+ (n = 7)	0.13±0.04	0.26±0.12	0.16±0.17	0.07±0.15
Quinapril	– (n = 7)	0.31±0.19	0.43±0.17	0.14±0.11	0.02±0.05
	+ (n = 7)	0.36±0.17	0.29±0.16	0.08±0.10	0.10±0.14
<i>SNX</i>					
Víz	– (n = 7)	1.40±0.6 ^a	1.82±0.67 ^a	1.78±0.60 ^a	0.42±0.17 ^a
	+ (n = 7)	0.80±0.23 ^b	1.46±0.13	0.75±0.25 ^b	0.40±0.29
Quinapril	– (n = 7)	0.37±0.16 ^b	1.14±0.18 ^b	0.48±0.15 ^b	0.45±0.31
	+ (n = 7)	0.31±0.15 ^{c (n.s.)}	0.55±0.37 ^{c,d (n.s.)}	0.15±0.13 ^{c,d (n.s.)}	0.12±0.05 ^{b (n.s.)}
ANOVA		p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001

^a p < 0.05 vs. sham + kezeletlen; ^b p < 0.05 vs. SNX + kezeletlen; ^c p < 0.01 vs. SNX + kezeletlen; ^d p < 0.05 vs. SNX + quinapril + sham Rhizotomia. + = Rhizotomia; – = sham Rhizotomia; n.s. = SNX + quinapril + Rhizotomia vs. sham + quinapril + Rhizotomia.

26. ábra

Glomeruloszklerózis index és reprezentatív kép minden csoportból

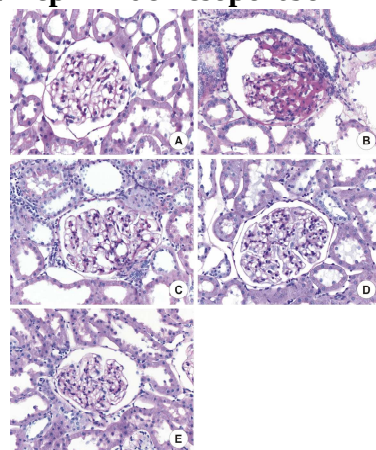
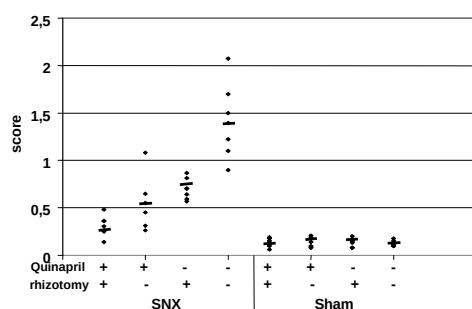


Fig. 3

A: Sham, B: SNX (kezeletlen) C: Quinapril D: Spironolactone E: kombinált kezelés (400x)

4. Sztereológiai eredmények (17. Táblázat)

A SNX következetesen, hasonló mértékben csökkentette a glomerulus számot, amit az SNX csoportok homogenitása bizonyít. A glomerulus térfogat kompenzatórikus megnagyobbodását találtuk minden SNX csoportnál, ami a Quinapril kezeltékben szignifikánsan alacsonyabb volt. A glomeruláris kapillárisok hosszúság denzitása, valamint a maradékvesében mért teljes kapilláris hossz szignifikánsan alacsonyabb volt SNX után, ami jól tükrözi a glomeruloszklerózis következtében létrejövő kapilláris károsodást és obliterációt. A rhizotómia, szemben a Quinaprillal, majdnem teljesen normalizálta a kapilláris hossz denzitást. SNX állatokban a mátrix a tuft szignifikánsan nagyobb részét tette ki, ami az extracelluláris mátrix felhalmozódására utal. A mátrix/tuft arány szignifikánsan csökkent Quinapril kezelésre, a rhizotómiának nem volt hatása.

17. Táblázat

A glomerulusok sztereológia vizsgálata

	Rhizotomia	Glomerular geometry		Glomerular capillaries		Glomerular matrix:
		N _{Glom}	mV _{Glom} , ×10 ⁶ μm ³	length density, mm/mm ³	total length, m	V _{Matrix} , %V _{Tuft}
<i>Sham</i>						
Víz	– (n = 7)	45,011±9,939	2.6±2.2	6.3±1.3	6,925±1,964	13.7±0.8
	+ (n = 7)	49,190±11,343	3.0±1.9	6.5±1.0	7,519±770	16.2±6.7
Quinapril	– (n = 7)	45,030±5,389	2.8±2.5	5.5±1.2	6,072±421	12.9±0.8
	+ (n = 7)	62,020±9,826	2.7±2.3	6.4±0.5	7,580±1,401	13.4±1.2
<i>SNX</i>						
Víz	– (n = 7)	18,024±3,290 ^a	7.3±1.6 ^a	4.3±0.2 ^a	3,906±759 ^a	23.0±1.4 ^a
	+ (n = 7)	19,136±5,180	6.4±2.2	5.1±0.3 ^b	5,302±1,486 ^b	23.6±3.5 ^a
Quinapril	– (n = 7)	23,089±5,959	5.0±3.2 ^b	4.5±0.4	3,653±989	14.9±0.4 ^{b (n.s.)}
	+ (n = 7)	19,896±3,704	4.5±1.7 ^b	5.0±0.7 ^b	5,549±2,208 ^b	14.1±0.8 ^{b (n.s.)}
ANOVA		p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001

^a p < 0.01 vs. sham + kezeletlen; ^b p < 0.05 vs. SNX + kezeletlen. + = Animals with Rhizotomia; – = animals with sham Rhizotomia; N_{Glom} = total number of glomeruli/kidney; mV = mean glomerular volume; n.s. vs. the respective control.

5. A glomeruláris sejtek analízise (18. Táblázat)

Ebben a mérsékelt súlyos vesekárosodás modellben (az endothel sejt szám feltűnően emelkedett kezeletlen SNX állatokban, de szignifikánsan alacsonyabb volt a Quinaprillal kezelt SNX csoportban, de a rhizotómizált SNX csoportban nem. Az endothel sejt térfogat nem változott szignifikánsan. Az SNX csoportokban a mezangiális sejt szám szignifikánsan emelkedett, ezt a Quinapril kezelés csökkentette, de nem normalizálta. A rhizotómia nem volt hatással erre a paraméterre. A mezangiális sejt térfogat nem változott szignifikánsan.

A podocytnak különös figyelmet szenteltünk, mivel jelenlegi ismereteink szerint központi szerepet játszanak a hyperfiltráció glomerulus károsodásban. Az egy glomerulusra eső podocyta szám nem változott a SNX hatására, de a podocyta térfogat jelentősen emelkedett az SNX csoportokban. A podocyta hypertrófiát szignifikánsan csökkentette a Quinapril kezelés, de a rhizotómiának nem volt ilyen hatása.

18. Táblázat

A Glomeruláris sejtek analízise

	Rhizotomia	Endothel sejtek		Mesangiális sejtek		Podocyta	
	I	nr/ glomerulus	térfogat, mm ³	nr/ glomerulus	térfogat, mm ³	nr/ glomerulus	Térfogat, mm ³
<i>Sham</i>							
Víz	– (n = 7)	446±76	181±43	364±84	210±51	109±6	796±7 1
	+ (n = 7)	500±62	166±50	356±42	291±118	106±10	810 ±41
Quinapril	– (n = 7)	490±60	147±51	273±82	279±90	110±4	719±3 9
	+ (n = 7)	511±58	132±11	342±28	258±48	106±2	806±5 9
<i>SNX</i>							
Víz	– (n = 7)	852±128 ^a	177±29	867±211 ^a	311±88	123±3	2,299±146 ^a
	+ (n = 7)	1,018±212	140±49	816±181	239±103	109±1	2,217±149
Quinapril	– (n = 7)	590±78 ^b	173±28	551±70 ^b	250±54	112±6	1,818±171 ^b
	+ (n = 7)	630±13 ^b	161±21	479±86 ^b	300±22	106±3	1,840±80 ^b
ANOVA		p < 0.001	n.s.	p < 0.001	n.s.	n.s.	p < 0.001

^a p<0.01 vs. sham + kezeletlen; ^b p<0.05 vs. SNX + kezeletlen. + = Rhizotomia; –=sham Rhizotomia.

^a p<0.01 vs. sham + kezeletlen; ^b p<0.05 vs. SNX + kezeletlen. + = Rhizotomia; –=sham Rhizotomia.

6. A vesék immunhisztokémiai és real-time PCR analízise

A glomerulusokban emelkedett mennyiségű kollagént (19. táblázat) találtunk, amit a kombinált kezelés szignifikánsan csökkentett. A tubulointersticiális kollagén lerakódást mindegyik kezelés gátolta. Érdekes módon a rhizotómia hatékonyabban, mint a Quinapril monoterápia.

A glomeruláris TGF-β₁ expresziót (17. Táblázat, 34. ábra) egyedül a kombinált kezelés csökkentette, a rhizotómia és a Quinapril (19. táblázat) önmagában nem.

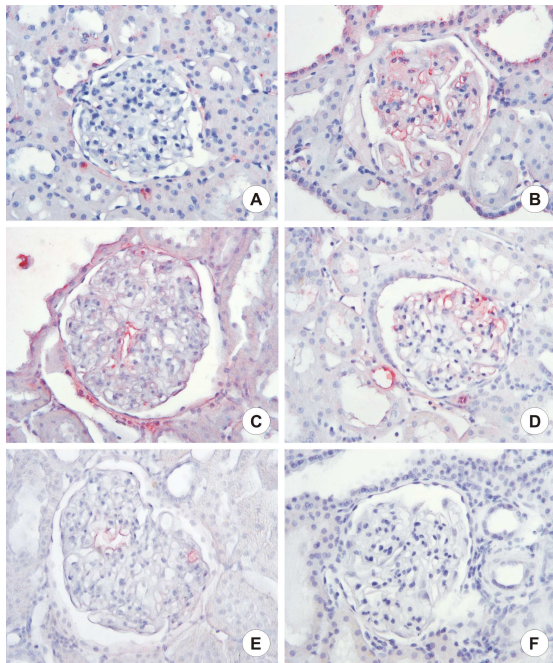
A kombinált kezelés normalizálta a NOS-3 (e-NOS) fehérje expressziót a glomerulusokban, míg a monoterápiák nem (20. táblázat). Hasonló tendenciát találtunk a NOS-3 mRNA expressziójában is, de a csoportok közötti különbség nem volt szignifikáns.

A macula densa sejtjeiben a NOS-1 (nNOS) fehérje expressziója csökkent az SNX állatokban. Ezt a kombinált kezelés normalizálta, monoterápiák nem voltak hatásosak (20. táblázat).

A nitrotirozin (podocyt oxidatív stressz marker) festődés sokkal intenzívebb volt kezeletlen SNX állatok esetében, mint Sham operált állatoknál (20. táblázat, 28. ábra). Itt a rhizotómiának nem volt hatása, a Quinapril kis fokban csökkentette, míg a kombinált kezelés teljesen normalizálta (18. Táblázat) a nitrotyrosin festődés mértékét.

27. ábra

TGF- β 1 immunfestés



A: Sham, B: SNX (kezeletlen) C: Quinapril D: Spironolactone E: kombinált kezelés F: negatív kontroll (400x)

19. táblázat

Fibrózis markerek immunhisztokémiai és real-time PCR analízise

	Rhizotomia	Collagen IV		TGF-β ₁		TGF-β ₁ PCR
		Glomerulus	Interstitium	Glomerulus	Interstitium	
<i>Sham</i>						
Viz	– (n = 5)	0.07±0.05	0.21±0.12	0.08±0.03	0.20±0.05	1.02±0.37
	+ (n = 5)	0.07±0.05	0.24±0.10	0.08±0.02	0.14±0.02	0.80±0.25
Quinapril	– (n = 5)	0.08±0.04	0.20±0.14	0.10±0.02	0.18±0.07	1.02±0.35
	+ (n = 5)	0.07±0.04	0.30±0.10	0.11±0.03	0.22±0.05	1.12±0.37
<i>SNX</i>						
Viz	– (n = 7)	0.6±0.07	0.92±0.17	0.57±0.04	0.49±0.09	3.00±0.60
	+ (n = 7)	0.57±0.07	0.36±0.10 ^c	0.48±0.08	0.45±0.10	1.88±0.70
Quinapril	– (n = 7)	0.20±0.08 ^{a,b}	0.73±0.21 ^a	0.41±0.07	0.46±0.09	1.34±0.37
	+ (n = 7)	0.25±0.06 ^{a,b}	0.45±0.14 ^a	0.32±0.08 ^a	0.42±0.17	1.04±0.30 ^a
ANOVA		p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	n.s.	p < 0.05

^a p<0.05 vs. SNX + kezeletlen; ^b p < 0.05 vs. SNX + víz + Rhizotomia; ^c p < 0.05 vs. SNX + quinapril + Rhizotomia. + = Rhizotomia, – = sham Rhizotomia.

20. táblázat

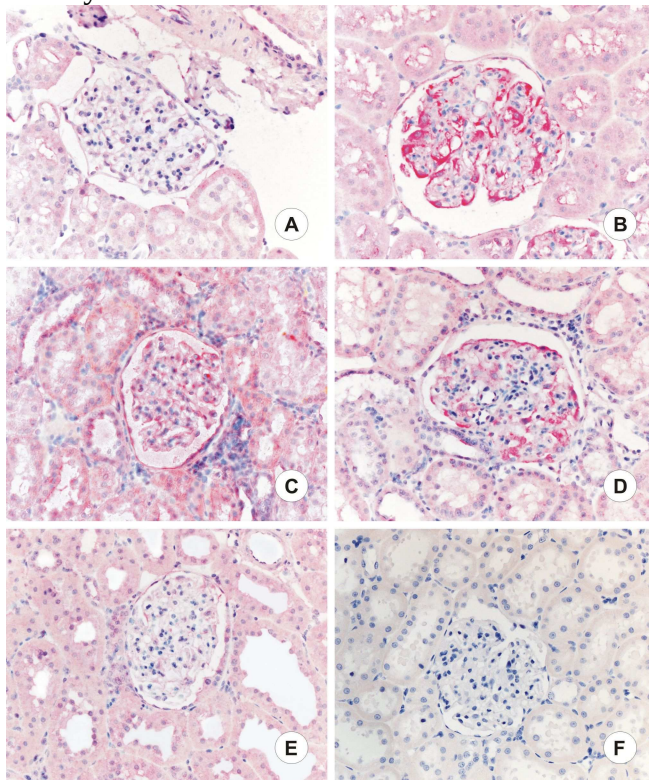
Nitrosooxidatív stressz markerek immunhisztokémiai és real-time PCR analízise

	Rhizotomia	Nitrotyrosine	NOS-1	NOS-3	NOS-3 PCR
<i>Sham</i>					
Viz	– (n = 5)	0.14±0.04	0.58±0.11	0.73±0.13	0.88±0.16
	+ (n = 5)	0.17±0.09	0.72±0.27	0.76±0.09	0.91±0.14
Quinapril	– (n = 5)	0.15±0.03	0.79±0.14	0.77±0.13	0.76±0.32
	+ (n = 5)	0.11±0.04	0.67±0.36	0.79±0.03	0.95±0.17
<i>SNX</i>					
Viz	– (n = 7)	0.98±0.18	1.33±0.09	0.46±0.09	1.33±0.39
	+ (n = 7)	0.89±0.11 ^b	0.84±0.09	0.47±0.18 ^b	0.93±0.12
Quinapril	– (n = 7)	0.66±0.12	0.72±0.04	0.63±0.09	0.98±0.28
	+ (n = 7)	0.50±0.11 ^a	0.65±0.15 ^a	0.80±0.11 ^a	1.00±0.13
ANOVA		p < 0.005	p < 0.005	p < 0.05	n.s.

^a p < 0.05 vs. SNX + kezeletlen; ^b p < 0.05 vs. SNX + quinapril + Rhizotomia. + = Rhizotomia; – = sham Rhizotomia.

28. ábra

Nitrotyrosin immunfestés



A: Sham, B: SNX (kezeletlen) C: Quinapril D: Spironolactone E: kombinált kezelés F: negatív kontroll (400x)

Megbeszélés

Veseátültetést követő ACE-gátlás, F344-to Lew patkány allograft modellben

Az ACE-gátlás vesebetegségekre és krónikus allograft nefropátia gyakorolt kedvező hatását különböző állatmodellekben már igazolták (157). A hatás pontos mechanizmusa azonban nem ismert. Vizsgálataink során a transzplantált patkányvesében ACE-gátlást követően a növekedési faktorok -mRNS szintjének csökkenését mutattuk ki. A kevesebb növekedési faktor temelés a krónikus allograft nefropátia tüneteinek enyhébb megjelenésével társult. A modellünkben a *ciklosporin-A* alkalmazásának igen rövid ideje és alacsony dózisa nagyon valószínűtlenné teszi annak lehetőségét, hogy a megfigyelt hisztológiai változások a *ciklosporin-A* nefrotoxicitásának lenne betudható. Így nem volt meglepő, hogy az áloperált állatoknál a krónikus allograft nefropátia egyetlen tünete sem fejlődött ki. Ez megerősíti korábban publikált kísérleteink eredményeit (158).

Vizsgálataink során a kontroll állatokban masszív proteinuria fejlődött ki 20 héttel a transzplantáció után. Az *enalapril* kezelés hatására a 24 órás fehérjeürítés szignifikánsan csökkent. A megfigyelés háttérében ACE- a glomeruláris sejtekre gyakorolt közvetlen és/vagy intraglomeruláris gátló hatása feltételezhető. Patkányoknál feltételezések szerint az intraglomeruláris hipertenzió indukál fehérjevesztést úgy, hogy a glomeruláris falban nagy,

nonszelektív nyílások képződnek a glomeruloszklerózis kialakulása előtt (159). Mikropunkciós vizsgálatok azt valószínűsítik, hogy a glomeruláris kapilláris hidraulikus nyomását ACE-inhibitorral csökkentve enyhül a proteinuria, a glomeruláris falban a nagyméretű nyílások számának csökkenésével (160). Ezzel a vese megvédhető a további károsodástól, és megelőzhető vesebetegség kialakulása. Ráadásul, Amann és munkatársai szubtotális nefrektómia patkánymodellen kimutatták, hogy az ACE-inhibitorok, ellentétben más, antihipertenzív hatóanyagokkal, megelőzték a proteinuriával szorosan összefüggő podocitakárosodást (43). Lewis és munkatársai krónikus vesebetegségeknél még kifejezettebb proteinuria-csökkentést mutattak ki ACE-inhibitorokkal kezelt betegek esetében, a kalcium-antagonistákkal vagy β -blokkolókkal kezelt betegekhez képest, noha a vérnyomás-csökkentő hatás mindegyik csoportban azonos volt (144).

Kísérleteink során a kontroll csoport egyedeiben progresszív glomeruloszklerózist, és a súlyos makrofág és limfocita infiltrációt figyeltük meg, mind a glomerulusokban, mind az intersticiumban. Ezzel szemben az *enalapril*-kezelt csoportban ezek a változások kifejezetten csökkentek. Ezek a megfigyelések az angiotenzin-II proliferatív és immunmoduláló jeleinek módosulásával magyarázhatóak. Az angiotenzin-II immunszabályozó: leukocita-infiltrációt és a kemotaxist befolyásoló hatása ismert (161). Ruiz-Ortega és munkatársai ACE-inhibitorral, *quinapril*-lal kezelt, immunkomplex-nefritiszos patkányok esetében a glomeruláris és intersticiális infiltráció szignifikáns csökkenését figyelték meg (162). Mindaddig nem tisztázott azonban, hogy az ACE-gátlás hogyan interferál az angiotenzin-II adhéziót elősegítő és kemoattraktáns hatásaival.

Az MCP-1 és a TGF- β_1 a monocita/makrofág rendszer kemotaktikus faktorai közé tartoznak. Mindkettő fő szerepet játszik a krónikus allograft nefropátia kórfolyamataiban és a krónikus gyulladásos válaszreakciókban, amint azt transzplantációs vaszkulopátiában megfigyelték (163). Ráadásul az MCP-1 szintén fokozza az adhéziós molekulák expresszióját, és így lehetővé teszi a monocita-adhéziót. Kísérleteinkben, Nadeau, Azuma és Tilney (163) megfigyeléseihez hasonlóan, az MCP-1 mRNS-szintjeinek progresszív növekedését mértük allograft vesékben, a makrofág infiltrációt megelőzően. Kísérleteink során a hosszú távú *enalapril*-kezelés szignifikáns mértékben csökkentette az MCP-1-expressziót és a TGF- β_1 -szintet. A TGF- β_1 -szerű immunreaktivitás főképp az intersticiális sejtekhez lokalizálódott a graftban. Ezzel párhuzamosan az ICAM-1 és a VCAM-1 expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt az *enalapril*-csoportban. Ezeket az eredményeket szintén magyarázhatja az angiotenzin-II adhézióra, migrációra és a mononukleáris sejtek proliferációjára gyakorolt módosító hatása.

Az ACE-gátlók *in vivo* hatásai közül több is az angiotenzin-II termelés gátlásának tulajdonítható. Kísérleteink során az angiotenzinogén fokozott szintézisét a mértük a kontrollokhöz viszonyítva. Ez a megfigyelés alátámasztja Jonsson, Frewin és Head beszámolóját, akik szintén az angiotenzinogén fokozott szintézisét mutatták ki ACE-inhibitor folyamatos alkalmazása után (164). Így feltételezhetjük, hogy az angiotenzin-I angiotenzin-II formájába való átalakulását az *enalapril* gátolta a kísérleteink során. Az angiotenzin-II az érfal símaizom sejtek (smooth muscle cell:SMC)-proliferációban betöltött szerepe ismert. Az SMC-k növekedése és proliferációja fontos esemény az intimahiperplázia és a korai arterioszklerózis kifejlődésében. Az IGF-1, a PDGF, aTGF- β_1 és az IL-1 fontos SMC növekedési faktorok. Tenyésztett vaszkuláris sejtekben az angiotenzin-II gátlása megakadályozta ezeket a változásokat, és a TGF- β_1 -neutralizáló antitestekkel történő együttes inkubálás megakadályozta az extracelluláris mátrix szintézisét is. Az angiotenzin-II megnövelte a TGF- β_1 látens formából aktív formává való konverzióját és növelte a TGF- β_1 mRNS-szintjét a glomerulusokban (160). Ráadásul, az angiotenzin-II krónikus infúziója megnövelte a glomeruláris kapilláris nyomást és glomeruloszklerózist indukált naiv patkányoknál (165). Ezen irodalmi adatok ismeretében elképzelhető, hogy a glomeruláris kapilláris hipertenzió és a következményes endotélsejt-aktiváció a transzplantált patkányoknál megnöveli a glomeruláris angiotenzin-II-aktivitást és így a TGF- β_1 -expresszót és bioaktivitást. Egy másik vizsgálatban az angiotenzin-II megnövelte a PDGF-A mRNS-szintet a vaszkuláris SMC-kben (166). Mivel a PDGF-A és a TGF- β_1 egymástól függetlenül indukálja más faktorok, mint például az IL-1 expresszióját, ezek a vizsgálatok azt valószínűsítik, hogy a PDGF A-lánca, a TGF- β_1 és az IL-1 a patkány-glomerulusokban összefüggésbe hozható a glomeruláris kapilláris nyomás indukálta angiotenzin-II-aktivitással. A kísérleteink során *enalapril*-kezelésre csökkenő növekedési faktor mRNS-szint - krónikus allograft nefropátiában - alátámasztja ezen hipotézist.

Kimutattuk továbbá, hogy az *enalapril* csökkentette az IGF-I (az SMC-k számára kemoattraktáns molekula, fibrotikus aktivitással) mRNS expresszióját is. Újabban kimutatták, hogy az angiotenzin-II proapoptotikus és antiapoptotikus hatást fejt ki különböző sejtvonalakon, többek között SMC-ken. Továbbá leírták, hogy az ACE-gátlók antihipertenzív és/vagy antihipertrofikus hatásuk részeként fokozták az SMC apoptózist, a vaszkuláris növekedés regressziójával párhuzamosan (167).

Az angiotenzin-II-képződés gátlásán túl, az ACE-gátlás növeli a bradikinin-koncentrációt is, amelyet a nitrogén-monoxid és prosztaglandinok keletkezése követ. Így az ACE-inhibitorok előnyös hatásai nemcsak a vesében érvényesülnek.

Összefoglalva, kimutattuk, hogy az ACE-inhibitor *enalapril* alkalmazása krónikus allograft nefropátiában csökkentette a súlyos proteinuria kifejlődését, enyhítette a morfológiai sérüléseket és csökkentette a leukocita infiltrációt és a növekedési faktorok mRNS-szintjét. A jövőben ez a hatóanyag-csoport hatásosnak bizonyulhat a klinikai gyakorlatban a krónikus allograft nefropátia ütemének lassításában, meghosszabbítva a veseallograftok hosszútávú túlélését.

A szimpatikus aktiváció és a RAS kombinált gátlása szubtotális nefrektómia után

E kísérlet eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy patkány maradékvese modellben az ACE-gátlás és rhizotómia (a vese szimpatikus beidegzésének kiiktatása) együttes alkalmazása előnyösebb, mint a megfelelő monoterápiák. A legenyhébb vese károsodásra utaló mutatókat (albuminuria, glomeruloszklerózis index, glomeruláris és tubulointersticiális TGF- β expresszió és kollagén depozíció, podocyta nitrotirzin festése és NOS-3 (eNOS) expresszió) a kombinált kezeléssel kaptuk.

Magas dózisú ACE-gátló kezelés sebészi vese ablációs modellben jelentősen lassította a glomeruloszklerózis kialakulását, valamint a tubuláris és intersticiális károsodást, megerősítve az irodalomban korábban közölt eredményeket. ACE-gátló kezeléssel a podocyta térfogatot és a mezangiális sejt számot kifejezetten javította. Továbbá alacsonyabb TGF- β_1 expressziót láttunk és a podocyta nitrotirozin festődése is kevésbé volt kifejezett.

A szimpatikus beidegzés kiiktatásának rhizotómiával (a vese afferens, szimpatikostimulátoros jel kiáramlásának kiiktatása), jelentős kedvező hatása volt glomeruloszklerózisra és az intersticiális károsodás mutatóira. Rhizotómia esetén szintén nagyobb volt a glomerulus kapillárisok hossz denzitása és totál hossza. Ugyanezt figyelték meg a szimpatikus aktivitás gátlása esetén a szív kapillárisainál is [168]. Ezek az eredmények egybevágnak a feltűnően alacsony albuminuriával.

Az SNS gátlás hatékonyabban előzte meg az intersticiális kollagén lerakódást és a retenciós paraméterek emelkedését, mint a RAAS-gátlás (szérum kreatinin, BUN). Továbbá, a rhizotómia önmagában fokozta az ACE-gátlás jótékony hatásait. Az albuminuria szignifikánsan alacsonyabb volt a kettős kezelt SNX állatokban. A tubuláris és intersticiális károsodás indexek szintén szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a Quinapril monoterápia esetén. Az SNS gátlás további haszna az intenzív RAAS-gátlás felett, az SNS gátlás RAAS-tól független jótékony hatására utal.

