

Terápiás lehetőségek diabéteszes és allograft nefropátia megelőzésében, kezelésében

Doktori értekezés

Dr. Prókai Ágnes

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szabó J. Attila egyetemi docens, MTA
doktora
Hivatalos bírálók: Dr. Balla József egyetemi tanár, MTA doktora
Dr. Prohászka Zoltán egyetemi tanár, Ph.D.
Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Ligeti Erzsébet egyetemi tanár, MTA
rendes tagja
Szigorlati bizottsági tag: Dr. Sulyok Endre egyetemi tanár, MTA doktora
Dr. Sótonyi Péter egyetemi tanár, MTA rendes
tagja

Budapest

2013

“I am among those who think that science has great beauty. A scientist in her laboratory is not only a technician: she is also a child placed before natural phenomena which impress her like a fairy tale.”

Marie Curie (1867-1934) French-Polish physicist and chemist

“Látni, amit mindenki lát, és gondolni, amit még senki sem gondolt.”

Szent-Györgyi Albert (1893-1986) Magyar biokémikus

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	3
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	8
1. ELŐSZÓ	11
2. BEVEZETÉS	15
2.1. A renin aktivitás direkt vizualizálása; multi-foton mikroszkópia és a FRET-alapú renin szubsztrát.....	15
2.2. A szukcinát GPR91-en keresztüli hatása a vese lokális renin-angiotenzin rendszerére	18
2.3. A calcineurin inhibitorok hatása a vese renin-angiotenzin rendszerére	21
2.4. Az eritropoietin szerepe a vese iszkémia/reperfúziós károsodásában	25
2.5. Poszt-transzplantációs diabétesz mellitusz gyermek transzplantáltakban...	28
3. CÉLKITŰZÉSEK	35
4. MÓDSZEREK	36
4.1 Sejtvonalak és kezelésük.....	36
4.2 Állatmodellek.....	37
4.3. Sejtkultúra mintagyűjtése.....	39
4.4. Szöveti minták gyűjtése	39
4.5.Gén kifejeződés vizsgálatok.....	40
4.6. Western blot	41
4.7. Spektrofluorometria	42

4.8. Fluorofórok	43
4.9. Immunocitokémia és immunohisztokémia	43
4.10. A gyűjtőcsatorna elválasztása (disszekció).....	45
4.11. Vese feltöltését szolgáló mikropunkciós technika	46
4.12. A vese in vivo multi-foton fluoreszcens képalkotása	47
4.13. Spektrofluorometria a vizelet renin aktivitás mérésére.....	50
4.14. PGE ₂ vizeletbe történő szekréciója	51
4.15. Vesefunkciós paraméterek	51
4.16. Hisztológiai analízis	51
4.17. Áramlási citometria (FACS analízis).....	52
4.18. Statisztikai analízis.....	52
4.19. Humán vizsgálat.....	53
4.20. A beteg populáció és immunosuppresszió	53
4.21. Labor paraméterek	54
4.22. Statisztikai analízis.....	54
5. EREDMÉNYEK	56
5.1. A renin aktivitás direkt vizualizálása; multi-foton mikroszkópia és a FRET-alapú renin szubsztrát.....	56
5.1.1. A FRET-alapú fluorogén renin szubsztrát specificitásának vizsgálata spektrofluorometriával és multi-foton mikroszkópiával.....	56
5.1.2. A FRET-alapú fluorogén renin szubsztrát specificitásának konfokális mikroszkópiával történő vizsgálata.....	57
5.1.3. A renin tárolásának, felszabadulásának és aktivitásának direkt kimutatása As4.1 és M1 sejtekben in vitro.....	58
5.1.4. Gyűjtőcsatornabeli renin aktivitás ex vivo vizsgálata	60

5.1.5.	Gyűjtőcsatornabeli renin aktivitás in vivo vizsgálata	61
5.2.	A szukcinát GPR91-en keresztüli hatása a vese lokális renin-angiotenzin rendszerére	62
5.2.1.	GPR91 mRNS expresszió és lokalizáció M1 sejtekben és a vesében	62
5.2.2.	Szukcinát aktiválta intra-renális RAS jelátviteli útvonal M1 sejtekben ..	64
5.2.3.	Gyűjtőcsatornabeli GPR91 kiváltotta pERK1/2 szignál.....	68
5.2.4.	PGE ₂ termelés, mint a renin szekréció végső triggerre	70
5.2.5.	A szukcinát befolyásolja a lokális RAS aktivációját in vivo	70
5.2.6.	Renin aktivitás a gyűjtőcsatornában és a vizeletben.....	71
5.3.	A calcineurin inhibitorok hatása a vese renin-angiotenzin rendszerére	75
5.3.1.	A JGA és gyűjtőcsatornabeli renin képződésének beállítása	75
5.3.2.	Immunosuppresszívumok kiváltotta renin termelés multi-foton mikroszkóppal való detektálása	75
5.3.3.	Immunosuppresszívumok kiváltotta renin termelés áramlási citometriával való mérése.....	77
5.3.4.	Fokozott renin termelés következtében kialakuló vazokonstrikció multi-foton mikroszkóppal való detektálása.....	77
5.3.5.	Fokozott renin termelés következtében kialakuló vazokonstrikció és hipoxia hisztológiai leírása.....	78
5.3.6.	Immunosuppresszívumok kiváltotta vesefunkció romlás labor paraméterekkel való megítélése	79
5.4.	Az eritropoietin szerepe a vese iszkémia/reperfúziós károsodásában	80
5.4.1.	EPO kezelt hím és nőstény patkányok iszkémia/reperfúziós károsodást követő túlélése.....	80
5.4.2.	Szérum EPO szintek	81
5.4.3.	Szérum karbamid és kreatinin szintek	82

5.4.4.	Vese Hisztológia	83
5.4.5.	HSP72 fehérje nem-függő változása iszkémia/reperfúziós vesekárosodást követően	85
5.4.6.	Na ⁺ /K ⁺ ATPáz- α 1 fehérje alegység nem-függő változása iszkémia/reperfúziós vesekárosodást követően.....	86
5.4.7.	A HSP 72 és a Na ⁺ /K ⁺ ATPáz- α 1 alegység immunolokalizációja.....	86
5.5.	Poszt-transzplantációs diabétesz mellitusz gyermek transzplantáltakban	88
5.5.1.	Vesetranszplantált gyermekek demográfiai és anamnesztikus adatai.....	88
5.5.2.	Immunoszuppresszívumok szerepe a poszt-transzplantációs diabétesz mellitusz kialakulásában	91
6.	MEGBESZÉLÉS	94
6.1.	A renin aktivitás direkt vizualizálható multi-foton mikroszkópiával és FRET-alapú renin szubsztráttal.....	94
6.2.	A szukcinát, a GPR91-en keresztül aktiválja a vese lokális renin-angiotenzin rendszerét; antifibrotikus terápia lehetőség diabéteszes nefropátiában	96
6.3.	A calcineurin inhibitorok aktiválják a vese renin-angiotenzin rendszerét; terápiai célpont krónikus allograft nefropátiában	101
6.4.	Az eritropoietin védő szerepe a vese iszkémia/reperfúziós károsodásában; nemi különbségek	105
6.5.	Poszt-transzplantációs diabétesz mellitusz gyermek transzplantáltakban; calcineurin inhibitorok patológiás szerepe.....	109
7.	KÖVETKEZTETÉSEK	114
8.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	115
9.	SUMMARY	116
10.	IRODALOMJEGYZÉK.....	117
11.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	134

