

A gyűjtőcsatorna renin termelésének vizsgálata a vese allograft diszfunkció kialakulásában

Doktori tézisek

Dr. Csohány Rózsa

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szabó J. Attila DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Sulyok Endre DSc, egyetemi tanár
Dr. Maurovich-Horváth Pál PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tordai Attila DSc, egyetemi docens
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szijártó Attila PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Szabó László DSc, egyetemi tanár

Budapest
2016

BEVEZETÉS

Egyre növekvő gyakorisága miatt a krónikus veseelégtelenség világszerte jelentős népegészségügyi és gazdasági problémát jelent. A közelmúlt nagy epidemiológiai vizsgálatai szerint a fejlett országok lakosságának több mint 10%-a szenved a krónikus veseelégtelenség valamelyik stádiumában. A betegség végső stádiumában vesepótló kezelésre van szükség, melyek közül a vesetranszplantáció hosszú távú megoldást, a dialízisnél jobb életminőséget és hosszabb túlélést biztosíthat a betegek számára. A beültetett vese optimális esetben évekig fiziológiásan működik, azonban az évek múltával egyre nagyobb a kockázata az allograft diszfunkció kialakulásának, 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, 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 romlik a szöveti oxigenizáció, megemelkedik a reaktív oxigénradikálok és kalcium szintje, végül a sejtek duzzadása következik be, ami sejthalálhoz vezet. A károsodás mértékében nemi különbség mutatható ki: a nőstények védettebbek az iszkémia/reperfúziós károsodással szemben, hímekhez képest.

A leggyakrabban használt CNI-ok közé tartozik a Cyclosporin A (CyA) és a Tacrolimus (Tac). A CNI-k az egy éves grafftúlélést 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.

Fontos megjegyezni, hogy mindkét allograft diszfunkcióhoz vezető folyamatban döntő szerepe van a szöveti renin-angiotenzin rendszer fokozott működésének. Az elmúlt évtizedben került leírásra, hogy bizonyos

kórállapotokban, mint diabétesz mellitusz vagy magas vérnyomás betegség, illetve magas sótartalmú diéta során, a gyűjtőcsatorna principális sejtjei képesek visszanyerni az embrionális korra jellemző renin termelő kapacitásukat.

Egy nemrégiben azonosított receptor a gyűjtőcsatorna renin termelésének jelentőségére hívhatja fel a figyelmet. Leírásra került ugyanis a renin saját, sejtfelszíni receptora, a (pro)renin receptor [(P)RR]. Elnevezésének oka, hogy ehhez a receptorhoz 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 elsősorban a gyűjtőcsatorna interkaláris sejtjein található meg. Különösen fontos, hogy a renin termelő, principális sejtek és az azt érzékelő, interkaláris sejtek közvetlenül egymás mellett helyezkednek el a vese gyűjtőcsatornáiban, ami igen szenzitív renin-angiotenzin rendszer szabályozást tesz lehetővé. A (P)RR megismerésével derült fény arra, hogy a renin nem csupán proteázként, hanem saját receptorán, ligandként is funkcionál, ráadásul e kettős funkció a proreninre is igaz, mivel a receptorhoz való bekötődést követően a prorenin konformáció-változáson megy keresztül, és hasítás nélkül is aktív enzim keletkezik belőle. 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, és a mitogén aktivált protein kináz valamint az extracelluláris szignál szabályozta kináz 1 és -2 jelátviteli útvonalakat aktivál, aminek hatására végeredményben hipertrófia, hiperplázia és fibrózis irányába mutató folyamatok indulnak be. Ez különösen fontos, hiszen ezáltal az angiotenzin II mellett a (pro)reninnek is jelentős szerepe lehet más kórképekhez társuló vesekárosodás kialakulásában, ahogyan azt már diabétesz mellitusz és hipertónia esetében leírták.

Feltételezzük, hogy az eddig ismert stressz állapotokon túl, más patofiziológiás helyzetekben is megjelenhet a juxtaglomeruláris apparátuson (JGA) kívüli renin termelés és a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben kóros mértékben termelődő renin hozzájárulhat az allograft diszfunkció kialakulásához.