A kísérlet néhány pontja további magyarázatot igényel. Tudatosan alkalmaztuk a veseszövet közepes fokú ablációs modelljét, ami reprodukálható glomerulus szám csökkenést eredményezett (17. Táblázat). A rezekció magába foglalta a külső kéreg állományt, így a maradék vese aránytalanul sok juxtaglomeruláris glomerulust tartalmazott, amelyekben ismerten magasabb a glomeruláris kapilláris nyomás [169] és sokkal érzékenyebbek károsodásra.

A számos elérhető ACE-gátló közül azért választottuk a Quinaprilt, mert ez a készítmény éri el a vesében a legmagasabb szöveti koncentrációt, így feltehetően optimálisan gátolja a lokális szöveti RAAS-t [170].

A krónikus vese betegségekben a hipertónia kialakulásában jelentős szerepe van a vese afferens jelkiáramlása következtében létrejött szimpatikus túlaktiválódásnak, valamint a hypothalamikus központ stimulációja miatt létrejött szimpatikus tónus módosulásnak [171]. A szimpatikus túlaktiválódás nem csak a vérnyomást emeli, hanem gyorsítja a vese betegség progresszióját is. A renális szimpatikus idegek jelentik a kritikus kapcsolódási pontot a szimpatikus idegrendszer és a hosszú távú artériás nyomás kontroll között [172]. Tudatosan nem akartuk befolyásolni a vese efferens szimpatikus aktivitását, mivel leírták, hogy ez a RAAS rebound aktivációján keresztül fokozza a vese kis ereinek ellenállását [173] és a denervációs nátriurézist [174]. Ezért választottuk a sebészi afferens-specifikus szimpatikus ideg ablációt.

A rhizotómia önmagában csökkentette, de nem normalizálta a farokvérnyomás mérővel és telemetriásan mért szisztolés vérnyomás értékeket, megerősítve Campese eredményeit [150]. További mérsékelt vérnyomás csökkenést láttunk a Quinapril plusz rhizotómiával kezelt SNX állatoknál. A telemetriával (a vérnyomásmérés legmegbízhatóbb metodikája – golden standard) mért vérnyomás értékekben minimális volt a különbség a csoportok között. Valószínűtlen, hogy ilyen kis vérnyomás különbség magyarázná a podocytákban észlelt markáns nitrosoxidatív stressz különbséget. Az általános szimpatikus gátlás igazoltan nefroprotektív: SNX patkányokban moxonidine vagy metoprolol a vérnyomástól függetlenül csökkenti a glomeruláris károsodást [152,153]. Krónikus vese betegekben az SNS-gátlás moxonidine-nel a RAAS gátlása mellett bizonyítottan előnyös [175,176]. Diabéteszes betegeknél a szimpatikus aktivitás csökkentése moxonidine-nel a vérnyomástól függetlenül csökkenti az albumin kiválasztást [177].

Paradox módon, de összhangban korábbi kísérleti eredményeinkkel, a Quinaprillal kezelt állatok szérum kreatinin és urea szintje magasabb volt. Lehetséges, hogy az alacsonyabb

glomeruláris kapilláris nyomás és filtrációs ráta másodlagosan csökkentette a glomerulus efferens artériás rezisztenciát [152,178]. A rhizotómizált (Quinaprillal kombinációban vagy Quinapril nélkül) állatok szérum kreatinin koncentrációja szignifikánsan ($p < 0,05$) alacsonyabb volt, lehetséges, hogy a csökkentett szimpatikus aktiváció kedvező intrarenális hemodinamikai hatásától függetlenül. A szimpatikus szignálok erősen stimulálják a renin transzkripciót és szekréciót [179,180], de nem valószínű, hogy azokban az állatokban, akiknél a RAS-t blokkoltuk, a szimpatikus aktivitás kiiktatása okozná a renin szekréció változását, mivel a magas dózisú ACE-gátlás már nagymértékű juxtaglomeruláris RAS gátlást okozott. A rhizotómia önmagában hatékonyan gátolta a glomeruláris kapilláris hosszdenzitás csökkenést, de a Quinapril monoterápia nem. Korábban már bemutattuk, hogy a rhizotómia SNX állatokban normalizálta a csökkent kapilláris hossz denzitást a glomerulusokban [153]. A rhizotómia hasonló kapilláris protektív hatást a szív eseténben mások is leírták [168]. A rhizotómia nem befolyásolta az ál-operált állatok glomerulus kapilláris hossz denzitását, de nyilvánvalóan módosította a nefron károsodás a glomeruláris kapillarogenezisre gyakorolt hatását. Érdekes módon, a kapilláris hossz denzitás változásokat nem követte az endotheliális sejtek térfogatának és számának változása: az endotheliális sejt számot a Quinapril befolyásolta, de a rhizotómia nem. Az Angiotenzin II -ről ismert, hogy a mezangiális sejt proliferáció agonistája, ezért nem meglepő, hogy a Quinaprillal kezelt SNX állatok mezangiális sejt száma alacsonyabb volt. A rhizotómiának nincs ilyen hatása, annak ellenére, hogy ismert a katekolaminok mezangiális sejt proliferációban betöltött szerepe [181]. A podocyta térfogatának növekedését a Quinapril részben csökkentette. Ez a megfigyelés egybevágh az az újkeletű megfigyeléssel, hogy a podocytaokban megtalálható a teljes lokális RAS, és képesek ANG II termelésére és AT-1 receptor expresszióra [182].

A vesekárosodásban szerepet játszó profibrotikus citokinek közül a TGF- β_1 -et ismerjük legjobban. A kombinált kezelést kapott SNX állatokban szignifikánsan alacsonyabb a TGF- β_1 expresszió. Az ANG II fokozta a TGF- β_1 expresszióját ami felelős lehet az ANG II profibrotikus hatásáért [160,183]. Úgy tűnik a szimpatikus aktivitás is szerepet játszik az ANG II TGF- β_1 expressziót fokozó hatásában: Moxonidine csökkentette a glomerulusokban a TGF- β_1 mRNS mennyiségét patkányokban [152].

A nitrotirozin az oxidatív módon módosított nitrogén monoxid (NO) stabil metabolitja és a nitros-oxidatív stressz markere. A nitrogén monoxid szintáz (NOS-3, endotheliális NOS) csökkent expressziója ellenére észlelt 10x-es emelkedés a nitrotirozin festésnél, masszív

oxidatív stresszre utal SNX állatokban. A kettős kezelés előnyösen befolyásolta a NOS-3 expressziót és a nitrotyrozin festést a sham-kontroll szintjére normalizálta.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy szubtotális nefrektómizált patkányokban a veséből származó szimpatikus aktivitás kiiktatása számottevően - és feltehetően a vérnyomástól független módon - fokozta az ACE-gátlás hatását. Ez a megfigyelés a kombinációs kezelés alapjául szolgálhat.

Immunszuppresszió alkalmazása (¹⁸, ²⁰, ²¹, ²², ²³)

Az új immunszuppresszív gyógyszerek (cyclosporin, poly- és monoklonális antitestek) kifejlesztése forradalmasította a szervátültetést. A fejlődés ellenére a veseátültetést követő hosszú távú prognózis nem javult. Ennek hátterében elsősorban a krónikus allograft nefropátia folyamata áll, melynek magyarázatára három elképzelés is kialakult. A krónikus allograft nefropátia lehet 1) a jelen lévő idegen (allo) antigén ellen folyamatosan zajló sejt mediálta immunfolyamat 2) visszatérő, önmagát limitáló akut kilökődési epizódok sorozata vagy 3) a graft endotél sejtjeinek aktivációját és nem specifikus gyulladásos választ indukáló alloantigén-független folyamatok összessége. Még nem tisztázott, hogy ezen mechanizmusok milyen mértékben vesznek részt a krónikus allograft nefropátia folyamatában.

Mivel IL-2 és IL-2R pozitív limfociták folyamatosan detektálhatóak krónikus allograft nefropátiát mutató vesékben (132,163), e sejteknek meghatározó szerepük lehet a krónikus allograft nefropátia progressziójában (184), alátámasztva ezzel az alloantigén függő események jelentőségét. Az IL-2, eredeti nevén T-sejt növekedési faktor (185), felelős az aktivált T-sejtek proliferációjáért (6). Az IL-2-t és receptorát kódoló gének expressziója idegen antigének vagy citokinek okozta T-sejt aktiváció során fokozódik (186).

A krónikus allograft nefropátiában kialakuló intersticiális fibrózist a lokális TGF- β és PDGF termelésnek tulajdonítják (40,166). Krónikus allograft nefropátiát mutató vesék klinikai biopsziáiban a TGF- β_1 izoforma volt túlsúlyban (160). Mivel leírták, hogy mind a cyclosporin A, mind a tacrolimus serkenti a TGF- β_1 szintézisét in vivo és in vitro,

²⁰ **Hamar P**; Liu S; Viklický O; Szabó A; Müller V; Heemann U: Cyclosporine A and Azathioprine are equipotent in chronic kidney allograft rejection Transplantation **2000** 69: 1290-5

²¹ **Hamar P**; Peti Peterdi J; Szabó A; Becker G; Flach R; Rosivall L; Heemann U: Interleukin-2-dependent mechanisms are involved in the development of glomerulosclerosis after partial renal ablation in rats. Exp Nephrol **2001** 9: 133-141

²² **Hamar P**; Szabó A; Müller V; Heemann U: Involvement of interleukin-2 and growth factors in chronic kidney allograft rejection in rats. Transplant P **2001** 33(3):2160-2.

²³ **Hamar P**; Szabó A; Müller V; Heemann U: The involvement of activated T-cells and growth factor production in the early and late phase of chronic kidney allograft nephropathy in rats Transplant Int **2002** 15: 446-454

feltételezhető, hogy az IL-2 út ezen szerekekkel történő gátlása a hosszú távú prognózist tekintve káros lehet. Egy másik pro-fibrotikus növekedési faktor a PDGF szintén fontos szerepet játszhat a krónikus allograft nefropátia folyamatában.

Kísérleteinkben vizsgálni kívántuk, hogy az IL-2 által mediált folyamatok gátlása hogyan hat a krónikus allograft nefropátia progressziójára, illetve a TGF- β és PDGF termelődésére. Ennek vizsgálatára, patkány vese transzplantációt követően cyclosporin A ill. tacrolimus segítségével tartósan gátoltuk az IL-2 szintézisét, és vizsgáltuk az allograftok krónikus nephropátiájának progresszióját, különös tekintettel a sejtes infiltráció mértékére, és a növekedési faktorok termelődésére.

Eredmények

Funkcionális vizsgálatok:

A kísérlet ideje alatt minden recipiensben progresszív proteinúria alakult ki (

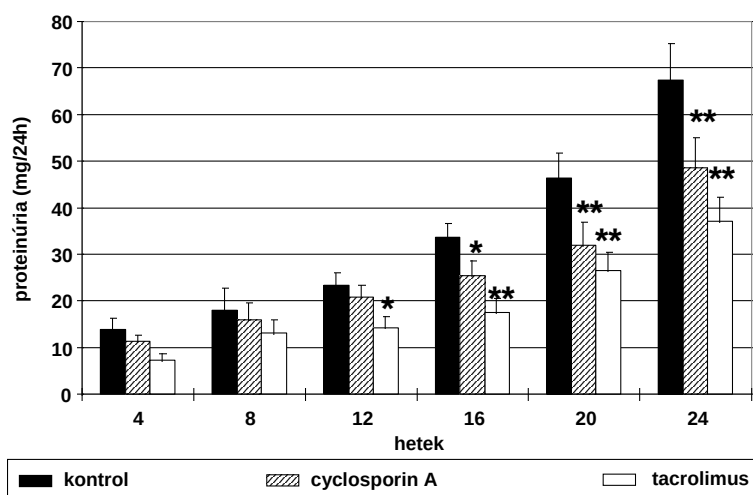
29. ábra). A vizelettel ürített fehérje mennyisége kifejezettebben növekedett a kontrol állatokban, mint a kezelt csoportokban. A kontrol állatokban 16., a cyclosporinnal kezeltékben a 20. és a tacrolimussal kezeltékben a 24. hétre fejlődött ki 30 mg/nap-ot meghaladó proteinúria.

A vesefunkció romlása, csökkent kreatinin clearance-ben ill. ezzel párhuzamosan emelkedett szérum kreatinin szintben is megmutatkozott (21. táblázat). Az IL-2 által közvetített mechanizmusok mind cyclosporinnal, mind tacrolimussal történő gátlása javította a vesefunkciót. Ezek a változások a 24. hétre váltak szignifikánssá. Ekkor a tacrolimussal kezelt állatokban volt a legmagasabb a clearance és legalacsonyabb a szérum kreatinin. ($p < 0.01$ a kontrolhoz képest). A cyclosporin jótékony hatása, kevésbé volt kifejezett ($p < 0.05$ a kontrolhoz képest) (21. táblázat).

A 16. és a 24. hét között a graft-funkció romlásával párhuzamosan, az artériás középnyomás is gyorsabban növekedett a kontrol állatokban, mint a kezeltékben (30. ábra). Ezek a különbségek a 24. hétre váltak szignifikánssá ($p < 0.05$)

29. ábra

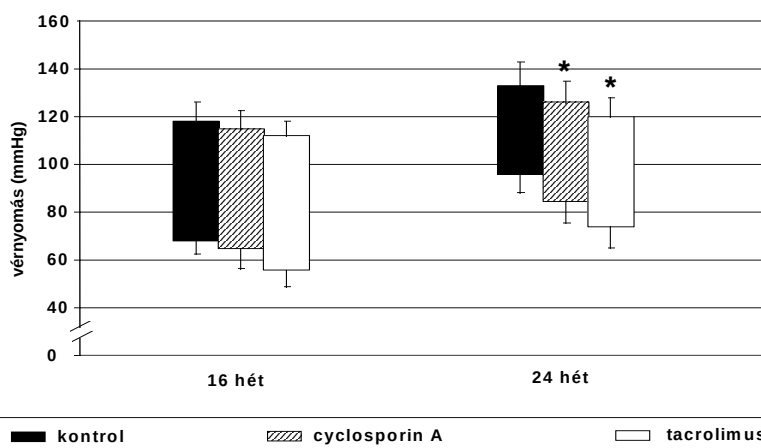
24 h alatt vizelettel ürített fehérje



(Uprot (mg) / 24 h) (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. kontrol)

30. ábra

Szisztémás vérnyomás 16 és 24 héttel transzplantáció után.



(*: $p < 0.05$ vs. kontrol) A keretek felső széle az aortában mért szisztolés, alsó széle a diasztolés vérnyomást reprezentálja.

21. táblázat

Kreatinin clearance, szérum kreatinin szint, és glomeruloszklerózis (a szklerotikus glomerulusok az ép glomerulusok százalékos arányában) 16 és 24 héttel veseátültetés után.

Csoport:		kontrol		Cyclosporin A		Tacrolimus	
	hetek	átlag±szórás	n	átlag±szórás	n	átlag±szórás	n
glomeruloszklerózis (%±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
kreatinin clearance (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
szérum kreatinin (mmol/l±SEM)	16	132±18	13	115±9	15	118±18	14
	24	186±20	8	150±19*	10	124±10**	9

A statisztikai szignifikanciát az egyes sorokon belül Fisher's least square distance test segítségével állapítottuk meg (45). A p értékek a kezelt és kontrol csoport student's T test szerinti összehasonlításából adódnak. (* $p < 0.05$ vs. kontrol, ** $p < 0.01$ vs kontrol)

Fénymikroszkópia és immunhisztológia

A krónikus allograft nefropátiara jellemző szövettani paraméterek: a glomeruloszklerózis, a leukocita infiltráció, az intersticiális fibrózis és az intimaproliferáció mértéke jó korrelációt mutattak a vesefunkcióval.

A kontrolokban a 16. héten a glomerulusok több, mint 40%-a szklerotizált. A szklerotizált glomerulusokat körülvevő intersticiumot és érfalakat, valamint magukat a glomerulusokat nagyszámú leukocita infiltrálta, melyek immunhisztokémiai festéssel ED1+ makrofágoknak és CD5+ T sejteknek bizonyultak. A sejtek egy része ezen felül sejtfelszíni adhéziós molekulákra (LFA-1 α és VLA-4 α) pozitív is volt (22. táblázat). Az IL-2 termelés gátlása csökkentette a glomeruloszklerózis ($p<0.01$; 1. táblázat), és a sejtes infiltráció mértékét. Az ED1+ makrofágok ($p<0.01$) és különösen CD5+ T-limfociták infiltrációja ($p<0.001$), valamint az LFA-1 α + és VLA-4 α + sejtek száma is szignifikánsan alacsonyabb volt az immunszupprimált csoportokban (22. táblázat).

22. táblázat

Infiltráló sejtek, és adhéziós molekulák immunhisztológiai festése, 16 és 24 héttel veseátültetést követően.

Csoport:		kontrol		cyclosporin A		Tacrolimus	
	hetek	átlag $\pm$ szórás	n	átlag $\pm$ szórás	N	átlag $\pm$ szórás	n
makrofágok (ED1) (sejt/lt)	16	80 $\pm$ 8.4	5	60 $\pm$ 3.3*	5	48 $\pm$ 4.4**	5
	24	68 $\pm$ 4.1	13	47 $\pm$ 4.6**	10	37 $\pm$ 2.3**	9
limfociták (CD5) (sejt/lt)	16	65 $\pm$ 6.6	5	45 $\pm$ 4.9**	5	40 $\pm$ 4.4**	5
	24	49 $\pm$ 3.3	13	33 $\pm$ 4.2**	10	27 $\pm$ 4.6**	9
VLA-4 α (sejt/lt)	16	11 $\pm$ 1.6	5	8 $\pm$ 0.3*	5	7 $\pm$ 0.9**	5
	24	9 $\pm$ 0.8	13	7 $\pm$ 0.7**	10	5 $\pm$ 0.2**	9
LFA-1a (sejt/lt)	16	8 $\pm$ 0.4	5	6 $\pm$ 0.9*	5	6 $\pm$ 0.5**	5
	24	7 $\pm$ 0.5	13	6 $\pm$ 0.4*	10	5 $\pm$ 0.3**	9
ICAM-1 ⁺ intenzitás (1-4)	16	3.2 $\pm$ 0.5	5	2.5 $\pm$ 0.6	5	2 $\pm$ 0.1*	5
	24	2.5 $\pm$ 0.6	13	2.2 $\pm$ 0.5	10	1.5 $\pm$ 0.4	9
VCAM-1 ⁺ intenzitás (1-4)	16	3.5 $\pm$ 0.6	5	2.5 $\pm$ 0.6	5	2.2 $\pm$ 0.5*	5
	24	2.7 $\pm$ 0.5	13	2 $\pm$ 0.8	10	1.5 $\pm$ 0.6	9

A statisztikai szignifikanciát az egyes sorokon belül Fisher's least square distance test segítségével állapítottuk meg (45). A p értékek a kezelt és kontrol csoport 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. kontrol, ** $p<0.01$ vs kontrol)

A kontrolokban a 24. hétre a sejtes infiltráció mértéke feltűnően csökkent. Ugyanakkor, az intersticiális fibrózis és az artériák intima-proliferációja sokkal kifejezettebbé vált. Ezzel párhuzamosan a szklerotizált glomerulusok száma is nőtt a 16. és a 24. hét között (21. táblázat). Az IL-2 által közvetített mechanizmusok gátlása szignifikánsan csökkentette a

glomeruloszklerózis, az intimaproliferáció, az intersticiális fibrózis és a leukocita infiltráció mértékét (21. táblázat és **22. táblázat**).

A kontrol állatokban az érfalak és a tubulointersticium intenzíven festődött a fehérvérsejtek kitapadását szolgáló adhézíós molekulák (ICAM-1 és VCAM-1) elleni antitestekkel. A festődés mértéke a 24. hétre csökkent (**22. táblázat**). Mind a cyclosporin mind a tacrolimus mindkét időpontban csökkentette ezen molekulák expresszióját.

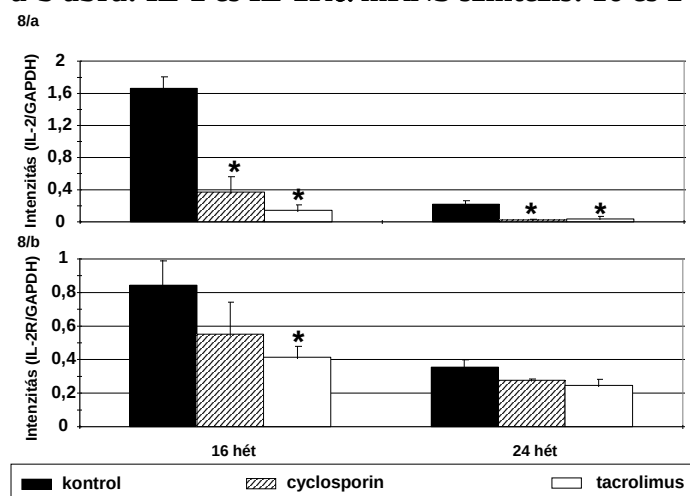
Polimeráz láncreakció (PCR)

A kontrol állatokban az IL-2 mRNS szintézise a tubulointersticiumot infiltráló mononukleáris 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 kontrolhoz képest). Érdekes módon a tacrolimus kezelés szignifikánsan ($p < 0.05$) hatékonyabb volt, mint a cyclosporin (31. ábra/a).

Az IL-2 receptor β láncának (IL-2R β) (p70) mRNS szintjei az IL-2 szintézissel párhuzamosan változtak: a kontrol állatokban a receptor szintézis 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 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 (31. ábra/b).

31. ábra

a-b ábra: IL-2 és IL-2R α mRNS szintézis: 16 és 24 héttel a transzplantációt követően.



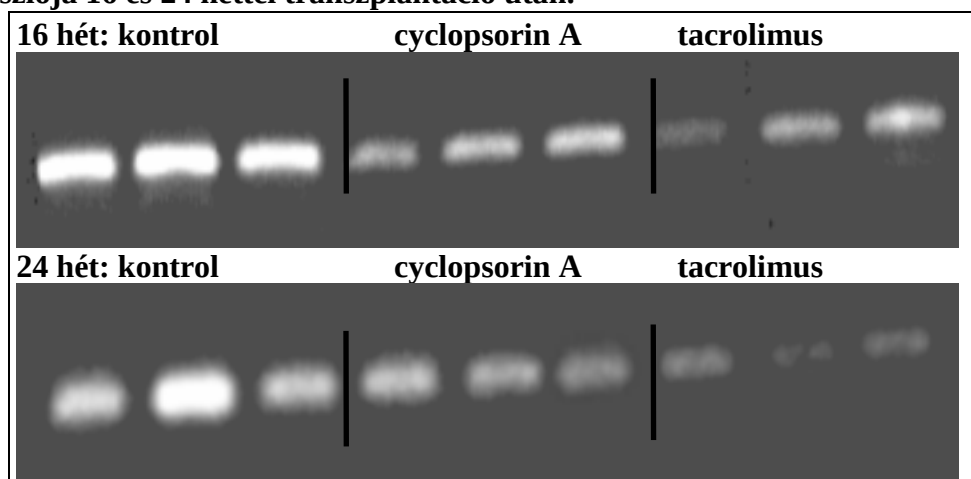
IL-2 és IL-2R sávok denzitometriás összehasonlítása GAPDH sávokkal *: $p < 0.05$ vs. kontrol

A kontrol csoportban a TGF- β_1 szintézise 16. héten a jelentősen fokozott volt (32. ábra).

A 24. hétre, amikor a sejtes infiltrációt intersticiális fibrózis és glomeruloszklerózis váltotta fel, a TGF- β_1 mRNS szintje 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 ($p < 0.01$) (33. ábra).

32. ábra

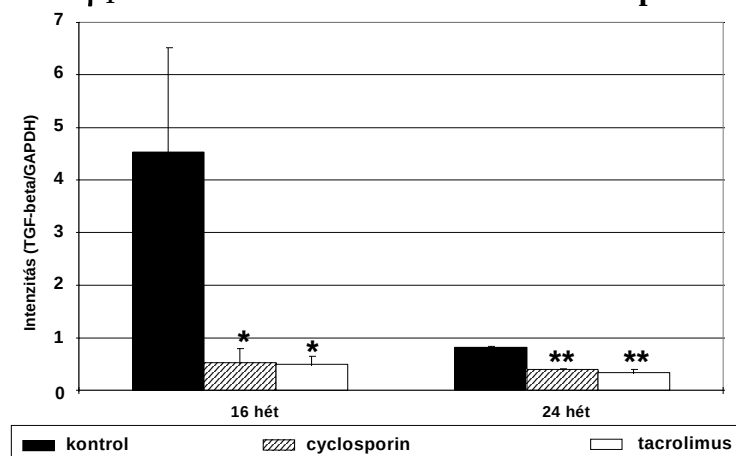
Vese allograft minták RT-PCR segítségével meghatározott TGF-beta-1 mRNS expressziója 16 és 24 héttel transzplantáció után.



A PCR terméket az agaróz gélen ethidium bromid festés segítségével tettük láthatóvá.

33. ábra

TGF- β_1 mRNS szintézis: 16 és 24 héttel transzplantáció után.

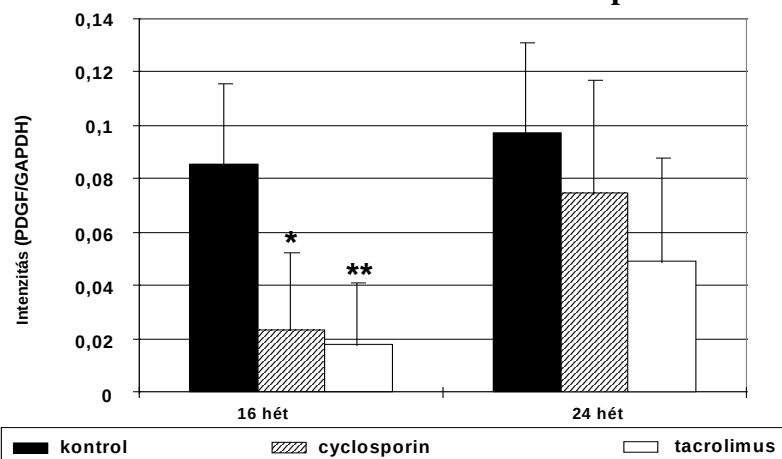


TGF- β_1 sávok denzitometriás összehasonlítása GAPDH sávokkal (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. kontrol)

Ellentétben a TGF- β_1 -el, a PDGF szintézise a kontrol 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 (34. ábra).

34. ábra

PDGF mRNS szintézis: 16 és 24 héttel transzplantáció után.



PDGF sávok denzitometriás összehasonlítása GAPDH sávokkal (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. kontrol)

Megbeszélés

A krónikus allograft nephropátia nehezen értelmezhető folyamata jelenleg a legjelentősebb oka a transzplantációt követő allograft vesztésnek. A krónikusan kilökődő transzplantált vesék immunhisztokémiai analízise során intenzív sejtes infiltrációt figyeltek meg. Az infiltráló sejtek makrofágoknak és T-sejteknek bizonyultak (187,188). A krónikus allograft nephropátia, mai elképzeléseink szerint, vagy az idegen antigén folyamatos felismerésén alapuló T-sejtek irányította immunválasz (6), vagy sorozatosan ismétlődő, de önmagát limitáló akut kilökődési epizódok (189) vagy alloantigén-független események következménye. Az alloantigéntől független tényezők: sérülés, lokális hemodinamikai változások, mint a hiperfiltráció, aktiválhatják a graft endotélsejtjeit, aminek következtében mononukleáris sejtek (limfociták, makrofágok) vándorolnak az allograftba (190). Minthogy a limfociták az ér pályából való kilépés során aktiválódnak, mindhárom teória felveti, hogy a krónikus allograft nephropátiában az IL-2 által közvetített mechanizmusoknak is szerepe lehet.