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:	134
Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:.....	136
12. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	139

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADA: American Diabetes Association/ Amerikai Diabétesz Társaság
Ang I: Angiotenzin I
Ang II: Angiotenzin II
Ang II R₁: Angiotenzin II
Ang: Angiotenzinogén
ANOVA: Analysis of variance/ Variancia analízis
AQP-2: Aquaporin-2
ARF: Acute renal failure/Akut veseelégtelenség
ARPKD: Autosomal recessive polycystic kidney disease/ Autoszómális recesszív policisztás vese betegség
As4.1: Immortalizált renin termelő vesetumor sejtvonala
Aza: Azathioprine
Bas: Basiliximab
BMI: Body mass index/ Testtömeg index
BUN: Blood urea nitrogen/ Vér urea nitrogen, Karbamid
C57 black 6: Általánosan használt, beltenyésztett labor egértörzs
cAMP: Cyclic adenosine monophosphate/ Ciklikus adenzin-monofoszfát
CAPD: Continuous ambulatory peritoneal dialysis/ Folyamatos ambuláns peritoneális dialízis
CAT: Chloramphenicol acetyltransferáz
CD: Collecting duct/ Gyűjtőcsatorna
cDNS: Copy of deoxiribonukleotid acid/ Deoxiribonukleotid sav másolat
CNI: Calcineurin inhibitor/ Calcineurin gátló
COX2: Ciklooxygenáz 2
CyA: Cyclosporin A
CS: Corticosteroid/ Kortikoszteroid
db/db: 1. típusú diabétesz mellitusz modellül szolgáló egér törzs
DIC: Differential interference contrast/ Fázis kontraszt
DM: Diabétesz mellitusz
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Dulbecco módosította sas médium
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay/ Enzimhez-kötött immunoszorbens vizsgálat
EPO: Eritropoietin
ERK1/2: Extracellular signal regulated kinase/ Extracelluláris szignál szabályozta kináz
FACS: Fluorescence-activated cell sorting/ áramlási citometria
FK506BP: FK506 binding protein/ FK506 kötő fehérje
FRET: Förster/fluoreszcens rezonancia-energiatranszfer
GFR: Glomerular filtration rate/ Glomeruláris filtrációs ráta

GLUT: Glucose transporter/ Glükóz transzporter
GPR91: G-protein coupled receptor/ G-fehérje kapcsolt receptor
HD: Haemodialízis
HEK: Human Embryonic Kidney 293/ Humán embrionális vese 293
HIF: Hipoxia indukált faktor
HNF: Hepatocita nukleáris faktor
HOMA-R: Homeostasis model assessment, mint az inzulin rezisztencia indexe
HRE: Hypoxia response element/ Hipoxiára válaszoló elem
HRP: Horseradish peroxidase/ Torma peroxidáz
HSE: Heat Shock Element/Hő-sokk elem
HSP: Heat shock protein/ Hő sokk fehérje
i.p.: Intraperitoneális
I/R: Iszkémia/reperfúzió
IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine
ICC: Immunocytochemistry/ Immuncitokémia
IGT: Impaired glucose tolerance/ Csökkent glükóz tolerancia
IL-2: Interleukin-2
IU: International unit/ Nemzetközi egység
JAK: Janus-activated kinase/ Jánus aktiválta kináz
JGA: Juxtaglomeruláris apparátus
KAN: Krónikus allograft nefropátia
KO: Knock out/ Génkiütött
KVE: Krónikus veseelégtelenség
LG: Low green/ Alsó zöld csatorna
LR: Low red/ Alsó piros csatorna
MI: Gyűjtőcsatorna eredetű sejtvonal
MMDDI: Macula Densa-Like sejtvonal
MMF: Mycophenolate mofetil
MODY: Maturity onset diabetes of the young/ Fiatalon kialakuló diabétesz mellitusz
mRNS: Messenger ribonukleinsav
mTOR: Mammalian target of rapamycin
NFATc: Nuclear factor of activated T-cells/ aktivált T-sejt nukleáris faktora
NGT: Normál glükóz tolerancia
NO: Nitrogén monoxid
OGTT: Orális glükóz tolerancia teszt
p38: 38kDa fehérje
p70S6K: p70 riboszómális S6 kináz
PBS: Phosphate buffered saline/ Foszfáttal pufferált sóoldat
Pen/Strep: Penicillin/Streptomycin
PGE₂: Prostaglandin E₂
PI3K: Foszfatidilinozitol 3-kináz
PMT: Photomultiplier / Fotelektronsokszorozó
(P)RR: (Pro)renin receptor

(pro)renin: Prorenin + renin

PTDM: Poszt-transzplantációs diabétesz mellitusz

qPCR: Quantitative real time polymerase chain reaction/ Mennyiségi valós idejű polimeráz lánc reakció

RAS: Renin-angiotenzin rendszer

rHuEPO: Rekombináns humán eritropoietin

RNS: Ribonukleinsav

ROS: Reactive oxygen species/ Reaktív oxigén termékek

RPM: Revolutions per minute/ Percenkénti fordulat

RT: Room temperature/ Szobahőmérséklet

SD: Standard deviation/ Szórás

SEM: Standard error of the mean/ Átlag standard hibája

Sir: Sirolimus

STAT: Transzkripció szignál transzdúcer és aktivátor

STZ: Streptozotocin

T2: Reperfúzió 2. órája

T24: Reperfúzió 24. órája

TAC: Tacrolimus/ FK506

TGF- β : Transforming growth factor beta/ Transzformáló növekedési faktor beta

Tx: Transzplantáció

VEGF: Vascular endothelial growth factor/ Éreredetű endotél növedési faktor

WT: Wild type/ Vad típus

1. ELŐSZÓ

“Ma Magyarországon minden tizedik embert érinthet vesebetegség, és évente mintegy 500-600.000 vesebeteg szorul gondozásra. Éves szinten 250-270 veseátültetés történik, és közel 6500 krónikus veseelégtelenségben (KVE) szenvedő beteg életben maradását a dialízis kezelés biztosítja. A vesebetegek és a vesepótló kezelésre szoruló betegek száma évente 4-6%-kal növekszik, és hazánkban a végállapotú veseelégtelenségben szenvedők fele akut veseelégtelenség miatt azonnali dialízisre szorul.” (http://www.fresenius.hu/files/sk_nvp_05_12.pdf, 2011)

Napjainkra a krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek számára létezik terápiás megoldás. A krónikus veseelégtelenség progrediáló szakaszaiban vesevédő illetve az uraemia következményeit kiküszöbölő konzervatív terápiában részesülhet, majd dialízis kezelés pótolhatja az elvesztett vesefunkciót. Végül a korszerű immunoszuppresszióknak köszönhetően a transzplantáció biztosíthat hosszútávú túlélést számára. Ez utóbbi azonban elvégezhető, elsősorban élődonáció esetén a dialízis elindítása nélkül (preemptív is). Ezen kezelések azonban az elmúlt évszázadok tükrében nagyon újszerű terápiás megoldások. A vesebetegségek és terápiájuk történelmi áttekintését az alábbi időrendi táblázattal kívánom bemutatni.

