

A krónikus allograft károsodás vizsgálata a vesében: a RAAS rendszer új szerepe új lokalizációban

BEVEZETÉS

A krónikus veseelégtelenség egyre növekvő gyakorisága miatt világszerte jelentős népegészségügyi és gazdasági problémát jelent. Az elmúlt években készült epidemiológiai vizsgálatok szerint a fejlett országok lakosságának több mint 10%-a érintett a krónikus veseelégtelenség valamelyik stádiumában. Végállapotú vesebetegségben vesepótló kezelésre van szükség, melyek közül a vesetranszplantáció jelenti a legjobb életminőséggel járó terápiás megoldást, hiszen a dialízisnél jobb életminőséget és hosszabb túlélést biztosíthat a betegek számára. A beültetett vese optimális esetben évekig fiziológiásan működik, azonban a szervátültetést követően a graft túlélését számos tényező limitálja, melynek hátterében alloantigén-függő és független folyamatok állhatnak. Jelen tanulmányunkban a vese transzplantációval minden esetben velejáró iszkémia/reperfúzió által okozott változásokat, illetve a transzplantáció után nagyon gyakran alkalmazott calcineurin inhibitor (CNI) kezelés nefrotoxikus hatását vizsgáltuk. Mindkettő jelentős, ám egyúttal módosítható faktor, amiket a transzplantált vese diszfunkciójának kialakulásában szerepet játszó alloantigén-független kóroki tényezők között tart számon a szakirodalom. A két hatás gyakran együttesen éri az átültetett vesét.

Az iszkémia/reperfúziós károsodás során jellemző a sejtek oxigénhiánya, megemelkedik a reaktív oxigéngyökök és kalcium szintje, a sejtek duzzadása következik be, ami sejthalálhoz vezet. A károsodás lezajlása nemi különbséget mutat, amelynek hátterében álló patomechanizmusok közül többet munkacsoportunk már vizsgált: állatkísérletekben a nőstények védettebbek az iszkémia/reperfúziós károsodással szemben, hímekhez képest.

A CNI-k közé tartozó Tacrolimus (Tac) és CyclosporinA (CyA) két nagy potenciálú immunszuppresszáns, amelyek ma még elengedhetetlen terápiás megoldásai az allograft rejekció kivédésének. A CNI-k az egy éves grafttúlélést jelentősen javítják, ám hosszú távon nefrotoxikus mellékhatásuk miatt jelentősen hozzájárulnak a krónikus allograft diszfunkció kialakulásához. Korábbi vizsgálatokból tudjuk, hogy CNI nefropátiában a CNI-k hatására csökken a vérátáramlás a vesében.

Mindkét allograft diszfunkcióhoz vezető folyamatban kiemelt szerepe van a szöveti renin-angiotenzin rendszer fokozott működésének. Az elmúlt évtizedben került leírásra, hogy bizonyos patológiás esetekben, mint diabétesz mellitusz vagy magas vérnyomás betegség, illetve magas sótartalmú diéta során, az összekötő szegmensben és a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben is megjelenhet renin termelés az eddig ismert juxtaglomeruláris apparatus (JGA) mellett.

A renin saját, sejtfelszíni receptorának, a (pro)renin receptornak [(P)RR] a megismerése a gyűjtőcsatorna renin termelésének jelentőségére hívhatja fel a figyelmet. A (P)RR-hoz nem csak a renin, hanem előalakja, a prorenin is kötődik (a (pro)renin egy kifejezés, amely egyszerre utal a reninre és a proreninre is). A (P)RR elsődleges lokalizációja a gyűjtőcsatorna interkaláris sejtjein található meg. Különösen fontos, hogy a renin termelő, principális sejtek és az azt érzéklni képes (pro)renin receptorral rendelkező, interkaláris sejtek közvetlenül egymás mellett helyezkednek el a vese gyűjtőcsatornáiban, ami igen szenzitív renin-angiotenzin rendszer szabályozást tesz lehetővé. A (P)RR leírása kapcsán derült fény arra, hogy a renin nem csupán proteázként, hanem saját receptorán, ligandként is funkcionál. A receptorhoz kötődött (pro)renin lényegesen nagyobb katalitikus aktivitásra tesz szert, így fokozott mértékben van lehetőség angiotenzin I termelésre. Mindeközben a receptor intracelluláris alegysége foszforilálódik, melynek hatására végeredményben hipertrofia, hiperplázia és fibrózis irányába mutató folyamatok indulnak be. Ez azt jelenti tehát, hogy az angiotenzin II mellett a (pro)reninnek is jelentős szerepe lehet más kórképekhez társuló vesekárosodás kialakulásában (ld. diabétesz mellitusz, hipertónia).