Az IL-2 a T-sejtek proliferációjának legfontosabb serkentője, régi nevén T-sejt növekedési faktor (191). Nyugalmi állapotban humán T-limfocitákban IL-2 mRNS nem detektálható (192), és az IL-2 receptor β lánc is csak nyomokban van jelen (6). A T-sejtek aktivációjakor az IL-2 és az IL-2R szintézise jelentősen fokozódik (192). Jelen kísérletünkben, az IL-2 és receptorának a szintézise a kontrol patkányokban a 16. héten érte el legmagasabb értékét, amikor a mononukleáris sejtes infiltráció is maximális volt. Az IL-2R krónikus allograft nephropátiában betöltött szerepét alátámasztja Krams és mtsai-nak azon munkája, melyben leírták, hogy humán nefrektómiás mintákban a szövettanilag igazolt krónikus allograft nephropátia eseteiben IL-2R mRNS is kimutatható volt (193).

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

A cyclosporin és a tacrolimus gátolja a T-sejt receptor intracelluláris jelátviteli útját, és így gátolja a T-sejt aktivációja következtében kialakult gén expressziót, beleértve az IL-2 és az IL-2R (194) gének expresszióját is. Kísérletünkben mind a tacrolimus, mind a cyclosporin A gátolta az IL-2 valamint az IL-2R β szintézisét. Az IL-2 szintézisének gátlása jelentősen lassította a vesefunkció (proteinúria, kreatinin clearance) hanyatlásának ütemét.

Néhány újabb tanulmány szerint a cyclosporinnal történő folyamatos kezelés lassíthatja a krónikus allograft nephropátia folyamatát, kísérletes (195) és klinikai (196) transzplantációt követően. Ugyanakkor ezen tanulmányok egyike sem fókuszál a vesetranszplantációt követő IL-2 által közvetített mechanizmusok folyamatos gátlásának hosszú távú hatásaira. Az IL-2 út gátlásával foglalkozó klinikai tanulmányok eredményei ellentmondásosak. A krónikus allograft nephropátia biopsziával bizonyított eseteiben az Azathioprin + Prednizolon kezelésről cyclosporin A + Prednizolon kezelésre (197) való áttérés, vagy a terápia cyclosporin A-val történő kiegészítése (196) lassította a hanyatlás ütemét. Ugyanakkor más tanulmányok a cyclosporin A-ról Azathioprin kezelésre történő átállás jótékony hatásairól számoltak be (198).

Kísérletünkben az IL-2 közvetített mechanizmusok gátlása szignifikánsan kifejezettebb volt tacrolimus kezelés esetén, mint cyclosporinnal kezelt recipiensekben. Klinikai adatok arra mutatnak, hogy a tacrolimussal történő szuppresszió hatásosabb az akut kilökődés megelőzésében, mivel a tacrolimus képes a cyclosporin A kezelés mellett előforduló szteroid rezisztens akut kilökődési reakciók visszafordítására (199).

Eredményeink alátámaszthatják azt a hipotézist, mely szerint a krónikus allograft nephropátia - részben - az idegen antigén folyamatos felismerésen alapulna. Az IL-2 által közvetített mechanizmusok, azonban a nem specifikus (az idegen antigéntől független) gyulladásos reakció részeként is értelmezhetőek. Ezen kérdés vizsgálatára parciális nefrektómián átesett patkányokat kezeltünk tacrolimussal, 20 héten át. A krónikus progrediáló glomeruloszklerózis, ezen alloantigén mentes modelljében is hatékonynak bizonyult az IL-2 szintézis gátlása, ami alátámasztja azt a feltevést, hogy az IL-2 dependens mechanizmusok idegen antigén hiányában lezajló gyulladásos folyamatokban is részt vesznek.

A szöveti átépülési folyamatokat - így a vese allograftok krónikus nephropátiáját is - lokálisan termelt növekedési faktorok irányítják (200). A TGF- β_1 kulcsszerepet játszik a fibrin termelésben és a krónikus fibrózis fontos mediátora (160). A krónikusan kilökő vese

allograftok biopsziás mintáiban (201) és krónikusan kilökődő patkány vese allograftokban (202) a TGF- β_1 expresszióját emelkedettnek találták, ami arra mutat, hogy ez a faktor jelentős szerepet játszhat a krónikus allograft nephropátia folyamatában. A TGF- β -át különböző sejttípusok termelik, többek között a graftot infiltráló makrofágok és T-limfociták (25).

Mivel a TGF- β ún. látens asszociált peptidhez kovalensen kötött pro-TGF- β formájában szekretálódik (201), az aktív fehérje szöveti szintjéről nincs információnk. Tanulmányunkban a TGF- β mRNS szintézisének fokozódása a kontrol csoportban időbeli kapcsolatot mutatott a sejtes infiltráció intenzitásával. Ezen túlmenően az immunszuprimált állatokban a TGF- β termelés minimálisra csökkenésével párhuzamosan a glomeruloszklerózis és intersticiális fibrózis 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 (195), tubuláris sejteken és fibroblasztokban in vitro (201) valamint in vivo: kezeletlen állatokban a szérum TGF- β szintjét emeli. Nincsenek adatok azonban arra vonatkozólag, hogy hogyan hat a cyclosporin a TGF- β_1 szintézisére krónikus allograft nephropátia során. Mivel a cyclosporinnal kezelt csoportban a vese össz TGF- β_1 mRNS tartalma alacsonyabb volt mint a kontrol csoporté, a cyclosporin lokális TGF- β termelésre gyakorolt stimuláló hatása valószínűleg elhanyagolható a sejtes infiltrációt gátló, és így a TGF- β -t termelő sejteket elimináló hatáshoz képest.

Egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a TGF- β mellett a PDGF szintézise is jelentős a szövet átépülési folyamatokban, így a progresszív glomeruloszklerózisban is (203). A PDGF a mezangiális sejtek, biztosan a legtöbbet vizsgált és feltehetően leghatásosabb mitogénje. Serkenti a mezangiális sejtek TGF- β termelését és a fibroblasztok proliferációját. Ezen felül a PDGF a glomeruláris hemodinamika regulációjában is szerepet játszhat. Bár a PDGF-AB normál vesében nem mutatható ki (204), a vesebetegségek számos fajtájában - köztük a vese allograftok krónikus nephropátiájában is (57) - fokozott expressziót sikerült igazolni (203). Paul és mtsai krónikusan kilökődő patkány vese transzplantátumokban a PDGF-receptor mRNS szintjét szignifikánsan emelkedettnek találták (200). Más patkányvese allotranszplantációról szóló tanulmányokban a sejtes infiltráció maximuma a 16. héten, összefüggést mutatott a graft artériás simaizom sejteinek PDGF immunhisztokémiai festődésével (57). Bár kísérletünkben mind a cyclosporin, mind a tacrolimus gátolta a PDGF szintézisét, 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 vérlemezkék termelnek PDGF-et, hanem más sejtek is (pl.: a glomeruláris mezangiális sejtek), elképzelhető, hogy a glomeruláris sejtproliferáció okozta mezangiális PDGF termelés következtében önmagát erősítő folyamat alakul ki (205). Ennek értelmében a PDGF termelés a krónikus allograft nephropátia késői progressziójában valószínűleg fontosabb, a TGF- β -nál. Ugyanakkor, míg a tacrolimus és a cyclosporin előnyös a krónikus allograft nephropátia korai fázisában, ha egyszer a vese heges átépülése megkezdődött, az alloantigéntől független folyamatok válnak dominánssá az öngerjesztő folyamatban és ezért az IL-2 szuppressziótól kevés további eredmény várható.

Összegzésképpen az IL-2 által közvetített mechanizmusok folyamatos gátlása lassítja a patkányvese allograftok krónikus nephropátiáját, azaz a makrofágok mellett az IL-2 aktiválta T-limfociták is szerepet játszanak a folyamatban. A progresszió szempontjából a folyamat első felében fontos mediátor a TGF- β , melynek szintézise az infiltráló, IL-2 aktiválta T-limfociták számának csökkentése révén jól gátolható. Előrehaladottabb stádiumban a PDGF szerepe kerül előtérbe, és ilyenkor az IL-2 termelés gátlására irányuló terápiától már kevés eredmény várható.

Mátrix metalloproteinázok szerepe ⁽²⁴⁾

Az extracelluláris mátrix (ECM) felhalmozódása, a krónikus allograft nefropátia (chronic allograft nephropathy) egyik egyedi szövettani jellemzője, felelős a progresszív tubulointersticiális fibrózisért (206). Az ECM felhalmozódását kiválthatja az ECM megnövekedett szintetizézise vagy csökkent lebontása, vagy a kettő kombinációja (207).

Az ECM körforgásának fő szabályozói a mátrix metalloproteinázok (MMP-k) (208) és a növekedési faktorok. Az MMP-k a cink-függő mátrix-bontó enzimek egy nagy családját képezik, a kötőszövet és bazális membránok ECM-jét bontják le (209) és az MMP-k úgynevezett szöveti inhibitorai gátolják őket. Az MMP-k fontosak a szövet kialakításában és gyógyulásában számos vesebetegség során, mint például a glomerulonefritisz és a progresszív vese fibrózis (210). A szubsztát specifitásuk alapján ezeket alosztályokba soroljuk: kollagenázok (MMP-1, -8, -13), zselatinázok (MMP-2, -9) és sztromelizinek (MMP-3, -7, -10, -11). Továbbá léteznek membrán típusú (MT)-MMP-k is (MT-1-4-

²⁴ Lutz J, Yao Y, Song EW, Antus B, **Hamar P**, Liu S, Heemann U: Inhibition of Matrix Metalloproteinases During Chronic Allograft Nephropathy in Rats. Transplantation **2005** 27;79(6): 655-661

MMP). A vesében és a vese átültetési modellekben akut allograft kilökődés (211) és CAN (206) tekintetében különösen az MMP-2 és -9 zselatinázokat tanulmányozták.

Az MMP-2 (zselatináz A) elsősorban fibronektint és laminint bont le, míg az MMP-9 (zselatináz B) a IV. és V. típusú kollagéneket bontja le (212). Az MMP-3 (sztromelizin-1) a bazális membrán fehérjéket részesíti előnyben, különösen a fibronektint (212). A vesében a IV. típusú kollagén jelen van a bazális membránokban, míg a fibronektin, a laminin és az V. típusú kollagén előfordul a tubulointersticiális mátrixban is (212). Jelenleg az MMP-k szerepe a CAN kialakulásában és progressziójában még nem egyértelmű. Feltételezzük, hogy az MMP-k, különösen az MMP-2 és -9 a tubulointersticiális ECM-re és a bazális membránokra gyakorolt hatásuk miatt az átültetés utáni akut fázisban a normális ECM/glomeruláris bazális membránok gyorsabb lebontásával megnövelhetik a szövetkárosodást, míg az átültetés utáni későbbi fázisokban az MMP aktivitásnak védő hatása lehet a CAN progressziója ellen, mivel csökkenti az ECM felhalmozódását és a fibrózist.

Feltehetjük a kérdést, hogy mi ismert az MMP-2 és -9 expressziójának intragraft kinetikájáról az átültetés utáni korai szakaszban. Újabban megnövekedett MMP-2 és -9 szinteket figyeltek meg tüdőátültetés modell korai szakaszában (213) és renalis ischaemia-reperfúzió után (214). Akut vese-allograft kilökődéses modellben az MMP-k differenciált expressziója volt megfigyelhető, az MMP-2 expressziója megnövekedett és az MMP-9 expressziója csökkent az átültetés utáni első 7 nap során (211). Továbbá, a poszt-ischemiás vese-szövetben valamint a tubuláris epitéliumsejtekben az MMP-2 és MMP-9 megnövekedett, és az intersticiális sejtekben és a tubulointersticiális részben lokalizálódott (215). Továbbá ureter elzáródás korai fázisában az MMP-2 és -9 termelése fokozódott (216).

Az MMP-k, különösen az MMP-3 és az elasztáz szintén képesek növelni az izolált patkány glomeruluszok in vitro albumin permeabilitását, feltételezhetően a glomeruláris bazális membrán bontásával (217). Egy kutatócsoport a glomeruláris bazális membrán hatékony károsítóiként azonosította a sztromelizint és a zselatinázt (218). Ezt támasztja alá a mezangiális MMP-k lokalizációja a mezangiólízis területein és a glomeruláris bazális membrán diszruptió helyein, ami megegyezik az anti-Thy 1.1 nefritisz során megemelkedett MMP szintekkel (219). Bár a nefritisznek ez a formája nem hasonlítható össze közvetlenül az átültetés utáni akut helyzettel, ugyanakkor közvetlen glomeruláris sérülést jelent, amely hasonló az átültetés során fellépő ischaemia-reperfúziós sérüléshez. Továbbá, a BB-94 MMP inhibitor (batimastat) hatékonyan gátolta a simaizom sejtek szaporodását és migrációját és a neointima kialakulását verőerek ballon-sérülései

modelljében (220). Ezek az adatok kihangsúlyozzák az MMP-k fontosságát az akut szövetsérülések hatásának mérséklésében a különböző szervek különböző sejttypusaiban.

Ugyanakkor felmerül a kérdés, hogy az előrehaladott vesebetegségek későbbi fázisaiban megfigyelt csökkentett MMP aktivitás oka vagy következménye ennek a folyamatnak (221). Az ECM lerakódása a csökkent MMP expressziót követően előrehaladott fibrózisban megzavarhatja a tubuláris epitél sejtek és az intersticiális fibroblasztok közötti a kölcsönhatást. A normális ECM homeosztázis megtartásához fontos ez a kölcsönhatás. Az ECM lerakódás öngerjesztő lehet, mivel a IV. típusú kollagén - amely az ECM egyik fő komponense is – kölcsönhatásba lép a növekedési faktorokkal, mint például a trombocita eredetű növekedési faktorról (platelet-derived growth factor, PDGF), ezzel stimulálva az intersticiális fibroblasztok szaporodását. Mindez előrehaladott szövethárosodáshoz valamint szervelégtelenséghez vezet (222).

A növekedési faktorokat, mint például a transzformáló növekedési faktor β -t (transforming growth factor, TGF- β) és PDGF-BB-t kapcsolatba hozták a CAN kialakulása során és akut vese ischiemiás-reperfúziós károsodás után kialakuló progresszív fibrózissal (223). A veseoszövetekben a TGF- β szintje fokozott CAN-ban és ischiemia-reperfúzió után kialakuló fibrózisban (223). Meglepő módon, az utóbbi alatt az MMP-k aktivitása és expressziója csökkent.

A BAY 12-9566 egy butánsav analóg, amely mint nem peptidszerű vegyület gátolja az alább következő MMP-eket, sorrendben csökkenő hatékonysággal: MMP-2 > MMP-3 > MMP-9 (224). Az MMP inhibitorokat az onkológia területén fedezték fel, mint olyan anyagokat, amelyek képesek csökkenteni a tumor invázióját, az angiogenezist és a metasztázist, tehát ígéretes eszközöknek bizonyulhatnak a rosszindulatú daganatok kezelésében (224). Az MMP-k azonban szintén befolyásolhatják a szöveti fibrózist, különösen a CAN kialakulása és progressziója során.

Feltételeztük, hogy az MMP-2, -3 és -9 gátlása az átültetés utáni korai fázisban csökkenti a szövethárosodást és hátráltatja a CAN progresszióját, míg az MMP-2, -3 és -9 késői gátlása a progresszív fibrózis folyamatát fokozhatja, ezáltal súlyosbítva a szövethárosodást és gyorsítva a CAN progresszióját. Ennek megfelelően különböző fázisokban kezeltünk patkányoka a BAY 12-9566 MMP inhibitorral a CAN kísérleti állatmodelljében.

Eredmények:

A korai MMP gátlás csökkentette a 24-órás fehérje kiválasztást

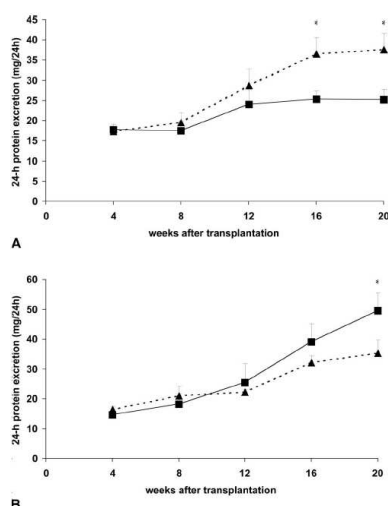
Az átültetés utáni első tíz napban alkalmazott MMP gátlása BAY segítségével (BAY 0-10) jelentősen kisebb mértékű fehérjevizelést eredményezett a kontrollokkal (VEH 0-10)

összehasonlítva a vizsgálati időszak végén ($P < 0,05$) (35. ábra/a). Ezzel ellentétben, azok az állatok, amelyeket az átültetés utáni 12. héttől a 20. hétig kezeltünk (BAY 12-20) jelentősen több fehérjét ürítettek vizeletükkel a kontrollokhoz képest (VEH 12-20) ($P < 0,05$) (35. ábra/b).

A kreatinin clearance magasabb volt a korai fázisban kezelt állatokban (BAY 0-10) a kontroll csoporthoz képest, míg jelentősen alacsonyabb volt a későbbi fázisban kezelt állatokban ($P < 0,05$) (23. táblázat). A csoportok közötti testsúly és artériás vérnyomás különbségek nem mutattak statisztikailag jelentős eltérést a vizsgálati időszak során (23. táblázat).

35. ábra

Proteinuria



(A) Fehérje kiválasztás az átültetés után a 4. héttől a 20. hétig, a transzplantáció utáni 0. naptól a 10. napig BAY 12-9566 vegyülettel (BAY 0-10, ▲) vagy hordozóval (VEH 0-10, ■) kezelt állatok körében. A mátrix metalloproteináz (MMP) gátlása a transzplantáció utáni első 10 napban jelentősen alacsonyabb fehérjevizelést eredményezett a kontrollhoz viszonyítva ($*P < 0,05$). (B) A fehérje kiválasztás az átültetés után a 4. héttől a 20. hétig, a transzplantáció után 12. héttől a 20. hétig BAY 12-9566 vegyülettel (BAY 12-20, ▲) vagy hordozóval (VEH 12-20, ■) kezelt állatok körében. A transzplantáció utáni 12. héttől 20. hétig kezelt állatok jelentősen súlyosabb fehérjevizelést mutattak a kontrollhoz viszonyítva a 20. hét után ($*P < 0,05$).

23. táblázat

Funkcionális adatok

	BAY 0-10	VEH 0-10	BAY 12-20	VEH 12-20
Cl-kreatinin (mL/perc)	1,7±0,2	1,5±0,2	1,2±0,1	1,6±0,2
véryomás (mm Hg)	103,4±12,1	102,2±6,8	93,2±5,9	108,8±4,8
testsúly (g)	444,4±17,2	435,8±15,1	418,6±8,9	438,8±5,5

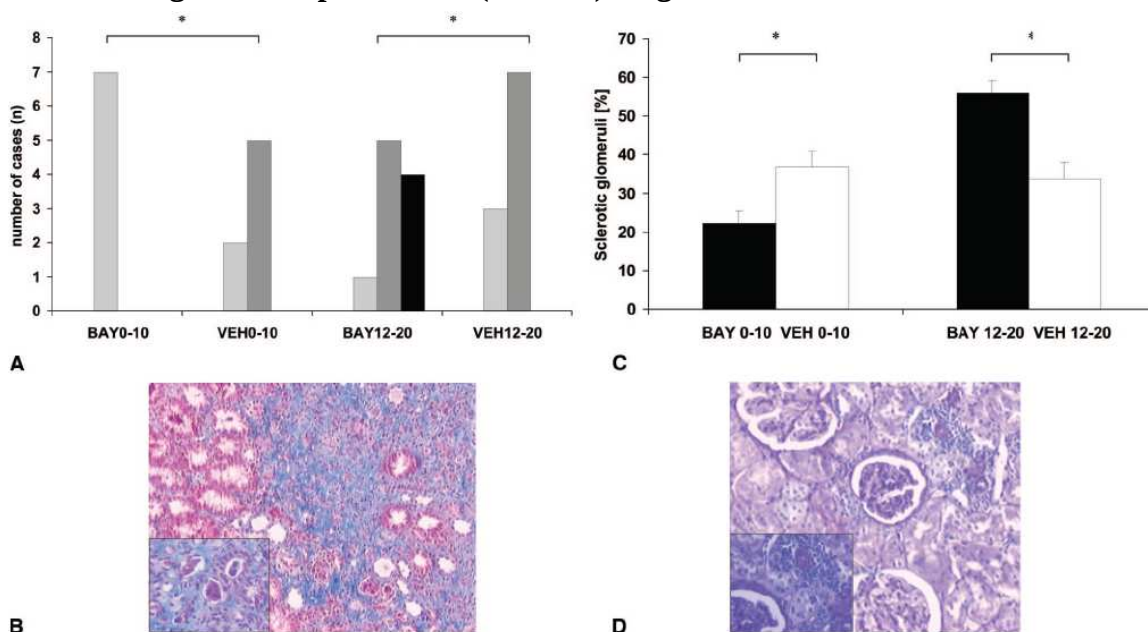
Kreatinine clearance, véryomás és testsúly a kísérlet végén: 20 héttel az átültetés után olyan állatokban, amelyeket BAY 12-9566 vegyülettel vagy hordozóval kezeltünk a 0. naptól a 10. napig (BAY 0-10, VEH 0-10) vagy a 12. héttől a 20. hétig (BAY 12-20, VEH 12-20) (átlag ± SEM (átlag standard hibája))

A korai MMP gátlás csökkentette a CAN és glomeruloszklerózis mértékét.

A CAN enyhébb volt a korai fázisban kezelt állatokban (BAY 0-10) ($P < 0,05$) a kontroll csoporthoz ($P < 0,05$) viszonyítva, míg a későbbi fázisban kezelt állatokban (BAY 12-20) súlyosabb CAN alakult ki. (36. ábra/a,b). Ezt jelentősen enyhébb glomeruloszklerózis kísérte a korai fázisban kezelt állatokban (BAY 0-10) mint a kontrollokban (VEH 0-10) ($P < 0,05$). Ezzel ellentétben a késői fázisban kezelt állatokban (BAY 12-20) jelentősen több glomerulus volt szklerotikus, mint a kontrollokban (VEH 12-20) ($P < 0,05$). (36. ábra/c,d)

36. ábra

Krónikus allograft nefropátia index (BANFF), és glomeruloszklerózis



(A) A krónikus allograft nefropátia (chronic allograft nephropathy, CAN) mértéke 20 héttel az átültetés után a BAY 0-10, BAY 12-20, VEH 0-10 és VEH 12-20 csoportokban. (□, enyhe CAN; ▒, közepes CAN; ■, súlyos CAN). A transzplantáció utáni 0. naptól a 10. napig BAY kezelést kapott állatoknál (BAY 0-10) jelentősen enyhébb volt a CAN mértéke a kontrollokhoz összehasonlítva (VEH 0-10). ($P < 0,05$). A transzplantáció utáni 12. héttől 20. hétig késői BAY kezelést kapott állatoknál (BAY 12-20) azonban súlyosabb CAN alakult ki, mint a kontrollokhoz képest (VEH 12-20). ($P < 0,05$).

(B) Tubulointersticiális fibrózis tubuláris atrófiával (x100, kiskép x400; Masson trikróm).

(C) Glomeruloszklerózis 20 héttel a transzplantáció után BAY 12-9566 vegyülettel (■) vagy hordozóval (□) a 0.-tól a 10. napig (BAY 0-10, VEH 0-10) vagy a 12. héttől a 20. hétig (BAY 12-20, VEH 12-20) kezelt állatokban. A transzplantáció utáni 0. naptól a 10. napig BAY kezelést kapott állatoknál (BAY 0-10) jelentősen enyhébb volt a glomeruloszklerózis mint a kontrollokban (VEH 0-10) ($P < 0,05$). A transzplantáció utáni 12. héttől a 20. hétig BAY kezelést kapott állatoknál (BAY 12-20) a kontrollokhoz képest (VEH 12-20) több szklerotikus glomerulus alakult ki. ($P < 0,05$).

(D) Szklerotikus glomerulus, kis artériák vaszkulopátiával (kiskép) és perivaszkuláris limfocita infiltrációk (x200, perjódsvavas Schiff reakció)

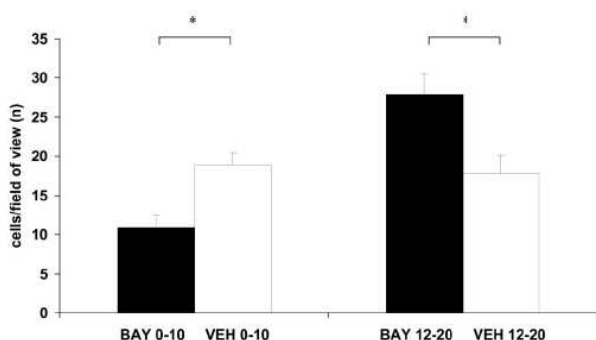
A korai BAY kezelés csökkentette az átültetett szövet makrofág infiltrációját.

A kontrollokhoz képest (VEH 12-20) ($P < 0,05$) a korai fázisban kezelt állatok (BAY 0-10) jelentősen enyhébb volta az ED1-pozitív makrofág infiltráció (VEH 0-10) ($P < 0,05$), míg a késői kezelés (BAY 12-20) jelentősen nagyobb számú, az átültetett graftba infiltráló makrofágot eredményezett (37. ábra). Az átültetett szövetbe infiltráló OX-19 pozitív

limfociták számában nem volt szignifikáns eltérés a kezelt állatok és a kontrollok között (nem közölt adatok).

37. ábra

A makrofágok infiltrációja az átültetett szövetben 20 héttel a transzplantáció után



BAY 12-9566 vegyülettel (■) vagy hordozóval (□) a 0. naptól a 10. napig (BAY 0-10, VEH 0-10) vagy a 12. héttől a 20. hétig (BAY 12-20, VEH 12-20) kezelt állatoknál. A korai BAY kezelést kapott állatoknál (BAY 0-10) jelentősen alacsonyabb volt az ED1-pozitív makrofágok száma az átültetett szövetben a kontrollhoz viszonyítva (VEH 0-10) (* $P < 0,05$), míg a késői kezelés (BAY 12-20) a kontrollhoz (VEH 12-20) viszonyítva jelentősen nagyobb számú, az átültetett szövetbe infiltrálódó makrofágot eredményezett (* $P < 0,05$).

A növekedési faktor mRNS szintek megemelkedtek a késői kezelést kapott állatokban.