I.u. 100 a római fürdőkben történik az első “dialízis”. Urea felszaporodásától szenvedő férfiak áztatták maguk a fürdőben, hogy “kiizzadják” szervezetük méreganyagait.

I.u. 200 *Hua-To*, a híres kínai sebész, beteg szerveket helyettesít egészségesekkel. A történelem során ez az első szerv-transzplantáció irányába mutató törekvés. Sajnos munkássága nem kerül dokumentálásra, így a következő nemzedékek nem tudták kamatoztatni értékes tapasztalatait.

1500-as években dokumentálják Báthory István, erdélyi fejedelemnek, Lengyelország királyának (1533-1588) betegségét, melyet később policisztás vesebetegségként ismer meg

a világ.

1800 *Dr. Richard Bright* behatóan kutatja a magas vizelet fehérje koncentrációval járó vesebetegségeket, ill. összefüggéseiket szív, máj, hasnyálmirigy és tüdőbetegségekkel. Őt tekintjük ma a nefrológiai atyjának.

1861 *Thomas Graham* kidolgozza a dialízis módszerét.

1869 *Jacques Louis Reverdin*, svájci sebész véghezviszi az első dokumentált human bőrgraft beültetést.

1902 *Ullmann Imre (Emerich Ullmann)* végrehajtja az első sikeres veseátültetést kutyán.

1912 *Alexis Carrel*, francia sebész kidolgozza a vérerek összeköttetésének technikáját valamint a folyadékok keringetésének módszerét annak érdekében, hogy a transzplantált szövetet életben tudja tartani.

1943 *Dr. Willem Kolff* megalkotja az első vesegépet, a világ ma őt tekinti a dialízis atyjaként.

1954 *Dr. Joseph E. Murray* véghezviszi az első sikeres, élő donációból származó vese transzplantációt a bostoni Brigham & Women's Hospital-ban.

1962 *Dr. Joseph Murray és David Hume* véghezviszi az első sikeres, cadaver donorból származó vese transzplantációt.

1963 *Dr. Joseph Murray* transzplantáció kapcsán először használ szteroidot.

1964 Lehetővé válik az otthoni dialízis.

1968 Az agyhalál fogalmát definiálják lefektetve ezzel a szervadományozást és transzplantáció alapjait.

1978 Bevezetésre kerül a Cyclosporin A, mely a graft kilökődés kivédésével jelentősen megnöveli a transzplantáció sikerrátáját.

1988 A ViaSpan, szerv prezervációs oldat mindennapi klinikai felhasználásba kerül.

1989 Elkezdődnek az FK506 gyógyszer klinikai vizsgálatai, mely 1994-ben kerül a mindennapi klinikai gyakorlatba. Az új medikáció jelentősen csökkenti a transzplantált szerv kilökődésének veszélyét.

1990 *Dr. Joseph Murray* Orvosi Nobel díjban részesül a vese transzplantáció területén végzett kiemelkedő munkásságáért.

A vesebetegségek gyógyszeres kezelése mellett figyelembe kell venni azt a tényt is, hogy a gyógyszerek döntő többsége részben vagy egészben a vizelettel ürül, így a vese és a gyógyszerek közötti kölcsönhatás sokrétű lehet. A perctérfogat 25%-a jut el a veséhez és az endotheliális fenesztráció következtében a vesekapillárisok átteresztőképessége jelentős, amely nagy mennyiségű ultrafiltrátum (percenként 130 ml) keletkezésének és a szabad gyógyszer-molekulák kiválasztásának teremt lehetőséget. A kiválasztás további finom szabályozására az aktív tubuláris szekréció és passzív reabszorpció ad lehetőséget. A romló veseműködés azonban a vese eliminációs képességét csökkenti, az egyébként vizelettel kiválasztódó gyógyszerek felszaporodhatnak a veseszövetben és káros hatással lehetnek a vese működésére akut vagy krónikus nefrotoxicitást okozva.

Értekezésem során először diabéteszes nefropátiában felmerülő új terápiás támadáspontot mutatok be. Az átültetésig vezető végállapotú vesebetegség leggyakoribb oka a ***diabéteszes nefropátia*** ^{Arieff 2009}. A kórkép patomechanizmusában vizsgálom a renin-angiotenzin rendszer (RAS) szerepét. Mindehhez megfelelő technika, a renin detektálásához a multi-foton mikroszkópia, jelöléséhez a fluoreszcens rezonancia-energiatranszfer (FRET) - alapú renin szubsztrát ^{Kang 2008} beállítása és validálása kísérleteim első lépése. Következő lépcsőben a renin gyűjtőcsatornabeli szekrécióját és irányát bizonyítom. Végül magyarázatot keresek a magas glükóz és a fokozott gyűjtőcsatornabeli renin szekréció közötti kapcsolatra, melyben a nemrégiben leírásra került G-fehérje kapcsolt receptor (GPR91), szukcinát receptor ^{Peti-Peterdi 2012} szerepét feltételezem.

Ezt követően a végállapotú vesebetegség definitív terápiájaként szolgáló vese transzplantáció hosszútávú kimenetelét befolyásoló rizikófaktorok közül hármat tárgyalok a gyógyszeres terápia aspektusából. Az allograft vesztés okai sokat változtak a modern immunosuppresszívumok bevezetése óta; a jobb kezelési sémák következtében az egy éves vese allograft túlélés jelentősen javult, ellenben, a krónikus allograft nefropátia (KAN) még mindig a vesegrft vesztés legfőbb okaként szerepel ^{Cecka 1995}. Az irodalom a

KAN számos rizikó faktorát ismeri és megkülönböztet immun-függő és -független faktorokat ^{Davidson 2003}. Dolgozatom második részében három allo-immun független rizikófaktort elemzek terápiás szempontból: *calcineurin inhibitorok okozta nefrotoxicitás*, calcineurin inhibitorok és egyéb rizikófaktorok kiváltotta *poszt-transzplantációs diabétesz mellituszt* és az eritropoietin (EPO) védő mechanizmusát *iszkémia/reperfúziós vesekárosodás*ban.