Feltételeztük, hogy az eddig ismert kórállapotokon túl, más patofiziológiás helyzetekben is megjelenhet a JGA kívüli renin termelés és a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben kóros mértékben termelődő renin hozzájárulhat az allograft diszfunkció kialakulásához.

CÉLKITŰZÉSEK

Hipotézisünk a következő volt. A közelmúltban leírt renin termelődésének lehetősége a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben, a szintén gyűjtőcsatornában található (P)RR-on keresztül olyan profibrotikus útvonalak aktiválásában vehet részt, mellyel végeredményben hozzájárulhat a vese graft diszfunkció kialakulásához, akár az iszkémia/reperfúziós károsodás, akár a CNI nefropátia esetében. Ezek alapján célunk volt a vese iszkémia/reperfúziós károsodás

akut modelljén vizsgálni a renin termelést a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben, különös tekintettel a nemi különbségekre. Emellett CNI nefropátia kialakulása során is vizsgáltuk a renin termelést a gyűjtőcsatornában, illetve azt, hogy milyen mechanizmusok aktiválásával vehet részt a lokálisan termelődő renin a graft károsodás kialakulásában.

MÓDSZEREK

A kísérletekben használt patkányokat és egereket standard körülmények között tartottuk, hőmérséklet kontrollált ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) szobákban, 12 óránként váltakozó világos és sötét periódusok mellett. Az állatoknak állandóan elérhető standard rágcsálótápot és csapvizet biztosítottunk. Minden állatkísérletre vonatkozó protokollt a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága engedélyezett (22.1/3491/003/2008).

A vese iszkémia/reperfúziós modelljéhez 10 hetes Wistar hím és nőstény patkányokat vizsgáltunk. Ötven perces bal oldali vese iszkémiát követően a reperfúzió első 30 percében, illetve a 2. (T2), 8. (T8), 16. (T16), 24. (T24) és 48. (T48) órájában történtek a mérések. Kontrollként áloperált állatok szolgáltak. A reperfúzió első 30 percében csak érátmérő mérések történtek, míg a többi időpontban az érátmérők mellett vizsgáltuk a renin tartalmat, szérum kreatinin szintet határoztunk meg és szövettani kiértékelést végeztünk.

A CNI nefrotoxicitás vizsgálata során háromhetes, hím C57 black 6 egereket 5 csoportba osztottunk a következő kezelési sémák alapján. Mindegyik kezelés három hétig zajlott naponta végzett intraperitoneális adagolással: az első csoportot, a kontroll csoportot fiziológias sóoldattal, a másodikat Tac-cal (0,075 mg/kg/nap), a harmadikat CyA-cal (2 mg/kg/nap), míg a negyedik és ötödik csoportot az CNI-k mellett direkt renin gátló Aliskirennel (25 mg/kg/nap) is kezeltünk.

