

Effetti della ciclosporina su colture di fibroblasti e cellule epiteliali tubulari renali

C. Esposito, F. Cornacchia, N. Bellotti, M.M. Conte, G. Fasoli, A. Foschi, T. Mazzullo, A.R. Plati, L. Semeraro, C. Libetta, A. Dal Canton

Unità Operativa di Nefrologia e Dialisi, IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia, Pavia

Riassunto

Premessa. La nefrotossicità cronica da ciclosporina è caratterizzata da atrofia tubulare e fibrosi interstiziale. Per una migliore comprensione dei meccanismi coinvolti nel danno da ciclosporina abbiamo valutato l'effetto della ciclosporina su cellule epiteliali e fibroblasti umani.

Metodi. La proliferazione cellulare veniva valutata mediante conta delle cellule con camera di Neubauer. L'apoptosi veniva determinata misurando la concentrazione di oligonucleosomi nel lisato cellulare con metodo ELISA. L'effetto della ciclosporina sul turnover della matrice extracellulare veniva studiato valutando la produzione di collagene mediante ELISA, i livelli di mRNA per il collagene ($\alpha 1$) I e ($\alpha 2$) IV, MMP9 e TIMP-1 mediante RT-PCR e l'attività gelatinolitica sul sovrantante mediante zimografia.

Risultati. La ciclosporina riduceva marcatamente la proliferazione di cellule epiteliali ma non aveva effetto sulla crescita dei fibroblasti. L'effetto antiproliferativo si associava alla induzione di apoptosi. Nelle cellule epiteliali trattate con ciclosporina era aumentata la sintesi di collagene tipo IV mentre nei fibroblasti era aumentato il livello di mRNA per TIMP-1.

Conclusioni. La ciclosporina possiede un effetto antiproliferativo su cellule epiteliali tubulari in coltura ma non su fibroblasti. Questo effetto è associato ad induzione di apoptosi. Il trattamento con ciclosporina causa accumulo di matrice extracellulare aumentando la sintesi di collagene nelle cellule epiteliali e riducendo la sua degradazione nei fibroblasti attraverso un aumento della espressione di TIMP-1.

In conclusione le alterazioni indotte dalla ciclosporina sono probabilmente il risultato dei suoi effetti a livello dei singoli tipi cellulari.

PAROLE CHIAVE: Tossicità da ciclosporina, Turnover matrice extracellulare, Apoptosi

Effect of cyclosporine on fibroblasts and renal tubular epithelial cells

Background. Tubular atrophy and interstitial fibrosis are characteristic of cyclosporine nephrotoxicity. To better understand how cyclosporine induces these changes we evaluated its effects on fibroblasts (MRC-5) and renal tubular epithelial cells (HK-2).

Methods. Cell proliferation was evaluated by cell counting using a Neubauer chamber. Apoptosis was determined by measuring the concentration of oligonucleosomes in the cell lysate. The effect of cyclosporine on extracellular matrix turnover was also studied. Collagen production was measured by ELISA. ($\alpha 1$)I and ($\alpha 2$)IV collagen, MMP9 and TIMP-1 mRNA levels were measured by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Gelatinolytic activity was evaluated on cell supernatant by zymography.

Results. Cyclosporine markedly decreased epithelial cell growth whereas the growth of fibroblasts was not affected by cyclosporine treatment. The antiproliferative effect of cyclosporine on epithelial cells was associated with the induction of apoptosis. ($\alpha 1$)I and ($\alpha 2$)IV collagen synthesis was increased in cyclosporine-treated epithelial cells. TIMP-1 mRNA level was upregulated by cyclosporine in fibroblasts.

Conclusions. Cyclosporine exerts an antiproliferative effect on epithelial cells but not on fibroblasts. This effect is associ-

ated with the induction of apoptosis. The treatment with cyclosporine induces extracellular matrix accumulation by increasing collagen synthesis in epithelial cells and reducing its degradation by upregulating TIMP-1 expression in fibroblasts. In conclusion the changes induced by cyclosporine are the results of its effect at cell level. (Giorn It Nefrol 2000; 17: 348-52)

KEY WORDS: *Cyclosporine toxicity, Extracellular matrix turnover, Proliferation, Apoptosis*