2. BEVEZETÉS

2.1. A renin aktivitás direkt vizualizálása; multi-foton mikroszkópia és a FRET-alapú renin szubsztrát

A *renin*, a RAS sebesség meghatározó lépése. Szisztémás hatásai közé tartozik szervezetünk só- és vízháztartásának finom hangolása, valamint a vérnyomás szabályozása ^{Kurtz 2011}. Ezen túl a lokális RAS részeként a renin releváns faktor a gyulladásban, trófikus és profibrotikus hatásokban is. Kiterjedt szerepe ellenére a renint termelő, tároló és felszabadító sejtek mai napig nem teljesen feltártak ^{Kobori 2007}. Jelentős renin termelés két lokalizációban bizonyított.

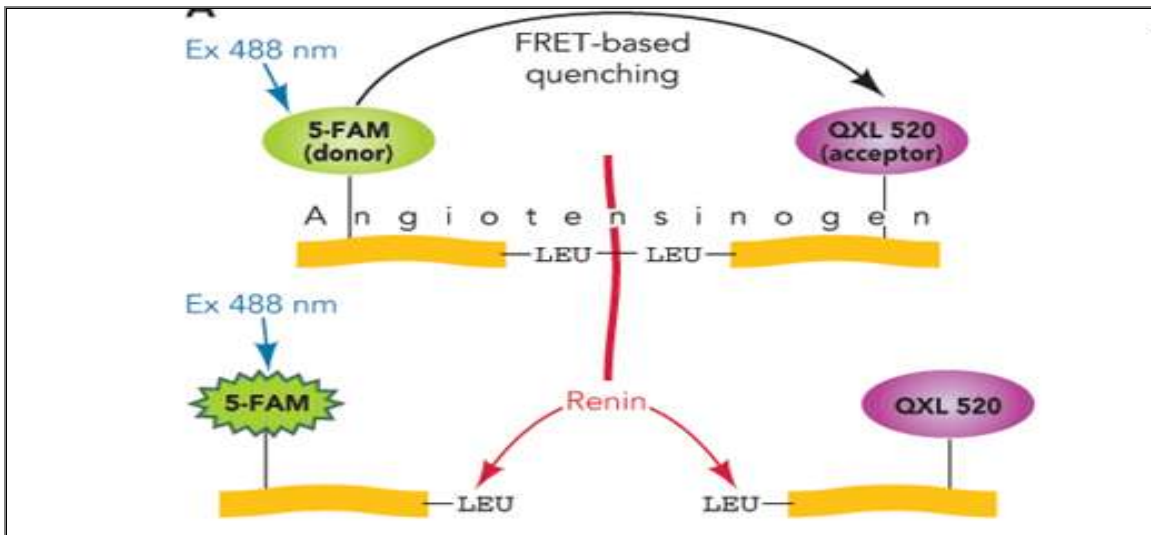
Az elfogadott paradigma szerint, a renin és prekursora, a prorenin főként a vese juxtaglomeruláris apparátusának (JGA) afferens arteriolájának granuláris sejtjeiben termelődik ^{Kurtz 2011}. Az ott található granuláris sejteknek két fontos feladata van. Egyrészt a megfelelő ingerre történő renin termelés (vese perfúzió csökkenése; a vasa afferens területén kialakuló nyomásesés; tubulusbeli nátrium-klorid koncentráció csökkenés; a JGA-ba futó szimpatikus idegek aktivitásfokozódása), másrészt a glomerulus filtráció tubuláris áramlás szerinti percről-percre szabályozása, vagyis a tubulo-glomeruláris feedback ^{Kurtz 2011}. Amennyiben az aszpartát proteáz, renin szekrécióra kerül, azt angiotenzin I-é (Ang I) hasítja, amely végső soron angiotenzin II (Ang II) generálásához, fokozott nátrium visszaszíváshoz és az erek összehúzódásán keresztül a vérnyomás emeléséhez vezet ^{Reid 1978}.

Nemrégiben derült fény azonban arra, hogy patológiás körülmények között a gyűjtőcsatorna (collecting duct, CD) principális sejtjei is képesek re-differenciálódni és az embrionális korra jellemző ^{Yosypiv 2011, Gomez 1989} (pro)renin (egy kifejezés, mely egyszerre utal mind a proreninre és a reninre) termelő képességüket visszanyerni ^{Kang 2008, Prieto-}

Carrasquero 2004, így mind mRNS, mind fehérje szinten jelentős mennyiségű (pro)renin található ebben a tubulus szegmensben ^{Rohrwasser 1999, Prieto-Carrasquero 2004, Kang 2008}.

Fontos hangsúlyozni, hogy a JGA-hoz képest a CD-ben éppen ellenkező reguláció határozza meg a renin termelését és felszabadulását ^{Prieto-Carrasquero 2004, Kang 2008}. A JGA-ban patofiziológiás állapotokban, így magas vérnyomás betegségben és diabétesz mellituszban (DM) a magas koncentrációban jelenlevő Ang II gátolja a renin felszabadulását, míg ugyanezekben az állapotokban a gyűjtőcsatornabeli renin lokális szintézise up-regulálódik ^{Prieto-Carrasquero 2004, Kang 2008}, ami végső soron a proximális tubulus szakaszban termelt angiotenzinogénnek (Ang I) történő átalakulásához ^{Ingelfinger 1986}, majd következményesen megnövekedett Ang II szinthez vezet.

Tekintettel a renin RAS aktivációjában betöltött központi szerepére, a különböző sejtek renin tartalmát és onnan való felszabadulását az elmúlt évtizedekben számos módszerrel, így elektron mikroszkópiával ^{Taugner 1984}, radioimmunoassay-jel ^{Lorenz 1991} és patch clamp technikával ^{Friis 1999} igyekeztek vizsgálni. Azonban e technikák egyike sem tette lehetővé a renin granulumok élő szövetben, valós időben történő, közvetlen megfigyelését. E probléma feloldása végett a Peti-Peterdi János által vezetett vesefiziológiai labor nemrégiben a vesekutatás mindennapi gyakorlatába ültette a magas térbeli és időbeli felbontással rendelkező multi-foton mikroszkópiát ^{Peti-Peterdi 2002, Kang 2006}, mellyel lehetővé vált a vese funkciójának feltérképezése.