Áramlási citometria segítségével a gyűjtőcsatorna aquaporin 2 pozitív, principális sejt populációján belül vizsgáltuk a renin és VEGF pozitív sejtek arányát. Multifoton mikroszkóppal meghatároztuk a renin lokalizációját és a peritubuláris kapilláris érátmérőket. Szövettani kiértékelés segítségével a szerkezeti károsodást, illetve a kollagén mennyiségét írtuk le. Reverz transzkripció és valós idejű polimeráz láncreakcióval mértük a vese szövet kollagén I mRNS expresszióját. A CNI vérszint meghatározáshoz nagyhatékonyságú

folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométert használtunk, míg a plazma renin aktivitás mérése radioimmunoassay-el történt. A vesefunkció leírása céljából szérum kreatinin szintet határoztunk meg, az iszkémia/reperfúziós vese károsodás vizsgálata során hagyományos kémiai analizátorral, míg a CNI nefropátia vizsgálatokor nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrométerrel. A CNI nefropátia vizsgálata során a vérnyomás meghatározásához farok mandzsettás vérnyomásmérőt használtunk. A statisztikai elemzés során az összehasonlításokat a normál eloszlású adatok esetében ANOVA teszttel, illetve a nem normál eloszlású adatok esetében Kruskal-Wallis teszt használatával végeztük. A p értéket 0,05 alatt tekintettük szignifikánsnak. Az adatokat átlag \pm átlag szórása (SEM) ábrázoltuk.