A korai fázisban kezelést kapott állatok (BAY 0-10) alacsonyabb TGF- β_1 mRNS szintekre való hajlamot mutattak a kontrollokhoz képest (VEH 0-10) ($P > 0,05$) (38. ábra/a) PDGF-B mRNS szintek hasonlóak voltak a korai kezelésű csoportban (BAY 0-10) és a kontroll csoportban (VEH 0-10). (38. ábra/b) A késői fázisú kezelést kapott állatok (BAY 12-20) jelentősen magasabb TGF- β_1 és PDGF-B mRNS szinteket mutattak mint a kontrollok (VEH 12-20) ($P < 0,05$) (38. ábra).

Megbeszélés

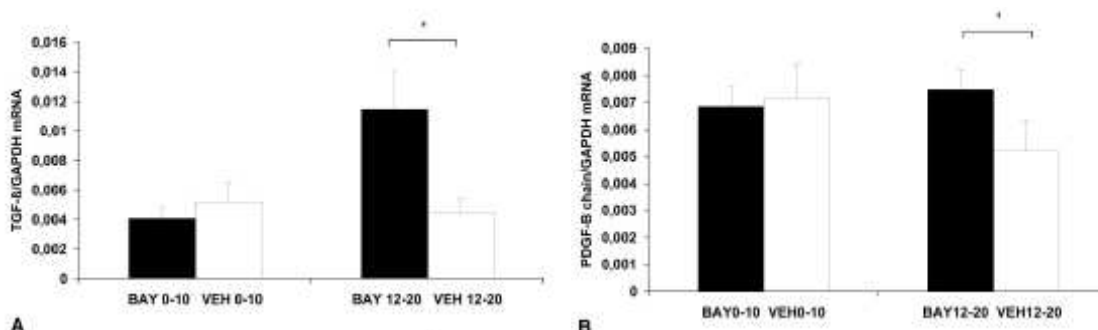
A vizsgálat során BAY 12-9566 vegyületet, az MMP-2, -3 és -9 inhibitorát alkalmaztuk patkány CAN modellben. Az MMP-k gátlásának különböző hatásai voltak a vese-átültetés után eltelt időtől függően. Míg a kontrollokhoz viszonyítva az MMP-k korai gátlása jelentősen javította a graft funkcióját és morfológiáját, a késői MMP gátlás jelentősen rontotta a graft funkcióját.

Érdekes megjegyezni, hogy a jótékony hosszú távú hatásokat egy, a poszttranszplantációs fázis elején alkalmazott rövid kezeléssel értük el, amikor a legjelentősebb az alloantigén-függő faktorok graft károsító hatása. Eredményeink megegyeznek egy tüdő-átültetési modellben megfigyeltekkel, ahol a korai MMP gátlás szintén javította az átültetés sikerét, különösen az ischemia-reperfúziós károsodás tekintetében (213). Az MMP-k fontosságát az akut szövetkárosodások mérséklésében erősen alátámasztja az MMP-9 célzott gátlásának védő hatása a szövetkárosodásra miokardiális ischemia-reperfúziós modellben

(225). Továbbá, egy akut vese-allograft kilökődési modellben a fehérjevizelés csökkent az átültetést követő hét napos MMP gátló kezelés hatására (211).

38. ábra

TGF- β és PDGF mRNS szintjei 20 héttel az átültetés után



(A) Transzformáló növekedési faktor- β (transforming growth factor TGF- β) BAY 12-9566 vegyülettel (■) vagy hordozóval (□) a 0. naptól a 10. napig (BAY 0-10, VEH 0-10) vagy a 12. héttől a 20. hétig (BAY 12-20, VEH 12-20) kezelt állatoknál. A korai BAY kezelést kapott állatokban (BAY 0-10) alacsonyabb TGF- β_1 mRNS szinteket mértünk, mint a kontrollokban (VEH 0-10), míg a késői kezelést kapott állatokban (BAY 12-20) a kontrollokhoz (VEH 12-20) viszonyítva magasabb TGF- β_1 mRNS szinteket mértünk (* $P < 0,05$).

(B) A trombocitából származó növekedési faktor B (platelet-derived growth factor, PDGF-B) mRNS szintjei 20 héttel az átültetés után BAY 12-9566 vegyülettel (■) vagy hordozóval (□) a 0. naptól a 10. napig (BAY 0-10, VEH 0-10) vagy a 12. héttől a 20. hétig (BAY 12-20, VEH 12-20) kezelt állatoknál. A PDGF-B mRNS szintek hasonlóak voltak a korai kezelésű csoportnál (BAY 0-10) és a kontrollnál (VEH 0-10), míg a transzplantáció utáni 12. héttől a 20. hétig késői BAY kezelést kapott állatoknál (BAY 12-20) a kontrollokhoz (VEH 12-20) viszonyítva jelentősen magasabb PDGF-B mRNS szintek mutatkoztak (* $P < 0,05$).

A kísérleti elrendezésünkben a korai BAY 12-9566 kezelés a transzplantáció utáni 0. naptól a 10. napig egybe esett a CAN modellünk részét képező 10 napos Cyclosporin A kezeléssel. Nem valószínű azonban, hogy a Cyclosporin A kezelésnek független hatása volt, mivel a kontroll állatok szintén ugyanazt a Cyclosporin dózist kapták anélkül, hogy a CAN kialakulása szempontjából jótékony hatást észleltük volna. Másrésről, a BAY 12-9566 önmaga is befolyásolhatja a Cyclosporin plazmabeli szintjeit, amelyek hatással lehetnek a graft gyulladásos folyamataira és hasonlóképpen a kalcineurin-inhibitorral kapcsolatos nefrotoxicitásra. Azonban mind a BAY 12-9566 vegyülettel, mind a hordozóval kezelt állatoknál hasonló vérnyomást és T-sejt infiltrációt tapasztaltunk. Így tehát nem valószínű, hogy a BAY 12-9566 megemelkedett Cyclosporin szintekhez vezetne.

A graft akut károsodása utáni korai fázis során két mechanizmus játszhat szerepet az ECM degradáció fibrózist elősegítő hatásaiban. Először, a vese akut károsodása (például ischemia-reperfúzió vagy átültetés után) (211) esetén a normális ECM hálózat felborulása aktiválhatja a mezangiális sejteket (226), amelyek általában a nyugalmi, nem fibrogén fenotípusban állapotban vannak. A IV. típusú kollagénból, lamininból és proteoglikánokból álló ECM-el való érintkezésük biztosítja nyugalmi állapotukat (227). A

normális ECM-el való kontaktus elvesztése következtében létrejövő mezangiális sejt aktivációt *in vitro* megfigyelések támasztják alá: a mátrix eltávolítása a nyugalmi helyzetben lévő mezangiális sejteket profibrogén myofibroblasztos fenotípussá alakította át. A myofibroblasztok fontos szerepet játszanak, a glomeruloszklerózishoz és a fibrózis progressziójában (228). Így a korai MMP gátlás az allograftokban elősegítheti a fiziológiás ECM megőrzését. Ez a profibrogén sejtek, mint például a mezangiális sejtek vagy intersticiális fibroblasztok kisebb mértékű aktiválását jelentheti, ami a CAN lassabb progresszióját eredményezi.

Másodszor, az ECM fragmensek, melyek MMPok aktivitása során keletkeznek, a leukociták számára kemotaktikus faktorokként és ko-stimulátorokként viselkedhetnek, így indukálhatják a leukociták osztódását, érből történő kilépését és aktiválását. Továbbá az MMP-k hasíthatják a kemokineket, így erősítik gyulladás serkentő hatásukat (229). Az MMP-2 és -9, amelyeket az aktivált T-sejtek is termelhetnek, elősegíthetik a gyulladásos sejtek érből történő kilépését és migrációját a gyulladás helyére (229). Pontosabban, a fibronektin elősegítheti az olyan gyulladásos sejtek kötődését, mint a monociták és erősítheti a citokin és MMP termelést, így súlyosbítva a gyulladást és a fibrózist (230). Továbbá, az MMP-k bazális membrán károsító hatása aktiválja az endotél sejteket (231). Ez szintén hozzájárulhat a leukocita/monocita infiltrációhoz, így elősegítve az intersticiális fibrózist. Tény, hogy kísérleteinkben az MMP-k korai gátlása csökkentette a makrofág infiltrációt. Így tehát a korai MMP gátlás kedvező hatásai származhatnak a csökkentett leukocita/monocita infiltrációból is, amihez hozzájárul a kemoattraktánsok termelésének vagy az endotél sejtek aktiválásának a gátlása is.

Eredményeinkkel ellentétben, az MMP-k gátlása vese ischemia-reperfúziós modellben nem javította a szerv funkcióját vagy a morfológiai végkifejletet (232). A szerzők azonban eltérő MMP inhibitor alkalmaztak és a károsodás bekövetkezte utáni 24 órás megfigyelési időszak túl rövid lehet a kísérleti csoportok közötti szignifikáns különbségek észleléséhez. A korai MMP gátlás kedvező hatásaival ellentétben, a késleltetett BAY 12-9566 kezelés rontotta a graft funkcióját és súlyosbította a CAN-t a graftok súlyosabb glomeruloszklerózisával párhuzamosan. Úgy tűnik tehát, hogy az MMP-k csökkent aktivitása kapcsolatba hozható a fibrózis progressziójával olyan krónikus vesebetegség modellekben, mint például diabétesz mellitus (233), öregedés (234) vagy nefrózis-szindróma (235).

Az adatok azt sugallják, hogy csökkentett MMP aktivitás vagy expresszió esetén az intracelluláris fehérjék és az ECM alkotóelemek felhalmozódása hozzájárul a glomeruloszklerózis és tubulointersticiális fibrózis kialakulásához. Az ECM csökkent

degradációja az elsősorban I. és III. típusú, elsődlegesen az interstíciumban előforduló kollagénből álló fibrilláris mátrix nettó növekedéséhez vezet, amely tovább indukálja a glomeruláris hipertrófiát, a glomeruláris bazális membrán vastagodását és a mezangium felszaporodását (236).

A vizsgálatunk során a patológiai elváltozások és csökkent vese funkció mellett az MMP-k késői gátlása fokozott TGF- β és PDGF-B lánc mRNS-ek szintézist eredményezett. Ez származhat a mononukleáris sejtek, (limfociták és makrofágok) fokozott infiltrációjából, ami szintén stimulálhatja a jelen levő sejteket ezen növekedési faktorok termelésére.

A TGF- β -t és PDGF-B-t átültetett vesékben az infiltráló sejtekre és fibroblasztokra továbbá glomerulosokra és érfalra lokalizálták (202). A késői MMP gátlás után fokozott makrofág infiltrációt is megfigyeltünk. Továbbá, a TGF- β nem csak számos mátrix komponens, például az I., III., IV. és V. típusú kollagének, a fibronektin, a laminin és a proteoglikánok szintézisét fokozza, hanem csökkenti az MMP aktivitást is (237). Ennek eredményeképpen a növekedési faktorok részvétele az MMP gátlás egy ördögi körét eredményezheti, amely végül elősegíti az allograft fibrózist és a CAN progresszióját. A növekedési faktor mRNS szintek azonban nem különböztek szignifikánsan a kísérlet során korai MMP kezelést kapott állatokban. Ennek oka lehetett, hogy a növekedési faktor szintek a transzplantációt követő hosszabb idő eltelte után lassan emelkedtek.

Összefoglalásképpen megállapíthatjuk, hogy az MMP gátlás a közvetlen poszttranszplantációs időszakban enyhítheti a CAN-t, feltételezhetően a fiziológias ECM lebontásának gátlásával, ami a kemoattraktánsok és profibrogén faktorok csökkent termelésével jár. Ugyanakkor az MMP gátlás elősegíti a CAN progresszióját, ha a transzplantáció késői fázisaiban alkalmazzuk a kezelést, feltételezhetően a feleslegesen termelődő intersticiális ECM csökkent bomlása révén. Ez azt sugallja, hogy az MMP-k CAN kifejlődésében és progressziójában időtől függően változó patogenetikus szerepet játszanak.

Nemi hormonok szerepe (7, 25, 26)

Krónikus veseelégtelenség kifejlődése nőkben lassabb, mint férfiakban. Újabban feltételezik, hogy a női nemi hormonok, például az ösztrogének, felelősek lehetnek a nők progresszív vesekárosodás iránti kisebb fogékonyságáért (238).

Glomerulosclerosis és atherosclerosis patogenezisében közös elemek lehetségesek. Felvetették, hogy az ösztrogének renoprotektív hatása valószínűleg a glomeruláris mesangiális sejtekre gyakorolt hatásukkal kapcsolatos hasonló módon, mint az ösztrogéneknek az ér simaizomsejtjeire gyakorolt hatása atherosclerosisnál. Ezt az elméletet támasztja alá, hogy ösztradiolról kimutatták, hogy gátolja a sejtszaporodást, valamint az I és IV típusú kollagén szintézisét, és gátolja a transzformáló növekedési faktor (TGF) - β és/vagy a trombocita-eredetű növekedési faktor (PDGF) közvetítette IV típusú kollagén expresszióját mesangiális sejtekben (239). Az ösztradiol továbbá serkenti a mátrix-metalloproteinázok szintézisét mesangiális sejtekben, amely arra utal, hogy ösztrogének korlátozhatják a glomeruláris hegesedést a mátrix bontásának fokozásával (240). Az ösztrogén jótékony hatását allograft nephropathiában is leírták (241).

Az ösztrogének renoprotektív tulajdonságait azonban a közelmúltban kétségbe vonták. Baylis és munkatársai (242) arról számoltak be, hogy nőstény patkányokban a korral járó glomerulopathia ösztrogénekkel nem befolyásolható. Hasonlóképpen Mulroney és munkatársai (243) bizonyították, hogy ovariectomiának nincs hatása glomeruláris hypertrophia és glomeruláris károsodás fejlődésére uninephrectomizált nőstény patkányokban. Végül pedig elhízott Zucker-patkányokban és analbuminémiás Nagase-patkányokban ösztradiol adagolása rontotta a vesefunkciót és kiterjedt glomerulosclerosist okozott (244).

Felvetették, hogy a progeszteronnak ösztrogénnel együtt való adása módosíthatja az ösztrogén cardio- és atheroprotektív hatását. Egyes kutatók az ösztrogén kedvező hatásainak csökkenését figyelték meg (245), míg más vizsgálatokban a progeszteron adásának semmilyen kedvezőtlen hatásáról nem számoltak be (246). Mindazonáltal kevés információ áll rendelkezésre arról, vajon progeszteron ösztrogénekkel együtt való adása befolyásolja-e ösztrogének vesekárosodásra kifejtett hatását.

²⁵ Gross ML, Adamczak M, Rabe T, Harbi NA, Krti J, Koch A, **Hamar P**, Amann K, Ritz E Beneficial effects of estrogens on indices of renal damage in uninephrectomised SHRsp rats J Am Soc Nephrol **2004** 15: 348-58

²⁶ Antus B, **Hamar P**, Kökény G, Szollosi Z, Mucsi I, Nemes Z, Rosivall L: Estradiol is nephroprotective in the rat remnant kidney. Nephrol Dial Transpl **2003** 18: 54-61

A női nemi hormonok szerepét vizsgáló első tanulmányunkban ösztrogének progresszív glomerulosclerosis kifejlődésében játszott szerepét vizsgáltuk nőstény Wistar-patkányok szubtotális vese ablatióját követően. Vizsgáltuk tovább, vajon progeszteronnak ösztrogénnel együtt történő adása befolyásolja-e ösztrogének hatását ebben a folyamatban. Végül pedig tanulmányoztuk, a TGF- β -ra és PDGF-re, amelyek a glomerulosclerosis jelenleg ismert legfontosabb növekesi faktorai, a szteroid női nemi hormonok hatnak-e.

A női nemi hormonokkal kapcsolatos kísérletes vizsgálatok ellentmondásos adatainak áttekintése közben elhatároztuk, hogy újra megvizsgáljuk az ösztrogének a progresszióra kifejtett hatását egy enyhébb vesekárosodással járó patkánymodellben is, hogy behatóbban tanulmányozhassuk a vese morфомetriai elváltozásait. Mivel az emberi betegségekben a nemi hovatartozás hatása nagyságrendekben mérhető, arra következtettünk, hogy az ösztrogének mennyiségi tekintetben nem játszhatnak fő szerepet. Ezért választottuk az uninephrectomizált (UNX), spontán hipertenzív (SHRsp) patkánymodellt, úgy gondolva, hogy a viszonylag kismértékű hatások könnyek kimutathatatlanok maradhatnak, ha olyan modellt választunk, amelyben a veseműködés gyorsan elveszik (mint a korábbi kísérletben alkalmazott, subtotalis nephrectomia modell).

A nemi hormonok hatásai eltérőek lehetnek a vese különböző területein (247) és feltehetően az UNX utáni maradék vese kompenzációs növekedése során (248). Ezért, kvantitatíve elemeztük a vese zónáinak keresztmetszetét, a glomerulus-térfogatokat, glomeruláris sejtek számát, a glomeruluskárosodási indexeket, és a glomeruluskárosodás mediátorait.

Eredmények

Ösztrogének és progeszteron hatásai vese ablációs modellben

Kísérleti állatok funkcionális adatai

A vizsgálat kezdetén a testsúlyok hasonlóak voltak valamennyi csoportban (1. táblázat). A 24. héten a vehikulummal kezelt, ovariectomizált (OVX) patkányok testsúlya szignifikánsan nagyobb volt, mint az intakt (INT) vagy a nemi hormonnal kezelt állatoké (E, E+P). A nemi hormonnal kezelt állatoknál inkább csökkent a testsúly az intakt patkányokhoz képest.

A méh sorvadását ovariectomia teljességének érzékeny jelzőjének tekintik. A méh súlya, valamint a méhsúlynak a testsúlyhoz viszonyított aránya szignifikánsan kisebb volt a vehikulummal kezelt, ovariectomizált (OVX) állatoknál a vehikulummal kezelt, intakt patkányokhoz képest (INT) (1. táblázat). Az ösztrogénpótlás önmagában (E) vagy

progeszteronnal kombinációban (E+P) a méh súlyát hasonló szinten tartotta, az intakt petefészekkel rendelkező állatokéhoz.

24. Táblázat

A testsúlyok és a méh súlya a vese ablatiójának időpontjában és 24 héttel később.

Állatok	Kezelés	<i>n</i>	Testsúly (g)		Méh súlya (g)	Méhsúly/testsúly
			Vese ablatio	24. hét		
Intakt nőstények	Vehikulum (INT)	8	173±2,9	293±4,9	0,21±0,04	0,00064±0,00012
Ovariectomizált nőstények	Vehikulum (OVX)	8	198±8,2	345±20,3 ^a	0,08±0,01 ^b	0,00022±0,00003 ^b
	Ösztadiol (E)	7	177±5,2	260±8,8 ^c	0,19±0,02	0,00081±0,00008
	Ösztadiol+progeszteron (E+P)	8	180±4,1	256±9,1 ^c	0,18±0,02	0,00074±0,00009

^a $P < 0,005$ vs vehikulummal kezelt, intakt állatok (ANOVA)

^b $P < 0,01$ vs vehikulummal kezelt, intakt állatok (ANOVA)

^c $P < 0,01$ vs vehikulummal kezelt, ovariectomizált állatok (ANOVA)

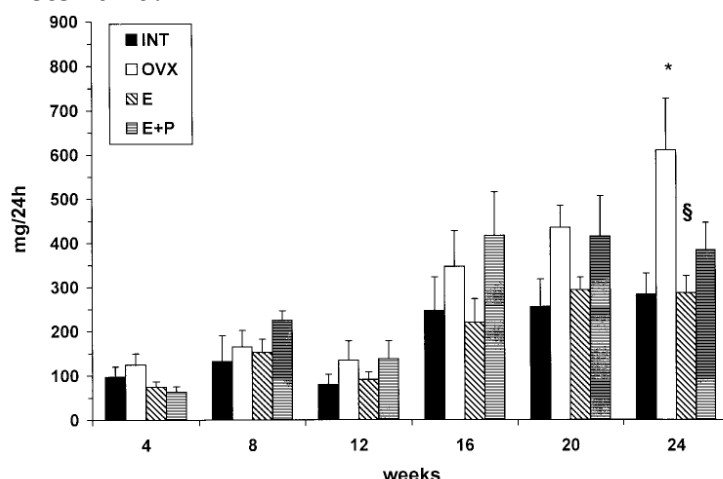
Funkcionális vizsgálatok

A 24. hétre a vehikulummal kezelt, ovariectomizált állatokban szignifikánsan kifejezettebb volt a proteinuria a vehikulummal kezelt, intakt patkányokhoz képest (OVX, $556,6 \pm 112,4$ összehasonlítva INT $283,2 \pm 47,5$ mg/24 h, $P < 0,05$, ANOVA) (39. ábra). Továbbá a szérum kreatinin szintje emelkedett, és ezeknél a patkányoknál a kreatinin-clearance beszűkült (25. Táblázat). Az ösztradiolpótlás az közel intakt patkányoknál megfigyelhető szintre csökkentette mind a proteinuriát (E, $286,4 \pm 39,1$ összehasonlítva OVX, $556,6 \pm 112,4$ mg/24 h, $P < 0,05$, ANOVA), mind a szérum kreatininszintjét, Hasonlóképpen a kreatinin-clearance az ösztradiollal kezelt állatokban jobban megmaradt, mint a vehikulummal kezelt, ovariectomizált patkányoknál. A progeszteronnak ösztradiollal együtt való adása inkább negatív irányba befolyásolta az ösztadiol kedvező hatásait mind a vizeletben kiválasztott fehérje (E, $286,4 \pm 39,1$ mg/24 h összehasonlítva E+P, $383,6 \pm 62,6$ mg/24 h), mind a szérum kreatinin tekintetében, de ezek a különbségek statisztikailag nem voltak szignifikánsak.

Az ovariectomia a plazma 17β -ösztadiol-szintjének szignifikáns csökkenését okozza (25. Táblázat). A csak ösztadiollal (E) vagy progeszteronnal kombinációban (E+P) kezelt patkányokban az ösztadiolszint az irodalomban az intakt, nőstény patkányokra leírt tartományba esett (249), és nem különbözött szignifikánsan az ebben a vizsgálatban a vehikulummal kezelt, intakt állatok értékeitől (amelyeket véletlenszerűen vettünk az ösztrus ciklus során). Az egyik ösztadiollal kezelt patkánynál különlegesen magas ösztadiolértéket tapasztaltunk (> 300 pg/ml), ezt az állatot kizártuk a vizsgálatból.

Az ovariectomia a szérumban progeszteron koncentrációját is csökkentette (25. Táblázat). Progeszteronnak az ösztadiol kezeléssel együtt való adása (E+P) az irodalomban eddig közölt adatokhoz (249) és az ebben a vizsgálatban vehikulummal kezelt, intakt állatokhoz (INT) hasonló progeszteron koncentrációt eredményezett a plazmában.

39. ábra Proteinuria.



* $P < 0,05$ vs vehikulummal kezelt, intakt állatok; (§ $P < 0,05$ vs vehikulummal kezelt, ovariectomizált állatok)

25. Táblázat Artériás vérnyomás és szérumértékek átlaga

Állatok	Kezelés	Artériás vérnyomás átlaga (mmHg)	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Kreatinin-clearance (ml/min/100 g testsúly)	17 β -ösztadiol (pg/ml)	Progeszteron (ng/ml)
Intakt nőstények	Vehikulum (INT)	96,2 $\pm$ 4,4	58,9 $\pm$ 4,1	0,25 $\pm$ 0,02	67,6 $\pm$ 18,2	43,6 $\pm$ 5,6
Ovariectomizált nőstények	Vehikulum (OVX)	110,3 $\pm$ 9,7	84,8 $\pm$ 12,9 ^a	0,19 $\pm$ 0,04	23,1 $\pm$ 2,9 ^c	18,9 $\pm$ 4,7 ^c
	Ösztadiol (E)	92 $\pm$ 9,1	53,9 $\pm$ 2,9 ^b	0,28 $\pm$ 0,11	76,3 $\pm$ 16,6 ^b	23,1 $\pm$ 3,6
	Ösztadiol+progeszteron (E+P)	93,5 $\pm$ 4,3	62,7 $\pm$ 3,9	0,20 $\pm$ 0,01	68,4 $\pm$ 9,3 ^b	50,7 $\pm$ 4,6 ^d

^a $P < 0,05$ vs vehikulummal kezelt, intakt állatok (ANOVA)

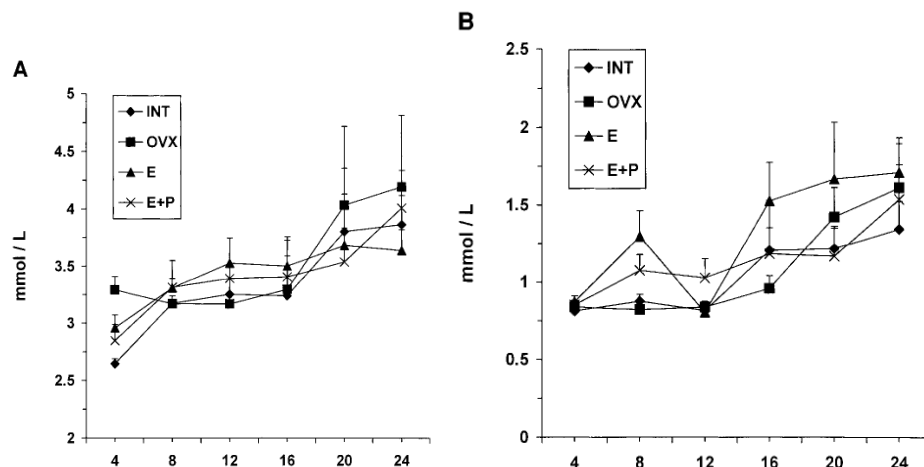
^b $P < 0,01$ vs vehikulummal kezelt, ovariectomizált állatok (ANOVA)

^c $P < 0,01$ vs vehikulummal kezelt, intakt állatok (ANOVA)

^d $P < 0,005$ vs 17 β -ösztadiollal kezelt, ovariectomizált állatok (ANOVA)

Az artériás vérnyomás átlag értéke a vehikulummal kezelt, ovariectomizált állatokban volt a legmagasabb, de a csoportok közötti különbség nem volt szignifikáns (25. Táblázat). Hasonlóképpen a lipidszintek, mind a szérumban koleszterin-, mind a triglicerid szintje hasonló volt a csoportok között a teljes követési időszak alatt (40. ábra). A 24. hétre azonban a koleszterinszint valamennyi csoportban valamelyest emelkedett.

40. ábra Lipid szintek



A: Szérum koleszterin.

B: Szérum triglicerid.

Szövetteni vizsgálat

Szignifikáns glomerulosclerosis alakult ki az ovariectomizált, vehikulummal kezelt patkányokban (OVX) az intakt patkányokhoz képest (INT) (3. táblázat). Szignifikáns növekedést tapasztaltunk a tubulointerstitialis fibrosisban is az ovariectomizált állatokban.

Glomerulosclerosis szignifikánsan csökkent az ösztradiollal kezelt állatoknál (E) a vehikulummal kezelt, ovariectomizált állatokhoz képest (OVX) (26. Táblázat). Ezekben az állatokban a kisebb mértékű glomeruláris károsodással párhuzamosan a tubulointerstitialis károsodás is enyhébb volt.