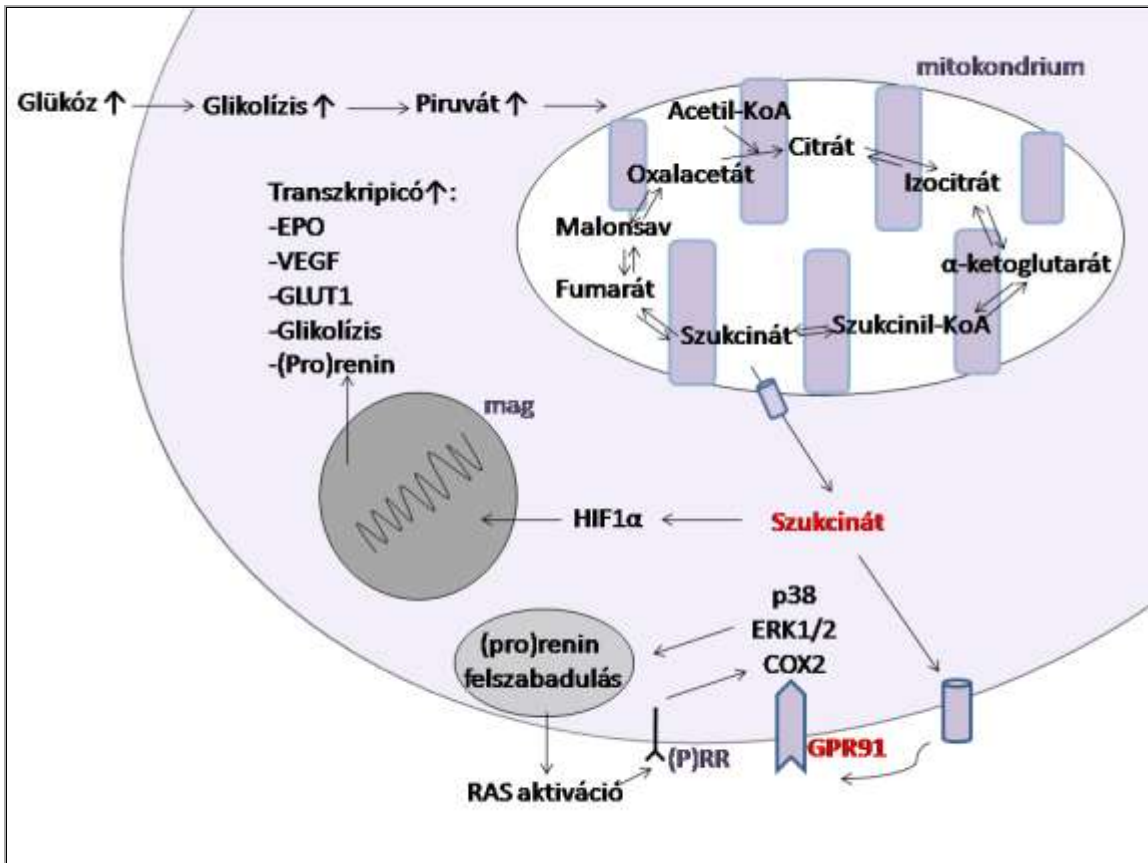
1. Ábra: *Fluoreszcens-rezonancia-energia transzfer (FRET) módszerén alapuló renin szubsztrát fluorofór.* A festék egy donor és egy akceptor részt tartalmaz, melyeket a Leu-Leu kötést is tartalmazó humán angiotenzinogén tíz aminosavnyi része köt össze. Abban az esetben, ha a két molekula közel van egymáshoz, az akceptor molekula elfojtja a donor molekula emisszióját, míg a renin általi hasítás a két molekulát eltávolítja egymástól, így a donor molekula fluoreszcens jelet bocsáthat ki ^{Peti-Peterdi 2009}.

A multi-foton mikroszkópia felhasználásával lehetségessé vált az intakt vesén belüli RAS közvetlen megjelenítése. Jelen vizsgálataink célja a gyűjtőcsatornán belüli renin szekréció irányának leírása, ezt követően pedig a renin aktivitás meghatározása, melyhez egy FRET módszerén alapuló festék specificitásának igazolására van szükség ^{Peti-Peterdi 2004}. A flurofor egy donor és egy akceptor részből áll, melyeket a Leu-Leu kötést is tartalmazó humán Ang tíz aminosavnyi része köt össze. Abban az esetben, ha a két molekula közel van egymáshoz, az akceptor molekula elfojtja a donor molekula emisszióját, míg a renin általi hasítás a két molekulát eltávolítja egymástól, így a donor molekula fluoreszcens jelet bocsáthat ki (1. Ábra).

A state-of-the-art technika, a multi-foton mikroszkópia felhasználásával méréseink első lépése volt validálni a FRET-alapú renin szubsztrát létjogosultságát a renin aktivitás vizsgálati eszközeként, valamint meghatározni és demonstrálni a (pro)renin bazolaterális és a lumináris lokalizációján túl a CD-ből való felszabadulását.

2.2. A szukcinát GPR91-en keresztüli hatása a vese lokális renin-angiotenzin rendszerére

A gyűjtőcsatornabeli renin lokalizáció leírását követően vizsgálataink a szekréció szabályozása felé fordultak; amennyiben a CD (pro)renin függetlenül regulálódik a JGA-tól, mi lehet az a stimulus, amely a renin termelését és felszabadulását kiváltja a CD-ban? A kérdés megválaszolására igen kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Ang II dependens magas vérnyomásban, „két-vese egy-klipp” patkány modellben ill. diabétesz mellituszban az Ang II képes volt aktiválni a lokális RAS-t ^{Prieto-Carrasquero 2004, 2008, Kang 2008}. Jelen vizsgálatunk szintén diabétesz mellituszban kívánja leírni azt a regulációs kaszkádot, mely a magas glükóz renin szekréciót eredményező hatását közvetíti és a diabéteszes nefropátia fibrotikus komponensének meghatározó faktora lehet.



2. Ábra: *Diabétesz mellituszra jellemző mitokondriális anyagcsere változások illusztrálása a GPR91 szerepének bemutatásával. A megváltozott glükóz felvétel, glikolízis és citrát ciklus magas metabolikus rátához és mitokondriális, citoszolbeli és intersticiális szukcinát felhalmozódáshoz vezet. A szukcinát által aktivált GPR91 szignál részt vesz a sejt hipoxiára és hiperglikémiára adott stressz válaszában és így az alapvetően védő mechaizmusok patológiás túlreakcióját eredményezi magába foglalva a RAS aktivációját. Rövidítések: EPO: eritropoietin; GLUT1: glükóz transzporter-1; HIF: hipoxia indukált faktor; RAS: renin-angiotenzin szisztem; VEGF: vaszkuláris endotéliális növekedési faktor; p38: 38kDa fehérje; ERK1/2: extracelluláris szignál szabályozta kináz; COX2: ciklo-oxigenáz 2; (P)RR: (pro)renin receptor.* ^{Peti-Peterdi 2010} alapján.