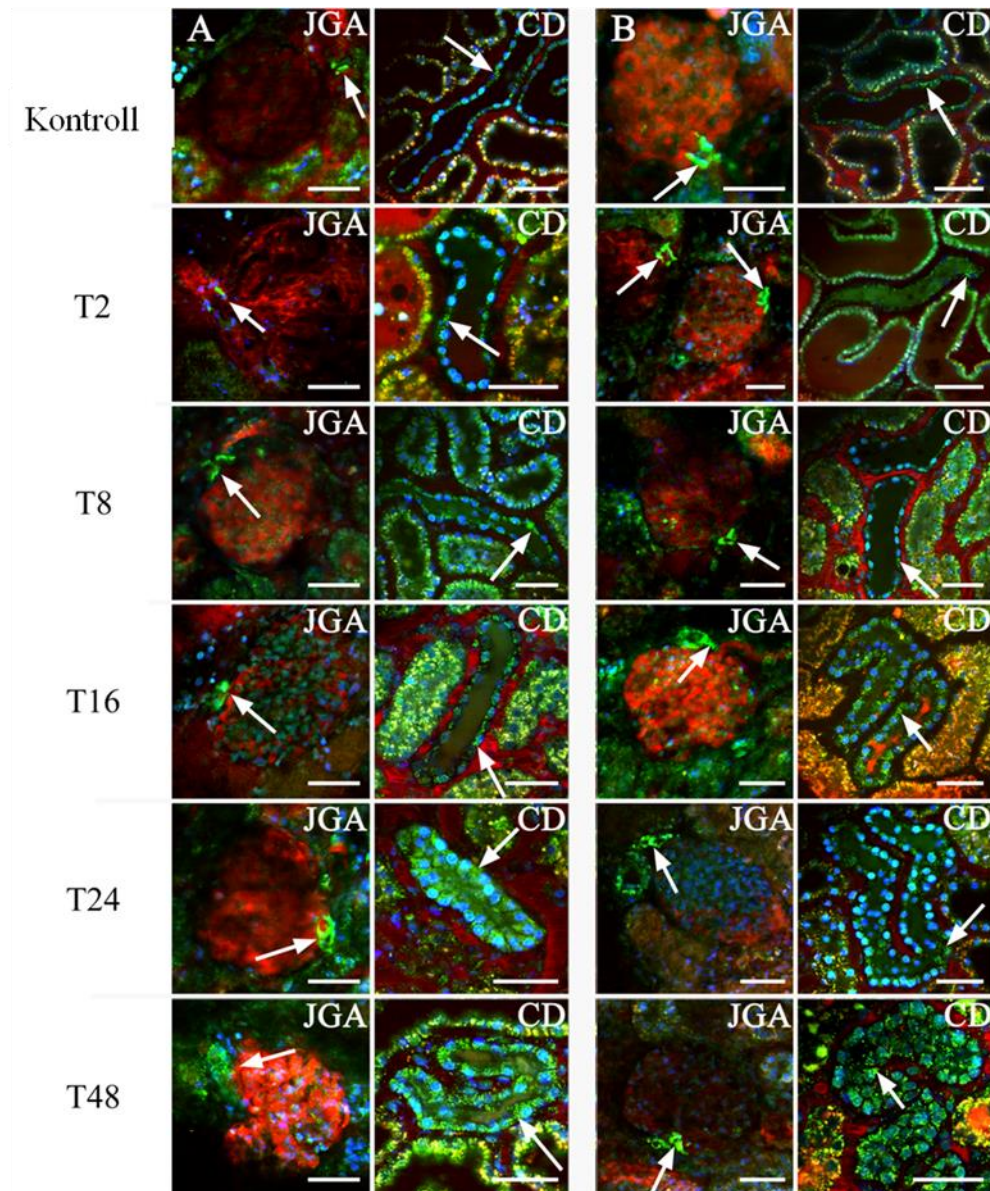
EREDMÉNYEK

Iszkémia/reperfúziós vesekárosodás

A vese működésének megítéléséhez **szérum kreatinin** szintet határoztunk meg az iszkémiát követő reperfúzió különböző időpontjaiban. Iszkémia/reperfúziós vesekárosodást követően a szérum kreatinin szint szignifikánsan megemelkedett T8 időpontra és a különbség a vizsgálat további időpontjaiban is szignifikáns maradt mindkét nemben. Ezek az értékek jelentős vesefunkció romlásra utaltak, egyben alátámasztották modellünk alkalmasságát az iszkémia/reperfúzió okozta akut vesekárosodás vizsgálatára.

Az állat modellünk validálása, az iszkémia/reperfúziós károsodás progressziója, illetve a nemi különbségek leírása céljából **perjódsv-Schiff festést** alkalmaztunk. Már T2 időpontban számottevő károsodás alakult ki mindkét nemben. Hímekben igen súlyos károsodás alakult ki a vesében T8 időpontra, ami szignifikánsan rosszabb eredményt jelent a nőstényekhez képest, akikben jelentős szöveti károsodás csak hosszabb idő alatt alakult ki. A nemek közötti szignifikáns különbség T8 időponttól a vizsgálat végéig megfigyelhető.

Áramlási citometriát alkalmazva vizsgáltuk a renin pozitív sejtek arányát az aquaporin 2 pozitív principális sejt populációban. A kontroll hím állatokban, jelentősebb mennyiségben, míg nőstényekben kisebb arányban voltak jelen a renin termelő principális sejtek. Mennyiségük T2 és T8 időpontra csökkent, míg T8 időponttól kezdve fokozatosan megnőtt, mely emelkedés kifejezettebb volt hímekben és T48 időpontra vált szignifikánssá.



A JGA és a gyűjtőcsatorna renin tartalmát **multifoton mikroszkóppal** vizsgáltuk. A kontroll csoportban a JGA és a gyűjtőcsatorna csak nyomokban tartalmazott renin granulomokat, mely mennyiség tovább csökkent T2 és T8 időpontokra. A renin festődés T16 időpontra mindkét lokalizációban fokozódott, majd T24 időpontra tovább nőtt és T48 időpontra vált igazán kifejezetté. Ekkora a nemek közötti különbség is szembetűnővé vált, hímekben jelentősebb renin termelést láttunk, mint nőstényekben.

Megfigyelésünk szerint az iszkémia/reperfúziós károsodást követően a gyűjtőcsatornában termelődő renin két irányba választódik ki: a szisztémás keringésbe és a tubulus lumenbe is.