CÉLKITÚZÉSEK

A közelmúltban a fentiekben részletezett vesekárosodások hátterében felmerült az extrajuxttaglomeruláris renin termelés patofiziológiai szerepe, illetve a renin-angiotenzin rendszer klasszikus, távoli, angiotenzin II receptor mediált hatásai mellett a szöveti renin-angiotenzin rendszerek és a gyűjtőcsatornában található (P)RR alternatív funkciója is egyre inkább előtérbe kerültek. Ezek lehetőségét kívántuk vizsgálni a hasonló vesekárosodást előidéző transzplantációs folyamat során, iszkémia/reperfúziós és CNI nefropátia állatmodelljén. Célunk volt a két kórfolyamatban a gyűjtőcsatorna principális sejteinek közvetlen renin termelését vizsgálni. A principális sejtekre jellemző akvaporin 2 fehérjének köszönhetően lehetőségünk volt ezen tubulus szakasz renin termelő sejteinek elkülönült tanulmányozására. A két állatmodellben a következőkre kerestük a választ:

Iszkémia/reperfúziós vesekárosodás:

1. Iszkémia/reperfúziós vesekárosodás során a renin klasszikus szekréción helyén túl, a gyűjtőcsatornában is megfigyelhető-e renin termelés?
2. Befolyásolja-e a nem a gyűjtőcsatorna renin termelését a reperfúzió ideje alatt?
3. A két nemet összehasonlítva különbözik-e a vese vérellátása a reperfúzió ideje alatt?

CNI nefropátia:

1. Calcineurin inhibitor kezelés előidézi-e a gyűjtőcsatornában a renin termelést?
2. A megnövekedett renin tartalom a gyűjtőcsatornában hozzájárulhat-e a CNI-k okozta vesekárosodás kialakulásához?
3. Milyen mechanizmusok aktiválásával vehet részt a lokálisan termelődő renin a CNI nefropátia 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 rágszálótápot 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. Intraperitoneálisan adott ketamin (100mg/ttkg) és xylazin (10mg/ttkg) anesztéziát alkalmazva 50 perces bal oldali vese iszkiémiát követően a reperfúzió első 30 percében, illetve a 2. (T2), 8. (T8), 16. (T16), 24. (T24) és 48. (T48) órájában történtek a mérések.

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:

1. fiziológiás sóoldat – kontroll csoport;
2. Cyclosporin A (2 mg/kg/nap);
3. Tacrolimus (0,075 mg/kg/nap) a vesetranszplantációt követő iniciációs dózisnak megfelelően;
4. Cyclosporin A (2 mg/kg/nap) + renin gátló Aliskiren (25 mg/kg/nap);
5. Tacrolimus (0,075 mg/kg/nap) + renin gátló Aliskiren (25 mg/kg/nap).

Áramlási citometria segítségével a gyűjtőcsatorna akvaporin 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. Szövetteni 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 analízátorral, míg a CNI nefropátia vizsgálatokor nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrométerrel. A CNI nefropátia vizsgálata során a vérnyomás meghatározásához fark 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) ábráztoltuk.

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 akvaporin 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** vizsgálatuk. 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 szembeütővé vált, hímekben jelentősebb renin termelést látunk, mint nőtényekben.

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 vizsgálatok** azt tapasztaltuk, hogy kontroll állatokban a vesekéregben található peritubuláris kapillárisok érátmérőiben a két nem között nem volt különbség. Ugyanakkor nőtényekben a reperfúzió 2. percétől nagyobb érátmérőket mértünk, mint a hímeknél, de a 15. perctől 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 fiziológiás 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 sejtszomszékében 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 sejtszomszékében 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

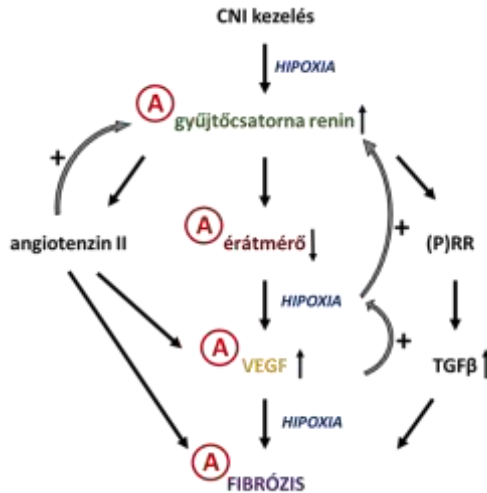
kezelést követően szignifikáns emelkedést láttunk a kollagén mennyiségében a CyA és Tac csoportban is. Vizsgálataink során feltűnt, hogy a szigetserű fibrotikus plakkok többnyire a gyűjtőcsatornák környezetében helyezkedtek el. Azon csoportokban, ahol Aliskiren kezelést is alkalmaztunk, a kollagén felhalmozódása kisebb mértékű volt.