A szöveti hipoxia és/vagy diabéteszre jellemző hiperglikémia mitokondriális stresszt, így a Szent-Györgyi Krebs ciklus egyensúlyának felbomlását és következményesen az egyik intermedier, a szukcinát helyi felszaporodását eredményezi ^{Hems 1970, Hebert 2004, He 2004}. Reverzibilis-irreverzibilis reakciók arányából ill. az enzimek különböző kinetikájából eredően a szukcinát lesz az az intermedier, amely a mitokondriális membránba lokalizálódó dikarboxilat transzporterén keresztül kilép a citoplazmába, bár ez a gyűjtőcsatornában még nem bizonyított, de más sejtekhez hasonlóan feltételezhetően foszfát-függő módon ^{Johnson 1973}, majd egy a sejtmembránba lokalizálódó dikarboxilat transzporterén keresztül, feltételezhetően itt nátrium-függő módon az extracelluláris térbe is kijut ^{Pajor 1999}. A szukcinát, a citrát ciklusban betöltött intermedier szerepén túl, egy nemrégiben azonosított metabolikus receptornak, a GPR91-nek is és csakis ez szolgál ligandjaként, mely a vesében ezidáig két lokalizációban, a JGA-ban ^{Toma 2008, Varga 2009} és a CD-ban ^{Robben 2009} került leírásra. Irodalmi adat szól amellet, hogy diabéteszes egér JGA-beli renin szekréciója nagy mértékben GPR91 mediált; géncsendesítést alkalmazva mind a RAS aktiváció, mind a következményes magas vérnyomás kivédhető ^{He 2004, Toma 2008}. A felszabadult renin, a nemrégiben leírásra került (pro)renin receptor [(P)RR]-hoz kötődhet ^{Nguyen 2002, Nguyen 2010, Batenburg 2012}, ami által egyrészt felsokszorozódik a (pro)renin enzimatis aktivitása (ANG I termelés), másrészt egy intracelluláris jelátviteli út aktiválódik. A (P)RR a renin mellett a prorenint is nagy affinitással képes megkötni. Az utóbbi esetben a proreninben konformációs változás történik, mely a fehérje non-proteolitikus aktivációját eredményezi. A kötődéssel egy időben a (P)RR intracelluláris szignál útvonalat aktivál, melynek tagjai, az extracelluláris szignál szabályozta kináz (ERK1/2), 38kDa fehérje (p38) MAP kináz és

ciklooxygenáz (COX) 2 nagymértékben megegyeznek a GPR91 regulációs kaszkádjával és nélkülözhetetlen résztvevői számos patofiziológias folyamatnak, így a proliferációnak és a szöveti fibrózisnak is (2. *Ábra*). Korábbi hisztológiai tanulmányok a (P)RR-t fagyasztott metszeten a vese glomeruláris mezangiális sejtjeibe és a vese artériák simaizom sejtjeibe lokalizálták, míg parafinba ágyazott metszeten a glomeruláris mezangiális sejtekben, valamint a disztális gyűjtőcsatorna sejtjeinek bazolaterális oldalán írták le ^{Nguyen 2006}.

Hipotézisünk a következő volt; diabéteszes körülmények között a szukcinát GPR91 receptor leszálló szignál kaszkádján keresztül jelentős szabályozója lehet a CD-beli lokális RAS-nak, (pro)renin termelést, felszabadulást és további, a sejt proliferációt és profibrotikus gének expresszió növekedését serkentő (P)RR aktivációt eredményezve.

2.3. A calcineurin inhibitorok hatása a vese renin-angiotenzin rendszerére

Az allograft vesztés okai sokat változtak a modern immunosuppresszívumok bevezetése óta; jelenleg a vesegraft vesztés legfőbb okaként a KAN szerepel ^{Cecka 1995}. Habár a KAN következtében kialakuló kilökődést tradicionálisan a kismértékű, allogenikus szövetre adott válaszok ismétlődésének tartjuk, számos bizonyíték támasztja alá, hogy alloantigéntől független faktorok szintén hozzájárulhatnak patogeneziséhez ^{Fellström 1993}. Ezek közül a legfontosabbak a gyógyszer toxicitás, metabolikus faktorok, az iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodás, non-compliance, donor ill. recipiens kora, működő nefronszám csökkenése, magas vérnyomás kialakulása, valamint infekciók elszenvedése ^{Davidson 2003}.

Számos determináns közül először a calcineurin inhibitorok (CNI) nefrotoxikus hatása került vizsgálataink előterébe, mely jelentős, ám egyúttal módosítható tényező.

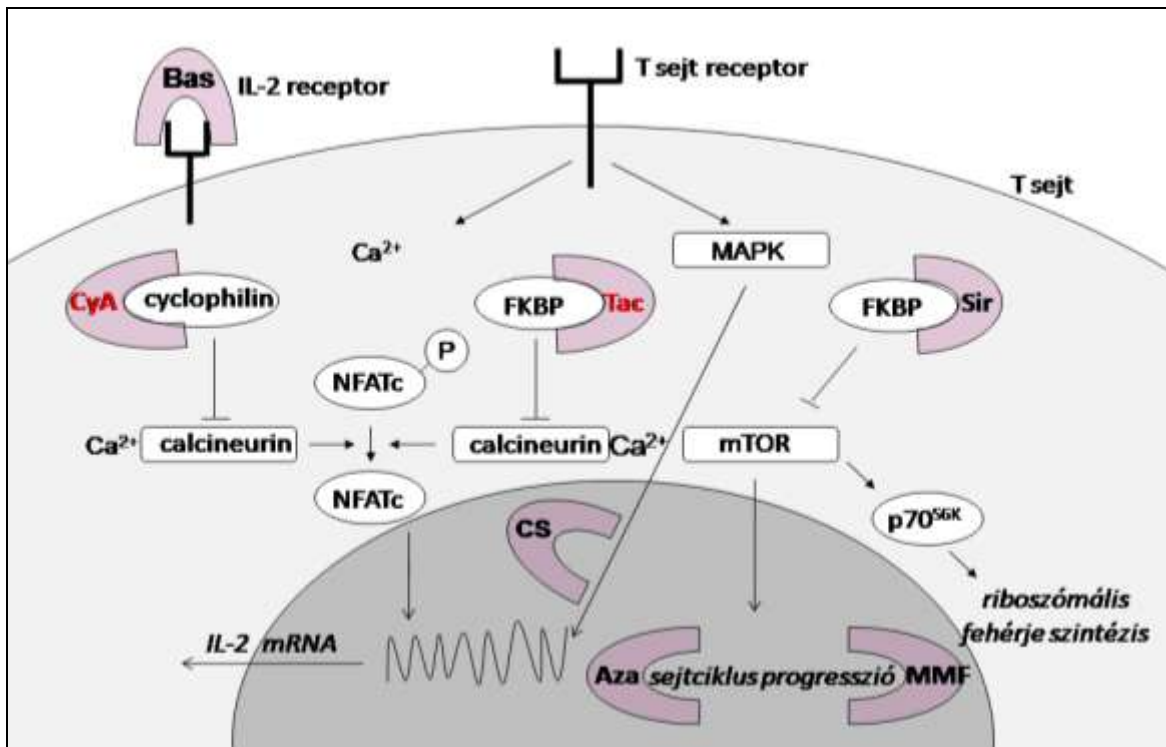
2.3.1. Tacrolimus (FK506)

A *Streptomyces tsukubaensis* által termelt makrolid antibiotikumot, a Tacrolimus-t (Tac) vagy más néven FK506-ot 1989-ben vezették be először a humán gyógyászatba ^{Starzl 1989}. T-sejtekben az antigén általi membrán aktiváció kalcium szignált indukál. A válasz során a megnövekedett intracelluláris kalcium szintek aktiválják a szerin/treonin fehérje foszfatáz, a calcineurint, ami defoszforilálja az aktivált T-sejtek nukleáris faktorát (NFATc). A defoszforilált NFATc a magba transzlokálódik és kölcsönhatásba lép a pro-inflammatórikus interleukin (IL)-2 génjével. Az FK506 az FK506 kötő fehérjéhez (FK506BP) való kötődése az immunofilin komplex-szel együtt fejt ki immunosuppresszáns hatását, a calcineurin foszfatáz aktivitás gátlása a T-sejt közvetítette immunválasz blokkolását idézi elő (3. *Ábra*).