Mind a glomerulosclerosis index, mind a tubulointerstitialis fibrosis mértéke nagyobb volt azokban az állatokban, amelyek kombinált nemihormon-pótlásos terápiát kaptak (E+P) azokhoz az állatokhoz képest, amelyek csak ösztradiol kezelést kaptak (E); ezek a különbségek azonban nem voltak szignifikánsak (26. Táblázat). Ugyanígy sem a glomerulosclerosis index, sem a tubulointerstitialis fibrosis nem különbözött szignifikánsan a kombinált hormonpótlást kapó állatoknál (E+P) és a vehikulumot kapó állatoknál (OVX).

26. Táblázat

A maradékvese-modell szövettani jellemzői

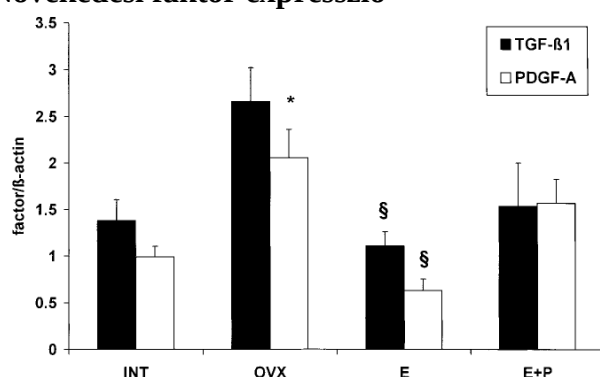
Állatok	Kezelés	Glomerulosclerosis index (0-3)	Tubulointerstitialis károsodás indexe (0-3)
Intakt nőstények	Vehikulum (INT)	1,5±0,18	0,75±0,25
Ovariectomizált nőstények	Vehikulum (OVX)	2,4±0,25 ^a	1,88±0,30 ^a
	Ösztradiol (E)	1,3±0,11 ^b	0,71±0,18 ^b
	Ösztradiol+progeszteron (E+P)	1,9±0,24	1,50±0,33

^a $P < 0,05$ vs vehikulummal kezelt, intakt állatok (Kruskal-Wallis vizsgálat)

^b $P < 0,05$ vs vehikulummal kezelt, ovariectomizált állatok (Kruskal-Wallis vizsgálat)

41. ábra

Növekedési faktor expresszió



TGF-β1 és PDGF-A-lánc mRNS-expressziója maradékvese-modellben a vizsgálat végén. (* $P < 0,05$ vs vehikulummal kezelt, intakt állatok; § $P < 0,05$ vs vehikulummal kezelt, ovariectomizált állatok)

Molekuláris vizsgálat

A TGF-β1 és PDGF-A-lánc semikvantitatív PCR-rel kimutatott mRNS-expressziója a vesefibrosis mértékével párhuzamosan alakult (41. ábra). Ovariectomia a PDGF-A expressziójának kb. kétszeres növekedését váltotta ki a vehikulummal kezelt állatokban (OVX, $2,1 \pm 0,3$ vs INT, $0,9 \pm 0,1$, $P < 0,01$, ANOVA). A TGF-β1 mRNS-szintje szintén fokozódott a vehikulummal kezelt, ovariectomizált patkányokban (OVX, $2,7 \pm 0,4$ vs INT, $1,4 \pm 0,2$), azonban ezek a különbségek nem voltak szignifikánsak. Az ösztradiolpótlás csökkentette mind a TGF-β1 (OVX, $2,7 \pm 0,4$ vs E, $1,1 \pm 0,2$, $P < 0,05$, ANOVA), mind PDGF-A expresszióját (OVX, $2,1 \pm 0,3$ vs E, $0,6 \pm 0,1$, $P < 0,005$, ANOVA). Azokban az állatokban, amelyek ösztradiolt progeszteronnal kombinációban kaptak, kissé emelkedett a TGF-β1 (E+P, $1,5 \pm 0,3$ vs E, $1,1 \pm 0,2$) és a PDGF-A expressziója (E+P, $1,6 \pm 0,3$ vs E, $0,6 \pm 0,1$) az ösztradiollal kezelt patkányokhoz képest.

Uninefrektomizált (UNX) Spontán hipertenzív (SHR) patkányok ösztadiol kezelése

Funkcionális eredmények

Uninefrektomizált és ovariectomizált (UNX/OVX) állatokban, az ösztadiol beadása csökkent táplálékfelvétellel járt (27. Táblázat, 28. Táblázat), az ösztadiolnak viszont nem volt ilyen hatása. A csoportokban mért testsúlyok között nem volt szignifikáns különbség, kivéve, hogy az ösztadiolal kezelt UNX/OVX állatok testsúlya nagyobb volt. A vese/súly testsúly arány szignifikánsan magasabb volt az UNX/OVX állatokban. A perfusioval fixált uterusok súlya szignifikánsan alacsonyabb volt a vivőanyaggal kezelt UNX/OVX állatokban, mint a kísérletben szereplő többi csoportban.

27. Táblázat

Az állatokról a kísérletek végén kapott adatok

	Testsúly (g)	Vese/súly (g)	Sys RR (Hgmm)	Albuminuria (mg/24 h)	Se [17β-Ö2] (pg/ml)	Se[T] (ng/dl)	Uterus súlya (g)
UNX/OVX ál + vivőanyag (n = 9)	217 ± 9	0,98 ± 0,08 ^{b,c,d}	191 ± 17	1,10 ± 0,46 ^b	12,9 ± 9,23 ^{c,e}	16,0 ± 6,6 ^{b,c,d}	1.15 ± 0.2 ^c
UNX/OVX ál + 17β-ösztadiol-3-benzoát (n = 10)	191 ± 7 ^d	1, ± 0,06 ^{b,c}	191 ± 24	1,12 ± 0,53 ^b	102 ± 60,0	20,5 ± 5,7 ^{b,c,d}	1.32 ± 0.22 ^c
UNX/OVX + vivőanyag (n = 10)	203 ± 9 ^d	1,54 ± 0,19 ^d	192 ± 23	25,4 ± 8,52	8,0 ± 5,12 ^{c,e}	6,0 ± 2,8	0.49 ± 0.14
UNX/OVX + 17β-ösztadiol-3-benzoát (n = 11)	192 ± 7 ^d	1,63 ± 0,22 ^d	209 ± 17	15,4 ± 6,12 ^b	101 ± 94,4	9,3 ± 4,13	0.89 ± 0.19 ^c
UNX/OVX + ösztadiol (n = 9)	235 ± 13	1,39 ± 0,12	178 ± 21	6,54 ± 2,24 ^b	11,3 ± 3,87 ^{c,e}	5,6 ± 2,78	0.74 ± 0.14 ^c
ANOVA	P < 0,05	P < 0,05	NS	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05

^a UNX, egyoldali nephrectomizált; OVX, ovariectomizált. 17β-Ö2: 17β-Ö2ztradiol-3-benzoát, Se[T]: tesztoszteron koncentráció

^b P < 0,05 versus UNX/OVX + vivőanyag.

^c P < 0,05 versus UNX/OVX + 17β-ösztadiol-3-benzoát.

^d P < 0,05 versus UNX/OVX + ösztadiol.

^e P < 0,05 versus ál + 17β-ösztadiol3-benzoát.

28. Táblázat

A kiválasztott vegyületek koncentrációja a plazmában a kísérlet végén

	Kreatinin (mg/dl)	Urea (mg/dl)	Koleszterin (mg/dl)	Trigliceridek (mg/dl)	HDL Koleszterin (mg/dl)	LDL Koleszterin (mg/dl)
UNX/OVX ál + vivőanyag (n = 9)	0,55 ± 0,18 ^a	53,0 ± 17,4 ^{a,b}	107 ± 14,6 ^{a,b,c}	69,1 ± 17,04 ^b	64,3 ± 5,96 ^{a,c}	29,22 ± 12,78 ^{a,b}
UNX/OVX ál + 17β-ösztadiol-3-benzoát (n = 10)	0,48 ± 0,06 ^{a,b}	44,8 ± 5,07 ^{a,b}	107 ± 16,3 ^{a,b,c}	83,9 ± 25,3 ^b	60,7 ± 8,31 ^{a,b,c}	29,1 ± 12,64 ^{a,b}
UNX/OVX + vivőanyag (n = 10)	0,68 ± 0,15	71,5 ± 11,1	148 ± 24,0	73,8 ± 32,4 ^b	87,6 ± 11,7	45,2 ± 11,9
UNX/OVX + 17β-ösztadiol-3-benzoát (n = 11)	0,63 ± 0,09 ^a	72,8 ± 16,03	144 ± 31,3	117 ± 30,2	72,2 ± 18,3	47,56 ± 18,3
UNX/OVX + ösztadiol (n = 9)	0,53 ± 0,06 ^a	55,4 ± 4,6 ^{a,b}	133 ± 16,3	75,0 ± 21,3 ^b	83,1 ± 6,62	35,0 ± 14,7
ANOVA	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05

^a P < 0,05 versus UNX/OVX + vivőanyag.

^b P < 0,05 versus UNX/OVX + 17β-ösztadiol-3-benzoát.

^c P < 0,05 versus UNX/OVX + ösztadiol.

A vérnyomás tekintetében nem volt szignifikáns különbség az egyes csoportok között. Az UNX/OVX állatokban szembeszökően súlyos albuminuriát figyeltünk meg. Az albuminexcretio mindkét ösztrogén hatására szignifikánsan lecsökkent. Az ösztradiol koncentrációja a plazmában magasabb volt az ösztradiollal kezelt, ál-operált és UNX/OVX állatokban. Az ösztriollal kezelt állatokban nem találtunk változást az ösztradiol plazmában mért koncentrációját illetően. A tesztoszteron koncentrációja a plazmában alacsonyabb volt az UNX/OVX csoportokban, mint az ál-operált állatokban, és a tesztoszteron koncentrációt nem befolyásolta az ösztrogénkezelés.

A kreatinin és urea koncentrációja szignifikánsan magasabb volt a vivőanyaggal kezelt UNX/OVX állatokban, mint az ál-operáltakban. Az ösztrogénkezelés szignifikánsan lecsökkentette a kreatinin koncentrációkat, de csak az ösztriol csökkentette az urea koncentrációját is (28. Táblázat).

Morfológiai vizsgálatok eredményei

Az UNX/OVX állatok szignifikánsan magasabb GSI-t mutattak, mint az ál-operált patkányok (29. Táblázat). A GSI szignifikánsan alacsonyabb volt az ösztradiollal vagy ösztriollal kezelt patkányokban, mint a vivőanyaggal kezelt patkányokban. A tubulointerstitialis károsodási index szignifikánsan magasabb volt az UNX/OVX patkányokban, mint a kontrol állatokban, viszont alacsonyabb volt az ösztriollal kezelt állatokban, de nem az ösztradiollal kezeltékben. A vascularis károsodási index szignifikánsan magasabb volt az UNX/OVX, mint a kontrol állatokban. UNX/OVX állatokon végzett mindkét kezelés szignifikánsan csökkentette a vascularis károsodást.

29. Táblázat

Vesekárosodási indexek és glomeruláris geometriai paraméterek

	GSI	TBI	VI	Glomerulus szám/vese	Glomerulus térfogat ($\times 10^6 \mu\text{m}^3$)	Kéreg térfogat (cm^3)	Medulla térfogat (cm^3)
UNX/OVX ál + vivőanyag (n = 9)	0,38 $\pm$ 0,08 ^{b,c}	0,68 $\pm$ 0,09 ^{b,c}	0,53 $\pm$ 0,08 ^b	42,272 $\pm$ 3973	1,08 $\pm$ 0,09 ^b	0,61 $\pm$ 0,04 ^{b,c,d}	0,33 $\pm$ 0,03 ^{b,c}
UNX/OVX ál + 17 β -Ö (n = 10)	0,34 $\pm$ 0,13 ^{b,c}	0,47 $\pm$ 0,16 ^{b,c}	0,48 $\pm$ 0,12 ^b	40,333 $\pm$ 1973	1,25 $\pm$ 0,15 ^b	0,65 $\pm$ 0,03 ^{b,c,d}	0,32 $\pm$ 0,03 ^{b,c}
UNX/OVX + vivőanyag (n = 10)	1,46 $\pm$ 0,09	1,08 $\pm$ 0,16	0,78 $\pm$ 0,17	38,031 $\pm$ 2735	1,64 $\pm$ 0,2 ^{c,d}	0,87 $\pm$ 0,07	0,47 $\pm$ 0,04 ^{c,d}
UNX/OVX + 17 β -Ö (n = 11)	0,69 $\pm$ 0,16 ^b	0,95 $\pm$ 0,1 ^b	0,51 $\pm$ 0,11 ^b	38,623 $\pm$ 4450	1,12 $\pm$ 0,16	0,84 $\pm$ 0,12	0,43 $\pm$ 0,03
UNX/OVX + ösztriol (n = 9)	0,21 $\pm$ 0,12 ^{b,c}	0,60 $\pm$ 0,26 ^{b,c}	0,48 $\pm$ 0,11 ^b	38,623 $\pm$ 9192	1,12 $\pm$ 0,38	0,84 $\pm$ 0,09	0,41 $\pm$ 0,01
ANOVA	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05	NS	P < 0,05	P < 0,05	P < 0,05

^a GSI, glomerulosclerosis index; TBI, tubulointerstitial károsodási index; VI, vascularis károsodási index.

^b P < 0,05 versus UNX/OVX + vivőanyag.

^c P < 0,05 versus UNX/OVX + 17 β -ösztadiol-3-benzoát.

^d P < 0,05 versus UNX/OVX + ösztriol

Az átlagos glomerulustérfogot szignifikánsan magasabb volt a vivőanyaggal kezelt UNX/OVX állatokban, mint a ál-operáltakban. UNX/OVX állatokban mindkét ösztrogén csökkentette az átlagos glomerulustérfogatot.

A podocyta szám szignifikánsan alacsonyabb volt a vivőanyaggal kezelt UNX/OVX patkányokban, mint a vivőanyaggal kezelt és ál-operált állatokban (30. Táblázat). Az átlagos podocyta-térfogatot egyetlen beavatkozás sem befolyásolta. A mesangiális sejtek száma magasabb volt a vivőanyaggal kezelt UNX/OVX patkányokban, mint a vivőanyaggal kezelt és ál-operált állatokban, viszont alacsonyabb volt az ösztriollal kezelt állatokban, de az ösztradiollal kezelt állatokban nem. A mesangiális sejtek száma szintén magasabb volt a vivőanyaggal kezelt UNX/OVX patkányokban, mint a ál-operált kontroll patkányokban és a kezelt patkányokban. Végül, az egyes glomerulusokra eső endothelsejtek száma, a kezeléstől függetlenül, szignifikánsan magasabb volt az összes UNX/OVX csoportban. Az átlagos endothelsejt-térfogot is magasabb volt az UNX/OVX patkányokban, mint az ál-operált kontroll patkányokban. Mindkét kezelés szignifikánsan csökkentette az endothelsejtek térfogát.

30. Táblázat
Glomeruláris sejtek

	Podocyta szám m/glom	A podocyta térfogot (μm^3)	Mesang sejt szám/glom	Mesang sejt térfogot (μm^3)	Endothelsejt szám/glom	Endothelsejt térfogot (μm^3)
UNX/OVX ál+vivőanyag (n = 9)	110 ± 15 ^a	475 ± 56	112 ± 41 ^{a,b}	173 ± 43 ^a	116 ± 27 ^{a,b,c}	144 ± 45 ^a
UNX/OVX ál + 17 β -Ö (n = 10)	97 ± 21	361 ± 126	143 ± 33 ^{a,b}	184 ± 52 ^a	124 ± 38 ^{a,b}	129 ± 23 ^a
UNX/OVX + vivőanyag (n = 10)	67 ± 12	478 ± 116	206 ± 35	303 ± 142 ^{b,c}	166 ± 40	218 ± 31 ^{b,c}
UNX/OVX + 17 β -Ö (n = 11)	96 ± 38	468 ± 226	263 ± 57	198 ± 64	186 ± 24	121 ± 43
UNX/OVX + ösztriol (n = 9)	84 ± 35	390 ± 137	167 ± 45 ^{a,b}	127 ± 143	175 ± 42	110 ± 21
ANOVA	$P < 0.05$	NS	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$

^a $P < 0,05$ versus UNX/OVX + vivőanyag.

^b $P < 0,05$ versus UNX/OVX + 17 β -ösztradiol-3-benzoát.

^c $P < 0,05$ versus UNX/OVX + ösztriol.

A kapilláris hossz-sűrűség és a teljes glomeruláris kapilláris hossz szignifikánsan alacsonyabb volt az ösztradiollal kezelt állatokban, mint az ösztriollal kezelt UNX/OVX állatokban (31. Táblázat). A frakcionális glomeruláris kapilláris-köteg térfogata tekintetében nem volt különbség az egyes csoportok között. A legmagasabb frakcionális mesangiális mátrix-térfogatot a vivőanyaggal kezelt UNX/OVX állatokban találtuk és ez az érték alacsonyabb volt az ösztriollal kezelt állatokban, de az ösztradiollal kezelt állatokban nem.

31. Táblázat

A glomeruláris kapillárisok hosszúsúsége (Lv), a glomeruláris kapillárisok teljes hossza (L_{total}), frakcionális glomeruláris kapilláris érgomolyag térfogat, és frakcionális mesangiális mátrixtérfogat

	LV (mm/mm ³)	L _{total} (m/vese)	Frakcionális glomeruláris kapilláris tuft térfogat (glomerulus %)	Frakcionális mesangiális mátrixtérfogat (tuft%)
UNX/OVX ál + vivőanyag (n = 9)	11,330 ± 2705 ^a	1250 ± 364 ^a	79,7 ± 3,19	1,94 ± 0,33 ^{a,b}
UNX/OVX ál + 17β- ösztadiol-3-benzoát (n = 10)	9421 ± 2584 ^a	1198 ± 371 ^a	80,3 ± 3,28	2,00 ± 0,49 ^{a,b}
UNX/OVX + vivőanyag (n = 10)	8554 ± 953 ^a	1334 ± 181 ^a	74,5 ± 4,51	5,43 ± 0,97
UNX/OVX + 17β-ösztadiol- 3-benzoát (n = 11)	8225 ± 2106	928 ± 309	76,0 ± 4,15	5,25 ± 0,66
UNX/OVX + ösztrol (n = 9)	9779 ± 2368 ^a	1260 ± 595 ^a	78,5 ± 4,20	2,88 ± 0,49 ^{a,b}
ANOVA	P < 0,05	P < 0,05	NS	P < 0,05

^a P < 0,05 versus UNX/OVX + 17β-ösztadiol3-benzoát.

^b P < 0,05 versus UNX/OVX + vivőanyag.

Immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei

A podocyták desmin festése, a podocyták károsodásának korai markere, kezeletlen UNX/OVX állatokban pozitív volt (0,48 ± 0,31), a vivőanyaggal kezelt és ál-operált kontrol állatokkal ellentétben (0,04 ± 0,02) (48/A-D. ábrák). Az ösztadiol-kezeléssel (0,68 ± 0,32) ellentétben, az ösztrol-kezelés (0,05 ± 0,01) szignifikánsan csökkentette a podocyták desmin festődését (P < 0,05). A PCNA-pozitv sejtek száma, ami a glomeruláris sejtek proliferációjának indexe, szignifikánsan lecsökkent az UNX/OVX állatokban. PCNA pozitivitásra az ösztadiolnak nem volt szignifikáns hatása, viszont az ösztrol-kezelés jelentősen csökkentette a PCNA-pozitv sejtek számát (49. ábra).

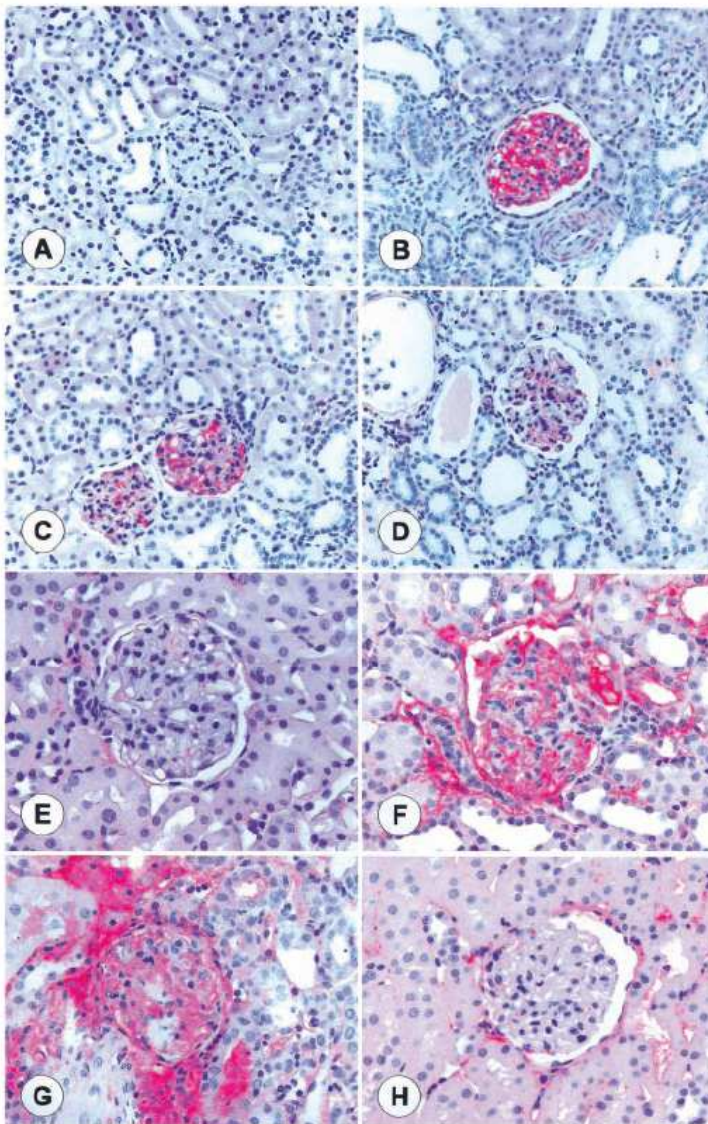
Az ET-1 fehérje glomeruláris, és még kifejezettebben, a tubulointerstitialis expressziója szignifikánsan fokozódott az UNX/OVX állatokban. Az ET-1 expresszió nem tért el szignifikánsan az ösztadiollal kezelt állatokban és enyhén, de szignifikánsan alacsonyabb volt az ösztrolal kezeltekben. Ahogyan a 49/b. ábra mutatja, az eNOS expressziót illetően is hasonló összefüggést figyeltünk meg. A TGF-β fehérjeexpressziója szignifikánsan (P < 0,05) magasabb volt az UNX/OVX állatok glomerulusaiban (0,72 ± 0,06) és az interstitiális térben (1,86 ± 0,21), a vivőanyaggal kezelt és ál-operált állatokban megfigyelt glomeruláris (0,11 ± 0,13) és tubulointerstitialis (0,3 ± 0,23) expresszióhoz képest (48/e-h. ábra). Az expresszió szignifikánsan nem változott meg az ösztadiollal kezelt állatokban (glomeruláris, 0,52 ± 0,08; tubulointerstitiális, 1,98 ± 0,83), viszont határozottan lecsökkent az ösztrolal kezelt állatokban (glomeruláris, 0,1 ± 0,06; tubulointerstitiális, 0,84 ± 0,55).

A kollagén IV festődés szignifikánsan (P < 0,05) erősebb volt az UNX/OVX állatokban (glomeruláris, 3,1 ± 0,42; tubulointerstitiális, 2,7 ± 0,26), a vivőanyaggal kezelt és ál-

operált állatokkal összehasonlítva (glomeruláris, $1 \pm 0,25$; tubulointerstitiális, $1,58 \pm 0,33$). A festődés az ösztradiol kezelés hatására (glomeruláris, $2,6 \pm 0,4$; tubulointerstitiális, $2,66 \pm 0,2$), minimálisan csökkent, de a glomeruláris expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt az ösztriollal kezelt állatokban (glomeruláris, $2,4 \pm 0,68$; tubulointerstitiális, $2,53 \pm 0,53$). Az α -ösztrogénreceptor glomeruláris expressziója szignifikánsan megemelkedett az UNX/OVX állatokban ($2,63 \pm 0,39$), a vivőanyaggal kezelt és ál-operált állatokhoz képest ($0,63 \pm 0,49$). Az ösztradiolnak nem volt hatása a glomeruláris expresszióra ($2,32 \pm 0,26$), viszont az UNX /OVX állatokkal összehasonlítva az ösztriol csökkentette a festődést ($1,03 \pm 0,06$, $P < 0,05$). Az α -ösztrogénreceptor glomeruláris expressziója szignifikánsan megemelkedett a vivőanyaggal kezelt UNX/OVX patkányokban ($2,04 \pm 0,35$) a vivőanyaggal kezelt és ál-operált állatokhoz képest ($1,01 \pm 0,67$). Mind az ösztradiol ($0,89 \pm 0,96$), mind az ösztriol ($1,21 \pm 0,17$) csökkentette az expressziót.

42. Ábra.

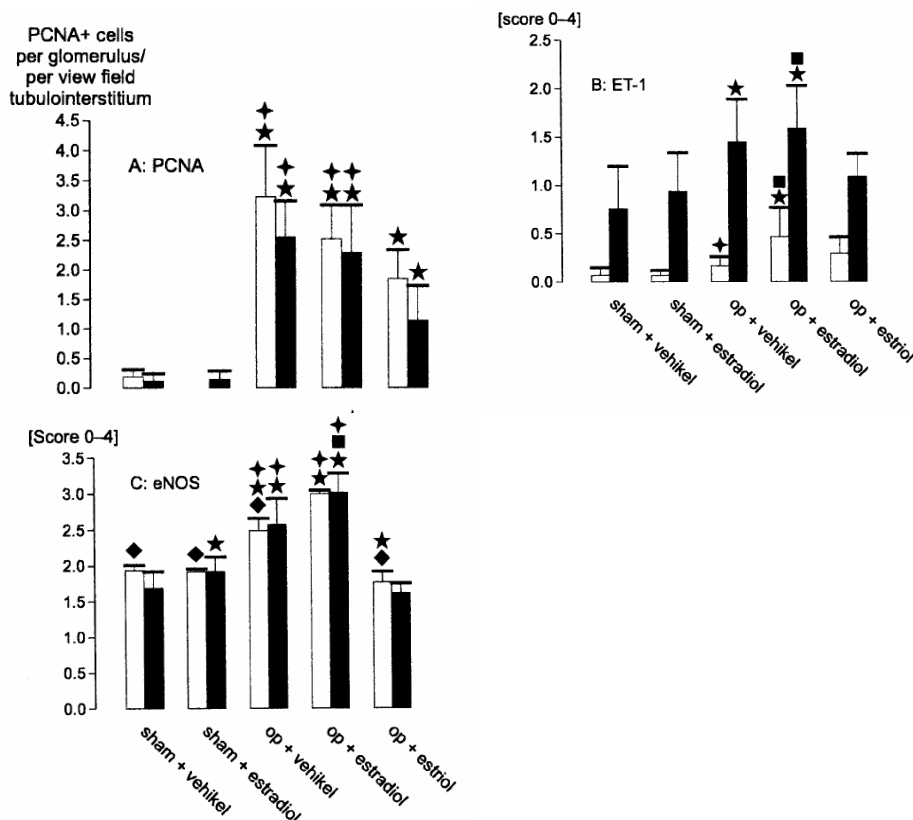
Desmin és TGF-beta immunfestés



A 17 β -ösztadiol-3-benzoát és az ösztriol hatása a desmin (A-D) (immunhisztokémiai festés, 250-szeres nagyítás) és a TGF - β expressziójára (E-H) (immunhisztokémiai festés, 300-szoros nagyítás). (A) Vivőanyaggal kezelt, ál-operált állat, gyakorlatilag nincs desminexpresszió. (B) Vivőanyaggal kezelt, egyoldali nephrectomizált (UNX) és ovariectomizált (OVX) patkány (UNX/OVX), feltűnő podocytá desminexpresszióval. (C) 17 β -ösztadiol-3-benzoáttal kezelt UNX/OVX patkány, enyhe desminexpresszióval. (D) Ösztadiollal kezelt UNX/OVX patkány, alacsony desminexpresszióval. (A) Vivőanyaggal kezelt, ál-operált állat, alacsony, az alapvonalnak megfelelő TGF - β expresszióval. (F) Vivőanyaggal kezelt UNX/OVX patkány, feltűnő mértékű TGF - β expresszióval. (C) 17 β -ösztadiol-3-benzoáttal kezelt UNX/OVX patkány, enyhébb TGF - β expresszióval. (H) Ösztadiollal kezelt UNX/OVX patkány, határérték körüli TGF - β expresszióval.