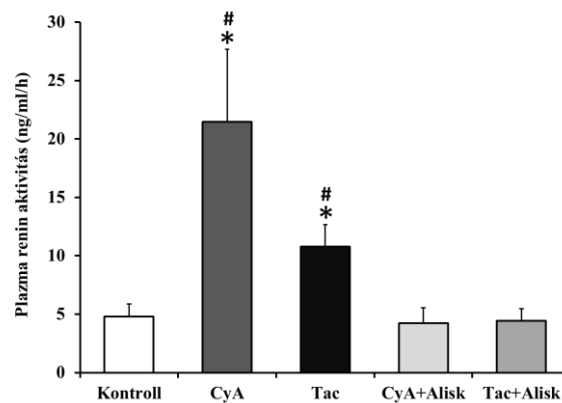
Az **érátmérők vizsgálata**kor azt tapasztaltuk, hogy kontroll állatokban a vesekéregben található peritubuláris kapillárisok érátmérőiben a két nem között nem volt különbség. Ugyanakkor nőstényekben a reperfúzió 2. percétől nagyobb érátmérőket mértünk, mint a hímeknél, de a 15. percétől az arány megfordult és hímekben mértünk nagyobb érátmérőket.

CNI nefropátia

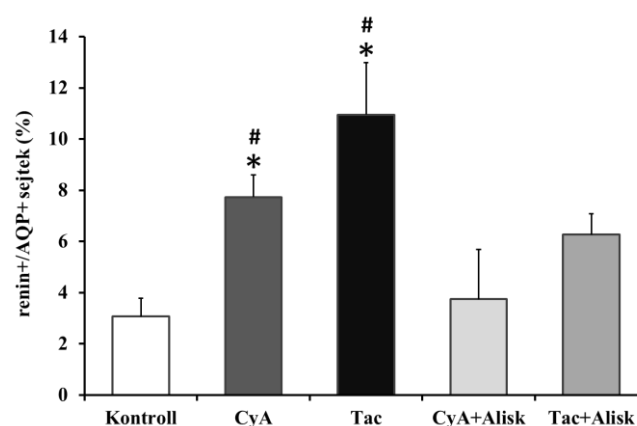
A vese funkcionális állapotának leírására **szérum kreatinin** szintet mértünk a három hetes kezelést követően. A kontroll állatok szérum kreatinin szintje a fiziológias tartományon belül maradt, azonban CNI kezelés hatására az állatok vesefunkciója szignifikánsan romlott. Aliskiren együttes adása CNI-kal szignifikánsan csökkentette a szérum kreatinin szintet.

Nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll és a kezelt csoportok **vérnyomás** értékei között, így ez a szisztémás hatás nem befolyásolta a nefropátia mértékét.

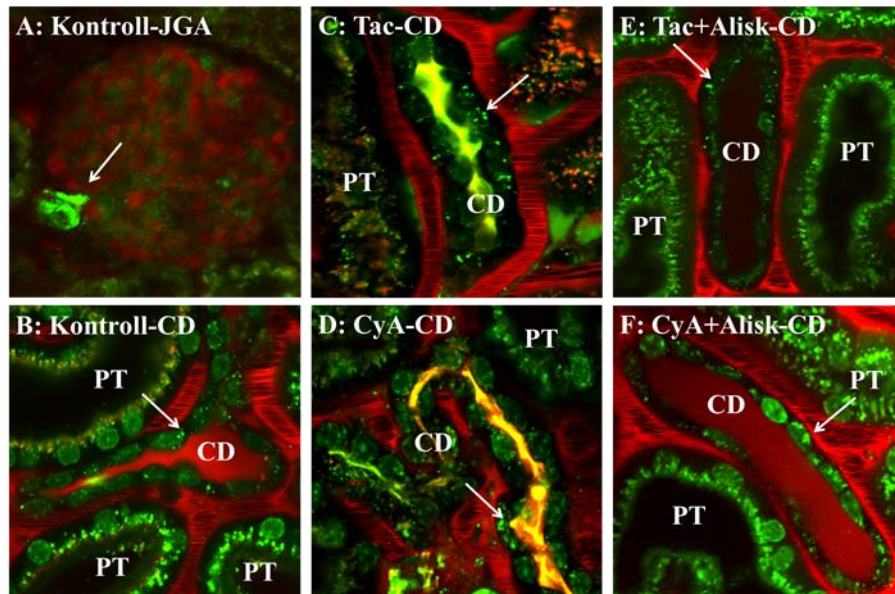
A gyógyszeres kezelés eredményességének ellenőrzése érdekében **CyA és Tac vérszintet** mértünk. Mindkét kezelés esetén a humán céltartományt megközelítő vérszint értékeket kaptunk.