2.3.2. Cyclosporin A

A Cyclosporin A (CyA) 1972-ben került először leírásra és forradalmasította a transzplantáció terápiáját, kimenetelét és a recipiensnek túlélését ^{Borel 1976}; az eredeti

közlemény citációs klasszikussá vált. Habár a CyA a Tac-tól kémiai szerkezetében különböző calcineurin inhibitor, ligandjához, a cyclophilinhez való bekötődést követően hatásmechanizmusa megegyező a Tac-éval. A CyA újrastrukturálja a cyclophilint, majd gátló komplexet alakít ki vele, blokkolva a calcineurin-foszfataz aktivitását, az NFATc magba történő transzlokációját és így kivédi a T-sejt aktivációt és citokin gének transzkripcióját (6. Ábra).

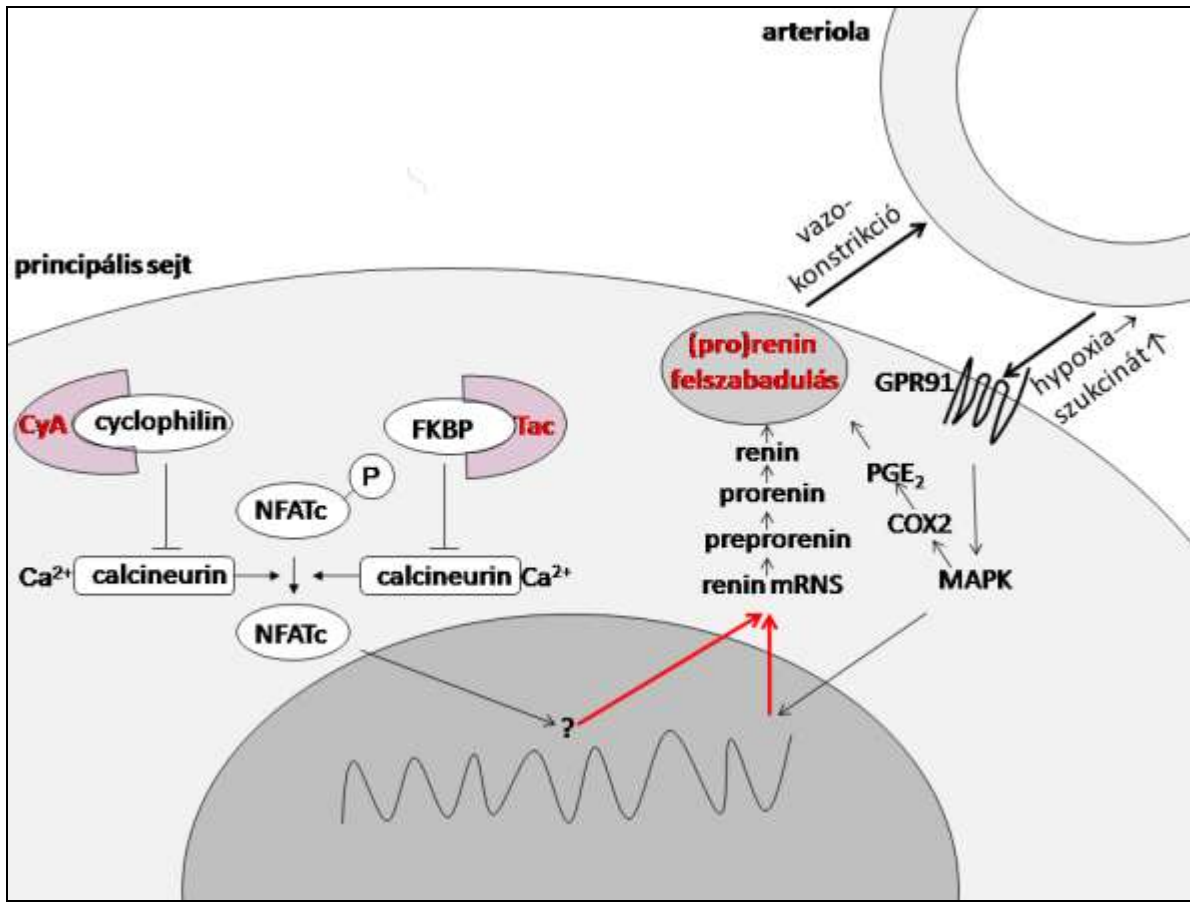


3. Ábra: Immunoszuppresszánsok T-sejteken kifejtett hatásmechanizmusa. A Cyclosporine A (CyA) és a Tacrolimus (Tac) calcineurin foszfatazon fejt ki gátló hatását, a Sirolimus (Sir) hatásmechanizmusa részben átfed a Tac-éval, de végső soron az mTOR szerin/treonin protein kináz inhibícióját eredményezi, a kortikoszteroid (CS)-oknak számos hatáspontja ismert, míg a Basiliximab (Bas) specifikusan az IL-2 receptort gátolja és az Azathioprine (Aza) a Mycophenolate mofetil (MMF)-lel hasonló hatást kifejtve a T-sejtek sejtciklusát befolyásolja. További rövidítések: FKBP: FK-kötő fehérje; mTOR: mammalian target of rapamycin; NFATc: nukleáris faktor aktiválta T-sejt; p70S6K: p70 riboszómális S6 kináz.

A CNI-ok immunoszuppressziót forradalmasító, fentebb részletezett hatásmechanizmusuk által kivédik a beültetett graft kilökődését, azonban ismert hosszú-távú vesekárosító, KAN-t indukáló paradox hatásuk is ^{Nankivell 2003}. A KAN kialakulásában a CNI nefrotoxicitás központi

szerepet játszik, habár a CNI nefropátia hátterében meghúzódó patomechanizmus nem teljes mélységében ismert. Irodalmi adatok szerint az akut nefropatiát előidéző hatását egyrészt az afferens arteriola vazokonstriktója következtében kialakuló vese vérátáramlás csökkenés idézi elő. Másrészt az intrarenalis RAS aktivációja megnöveli az endothelin-1 szintjét, kiváltja a nitrogén monoxid (NO) és a NO szintetáz diszregulációját, a transzformáló növekedési faktor 1 β up-regulációját, fokozza az apoptózis rátáját, a gyulladási mediátorok stimulációját, az endoplazmatikus retikulum stressz válaszát, aktiválja a veleszületett immunitást és autofágiát indukál, melyek mind kóroki faktorként szerepelnek a KAN patogenezisében ^{Bennett 1996}. Következésképpen krónikus tubuláris károsodásra, intersticiális fibrózisra és arteriopátiára jellemző hisztológiai kép fejlődik ki, ami együtt jár a vesefunkció romlásával.