43. Ábra.

Endothelin, PCNA és eNOS immunfestés



A 17 β -ösztadiol-3-benzoát és az ösztriol hatása az endothelin-1 (ET-1), a proliferálódó sejtek sejtmag-antigénjének (PCNA), és az endothel nitrogén-monoxid szintetáz (eNOS) expressziójára, immunhisztokémiai értékelés alapján. □, Glomeruláris expresszió; ▬, tubulointerstitális expresszió. (A) A PCNA-pozitív sejtek gyakorisága (glomerulusmetszetenként és tubulointerstitiális látómezőnél) UNX/OVX állatok esetében a glomerulusokban és a tubulointerstitiális terekben következetesen megnövekedett a PCNA-pozitív sejtek száma. A 17 β -ösztadiol-3-benzoát és még inkább az ösztriol csökkentette a PCNA-pozitív sejtek glomerulusonkénti számát. A 17 β -ösztadiol-3-benzoáttal szemben az ösztriol csökkentette a tubulointerstitiális térben található PCNA-pozitív sejtek számát. (B) Az ET-1 tubulointerstitiális expressziója. Az expresszió fokozódott a vivőanyaggal kezelt UNX/OVX patkányokban és még tovább nőtt a 17 β -ösztadiol-3-benzoáttal kezelt patkányokban. Az ösztriol jelentős mértékben csökkentette ezt az expressziót. (C) Az eNOS glomeruláris és tubulointerstitiális expressziója. Az expresszió megemelkedett az UNX/OVX állatokban és magas is maradt a 17 β -ösztadiol-3-benzoáttal kezelt állatokban. Az ösztriol csökkentette az eNOS glomeruláris és tubulointerstitiális expresszióját. F, $P < 0,05$ versus operáció (op) + vivőanyag; }, $P < 0,05$ versus operáció + ösztadiol; P, $P < 0,05$ versus operáció + ösztriol; P, $P < 0,05$ versus ál-operáció + ösztadiol; P, $P < 0,05$ versus ál-operáció + vivőanyag.

Megbeszélés

Ösztrogének és progeszteron hatásai vese ablációs modellben

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az ösztrogén státusz fontos szerepet játszik glomerulosclerosis kifejlődésében nőstény patkányok szubtotális vese ablatióját követően. Az ováriumok eltávolítása után kialakult ösztrogénhiány a veseműködés gyorsabb romlásával társult, amely ösztadiolpótlással megakadályozható volt. Eredményeink azt mutatják, hogy az ösztrogének renoprotektív hatásúak krónikus vesekárosodás modelljében.

A kísérleti felállástól függően az ösztrogének különböző, és akár egymással ellentétes hatást is kifejthetnek a vesebetegség progressziójára. Nőstény, hyperkoleszterinémiás Imai-patkányban ovariectomiáról kimutatták, hogy felgyorsítja a vesekárosodást, míg ösztradiol pótlás enyhíti ezt a jelenséget (250). Hasonlóképpen korábban bizonyítottuk, hogy ösztrogének javítják krónikus allográf nephropathiát transzplantált patkányvesében (249). Azonban vannak ezekkel ellentétes beszámolók is. Például Baylis és munkatársai (242) közölték, hogy az öregedéssel együttjáró glomerulopathiát ösztrogének nem befolyásolják. Lehetséges, hogy különböző mechanizmusok vesznek részt az öregedés okozta glomerulopathiában, mint vese ablatiónál. A glomeruláris hipertenzióról ismert, hogy központi patogén szerepet játszik maradékvese-modellben, míg ez a kockázati tényező valószínűleg kevésbé fontos az öregedéssel járó glomeruláris károsodásnál (242). A kompenzációs vesenövekedés és a glomeruláris károsodás uninephrectomizált nőstény patkányokban szintén ösztrogénektől függetlennek tűnik (243). A veseműködés azonban viszonylag jól megmarad az egyik vese eltávolítása után, így következtetéseket levonni az ösztrogénnek progresszív fibrotikus folyamatokban betöltött szerepére vonatkozólag ezekből a kísérletekből nem lehet. Végül, azokban a patkányfajokban, amelyek spontán módon hyperglyceridémiásak, az ösztrogén elősegíti a vesekárosodást (244). Ezekben a modellekben ösztrogén adása tovább növeli a lipidszintet, amely progresszív vesekárosodáshoz vezet. A vizsgálatunkban alkalmazott Wistar-patkányok normolipidémiásak, és sem a gonadális állapotuk, sem az ösztrogénkezelés nem befolyásolta a lipidparamétereket. Adataink tehát nem támogatják a lipidek szerepét ösztrogének vesére gyakorolt hatásában.

Közismert, hogy az étkezéssel felvett fehérjék befolyásolják a vesebetegségek progresszióját. Vizsgálatunkban az állatoknak ugyanolyan mennyiségű táplálékot adtunk a teljes követési időszakban. A vesekárosodásbeli különbségek tehát nem tulajdoníthatók az eltérő fehérjefelvételnek. A vehikulummal kezelt ovariectomizált patkányok testsúlygyarapodása azonban nagyobb volt, mint a vehikulummal kezelt intakt, vagy a nemi hormonnal kezelt patkánycsoporté. Nephron/testsúly-aránytalanság lép fel, és ez hozzájárul a kifejezettebb vesekárosodáshoz a vehikulummal kezelt, ovariectomizált patkányoknál. Mivel azonban ezek az állatok főleg zsírszövetet halmoznak fel, és nem izomszövetet, a nephron/testsúly-aránytalanság valószínűleg elenyésző hatást gyakorol a vesekárosodásra. Párban való etetési protokollt alkalmazva, azonos testsúlyt lehetett volna fenntartani a csoportokban. Ebben az esetben azonban a fehérjefogyasztás eltérő lett volna a csoportok között. Mivel úgy gondoltuk, hogy a leírt kísérleti elrendezésben a fehérjefelvétel

fontosabb zavaró tényező lett volna, mint a nephron/testsúly-aránytalanság, így a vizsgálatunkban a fehérjefelvételt kontrolláltuk, és nem a testsúlyt.

Mint a 25. Táblázatban bemutatjuk, az artériás vérnyomás kissé magasabb a vehikulummal kezelt, ovariectomizált patkányokban, mint a vehikulummal kezelt, ép állatokban. Ez a valamelyest magasabb vérnyomás hozzájárulhatott a kifejezettebb vesekárosodáshoz ovariectomizált patkányokban. Nem tisztázott, hogy vajon a vérnyomásban jelentkező tendencia ösztrogén hatásának tulajdonítható, vagy csak a kifejezett veseelégtelenséggel párosul ezekben az állatokban. Meg kell azt is jegyeznünk, hogy a kísérleteinkben a vérnyomást altatott patkányokon mértük. Lehetséges, hogy a csoportok közötti vérnyomásbeli különbség statisztikailag szignifikáns lett volna, ha a vérnyomást éber állatokon mérjük, például telemetriás módszerrel. Ez a technika azonban ezen kísérletek végzésekkor nem állt rendelkezésünkre a laboratóriumunkban.

A szérum kreatinin szintje az észlelt hisztológiai eltérésekkel együtt változott mind a vehikulummal, mind az ösztradiollal kezelt állatokban. Ezzel szemben a kreatinin-clearance nem mutatott hasonlóan egyértelmű korrelációt a hisztológiai adatokkal. Az eltérés oka nem ismert. A kreatinin-clearance valószínűleg kissé pontatlan jelzője patkányokban a veseműködésnek a viszonylag magas tubuláris kreatinin-kiválasztás miatt. Ez magyarázhatja, hogy a kreatinin-clearance-ben lévő különbségek miért nem szignifikánsak a vizsgálatunkban.

A mechanizmus, amely révén a progeszteron úgy tűnik csökkenti az ösztrogén kedvező hatásait, nem ismeretes. Progesztinekről tudjuk, hogy részleges androgén hatást fejtenek ki, mivel gyengén kötődnek a különböző szövetekben, például a vesében lévő androgénreceptorokhoz (251). Mivel az androgének elősegítik a vesefibrosist (249), elképzelhető, hogy az androgén receptorok aktiválása felelős a progeszteron hatásáért. Továbbá a progeszteron és az ösztrogén vagy a progeszteron és az angiotenzin I típusú receptor expressziója közötti kölcsönhatás (252) játszhatott szerepet ebben a folyamatban.

Patkány maradékvese-modellben a glomeruláris károsodást általában a mesangiális sejtek által szabályozott mátrix anyagcsere megváltozásának tulajdonítják. Adataink a korábbi eredményekkel összhangban alátámasztják, hogy ösztradiol közvetlenül gátolhatja a glomerulosclerosist akár a kollagénszintézis gátlásával, akár a mesangiális sejtekben lévő mátrix-metalloproteázok termelődésének fokozásával (239,240).

Ezen kívül a növekedési faktorok széles skálája, például a TGF- β 1 és a PDGF vesz részt a glomerulosclerosis kifejlődésében (253). A TGF- β 1 segíti a mátrix szintézisét, és gátolja annak különböző mechanizmusokon keresztül történő bontását, és így a szöveti fibrosis egyik legfontosabb közvetítője (254). Hasonlóképpen a PDGF az erős mitogén

hatásától eltekintve serkenti az extracelluláris mátrix különböző komponenseinek termelődését emberben és kísérletes vesebetegségekben (249). A közelmúltban felvetették, hogy ösztrogéneknek közvetlen atheroprotektív hatása lehet a TGF- β 1 és a PDGF-A expressziójának gátlása révén ér simaizomsejtjeiben (255). Mivel a mesangiális sejtek fenotipikusan hasonlóak a simaizomsejtekhez, feltételeztük, hogy az ösztradiol renoprotektív hatásait legalábbis részben a mesangiális sejtekben a növekedési faktor szintézisére gyakorolt gátló hatásával fejt ki. Valóban, az ösztradiol kezelés alacsonyabb szintre szabályozta a TGF- β 1 és a PDGF-A ovariectomiát követő megnövekedett expresszióját, és ez hozzájárulhatott ennek a csoportnak a kedvezőbb végkifejletéhez. A progeszteron ösztrogénnel együtt adása azonban csökkentette az ösztradiol kedvező hatását a TGF- β 1 és a PDGF-A expressziójára, amely magyarázhatja a kombinált hormonkezelést kapó állatokban kialakult, kifejezettebb glomeruláris károsodást. A TGF- β 1 és a PDGF-A szöveti fibrosis fontos közvetítői mind a glomerulusokban, mind pedig a tubulointerstitiális térben. Ebben a munkánkban nem vizsgáltuk, hogy az mRNS expressziójában megfigyelt változások glomeruláris vagy interstitialis változásokat tükröznek-e a maradék vesében. Mivel azonban ösztradiol csökkenti mind a glomerulosclerosist, mind az interstitialis fibrosist, feltételezzük, hogy a TGF- β és a PDGF expressziója egymással párhuzamosan alacsonyabb szintre szabályozódott a vese mindkét kompartmentjében a hormon hatására.

Jelenleg nem áll elegendő adat rendelkezésre, hogy eldöntsük, vajon az ösztrogénpótló terápia befolyásolhatja-e posztmenopauzában lévő nők vesebetegségének előrehaladását. Ez a kérdés azonban számottevő jelentőségű, mivel végstádiumban lévő vesebetegségben szenvedő, posztmenopauzás nők száma jelentősen nőtt az utóbbi évtizedben. Eredményeink azt mutatják, hogy ösztrogénpótlás visszafoghatja a veseműködés romlását ezen női populációban. Említésre érdemes, hogy Szekacs és munkatársai (256) a közelmúltban bizonyították, hogy diabéteszes és hipertenziós, posztmenopauzás nők egy kis csoportjában hormonpótló terápiával csökkent a proteinuria és javult a kreatinin-clearance.

A kísérleteinkben adott nemi hormonok mennyiségét pilot vizsgálatban határoztuk meg. Ezekben a vizsgálatokban megfigyeltük, hogy a szérumban az ösztradiol és a progeszterin szintje a jelen kísérleteinkben alkalmazott adagokban az anyag beadását követő 4.-től 12. óráig nőtt, majd 48 órával később visszatért az alapszintre. Ezek a hormonszintek hasonlóak a naiv ciklusú patkányban lévőkhöz. Megjegyezzük, hogy a vizsgálatunkban adott szteroidmennyiség nagyobb, mint a terápiás dózis emberekben. A különbség oka nem ismert, de állati és emberi kísérletekben alkalmazott terápiás dózisok

közötti különbségek valószínűleg a hatóanyag felszívódásában vagy metabolizmusában rejlő különbségeken alapulnak.

Összefoglalva, bemutattuk, hogy ösztadiol védő hatást fejt ki a vesére progresszív glomerulosclerosis esetén nőstény patkányok maradékvese-modelljében. További vizsgálatok szükségesek ezeknek a kísérleti tapasztalatoknak klinikai célokra való lehetséges alkalmazásának kiértékelésére.

Uninefrektomizált (UNIX) Spontán hipertenzív (SHR) patkányok ösztadiol kezelése

A vizsgálat legfontosabb eredménye, hogy spontán progresszív vesekárosodási modellben (azaz, az UNIX SHRsp patkányokban) az ösztriol (és kisebb mértékben a 17β -ösztadiol-3-benzoát) csökkenti az albuminuriát, és a glomeruláris és tubulointerstitiális károsodási indexet, illetve a vesekárosodást közvetítő rendszerek expresszióját. Az ösztriolkezelés hatással volt a glomerulusok térfogatára és sejtes összetételére, megakadályozta a podocyta károsodását, és mRNS-, illetve fehérjeszinten csökkentette az ET-1 illetve annak receptorai, a TGF- β , és az α -ösztrogénreceptor fokozott expresszióját. Mivel az ösztrogéneket a kísérlet kezdetétől folyamatosan adtuk, a kísérlet a károsodás megakadályozását, és nem a már zajló vesekárosodás regresszióját vizsgálta.

E kísérletekben az ösztrogéneket, más hasonló vizsgálatokban megszokott módon, folyamatosan adtuk. Elképzelhető, hogy ciklikus adagolás esetleg más, a mi kísérleteinkben megfigyeltektől eltérő hatásokkal is rendelkezhet.

Ebben a modellben az ösztrogének jótékony hatása nem magyarázható egyszerűen csak valamilyen műtermék - mint például a lipidszintekre gyakorolt hatás, vagy vérnyomás – alapján. Az LDL- és koleszterinszintek ugyan megnövekedtek az UNIX/OVX állatokban, de ezekre az ösztrogénkezelés nem volt hatással. Annak ellenére, hogy az állatok hasonló mennyiségű táplálékot fogyasztottak, ösztriollal kezelt UNIX/OVX állatok testsúlya nagyobb volt, mint a vivőanyaggal kezelt UNIX/OVX állatoké. Ezért az ösztriol jótékony hatása biztosan nem magyarázható kóros táplálkozással, sorvadással. A szisztolés vérnyomás tekintetében sem találtunk különbséget, bár megjegyzendő, hogy az értékek alacsonyabbak voltak az ösztriollal kezelt állatokban.

Az UNIX/OVX állatokban a maradék vese súlya megnőtt. E növekedés együtt járt a glomerulusok és a vesekéreg átlagos térfogatában bekövetkezett szembetűnő növekedéssel. Az ösztriol- és ösztadiol-kezelés a glomerulusok térfogatát csökkentette, viszont a vesekéregét nem, ami a glomerulusok és a tubulusok növekedése közötti disszociációra utal.

A GSI magas volt a vivőanyaggal kezelt UNX/OVX patkányokban, és ezt ösztriollal normalizálni, ösztradiollal viszont szignifikánsan csökkenteni lehetett. Hasonló jellegzetességeket figyeltünk meg a tubulointerstitiális és ér-károsodási indexek terén is. A ál-operált állatokkal összehasonlítva, az átlagos podocyta-szám szignifikánsan alacsonyabb volt az UNX/OVX állatokban, ami podocyta-vesztésre enged következtetni. Az ösztriollal vagy ösztradiollal kezelt állatokban bizonyos tendencia mutatkozott a magasabb podocyta-számok irányába. Podocyta-károsodására utaló döntő bizonyítékot ($P < 0,05$) a desmin – a korai podocyta-károsodás érzékeny markere (257) - expressziója biztosított, és ezt az expressziót az ösztriolkezelés gyakorlatilag megszüntette.

A mesangiális sejtek számában és térfogatában szembetűnő növekedést tapasztaltunk, de ezt a növekedést ösztriollal és – kisebb mértékben – ösztradiollal meg lehetett szüntetni. A mesangiális sejtek térfogatváltozásai és a mesangiális mátrix növekedése párhuzamosan következett be. A mesangiális sejtek száma szignifikánsan alacsonyabb volt az ösztriollal kezelt állatokban, és a mesangiális sejtek térfogatát mind az ösztriollal és mind pedig az ösztradiollal végzett kezelés csökkentette.

Végül, az endothelsejtek száma és térfogata szignifikánsan megnőtt az UNX/OVX állatokban, ami feltehetőleg az intenzív kapilláris-átpülésre vezethető vissza. Ezzel párhuzamosan a PCNA-pozitív sejtek száma is megnőtt. Az endothelsejtek térfogatát az ösztradiol- és ösztriolkezelések normalizálták. Ez a felismerés azért nem valószínűtlen, mert legalább az artériák endothelsejtjei expresszálnak ösztrogénreceptorokat (258).

Az ösztrogéneknek, és különösen az ösztriolnak, a vese szerkezeti paramétereire gyakorolt védő hatását bizonyító tényeket kiegészítik azok a bizonyítékok, amelyek a glomeruláris és interstitiális károsodás patogenezisében ismertén működő közvetítő rendszerek kevésbé kifejezett expressziójára utalnak. Ez különösen igaz a TGF- β és ET-1 esetében mind fehérje, mind mRNS szinten. Ahogyan az a glomeruláris és tubulointerstitiális károsodási indexekből előre látható volt, a kollagén IV expressziója megnövekedett az UNX/OVX állatokban és ezt a növekedést ösztriolkezeléssel részben meg lehetett szüntetni. Az alacsonyabb fokú glomeruláris, interstitiális és vasculáris fibrosis magyarázata szempontjából lényeges, hogy az ösztrogének fibroblastokra gyakorolt hatása szervenként eltér. A 17 β -ösztradiol-3-benzoátról kimutatták, hogy pro-proliferatív hatású a kötőszövetekben található (259), illetve a bőr- és tüdő fibroblastokban (260), viszont a veseablatios modellben csökkenti a sejtek proliferációját. Az ösztrogének normalizálták a sebágy kollagéntartalmát és szerkezetét az OVX patkánymodellben (261). Mesangiális sejtek tenyésztésében a genistein – egy szelektív ösztrogénreceptor-modulátor (262) – és a 17 β -ösztradiol-3-benzoát csökkentette az I-es és IV-es típusú kollagének expresszióját

(263). A 17β -ösztadiol-3-benzoát a metalloproteinázok expresszióját is fokozta (263). A hypoxia vesefibrózis kiváltásában betöltött potenciális szerepét (264) tekintve érdekes az, hogy a 17β -ösztadiol-3-benzoátról kimutatták, hogy indukálja a hypoxia által indukálható gének – mint például vascularis endotheliális növekedési faktor (265) – expresszióját, viszont a vesében csökkenti az ET-1 termelődését (266). Kísérleteinkben az ösztriol csökkentette az ET-1 és ET receptorok expresszióját, ezzel szemben az ösztadiolnak nem volt ilyen hatása.

Az ösztrogének serkentik továbbá a renin-angiotensin rendszert és emelik az angiotensinogen koncentrációját, de a mellékvesében és feltehetően a vesében is csökkentik a plazma reninaktivitását (267). Az ösztrogének tovább csökkentik az AT_1 receptor expresszióját (268), feltehetően az angiotensin II (AngII) koncentrációjának modulálásával a mellékvesében, és növelik az AT_2 receptorok expresszióját (269). Ez releváns lehet annak értelmezésében, hogy miért találtunk kisebb mértékű glomerulusnövekedést és kevesebb fibrosist kísérleteink során. Az erek simaizom-sejtjeiben az ösztrogének antagonizálják az AngII növekedést elősegítő hatását (266). Endothelsejteken az ösztrogének gátolják az AngII által indukált NAD(P)-oxidáz serkentést (270). Nemcsak az AngII de az α -adrenoreceptorokra adott választ is csökkentik az ösztrogének (271).

Az ösztriol hatékonyabb volt a vesekárosodás megszüntetésében. Az ösztriol és az ösztadiol közötti ezen különbség továbbra is érdekfeszítő marad. Nincsenek adataink a dózis-hatás összefüggést illetően, de kizárhatjuk azt a lehetőséget, hogy a szubkután raktárakból elégtelen mennyiségű ösztadiol szívódna fel, mivel a plazmában megnövekedett ösztadiol-koncentrációkat mértünk. A koncentráció-idő profilokban különbség volt: az ösztriol beadása az ivóvízzel vs. szubkután olajos ösztadiol-raktárakból történő folyamatos felszabadulás. Itt jegyeznénk meg, hogy a parenterális beadásnál tapasztaltaktól eltérhet az orális beadás hatása, mivel az ösztrogének lebontása a bél falban és a májban eltér (ezenfelül, számos másodlagos következmény is közrejátszhat, mint például eltérések az angiotensin koncentrációban és a szexhormont kötő fehérjék szintjeiben). Nem tudjuk kizárni az effektor útvonalakban fennálló különbségeket sem, különösen a genomiális versus nem genomiális útvonalak viszonylagos részvételét illetően. Csak nem régen bizonyították, hogy az ösztriol nem genomiális útvonalakon is hat. Kétféle ösztrogénreceptor-típust (α - és β -ösztrogénreceptor) ismerünk, és újabb adatok szerint az ösztrogének védőhatását főleg az α -ösztrogénreceptor közvetíti (272). Ez azért érdekes, mert a glomerulosisra hajlamos illetve az arra rezisztens egerek az expresszió tekintetében különböznek, azaz a glomerulosisra hajlamos egerek glomerulusaiban az (α - és β -

ösztrogénreceptorok expressziója lecsökkent (240). A 17β -ösztradiol csökkentette a kollagén akkumulációját illetve növelte a mátrix metalloproteináz-9 expressziót és aktivitást (273). Az ösztrogénreceptor működését – az ösztrogénaktivitás represszorának az ösztrogénreceptorról történő eltávolítása révén a transzkripcionális aktivitást fokozó - specifikus koregulátorok jelentős mértékben befolyásolják (274). Felmerült az az elképzelés, hogy a 17β -ösztradiol-3-benzoát antiproliferatív működései a hidroxí és metoxi-metabolitokká történő helyi konverzió révén jutnak érvényre. Ezek a metabolitok specifikus hatást mutatnak annak ellenére, hogy nem lépnek kölcsönhatásba az α -ösztrogénreceptorral (275). Az ösztrogének metabolizmusa a vesében szintén mutat bizonyos egyedi aspektusokat, amelyek esetleg relevánsak lehetnek az ösztrogén indukálta vesedaganatok patogenezisének illetően (276).

A vese patológiai állapotai esetében, az ösztrogének heterogén hatásait illetően (241) figyelemre méltó az, hogy bizonyos szerzők sejttípustól függő különbségeket figyeltek meg az ösztrogén indukálta mitogén aktiválta proteinkináz (MAP kináz) útvonalakban (277). Az ösztrogének befolyásolnak olyan faktorokat is melyek részt vehetnek a vese kóros állapotaiban mint az inzulinszerű növekedési faktor (278), hősokk fehérjék (279), és az antioxidáns (280) vagy 11β -hidroxiszteroid dehidrogenáz (281) enzimek expressziója. A retinoidok szembeszökő vesevédő hatásainak tükrében (282) az is érdekes, hogy az ösztrogének koordináltan fokozzák a retinoidok elválasztását és jelátvitelét és emellett antiproliferatív hatásaik is vannak (283). A spontán mérsékelt vesekárosodás ezen in vivo modelljében az ösztrogén kezelés csökkentette a vesekárosodás mértékét. A vesekárosodás súlyosságában mutatkozó nemi különbség nem teljesen magyarázható a tesztoszteron hiányával, ami egyezik azzal az elképzeléssel, mely szerint az ösztrogéneknek specifikus vesevédő hatása van (240). Az ösztrogének hatásait illetően jelentős különbségek vannak az egyes fajok között, és ezért nem lehetséges ezeket az adatokat közvetlenül az emberre extrapolálni. A szelektív, nem feminizáló hatású ösztrogén modulátorok felfedezése hozzájárulhat ahhoz, hogy ezzel a kérdéssel emberi alanyokon is foglalkozzanak.

Saját eredmények összefoglalása.

Kísérleti eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy átültetés során (a donor szervezetben, valamint a transzplantációs műtét során) és azt követően a recipiens szervezetben a graftot számos károsító hatás éri, melyek krónikus allograft nefropátiában kumulálódnak.

A donor szervezetben ért lehetséges károsodásokat klinikai anyagon vizsgáltuk, és megállapítottuk, hogy a donor és recipiens metabolikus állapota és vérnyomása a késői prognózis fontos meghatározói.

Egérmodellen vizsgáltuk az átültetés során elszenvedett ischemia-reperfúziós károsodás hatását, és megfigyeltük, hogy a károsodás mértéke csökkenthető, ha a vesét prekondicionálással felkészítjük az ischemiás károsodásra. A graft donor szervezetben történő ilyen jellegű „traumatizálása” azonban klinikai körülmények között nem elképzelhető, és az endotoxin toxikus és nem toxikus hatásait nem sikerült még kellő mértékben szétválasztani. Ezért talán legfontosabb eredményünk, hogy a reperfúziós károsodás szintén hatékonyan csökkenthető RNS interferencia segítségével, ha sikerül a graft szöveteit a reperfúziós károsodásra felkészíteni. A szervátültetés fontos terület lehet a génterápia klinikai alkalmazására, mivel az ex-vivo eltöltött időszak olyan terápiás „ablak”, mely lehetővé teszi a génterápia számos szisztémás mellékhatásának kiküszöbölését.