CNI kezelést követően szignifikánsan megemelkedett a **plazma renin aktivitás**, mely renin gátló kezelés hatására a kontroll csoporthoz hasonló értékre csökkent.



Áramlási citometriával a renin pozitív sejtek arányát határoztuk meg a principális sejtek között. A kontroll állatok principális sejtjeinek körülbelül 3%-a tartalmazott renint. Három hetes CNI kezelés szignifikáns emelkedést eredményezett a renin pozitív sejtek arányában, mely szignifikancia eltűnt a kombinált kezelést kapott állatoknál.

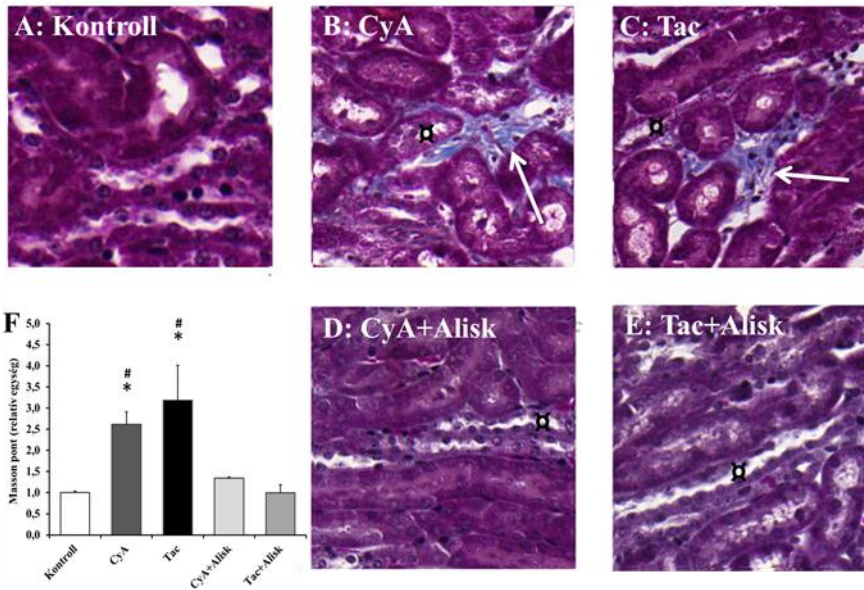


A három hetes gyógyszeres kezelést követően **multifoton mikroszkóppal** figyeltük meg a renin tartalom változását. A kontroll állatok gyűjtőcsatornájának principális sejtjeiben alig mutatkozott néhány renin szemcse. A CNI kezelésben részesült állatok gyűjtőcsatornájában azonban a principális sejtek bazális és apikális membránhoz közel eső területeit sűrűn kitöltötték a renin granulumok. A kombinált kezelésben részesült csoportokban a renin szemcsék száma látványosan lecsökkent, a kontroll csoportéhoz hasonló szintre.

A CyA-val és Tac-szal kezelt csoportokban szignifikáns **peritubuláris kapilláris érátmérő** csökkenést mértünk a kontroll és az Aliskirennel is kezelt csoportokhoz képest.

Az érátmérők vizsgálata során érmalformációkra lettünk figyelmesek a gyűjtőcsatornák közvetlen közelében. Néhol jelentősen beszűkült, máshol tág ereket figyeltünk meg turbulens áramlással. A patomechanizmus esetleges újabb lépcsőjének felderítése céljából vizsgáltuk a **vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) pozitív sejtek** arányát a gyűjtőcsatornák principális sejtjei között áramlási citometriával. Kontroll állatokban a principális sejtek 10%-a tartalmazott VEGF-et. Ez az arány szignifikánsan emelkedett a CNI kezelt csoportban. A CNI mellett renin gátló kezelést is kapott csoportokban ez az emelkedés elmaradt.