KÖVETKEZTETÉSEK

PhD munkám célja a vesetranszplantáció következményeként kialakuló allograft diszfunkció hátterében álló folyamatok pontosabb megértése volt. A transzplantációval mindig együtt járó iszkémia/reperfúziós károsodás, illetve az elsődlegesen alkalmazott immunszuppresszívumok, a CNI toxicitás okozta vesekárosodás során a gyűjtőcsatorna principális sejtjeinek közvetlen renin termelését vizsgáltuk. Eredményeink alapján elmondható, hogy:

1. leírtuk a vese iszkémia/reperfúziós károsodásának akut modelljében a renin válasz meglétét a JGA mellett a gyűjtőcsatornában is;
2. a hímek nem csak fiziológiás állapotban rendelkeznek nagyobb renin tartalékkal a gyűjtőcsatornában a nőstényekhez képest, de az iszkémia/reperfúziós károsodás hatására hímekben több renin termelődik a gyűjtőcsatornában;
3. hímekhez képest a nőstények lényegesen kiegyensúlyozottabb peritubuláris érátmérőkkel rendelkeznek a vese kéregben, mely a veseszövet egyenletesebb vérellátását biztosíthatja;
4. az eddig ismert patofiziológiás állapotokon túl, CNI kezelés hatására is fokozódik a renin termelés a gyűjtőcsatornában;
5. a CNI-ok vesekárosító hatása összefüggésbe hozható a gyűjtőcsatornában termelődő reninnel, amit alátámaszt a direkt renin inhibitor jótékony hatása CNI nefropátia állatmodellünkben: feltételezhetően a krónikus allograft nefropátia irányába ható folyamatokat gátolja az Aliskiren;

6. a gyűjtőcsatorna fokozott renin termelése és ezzel párhuzamosan csökkent peritubuláris kapilláris érátmérők következtében feltételezhetően csökken a vese vérátáramlásra és lokális hipoxia alakul ki, melyre a principális sejtek kóros VEGF expresszióval válaszolhatnak, ez aránytalan érnövekedéshez vezethet, mely tovább fokozza az intersticiális fibrózis kialakulását.



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-k 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 Apr. 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

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – közlemények:

Szebényi K, Füredi A, Kolacsek O, **Csohány R**, Prókai Á, Kis-Petik K, Szabó AJ, Bősze Zs, Bender B, Tóvári J, Enyedi Á, Orbán TI, Apáti Á and Sarkadi B. Visualization of calcium dynamics in rat kidney proximal tubules. *JASN*. 2015 Nov;26(11):2731-40. (IF: 9,343)

Kerti A, **Csohány R**, Wagner L, Jávorszky E, Maka E, Tory K. *NPHS2* homozygous p.R229Q variant: potential modifier instead of causal effect in FSGS. *Pediatr Nephrol*. 2013 28(10):2061-4. (IF: 2,856)

Kerti A, **Csohány R**, Szabó A, Árkossy O, Sallay P, Morinière V, Vega-Warner V, Nyíró G, Lakatos O, Szabó T, Lipska BS, Schaefer F, Antignac C, Reusz G, Tulassay T, Tory K. *NPHS2* p.V290M mutation in late-onset steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2013 28(5):751-7. (IF: 2,856)

Kerti A, Jávorszky E, **Csohány R**, Varga N, Szabó A, Árkossy O, Sallay P, Balogh L, Szabó T, Reusz Gy, Tulassay T, Tory K. A szteroid-rezisztens nephrosis szindró, a genetikai vizsgálata Magyarországon. *Gyermekgyógyászat* 2013; 64. évfolyam 1. szám