A recipiensben elszenvedett károsodások legfőbb hajtóereje az idegen antigén elleni immunválasz (akut és krónikus kilökődés), de alloantigén független tényezők (a recipiens vérnyomása, hyperfiltrációs károsodás, fertőzések, vesebetegség kiújulása) is hozzájárulnak a graft funkció fokozatos romlásához, ami végül is krónikus allograft nefropátia és vesefibrózis útján vezet a graft elégtelenségéhez. Megfigyeléseink szerint a folyamat kórélettani szempontból két különálló részre osztható, mely beosztásnak terápiás konzekvenciái vannak. Az átültetést követő korai időszakra jellemző az igen kifejezett mononukleáris sejtes infiltráció ami TGF-beta szintézissel jár együtt. E korai időszakban az infiltráció gátlása (pl. mycophenolat mofetillel) és/vagy a matrix metalloproteinázok gátlása a gyulladásos és immunsejtek infiltrációját akadályozza, ezért jótékony hatású. A késői stádiumra enyhébb gyulladásos infiltráció mellett a hegesedési folyamatok dominanciája jellemző, aminek meghatározó cytokine a PDGF. Ez az ömagát fenntartó hegesedési folyamat terápiásan kevésbé befolyásolható, bár az intraglomeruláris nyomás csökkentésén keresztül ható a renin-angiotenzin rendszert gátló beavatkozások képesek a folyamat lassítására. A jelenleg klinikumban alkalmazott immunszuppresszív kezelés a

krónikus allograft nefropátia kezelésére csak részben hatékony: minden kezelés ellenére a graft funkciója idővel megszűnik. Az immunszuppresszív szerek hatékonyak lehetnek a mind az alloimmun, mind a nem specifikus gyulladásos folyamatok gátlásában. Az angiotensin rendszer gátlásával kombinálva a két terápiás beavatkozás hatékonysága összegződik.

Hivatkozások jegyzéke:

- 1 Häyry-P, Isoniemi-H, Yilmaz-S: Chronic allograft rejection. *Immunol Rew* 1993 134: 33-81
- 2 Perner-F, Járny-J, Alföldy-F és mtsai: The results of 1009 kidney transplantations performed in Hungary. *Surg Today* 1996 26: 561-7
- 3 Solez-K; Axelsen-R; Benediktsson-H et al: International standardization of criteria for the histology diagnosis of renal allograft rejection : The Banff working classification o kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993 44: 411-22
- 4 Hamar-P, Müller-V, Kohnle-M és mtsai: Metabolic factors have a major impact on kidney allograft survival. *Transplantation* 1997 64: 1135-9
- 5 Perkins DL, Carpenter CB: Immunobiology of Transplantation. In *Diseases of the Kidney*. Ed. Brenner B, and rector. pp. 2576-2601
- 6 Immunity to tissue transplantant. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS ed. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia Pa: WB Saunders Co;1991; 319-331
- 7 László G, Rajnavölgyi É. A transzplantációs immunológia alapjai. Gergely J, Erdei A: *Immunbiológia Budapest. Medicina*. 2000, 358-367
- 8 Sibley RK, Payne W: Morphologic findings in the renal allograft biopsy. *Semin Nephrol*. 1985. 5: 294-306
- 9 Matas AJ, Sibley R, Mauer M et al: The value needle renal allograft biopsy.I. A retrospective study of biopsies performed during putative rejection episodes. *Ann-Surg*. 1983; 197(2):226-237
- 10 Ratner LE, Hardley GA, Hanto DW et: al Immunology of renal allograft rejection. *Arch-Pathol-Lab-Med*. 1991; 115:283-287
- 11 Rajnavölgyi É, Gergely J. A fő hisztokompatibilitási génkomplex (MHC) termékei. Gergely J, Erdei A: *Immunbiológia Budapest. Medicina*. 1998; 95-118
- 12 Germain RN: MHC dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994 79: 287
- 13 Sawyer GJ, Dalchau R, Fabre JW, Indirect T-cell allorecognition: A Cyclosporin A resistnat pathway for T-cell help for antibody production to donor MHC antigens. *Transplant Immunol* 1993 1: 77-81
- 14 Smith JD, Lawson C, Yacoub MH, Rose ML. Activation of NF-kappa B in human endothelial cells induced by monoclonal and allospecific HLA antibodies. *International Immunology*. 12(4):563-71, 2000 Apr.
- 15 Goes N, Urmson J, Vincent D, Halloran PF: Acute renal injury in the interferon- γ gene knockout mouse: effect on cytokine gene expression. *Transplantation* 1995 60 1560-1564
- 16 Halloran PF, Homik J, Goes N, Lui J, Urmson V, Ramassar V, Cockfield SM: The „injury response”: a concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long-term transplant outcomes. *Transplant P* 1997 29: 79-81
- 17 Goes N, Urmson J, Ramassar V, Halloran PF: Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response. *Transplantation* 1995 59: 565-72
- 18 Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Cho YW. Spousal and other living renal donor transplants. *Clinical Transplants*. :269-84, 1997.
- 19 Pratschke WMJ, Kusaka M, Hancock WW, Tilney NL. :Donor brain death affects tempo and intensity of acute rejection of rat chronic allografts. *Transplantation Proceedings*. 31(1-2):1008-9, 1999 Feb-Mar.
- 20 Kusaka M, Pratschke J, Wilhelm MJ, Ziai F, Zandi-Nejad K, Mackenzie HS, Hancock WW, Tilney NL. : Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death. *Transplantation*. 69(3):405-10, 2000 Feb 15.
- 21 Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Beato F, Milford EL, Hancock WW, Tilney NL. Accelerated rejection of renal allografts from brain-dead donors. *Annals of Surgery*. 232(2):263-71, 2000 Aug.
- 22 Tanabe K, Takahashi K, Sonda K, Tokumoto T, Ishikawa N, Kawai T, Fuchinoue S, Oshima T, Yagisawa T, Nakazawa H, Goya N, Koga S, Kawaguchi H, Ito K, Toma H, Agishi T, Ota K: Long-term results of ABO-incompatible living kidney transplantation: a single-center experience. *Transplantation* 1998 65: 224-8
- 23 Halloran P: Renal allograft C4d deposition. 6th. Banff conference on allograft pathology. 2001 www.cybernephrology.org
- 24 Hamar-P; Heemann-U; Rosivall-L: Az alloantigén független tényezők szerepe a transzplantált vese krónikus kilökődésében. *Hyperton Neph* 1998 2:59-66
- 25 Paul-LC: Chronic renal transplant loss. *Kidney Int* 1994 47: 1491-9
- 26 Checka-JM: Outcome statistics of renal transplants with an emphasis of long term survival. *Clin transplant* 1992 8: 634-9
- 27 Nemes-B, Lázár-N: Krónikus rejectió mint a vese allograftok késői elvesztésének egyik lehetséges útja. *Klinikopathológiai tanulmány. Magyar Sebészet* 1995 48: 397-411

- 28 Opelz-G; Terasaki-PI: Improvement of kidney graft survival with increased numbers of blood transfusions. *N Engl J Med*. 1978; 299: 799-803
- 29 Terasaki-P; Mickey-R; Iwaki-Y; et al: Long term survival of kidney grafts. *Transplant Proc*. 1989 21: 615-617
- 30 Opelz-G: Prognostische Faktoren für den Verlauf nach Nierentransplantation. *Urologe* 1994. 33: 377-382
- 31 Troppmann-C; Gillingham-KJ; Benedetti-E; et al: Delayed Graft Function, Acute Rejection, and Outcome After Cadaver Renal Transplantation. *Transplantation* 1995 59: 962-968
- 32 Schwarz U, Amann K, Orth SR, et al.: Effect of 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ on glomerulosclerosis in subtotaly nephrectomized rats. *Kidney Int* 1998;53:1696-1705.
- 33 White E, Hildemann WH. Allografts in genetically defined rats: difference in survival between kidney and skin. *Science* 1968; 162: 1293.
- 34 White E, Hildemann WH, Mullen Y. Chronic kidney allograft reactions in rats. *Transplantation* 1969; 5: 602.
- 35 Diamond JR, Tilney NL, Frye J, et al. Progressive albuminuria and glomerulosclerosis in a rat model of chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1992; 54: 710.
- 36 Hancock WH, Whitley WD, Tullius SG, et al. Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation* 1993; 56: 643.
- 37 Schmid C, Heemann U, Tilney NL. Retransplantation reverses mononuclear infiltration but not myointimal proliferation in a rat model of chronic cardiac allograft rejection. *Transplantation* 1996; 27: 1695.
- 38 Wang M, Bai J, Baumann M, Heemann U. New model for simultaneous heart and kidney transplantation in mice. *Microsurgery* 2003; 23: 164-168.
- 39 Bunag RD: Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol* 1973;34:279-282.
- 40 Magnotti RA, Jr., Stephens GW, Rogers RK, Pesce AJ: Microplate measurement of urinary albumin and creatinine. *Clin Chem* 1989;35:1371-1375.
- 41 el Nahas AM, Zoob SN, Evans DJ, Rees AJ: Chronic renal failure after nephrotoxic nephritis in rats: contributions to progression. *Kidney Int* 1987;32:173-180.
- 42 Kang DH, Hughes J, Mazzali M, et al.: Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1448-1457.
- 43 Amann K, Nichols C, Tornig J, et al.: Effect of ramipril, nifedipine, and moxonidine on glomerular morphology and podocyte structure in experimental renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:1003-1011.
- 44 Chomczynsky P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem* 162:156-161, 1987
- 45 Hartung J: *Lehr und Handbuch der angewandten Statistik* (6.ed). München, Wien, R. Oldenburg Verlag, 1987
- 46 Häyry P, Isoniemi H, Yilmaz S, et al. Chronic allograft rejection. *Immunol Rev* 1993; 134: 33.
- 47 Katznelson S, Kobashigawa JA. Dual roles of HMG-CoA reductase inhibitors in solid organ transplantation: lipid lowering and immunosuppression. *Kidney Int* 1995; 48: s112.
- 48 Dimeny E. Metabolic factors and outcome of organ transplantation. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1994; 159: 1.
- 49 Kahan BD, Mickey R, Flechner SM, et al. Multivariate analysis of risk factors impacting on immediate and eventual cadaver allograft survival in cyclosporine-treated recipients. *Transplantation* 1987; 43: 65.
- 50 Modena FM, Hostetter TH, Salahudeen AK, Najarian JS, Matas AJ, Rosenberg ME. Progression of kidney disease in chronic renal transplant rejection. *Transplantation* 1991; 52: 239.
- 51 Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N Engl J Med* 1982; 307: 652.
- 52 Cho YW, Terasaki PI, Graver B. Fifteen year kidney graft survival. In: Terasaki P, ed. *Clinical transplants* 1989. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1989: 325.
- 53 Vianello A, Mastrosimone S, Calconi G, et al. Influence of donor age on cadaver kidney graft function and survival: univariate and multivariate analyses. *Nephron* 1993. 65. 541.
- 54 Hestin D, Frimat L, Hubert J, Renoult E, Huu TC, Kessler M. Renal transplantation in patients over sixty years of age. *Clin Nephrol* 1994; 42(4): 232.
- 55 Feduska NJ Jr, Cecka JM. Donor factors. *Clin Transpl* 1994: 381.
- 56 Brenner BM, Cohen RA, Milford EL. In renal transplantation, one size may not fit all. *J Am Soc Nephrol* 1992; 3: 162.

- 57 Heemann U, Azuma H, Tullius SG, Schmid C, Philipp T, Tilney NL. Infections and reduced functioning kidney mass induce chronic rejection in rat kidney allografts. *Clin Nephrol* 1996; 46: 34.
- 58 Najarian JS, Gillingham KJ, Sutherland DER, Reinsmoen NL, Payne WD, Matas AJ. The impact of the quality of initial graft function on cadaver kidney transplants. *Transplantation* 1994; 57: 812.
- 59 Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Najarian JS. The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival(t1/2). *Transplantation* 1994. 57: 857.
- 60 Forman MB, Virmani R, Peutt DW: Mechanism and therapy of myocardial reperfusion injury. *Circulation* 1990, 81(Suppl 4):69–78
- 61 Cafe C, Torri C, Marzatico F: Cellular and molecular events of ischemic brain damage. *Funct Neurol* 1993, 8:121–133
- 62 Paller MS: Effect of neutrophil depletion on ischemic renal injury in the rat. *J Lab Clin Med* 1989, 113:379–386
- 63 Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Falt K: The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990, 107:574–580
- 64 Alkhunaizi AM, Schrier RW: Management of acute renal failure: new perspectives. *Am J Kidney Dis* 1996, 28:315–328
- 65 Bonventre JV: Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1993, 43:1160–1178
- 66 Szabo A, Heemann U: Ischemia/reperfusion injury, and chronic allograft rejection: *Transplant Proc* 1998, 30:4281–4284
- 67 Woolfson RG, Millar CGM, Neild GH: Ischemia and reperfusion injury in the kidney: current status and future direction. *Nephrol Dial Transplant* 1994, Editorial Comments:1529–1531
- 68 Ayala A, Ertel W, Chaudry IH: Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. *Shock* 1996, 5:79–90
- 69 Meldrum DR, Sheridan BC, Cleveland JC Jr, Fullerton DA, Banerjee A, Harken AH: Neutrophils are required for endotoxin-induced myocardial cross-tolerance to ischemia-reperfusion injury. *Arch Surg* 1996, 131:1203–1208
- 70 Colletti LM, Remick DG, Campbell DA Jr: LPS pretreatment protects from hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 1994, 57:337–343
- 71 Gerner EW, Schneider MJ: Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature* 1975, 256:500–502
- 72 Brown JM, Grosso MA, Terada LS, Whitman GJR, Banerjee A, White CW, Harken AH, Repine JE: Endotoxin pretreatment increases endogenous myocardial catalase activity and decreases ischemiareperfusion injury of isolated rat hearts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:2516–2520
- 73 Vogel SN, Hogan MM: The role of cytokines in endotoxin mediated responses. *Immunophysiology: Role of Cells and Cytokines in Immunity and Inflammation*. Edited by JJ Openhein , E Shevach. New York: Oxford Univ. Press, 1987
- 74 Sheppard BC, Fraker DL, Norton JA: Prevention and treatment of endotoxin and sepsis lethality with recombinant human tumor necrosis factor. *Surgery* 1989, 106:156–160
- 75 Hewitt G, Halliday M, McCaigue M, Campbell G, Rowlands B, Diamond T: Mortality, endotoxemia, and cytokine expression after intermittent, and continuous hepatic ischemia. *Br J Surg* 1995, 82:1424–1426
- 76 He W, Fong Y, Marano MA, Gershenwald JE, Yurt RW, Moldawer LL, Lowry SF: Tolerance to endotoxin prevents mortality in infected thermal injury: association with attenuated cytokine response. *J Infect Dis* 1992, 165:859–864
- 77 Weiss SJ, Regiani S: Neutrophils degrade subendothelial matrices in the presence of a-1-protease inhibitor: cooperative use of lysosomal proteases and oxygen metabolites. *J Clin Invest* 1984, 73:1297–1304
- 78 Baird BR, Cheronis JC, Sandhaus RA, Berger EM, White CW, Repine JE: O metabolites and neutrophil elastase synergistically cause edematous injury in isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 1986, 61:2224–2229
- 79 Koike K, Moore FA, Moore EE, Trew CE, Banerjee A, Peterson VM: Endotoxin pretreatment inhibits neutrophil proliferation and function. *J Surg Res* 1994, 57:49–54
- 80 Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, Bonventre JV: Intercellular adhesion molecule- 1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest* 1996, 4:1056–1063
- 81 Billups KL, Palladino MA, Hinton BT, Sherley JL: Expression of Eselectin mRNA during ischemia/reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 1995, 5:626–633
- 82 Hellberg POA, Kallskog OT, Ojteg G, Wolgast M: Peritubular capillary permeability and intravascular RBC aggregation after ischemia: effects of neutrophils. *Am J Physiol* 1990, 258:F1018–1025
- 83 Lemonick, M. *TIME Magazine*, 2003, 161, 41 Secret of Life
- 84 Qasim W, Gaspar HB, Thrasher AJ: Gene therapy for severe combined immunodeficiency. *Expert Rev Mol Med*. 2004; 1 – 15
- 85 www.clinicaltrials.gov, ghv.nlm.nih.gov

- 86 Devroe E, Silver PA.: Therapeutic potential of retroviral RNAi vectors. *Expert Opin Biol Ther.* 2004 Mar;4(3):319-27.
- 87 Vaucheret H., Beclin C. and Fegard M.: Post – transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 2001, 114, 3083 – 3091
- 88 Agrawal N., Malhotra P., Bhatnagar RK.: siRNA – directed silencing of transgene expressed in cultured insect cells, *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jul 23, 320 (2): 428 – 34
- 89 Jenn – Yah Yu, Stacy L. DeRuiter, David L. Turner: RNA interference by expression of short – interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells, *PNAS.* 2002, 99 (9): 6047 – 6052
- 90 Madhur Kumar, Gordon G. Carmichael.: Antisense RNA: Function and Fate of Duplex RNA in cells of Higher Eukaryotes, *MMBR.* 1998, 62 (4): 1415 – 1434
- 91 C Napoli, C Lemieux, R Jorgensen: Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co – Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell.* 1990 April, 2 (4): 279 – 289
- 92 Grishok A., Mello C. C.: RNA interference (nematodes: *C. elegans*). *Adv. Genet.*, 2002, 46, 339 – 360
- 93 Hammond S. M., Bernstein E., Beach D., Hannon G. J.: An RNA – directed nuclease mediates post – transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 2000, 404, 293 - 296
- 94 Elbashir S. M., Harboth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T., *Nature*, 2001 411, 494-498
- 95 Fire A., Xu S., Montgomery MK., Kostas SA., Driver SE, Mello CC.: Potent and specific genetic interference by double – stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature.* 1998, 391 (6669): 806 – 11
- 96 Kennerdell JR, Carthew RW: Use of dsRNA – mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway, *Cell.* 1998, 95 (7): 1017 – 1026
- 97 Ngo H., Christian T., Gull k., Ullu e.: Double – stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*, *PNAS Biochem.* 1998, 95 (25): 14687 – 14692
- 98 Lohmann JU, Endl I, Bosch TC: Silencing of developmental genes in hydra, *Dev Biol.* 1999, 214 (1): 211 – 214
- 99 Gro, V.A.; Zilá, M. P.S.; Karina, L.G.; Kari, N.; Stig, W.O. *BMC Biotechnol.* 2003, 3, 1
- 100 Wargelius A., Ellingsen S., Fjose A.: Double – stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos, *Biochem Biophys Res Commun.* 1999, 263 (1): 156 – 161
- 101 Erwei Song, Sang-Kyung Lee, Jie Wang, Nedim Ince, Nengtai Ouyang, Jun Min, Jisheng Chen, Premalata Shankar, Judy Lieberman: RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis, *Nature Medicine*, 2003, Vol 9, Nr 3, Mar
- 102 Hamar P, Song E, Kökény G, Chen A, Ouyang N, Lieberman J: Short interfering RNA targeting Fas protects mice against renal ischemia-reperfusion injury *PNAS* 2004 101: 41 14883–14888
- 103 Gou, D.; Narasaraaju, T.; Reddy, N.; Jin, C.N.; Wang, P.; Liu, L. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32, 134
- 104 Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M., Hannon G. J.: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, 409, 363 – 366
- 105 Thomas T., Philip D. Z., Ruth L., David P. B., Philip A. S.: Targeted mRNA degradation by double – stranded RNA in vitro, *Genes and Development*, 1999, 13 (24): 3191 – 3197
- 106 Ollivier Milhavet, Devin S. Gary, Mark P. Mattson: RNA Interference in Biology and Medicine, *Pharmacol Rev* 55: 629- 648, 2003
- 107 Sandeep S., Zophonias O. Jónsson, Anindya Dutta: Small RNAs with Imperfect Match to Endogenous mRNA Repress Translation, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 45, 44312 – 44319
- 108 Dag R. Sorensen, Marianne Leirdal, Mouldy Sioud: Gene Silencing by Systemic Delivery of Synthetic siRNAs in Adult Mice, *J. Mol. Biol.* 2003, 327, 761-766
- 109 Judy Lieberman, Erwei Song, Sang-Kyung Lee, Premalata Shankar: Interfering with disease: opportunities and roadblocks to harnessing RNA interference, *Trends in Molecular Medicine*, Vol 3, Issue 9, September 2003, 397-403
- 110 Nykanen A, Haley B, Zamore PD: ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathwa
- 111 Frank Z., Melanie F., Sybille D., Hüseyin A., Anke K., Gijsbertus J. P., Klaus G., Jörg K.: Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells, *Nucleic Acid Res.* 2003 June 1, 31 (11): 2705 – 2716
- 112 H Herweijer, JA Wolff: Progress and Prospects: Naked DNA gene transfer and therapy, *Gene Therapy*, 2003, 10, 453-458
- 113 Contreras JL., Vilatoba M., Eckstein C., Bilbao G., Anthony Thompson J., Eckhoff DE.: Caspase – 8 and caspase – 3 small interfering RNA decreases ischemia/ reperfusion injury to the liver in mice. *Surgery.* 2004 Aug, 136 (2): 390 – 400
- 114 Davidson BL., Paulson HL.: Molecular medicine for the brain: silencing of disease genes with RNA interference. *Lancet Neurol.* 2004 Mar, 3 (3): 145 – 9

- 115 Erwei S., Patrick S., Deborah P., Luk Van P., Judy L.: RNA interference in mouse models
- 116 Sledz CA, Holko M, Veer MJ, Silverman RH, Williams BRG. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, 2003, 5: 834-39
- 117 Peter C. S., Orit R., Natasha J. C., Tyra G. W., Lowell U., Jeffrey C. L., Christina M. H., Kalai S. S., Arindam B., Matthew M., Francis S. C.: Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *PNAS*. 2004 Feb 14, vol 101, no 7, 1892 – 1897
- 118 Andrew D.: The specifics of small interfering RNA specificity. *PNAS*. 2003 May 27, 100 (11): 6289 – 6291
- 119 Aimee L. Jackson, Steven R. Bartz, Janell Schelter, Sumire V. Kobayashi, Julja Burchard, Mao Mao, Bin Li, Guy Caret, Peter S. Linsey: Expression reveals off – target gene regulation by RNAi, *Nature Biotechnology*, 2003, Vol 21, 635 - 637
- 120 Castaneda, M. P., Swiatecka-Urban, A., Mitsnefes, M. M., Feuerstein, D., Kaskel, F. J., Tellis, V. & Devarajan, P. (2003) *Transplantation* 76, 50-4.
- 121 Lee, P., Sata, M., Lefer, D. J., Factor, S. M., Walsh, K. & Kitsis, R. N. (2003) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, H456-63.
- 122 Miyazawa, S., Watanabe, H., Miyaji, C., Hotta, O. & Abo, T. (2002) *J Lab Clin Med* 139, 269-78.
- 123 McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J. & Kay, M. A. (2002) *Nature* 418, 38-9.
- 124 Maruyama, H., Higuchi, N., Nishikawa, Y., Hirahara, H., Iino, N., Kameda, S., Kawachi, H., Yaoita, E., Gejyo, F. & Miyazaki, J. (2002) *Hum Gene Ther* 13, 455-68.
- 125 Chiu, Y. L. & Rana, T. M. (2003) *Rna* 9, 1034-48
- 126 Monga G, Mazzucco G, Messina M, et al. Intertubular capillary changes in kidney allografts: a morphologic investigation on 61 renal specimens. *Modern Pathology* 1992; 5: 125.
- 127 Morozumi K, Oikawa T, Fukud M, et al. Diagnosis of chronic rejection using peritubular and glomerular capillary lesions. *Transplant Proc* 1996; 28: 508.
- 128 Mihatsch MJ, Nickleleit V, Gudat F. Morphologic criteria of chronic renal allograft rejection. *Transplant Proc* 1999; 31: 1295.
- 129 Ivanyi B, Hansen HE, Olsen TS. Postcapillary venule-like transformation of peritubular capillaries in acute renal allograft rejection. An ultrastructural study. *Arch Path Lab Med* 1992; 116: 1062.
- 130 Joosten SA, vanDixon MGA, Borrias MC, et al. Antibody response against perlecan and collagen types IV and VI in chronic renal allograft rejection in the rat. *Am J Pathol* 2002; 160: 1
- 131 Kusaka M, Zandi-Nejad K, Kato S, et al. Exploitation of the continuum between early ischemia/reperfusion injury and host alloresponsiveness: indefinite kidney allograft survival by treatment with a soluble P-selectin ligand and low-dose cyclosporine in combination. *Transplantation* 1999; 67: 1255.
- 132 Hancock WH, Whitley WD, Tullius SG, et al. Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation* 1993; 56: 643.
- 133 Kusaka M, Mackenzie HS, Ziai F, et al. Recipient hypertension potentiates chronic functional and structural injury of rat renal allografts. *Transplantation* 2002; 74: 307.
- 134 Nagano H, Nadeau KC, Kusaka M, et al. Infection-associated macrophage activation accelerates chronic renal allograft rejection in rats. *Transplantation* 1997; 64: 1602.
- 135 Pagtalunan ME, Olson JL, Tilney NL, Meyer TW. Late consequences of acute ischemic injury to a solitary kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 366.
- 136 Laskowski IA, Pratschke J, Wilhelm MM, et al. Early and late injury to renal transplants from non-heart-beating donors. *Transplantation* 2002; 73: 1468.
- 137 Tullius SG, Heemann UW, Azuma H, et al. Alloantigen-independent factors lead to signs of chronic rejection in long-term kidney isografts. *Transplant International* 1994; 7(Suppl 1): S306.
- 138 Johnson RJ, Madias NE, Kates D, et al: *Kidney Int* 45:1769, 1994
- 139 Lee LK, Meyer TW, Pollock AS, et al: *J Clin Invest* 96:953, 1995
- 140 Benediktsson H, Chea R, Davidoff A, Paul LC: Antihypertensive drug treatment in chronic renal allograft rejection in the rat. 1988
Transplantation 62:1634–1642, 1996
- 141 Rennke HG, Klein PS: Pathogenesis and significance of nonprimary focal and segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 1989;13:443-456.
- 142 Remuzzi G, Bertani T: Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 1998;339:1448-1456.
- 143 Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, et al.: Renoprotective effect of the angiotensinreceptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001;345:851-860.