Az intersticiális fibrózis a CNI nefrotoxicitás egyik jellegzetes szövettani elváltozása, melynek egyik markerét, a kollagén mennyiségét vizsgáltuk **kollagén I mRNS szint meghatározásával**. A CyA és Tac kezelt csoportokban szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a kollagén I mRNS expresszióban a kontroll csoporthoz képest. A renin inhibitorral együtt kezelt csoportokban a kontroll csoporthoz hasonló mértékű kollagén I mRNS expressziót mértünk.



A kollagén kimutatására alkalmas **Masson festéssel** a vese egészét érintő szerkezeti változásokat figyeltük meg. A CNI-ok nefrotoxikus hatásának és az Aliskiren kezelés jótékony hatásának vizsgálatára a kollagén kiterjedését és pontos lokalizációját vizsgáltuk. A kontroll állatok veséiből készült szövettani metszeteken az arteriolák körül figyeltünk meg kollagén festődést, azonban az intersticiális fibrózis nyomait nem találtuk. Három hetes CNI kezelést követően szignifikáns emelkedést láttunk a kollagén mennyiségében a CyA és Tac csoportban is. Vizsgálataink során feltűnt, hogy a szigetszerű fibrotikus plakkok többnyire a gyűjtőcsatornák környezetében helyezkedtek el. Azon csoportokban, ahol Aliskiren kezelést is alkalmaztunk, a kollagén felhalmozódása kisebb mértékű volt.

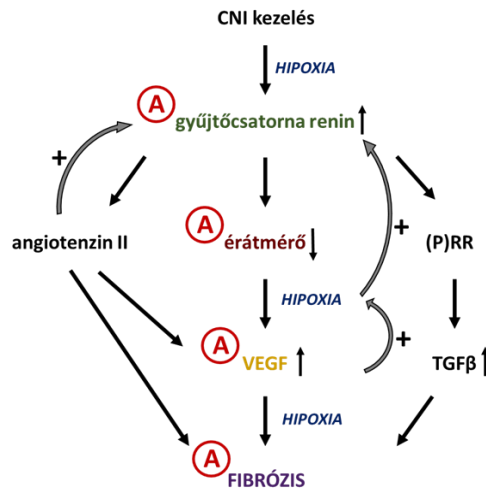
KÖVETKEZTETÉSEK

Összefoglalva, a bevezetőben említett kórállapotok mellett, iszkémia/reperfúziós vesekárosodás során, illetve CNI nefropátiában is kórosan emelkedett a gyűjtőcsatorna principális sejtjeinek renin termelése, amelyet elsőként írtunk le az irodalomban. Ezen megfigyelések felhívhatják a figyelmet a renin kulcsszerepére a krónikus allograft diszfunkció kialakulásában és terápiás célpont lehet hipertóniával nem járó állapotokban is.

Iszkémia/reperfúziós vesekárosodás kapcsán emellett elmondható, hogy a renin termelés kifejezettebb hímekben, mint nőstényekben. A renin-angiotenzin rendszer eltérő szabályozása magyarázatul szolgálhat a hímekre jellemzőbb ingadozó értónus szabályozásra, míg a nőstények igen kiegyensúlyozott renin-angiotenzin rendszer regulációval és stabilabb érátmérőkkel rendelkeznek a vese kéregben. Feltételezzük, hogy a renin közvetlenül is szerepet játszhat az iszkémia/reperfúziós vesekárosodás rövidebb és hosszabb távú következményeinek kialakulásában. Ennek hátterében a megnövekedett renin elválasztás állhat, amely az angiotenzin II-t, illetve saját (pro)renin receptorát aktiválva a folyamat központi szereplője lehet. A renin gátlása terápiás lehetőségként merülhet fel az iszkémia/reperfúziós vesekárosodás mind akut, mind krónikus következményeinek csökkentésében.