- 144 Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD: The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 1993;329:1456-1462.
- 145 Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, et al.: Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2001;345:861-869.
- 146 Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ: Multiple response to angiotensin II. *J Clin Invest* 91:2268-2274, 1993
- 147 Muller GA, Schettler V, Muller CA, Strutz F: Prevention of progression of renal fibrosis: How far are we? *Kidney Int* 49(Suppl 54):75-82, 1996
- 148 Wolf G, Neilson EG: Angiotensin II as a renal growth factor. *J Am Soc Nephrol* 3:1531-1540, 1993
- 149 Hilgers KF, Mann JFE: Role of angiotensin II in glomerular injury: Lessons from experimental and clinical studies. *Kidney Blood Press* 19:254-262, 1996
- 150 Campese VM, Kogosov E: Renal afferent denervation prevents hypertension in rats with chronic renal failure. *Hypertension* 1995;25:878-882.
- 151 Ye S, Zhong H, Yanamadala V, Campese VM: Renal injury caused by intrarenal injection of phenol increases afferent and efferent renal sympathetic nerve activity. *Am J Hypertens* 2002;15:717-724.
- 152 Amann K, Rump LC, Simonaviciene A, et al.: Effects of low dose sympathetic inhibition on glomerulosclerosis and albuminuria in subtotal nephrectomized rats. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1469-1478.
- 153 Amann K, Koch A, Hofstetter J, et al.: Glomerulosclerosis and progression: effect of subantihypertensive doses of alpha and beta blockers. *Kidney Int* 2001;60:1309-1323.
- 154 Rump LC, Oberhauser V: [Chronic renal failure--taming the sympathetic nervous system! New approach to delaying progression]. *MMW Fortschr Med* 1999;141:3941.
- 155 Hostetter TH: The next treatments of chronic kidney disease: if we find them, can we test them? *J Am Soc Nephrol* 2002;13:3024-3026.
- 156 Benigni A, Zoja C, Corna D, et al.: Add-on anti-TGF-beta antibody to ACE inhibitor arrests progressive diabetic nephropathy in the rat. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1816-1824.
- 157 Brunner HR: ACE inhibitors in renal disease. *Kidney Int* 42:463-479, 1992
- 158 Mackenzie HS, Tullius SG, Heemann UW, Azuma H, Rennke HG, Brenner BM, Tilney NL: Nephron supply is a major determinant of long-term renal allograft outcome in rats. *J Clin Invest* 94:2148-2152, 1994
- 159 Yoshioka T, Shiraga H, Yoshida Y: "Intact nephrons" as the primary origin of proteinuria in chronic renal disease: Study in the rat model of subtotal nephrectomy. *J Clin Invest* 82:1614-1623, 1988.
- 160 Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA: Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 93:2431-2437, 1994
- 161 Defraissy JF, Galanaud P, Balavoine JF, Wallon C, Dormont J: Captopril and immune regulation. *Kidney Int* 25:925-929, 1984
- 162 Ruiz-Ortega M, Gonzalez S, Seron D, Condom E, Bustos C, Largo R, Gonzalez E, Ortiz A, Egido J: ACE inhibition reduces proteinuria, glomerular lesions and extracellular matrix production in a normotensive rat model of immune complex nephritis. *Kidney Int* 48:1778-1791, 1995
- 163 Nadeau 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 USA* 92:8729-8733, 1995
- 164 Jonsson JR, Frewin DB, Head RJ: The effect of captopril treatment and its withdrawal on the gene expression of the renin-angiotensin system. *Blood Press* 3:97-105, 1994
- 165 Miller PL, Rennke HG, Meyer TW: Glomerular hypertrophy accelerates glomerular injury in rats. *Am J Physiol* 261:459-465, 1991
- 166 Naftalin AJ, Pratt RE, Dzau VJ: Induction of platelet derived growth factor A chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83:1419-1424, 1989
- 167 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* 63:PL289-PL295, 1998
- 168 Torry RJ, Connell PM, O'Brien DM, et al.: Sympathectomy stimulates capillary but not precapillary growth in hypertrophic hearts. *Am J Physiol* 1991;260:H1515-1521.
- 169 Skov K, Nyengaard JR, Patwardan A, Mulvany MJ: Large juxtamedullary glomeruli and afferent arterioles in healthy primates. *Kidney Int* 1999;55:1462-1469.
- 170 Culy CR, Jarvis B: Quinapril: a further update of its pharmacology and therapeutic use in cardiovascular disorders. *Drugs* 2002;62:339-385.

- 171 Orth SR, Amann K, Strojek K, Ritz E: Sympathetic overactivity and arterial hypertension in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16 Suppl 1:67-69.
- 172 Lohmeier TE: The sympathetic nervous system and long-term blood pressure regulation. *Am J Hypertens* 2001;14:147S-154S.
- 173 LeNoble LM, Lappe RW, Brody MJ, et al.: Selective efferent chemical sympathectomy of rat kidneys. *Am J Physiol* 1985;249:R496-501.
- 174 Szenasi G, Bencsath P, Szalay L, Takacs L: Fasting induces denervation natriuresis in the conscious rat. *Am J Physiol* 1985;249:F753-758.
- 175 Neumann J, Ligtenberg G, Oey L, et al.: Moxonidine normalizes sympathetic hyperactivity in patients with eprosartan-treated chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2902-2907.
- 176 Vonend O, Marsalek P, Russ H, et al.: Moxonidine treatment of hypertensive patients with advanced renal failure. *J Hypertens* 2003;21:1709-1717.
- 177 Strojek K, Grzeszczak W, Gorska J, et al.: Lowering of microalbuminuria in diabetic patients by a sympathicoplegic agent: novel approach to prevent progression of diabetic nephropathy? *J Am Soc Nephrol* 2001;12:602-605.
- 178 Rosenberg ME, Hostetter TH: Comparative effects of antihypertensives on proteinuria: angiotensin-converting enzyme inhibitor versus alpha 1-antagonist. *Am J Kidney Dis* 1991;18:472-482.
- 179 DiBona GF: Neural control of the kidney: past, present, and future. *Hypertension* 2003;41:621-624.
- 180 DiBona GF: The sympathetic nervous system and hypertension: recent developments. *Hypertension* 2004;43:147-150.
- 181 Boivin V, Jahns R, Gambaryan S, et al.: Immunofluorescent imaging of beta 1-and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney. *Kidney Int* 2001;59:515-531.
- 182 Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, et al.: Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int* 2004;65:30-39.
- 183 Wolf G, Mueller E, Stahl RA, Ziyadeh FN: Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 1993;92:1366-1372.
- 184 Orosz-CG: Local cellular immunology of experimental transplant vascular sclerosis. *Clin Transplant* 1996 10: 100-103
- 185 Smith-KA: Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 1988 240: 1169-76
- 186 O'Neil-EA; Tocci-MJ: Transcriptional activation of the IL-2 gene. *Transplantation Science* 1993 3: 77-82
- 187 Heemann-U; Tullius-SG; Tamatami-T; et al: Infiltration patterns of macrophages and lymphocytes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transplant Int* 1994 7: 349-55
- 188 Frishberg-Y; Meyers-CM; Kelly-CJ: cyclosporin A regulates T cell-epithelial cell adhesion by altering LFA-1 α and ICAM-1 expression. *Kidney Int* 1996 50: 45-53
- 189 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
- 190 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
- 191 Dendorfer-U; Maslinski-W; Remillard-B; Strom-TB: Interleukin-2 and the interleukin-2 receptor. *Transplantation Science* 1993 3: 77-82
- 192 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: 1259-62
- 193 Krams-SM; Falco-DA; Villaneuva-JC; et al: Cytokine and T-cell gene expression at the site of allograft rejection. *Transplantation* 1992 53: 151-6
- 194 Halloran-PF: Molecular mechanisms of new immunosuppressants. *Clin Transpl* 1996 10:118-123
- 195 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
- 196 Abbud-Filho-M; Ramalho-HJ; Barberato-JB et al: Inhibition of chronic kidney allograft rejection by cyclosporine. *Transplant Proc* 1989 21: 1660-62
- 197 Rosenblum-ND; Harmon-WE; Levey-RH: Treatment of chronic renal allograft rejection with cyclosporin and prednisolone. *Transplantation* 1988 45: 232-233
- 198 Hollander-AA; van Saase-JL; Kootte-AM; et al: Beneficial effects of conversion from cyclosporin to azathioprine after kidney transplantation. *Lancet* 1995 345: 610-4
- 199 Becker-G; Witzke-O; Friedrich-J; et al: Rescue therapy with tacrolimus in simultaneous pancreas/kidney transplantation. *Transpl Int* 1997 10: 51-4

- 200 Paul-LC; Saito-K; Davidoff-A; Benediktsson-H: Growth factor transcripts in rat renal transplants. *Am J Kid Dis* 1996 28: 441-50
- 201 Horvath-LZS, Friess-H, Schilling-M, et al: Altered expression of transforming growth factor- β s in chronic renal rejection. *Kidney Int* 1996 50: 489-98
- 202 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: 1904-12
- 203 Ostendorf-T; Burg-M; Floege-J: Cytokines and glomerular injury. *Kidney Blood Press Res* 1996 19: 281-89
- 204 Abboud-HE: Platelet derived growth factor and mesangial cells. *Kidney Int* 1992 41: 581-83
- 205 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
- 206 Inkinen K, Soots A, Krogerus L, et al. Collagens in chronic rejection of rat renal allografts. *Transplant Proc* 1997; 7: 2495.
- 207 Norman JT, Lewis MP. Matrix metalloproteinases (MMPs) in renal fibrosis. *Kidney Int* 1996; 49: 61.
- 208 Baricos WH. Chronic renal disease: do metalloproteinase inhibitors have a demonstrable role in extracellular matrix accumulation? *Curr Opin Neph Hyperten* 1995; 4: 365.
- 209 Chapman KT, Kopka IE, Durette PL, et al. Inhibition of Matrix Metalloproteinases by N-carboxyalkyl peptides. *J Med Chem* 1993; 36: 4293.
- 210 Rodrigo E, Lopez-Hoyos M, Escallada R, et al. Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-3, and MMP-2 in renal transplant recipients with chronic transplant nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 2041.
- 211 Ermolli M, Schumacher M, Lods N, et al. Differential expression of MMP-2/MMP-9 and potential benefit of an MMP inhibitor in experimental acute kidney allograft rejection. *Transplant Immunol* 2003; 11: 137.
- 212 Johnson TS, Haylor JL, Thomas GL, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitions in experimental renal scarring. *Exp Nephrol* 2002;10: 182.
- 213 Soccia PM, Gasche Y, Miniati DN, et al. Matrix metalloproteinase inhibition decreases ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 41.
- 214 Forbes JM, Hewitson TD, Becker GJ, et al. Ischemic acute renal failure: long-term histology of cell and matrix changes in the rat. *Kidney Int* 2000; 57: 2375.
- 215 Basile DP, Fredrich K, Weihrauch D, et al. Angiostatin and matrix metalloproteinase expression following ischemic acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: F893.
- 216 Sharma AK, Mauer SM, Kim Y, et al. Altered expression of matrix metalloproteinase-2, TIMP, and TIMP-2 in obstructive nephropathy. *J Lab Clin Med* 1995; 125: 754.
- 217 Sharma R, Suzuki K, Nagase H, et al. Matrix metalloproteinase (stromelysin-1) increase the albumin permeability of isolated rat glomeruli. *J Lab Clin Med* 1996; 128: 297.
- 218 Baricos WH, Murphy G, Zhou Y, et al. Degradation of glomerular basement membrane by purified mammalian metalloproteinases. *Biochem J* 1998; 254: 609.
- 219 Le Q, Cortez S, Nguyen H, et al. Glomerular neutral metalloproteinase: characterization and activity in animal models of human glomerular disease. *Matrix (Suppl)* 1992; 1: 415.
- 220 Zempo N, Koyama N, Kenagy RD, et al. Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 28.
- 221 Carome M, Striker L, Peten E, et al. Assessment of 72-kilodalton gelatinase and TIMP-1 gene expression in normal and sclerotic murine glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4: 1391.
- 222 Somasundaram R, Schuppan D. Type I, II, III, IV, V, and VI collagens serve as extracellular ligands for the isoforms of platelet-derived growth factor (AA, BB, and AB). *J Biol Chem* 1996; 271: 26884.
- 223 Song E, Zou H, Yao Y, et al. Early application of Met-RANTES ameliorates chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2002; 61: 676.
- 224 Rothenberg ML, Nelson AR, Hande KR. New drugs on the horizon: matrix metalloproteinase inhibitors. *Stem Cells* 1999; 17: 237.
- 225 Romanic AM, Harrison SM, Bao W, et al. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9. *Cardiovasc Res* 2002; 54: 549.
- 226 Yamada H, Saito F, Fukuta-Ohi H, et al. Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via dystroglycan complex. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1563.
- 227 McLennan SV, Fisher E, Martell SY, et al. Effects of glucose on matrix metalloproteinase and plasmin activities in mesangial cells: possible role in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2000; 58: S81.

- 228 Pawluczyk IZ, Harris KP. Cytokine interactions promote synergistic fibronectin accumulation by mesangial cells. *Kidney Int* 1998; 54: 62.
- 229 Van Den Steen PE, Wuyts A, Husson SJ, et al. Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *Eur J Biochem* 2003; 270: 3739.
- 230 Chana RS, Martin J, Rahman EU, et al. Monocyte adhesion to mesangial matrix modulates cytokine and metalloproteinase production. *Kidney Int* 2003; 63: 889.
- 231 Hudlicka O, Brown MD. Postnatal growth of the heart and its blood vessels. *J Vasc Res* 1996; 33: 266.
- 232 Ziswiler R, Daniel C, Franz E, et al. Renal matrix metalloproteinase activity is unaffected by experimental ischemia-reperfusion injury and matrix metalloproteinase inhibition does not alter outcome of renal function. *Exp Nephrol* 2001; 9: 118.
- 233 Schaefer L, Han X, August C, et al. Differential regulation of glomerular gelatinase B (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in obese Zucker rats. *Diabetologica* 1997; 40: 1035.
- 234 Gagliano N, Arusio B, Santambrogio D, et al. Age-dependent expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in rat kidney cortex. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2000; 55: B365.
- 235 Uchio K, Manabe N, Tamura K, et al. Decreased matrix metalloproteinase activity in the kidneys of hereditary nephrotic mice (ICGN strain). *Nephron* 2000; 86: 145.
- 236 Heidland A, Sebekova K, Paczek L, et al. Renal fibrosis: role of impaired proteolysis and potential therapeutic strategies. *Kidney Int* 1997; 62(Suppl): S32.
- 237 Mozes MM, Bottinger EP, Jacot TA, et al. Renal expression of fibrotic matrix proteins and of transforming growth factor-beta (TGF-B) isoforms in TGF-B transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 271.
- 238 Silbiger SR, Neugarten J. The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1995; 25: 515-533.
- 239 Lei J, Silbiger S, Ziyadeh FN, Neugarten J. Serum stimulated α_1 type IV collagen gene transcription is mediated by TGF β and inhibited by estradiol. *Am J Physiol* 1998; 274: F252-258.
- 240 Potier M, Elliot SJ, Tack I, Lenz O, Striker GE, Striker LJ, Karl M. Expression and regulation of estrogen receptors in mesangial cells: influence on matrix metalloproteinase-9. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 241-251.
- 241 Antus B, Yao Y, Song E, Liu S, Lutz J, Heemann U: Opposite effects of testosterone and estrogens on chronic allograft nephropathy. *Transplant Int* 15: 494-501, 2002
- 242 Baylis C. Age-dependent glomerular damage in the rat. Dissociation between glomerular injury and both glomerular hypertension and hypertrophy. Male gender as a primer risk factor. *J Clin Invest* 1994; 94: 1823-1829.
- 243 Mulroney SE, Woda C, Johnson M, Pesce C. Gender-differences in renal growth and function after uninephrectomy in adult rats. *Kidney Int* 1999; 56: 944-953.
- 244 Joles JA, van Goor H, Koomans HA. Estrogen induces glomerulosclerosis in albuminemic rats. *Kidney Int* 1998; 53: 862-868.
- 245 Hanke H, Hanke S, Bruck B, Brehme U, Gugel N, Finking G, Muck AO, Schmahl FW, Hombach V, Haasis R. Inhibition of the atheroprotective effects estrogens by progesterone in experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1996; 121: 129-138.
- 246 Adams MR, Kaplan JR, Manuck SB, Koritnik DR, Parks JS, Wolfe MS, Clarkson TB. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17 β -estradiol in ovariectomized monkeys. Lack of effects of added progesterone. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 1051-1057.
- 247 Oudar O, Elger M, Bankir L, Ganten D, Ganten U, Kriz W: Differences in rat kidney morphology between males, females and testosterone-treated females. *Ren Physiol Biochem* 14: 92-102, 1991
- 248 Kwan G, Neugarten J, Sherman M, Ding Q, Fotadar U, Lei J, Silbiger S: Effects of sex hormones on mesangial cell proliferation and collagen synthesis. *Kidney Int* 50: 1173-1179, 1996
- 249 Müller V, Szabo A, Viklicky O, Gaul I, Pörtl S, Philipp T, Heemann U. Sex hormones and gender related differences: their influence on chronic renal allograft rejection. *Kidney Int* 1999; 55: 2011-2020.
- 250 Sakemi T, Toyoshima H, Shouno Y, Morito F. Estrogen attenuates progressive glomerular injury in hypercholesterolemic male Imai rats. *Nephron* 1995; 69: 159-165.
- 251 Bullock LP, Bardin CW, Sherman MR. Androgenic, antiandrogenic and synandrogenic actions of progestins: role of steric and allosteric interactions with androgen receptors. *Endocrinology* 1978; 103: 1768-1778.
- 252 Nickening G, Strehlow K, Wassmann S, Bäumer AT, Albory K, Sauer H, Böhm M. Differential effects of estrogen and progesterone on AT1 receptor gene expression in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2000; 102: 1828-1833.

- 253 Muchaneta-Kubara EC, Sayed-Ahmed N, El Nahas AM. Subtotal nephrectomy: a mosaic of growth factors. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 320-327.
- 254 Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF- α 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 1994; 45: 916-927.
- 255 Kikuchi N, Urabe M, Iwasa K, Okubo T, Tsuchiya H, Hosoda T, Tatsumi H, Honjo H. Atheroprotective effect of estradiol and estrone sulfate on human vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 72: 71-78.
- 256 Szekacs B, Vajo Z, Varbiro Sz, Kakucs R, Vaslaki L, Acs N, Mucsi I, Brinton EA. Postmenopausal hormone replacement improves proteinuria and impaired creatinine clearance in type 2 diabetes mellitus and hypertension. *BJOG* 2000; 107: 1017-1021.
- 257 Phillips AO, Baboolal K, Riley S, Grone H, Janssen U, Steadman R, Williams J, Floege J: Association of prolonged hyperglycemia with glomerular hypertrophy and renal basement membrane thickening in the Goto Kakizaki model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 37: 400-410, 2001
- 258 Losordo DW, Isner JM: Estrogen and angiogenesis: A review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 6-12, 2001
- 259 Gendimenico GJ, Mack VJ, Siock PA, Mezick JA: Topical estrogens: Their effects on connective tissue synthesis in hairless mouse skin. *Arch Dermatol Res* 294: 231-236, 2002
- 260 Hosokawa M, Ishii M, Inoue K, Yao CS, Takeda T: Estrogen induces different responses in dermal and lung fibroblasts: Special reference to collagen. *Connect Tissue Res* 9: 115-120, 1981
- 261 Pirila E, Parikka M, Ramamurthy NS, Maisi P, McClain S, Kucine A, Tervahartiala T, Prikk K, Golub LM, Salo T, Sorsa T: Chemically modified tetracycline (CMT-8) and estrogen promote wound healing in ovariectomized rats: Effects on matrix metalloproteinase-2, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and laminin-5 α 2-chain. *Wound Repair Regen* 10: 38-51, 2002
- 262 Pirila E, Parikka M, Ramamurthy NS, Maisi P, McClain S, Kucine A, Tervahartiala T, Prikk K, Golub LM, Salo T, Sorsa T: Chemically modified tetracycline (CMT-8) and estrogen promote wound healing in ovariectomized rats: Effects on matrix metalloproteinase-2, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and laminin-5 α 2-chain. *Wound Repair Regen* 10: 38-51, 2002
- 263 Neugarten J, Medve I, Lei J, Silbiger SR: Estradiol suppresses mesangial cell type I collagen synthesis via activation of the MAP kinase cascade. *Am J Physiol* 277: F875-F881, 1999
- 264 Norman JT, Clark IM, Garcia PL: Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int* 58: 2351-2366, 2000
- 265 Banerjee S, Saxena N, Sengupta K, Banerjee SK: 17 β -Estradiol-induced VEGF-A expression in rat pituitary tumor cells is mediated through ER independent but PI3K-Akt dependent signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 300: 209-215, 2003
- 266 Takaoka M, Yuba M, Fujii T, Ohkita M, Matsumura Y: Oestrogen protects against ischaemic acute renal failure in rats by suppressing renal endothelin-1 overproduction. *Clin Sci* 103[Suppl 48]:434S-437S, 2002
- 267 Chen YF, Naftilan AJ, Oparil S: Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension* 19: 456-463, 1992
- 268 Wu Z, Zheng W, Sandberg K: Estrogen regulates adrenal angiotensin type 1 receptors by modulating adrenal angiotensin levels. *Endocrinology* 144: 1350-1356, 2003
- 269 Armando I, Jezova M, Juorio AV, Terron JA, Falcon-Neri A, Semino-Mora C, Imboden H, Saavedra JM: Estrogen upregulates renal angiotensin II AT2 receptors. *Am J Physiol* 283: F934-F943, 2002
- 270 Gragasin FS, Xu Y, Arenas IA, Kainth N, Davidge ST: Estrogen reduces angiotensin II-induced nitric oxide synthase and NAD(P)H oxidase expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 38-44, 2003
- 271 Minami N, Mori N, Nagasaka M, Kurosawa H, Kanazawa M, Kohzuki M: Effect of estrogen on pressor responses to α 1- adrenoreceptor agonist in conscious female rats. *Hypertens Res* 25: 609-613, 2002
- 272 Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, Mendelsohn ME: Estrogen receptor- α mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res* 90: 1087-1092, 2002
- 273 Guccione M, Silbiger S, Lei J, Neugarten J: Estradiol upregulates mesangial cell MMP-2 activity via the transcription factor AP-2. *Am J Physiol* 282: F164-F169, 2002
- 274 Martini PG, Katzenellenbogen BS: Modulation of estrogen receptor activity by selective coregulators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85: 117-122, 2003
- 275 Dubey RK, Gillespie DG, Zacharia LC, Rosselli M, Imthurn B, Jackson EK: Methoxyestradiols mediate the antimitogenic effects of locally applied estradiol on cardiac fibroblast growth. *Hypertension* 39: 412-417, 2002
- 276 Cavalieri EL, Kumar S, Todorovic R, Higginbotham S, Badawi AF, Rogan EG: Imbalance of estrogen homeostasis in kidney and liver of hamsters treated with estradiol: Implications for estrogen-induced initiation of renal tumors. *Chem Res Toxicol* 14: 1041-1050, 2001

- 277 Gerald P, Sirois MG, Tanguay JF: Specific contribution of estrogen receptors on mitogen-activated protein kinase pathways and vascular cell activation. *Circ Res* 93: 399–405, 2003
- 278 Marshman E, Streuli CH: Insulin-like growth factors and insulinlike growth factor binding proteins in mammary gland function. *Breast Cancer Res* 4: 231–239, 2002
- 279 Voss MR, Stallone JN, Li M, Cornelussen RN, Knuefermann P, Knowlton AA: Gender differences in the expression of heat shock proteins: The effect of estrogen. *Am J Physiol* 285: H687– H692, 2003
- 280 Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohe C, Laufs K, Böhm M, Nickenig G: Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 93: 170–177, 2003
- 281 Gomez-Sanchez EP, Ganjam V, Chen YJ, Liu Y, Zhou MY, Toroslu C, Romero DG, Hughson MD, de Rodriguez A, Gomez- Sanchez CE: Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the rat kidney by estradiol. *Am J Physiol* 285: E272–E279, 2003
- 282 Lehrke I, Schaier M, Schade K, Morath C, Waldherr R, Ritz E, Wagner J: Retinoid receptor-specific agonists alleviate experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol* 282: F741– F751, 2002
- 283 Deng L, Shipley GL, Loose-Mitchell DS, Stancel GM, Broddus R, Pickar JH, Davies PJ: Coordinate regulation of the production and signaling of retinoic acid by estrogen in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2157–2163, 2003

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani első helyen azoknak a jelenlegi és korábbi

PhD hallgató diákoknak: *Dr Rácz Zsuzsanna, Révész Csaba, Dr Kaucsár Tamás, Dr Budai Anna, Dr Németh Zsolt, Dr Kökény Gábor* továbbá a jelenlegi és volt

diákkörös hallgatóknak: *Elisabeth Nagy, Andreas Hiltmann, Clemens Reichart, Zátroch István, Pelsőczy Gergely, Újhelyi Mihály, Dr Aristoteles Perrakis, Dr Dominikus Schuller, Dr Lipták Péter, Dr Regős András, Dr Csóka Gábor, Dr Kovács Gergely*, akik a kísérleti munkában hatékony segítséget nyújtottak.

Külön szeretnék köszönetet mondani *Godó Máriának* a Kórélettani Intézetben, aki számos kísérleti metodika beállításában és kivitelezésében orozslánrészt vállalt, és a kutatómunka szellemi részében is hatékonyan részt vesz, valamint *Nagy Katinak* a Bécsi Egyetemen, akitől az immunfestést tanultam és *Cser Ágnesnek*, aki nélkül a laborunk nem tudna hatékonyan működni.

A kísérletek végzésében és metodikák beállításában, és elsajátításában szintén hatékony segítséget nyújtottak a Kórélettani Intézetben *Adamkó Sarolta*, az Esseni Egyetemi Klinikán: *Magdalene Vogelsang*, Heidelebergi Egyetemen: *Peter Rieger, Heike Ziebart és Zlata Antoni*.

Köszönet illeti kollegáimat, akikkel egyes kísérleteket együtt végeztünk: *Dr Antus Balázs, Dr Bagi Zsolt, Dr Müller Veronika, Dr Szabó Attila, Dr Minghui Wang, Dr Shanying Liu és Dr Nengtay Oyang*.

Sokat segítettek, szakmai tanácsokkal kollegáim: *Bodor Csaba, Dr Csekő Csongor, Dr Rácz Anita, Dr Masszi András, Dr Huszár Tamás, Dr Mózes Miklós*.

és kollaborátoraink: *Dr Benyó Zoltán, Dr Lacza Zsombor, Dr Ungvári Zoltán, Dr Anna Zenclussen, Dr Marie-Luise Gross, Dr Erwei Song, Dr Geiszt Miklós.*

Köszönettel tartozom azon tanszék és laborvezetőknek, akik utamon szakmai tanácsaikkal vezettek és a kísérletek elvégzéséhez szükséges feltételek előteremtésében hatékony segítséget nyújtottak: *Prof. Dr Koller Ákos, Prof Dr Losonczy György, Prof Dr Iványi Béla, Prof Dr Dieter Volk, Prof Dr. Rosivall László, Prof Dr Szollár Lajos.*

Külön köszönetet szeretnék mondani *Prof Dr Uwe Heemann*nak, aki a legfontosabb kezdő lökést adta a veseátültetés kísérletes vizsgálataihoz, *Prof Dr Eberhard Ritz*nek, aki szakmai példaképül és iránymutatásul szolgált és *Prof Dr Judy Liebermann*nak és *Prof Dr Harry Holthöfer*nek, akiktől jelenleg a legtöbb szakmai segítséget kapom.

Végül szeretnék köszönetet mondani édesapámnak: Hamar Jánosnak, akitől a kutatói pálya szeretetét tanultam kisgyermek koromtól.