Összefoglalva a CNI nefropátia kialakulásával kapcsolatos eredményeket kijelenthetjük, hogy a CNI kezelés hatására ismerten kialakuló vérátáramlás csökkenés a vesében lokális hipoxiát eredményez, aminek következményeként fokozódik a renin termelés, a JGA mellett a gyűjtőcsatornában is. A megnövekedett mennyiségű renin hatására csökkennek a peritubuláris érátmérők, aminek hatására tovább romlik a lokális hipoxia. Ez az inger tovább fokozza a gyűjtőcsatorna renin elválasztását, másrészt kóros VEGF termeléshez vezet. A VEGF kóros termelődésének hatására kóros érhálózat fejlődhet ki a vesében, mely szintén hozzájárul a vese romló vérellátásához, végső soron a fibrózis kialakulásához. Fontos megemlíteni, hogy a gyűjtőcsatornában termelődő renin saját receptorán keresztül is közre játszhat a CNI-k okozta vesekárosodás kialakulásához, többek közt a TGF béta szint emelésén keresztül. Ráadásul a renin fokozza az angiotenzin II képződését a gyűjtőcsatornában, mely közvetlenül is, illetve kóros VEGF termelésen keresztül is fibrózis kialakulásához vezethet. Mindemellett az angiotenzin II, a JGA-ban történő renin elválasztás gátlásával szemben a gyűjtőcsatornában fokozza a renin termelést, hozzájárulva egy ördögi kör kialakulásához. Kísérleteink során az

Aliskiren kezelés gátolta a kóros mennyiségű renin és VEGF termelődést, a peritubuláris érátmérők csökkenését, illetve ezek eredményeként megjelenő fibrózist.



1. ábra Calcineurin inhibitor kezelés hatására kialakuló vese károsodás lehetséges útvonalai. A CNI kezelés hatására ismertén kialakuló vérátáramlás csökkenés a vesében lokális hipoxiát eredményez, aminek következményeként fokozódik a renin termelés, többek között a gyűjtőcsatornában is. A renin fokozza az angiotenzin II képződését, mely közvetlenül is, illetve kóros VEGF termelésen keresztül is fibrózis kialakulásához vezethet. A VEGF kóros termelődése részben a megnövekedett mennyiségű renin következményeként kialakuló hipoxia hatására is bekövetkezhet. Végül, a renin saját receptorán keresztül is közre játszhat a CNI- okozta vesekárosodás kialakulásához. Kísérleteink során az Aliskiren kezelés gátolta a kóros mennyiségű renin és VEGF termelődést, a peritubuláris érátmérők csökkenését, illetve ezek eredményeként megjelenő fibrózist. A: Aliskiren; CNI: calcineurin inhibitor; (P)RR: (pro)renin receptor; TGF β: transzformáló növekedési faktor β; VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

Csohány R, Prókai Á, Sziksz E, Balicza-Himer L, Pap D, Kosik A, Sugár D, Vannay Á, Kis-Petik K, Fekete A, Szabó AJ. Sex differences in renin response and changes of capillary diameters after renal ischemia/reperfusion injury. *Pediatric Transplantation*. 2016 in: p. press. doi: 10.1111/petr.12712 (IF: 1,441)

Prókai Á and **Csohány R**, Sziksz E, Pap D, Balicza-Himer L, Boros Sz, Vannay Á, Kis-Petik K, Fekete A, Peti-Peterdi J, Szabó AJ. Calcineurin-inhibition results in up-regulation of local renin and subsequent VEGF production in renal collecting ducts. *Transplantation*. 2016 Feb;100 (2):325-33 (IF:3,828)

Csohány R, Prókai Á, Kosik A, Szabó JA. A gyűjtőcsatorna meghatározó szerepe a vese lokális renin-angiotenzin rendszerében. *Orvosi Hetilap* 2013 154 (17):643-9.

Csohány R, Prókai Á, Kosik A, Szabó JA. Multi-foton mikroszkópia a vesekutatásban. *Gyermekgyógyászat* 2013; 64. évfolyam 2. szám