A CNI nefropátia elindításában és fenntartásában a RAS szerepét sokkal inkább a végső lépés, az Ang II-n keresztül közelítik meg az irodalomban és a renin szerepét kevésbé mélyrehatóan vizsgálják. Tudott azonban, hogy CNI-ral kezelt patkányok JGA-ának renin termelő granuláris sejteiben hipertrófia jön létre ^{Ryffel 1994}. Kimutatták továbbá, hogy a JGA sejtek kifejezik azon calcineurin izoformákat, melyek CyA-val történő gátlása szignifikánsan stimulálja tenyésztett granuláris sejtek renin felszabadulását ^{Madsen 2010}. Ezen vizsgálati eredmény *in vivo* is megerősítést nyert, CyA kezelt patkányok afferens arteriolabeli renin mennyiségének emelkedését tapasztalták, ami jelentős haemodinamikai változást okozott a vese mikrovaskulaturájában ^{Norling 1996}. Hasonló megfigyeléseket írtak le Tac-szal kapcsolatban is. Ennek a szernek az adása is jelentősen megnöveli a plazma renin aktivitást ^{Andoh 1997} (4. Ábra). Fontos azonban megjegyezni, hogy minden tanulmány a JGA-ban zajló renin termelésre fókuszált, a helyi RAS más lokalizációit nem vizsgálta.



4. Ábra: Calcineurin inhibitorok hatása a (pro)renin szintézisre. A Cyclosporine A (CyA) és a Tacrolimus (Tac) immunosuppressziót eredményező hatásuk mellett feltételezhetően az NFATc gátlásán keresztül, eddig ismeretlen módon, renin termelést váltanak ki. A fokozott renin expresszió és szekréció, következményes érösszehúzódást eredményez, mely hipoxiához és következményesen emelkedett szukcinát szinthez vezet. A citrát ciklus ezen intermediere a GPR91 receptorán keresztül képes pozitív visszacsatolással mind a renin átíródását, mint a szekrécióját serkenteni. NFATc: nukleáris faktor aktiválta T-sejt, FKBP: FK506 kötő fehérje.

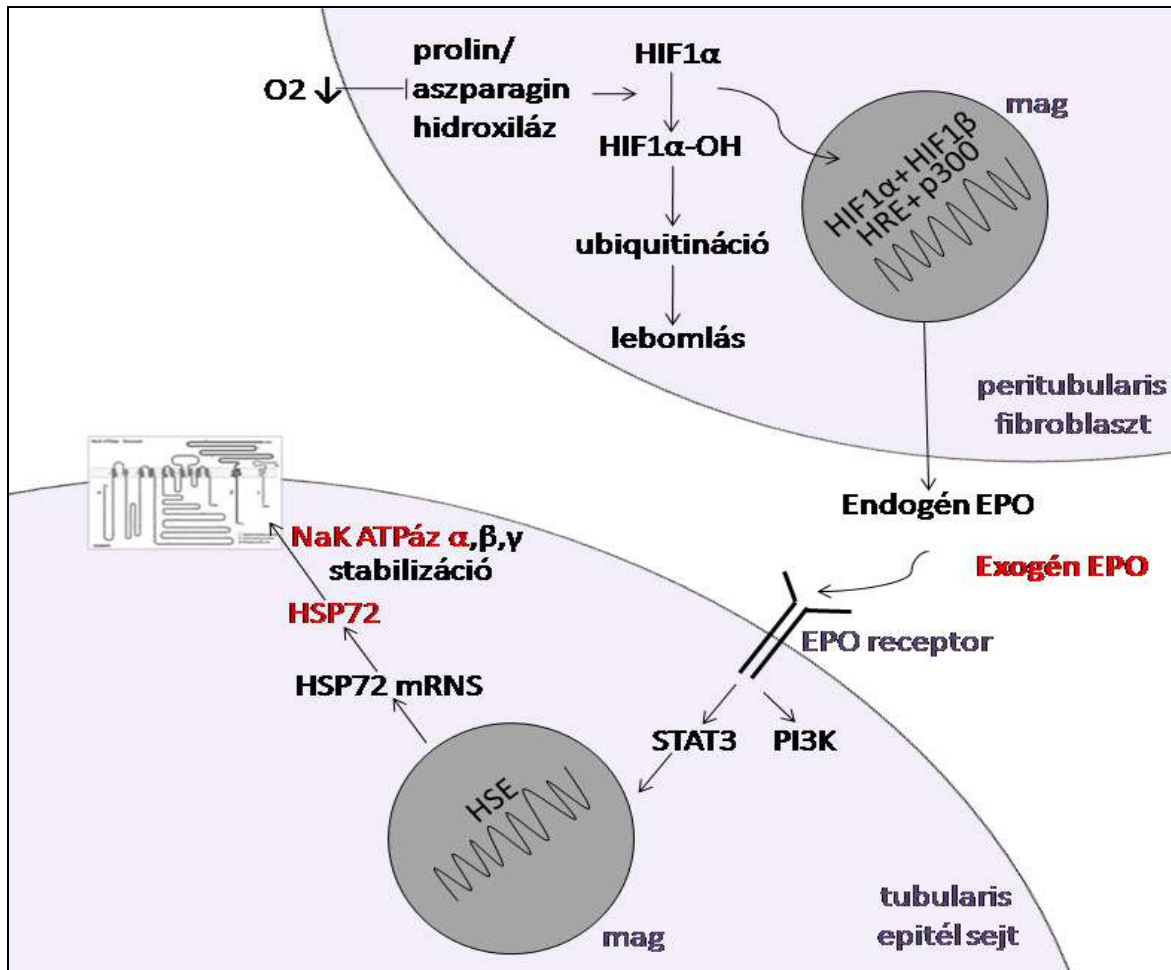
Célkitűzésünk a következő volt: megvizsgálni, vajon a CNI részben a lokális RAS inicializálásán keresztül fejti-e ki nefrotoxikus hatását, különös tekintettel az összekötő szegmens vagy a gyűjtőcsatorna lokalizációjában.

2.4. Az eritropoietin szerepe a vese iszkémia/reperfúziós károsodásában

Az I/R, a vese transzplantáció során a késői graft funkció csökkenésnek és a KAN harmadik, disszertációnál által tárgyalt rizikófaktora. Az I/R pontos patomechanizmusa nem teljes mértékben tisztázott. Patomechanizmusában feltételezik a sejthalál, necrosis, necroptosis szerepét, a vaszkuláris „leakage”-et, a „no reflow phenomenon”-t, az autoimmunitást, mely részeként autoantitestek jelennek meg a keringésben, komplement aktiválódik. A veseszűletett és adaptív immunrendszer jelentős aktivációja szintén jól ismert ^{Eltzschig 2011}. Egyre nagyobb számú tanulmány bizonyítja azt is, hogy jelentős nemkülönbség mutatható ki a vese iszkémiás károsodására adott válaszban ^{Müller 2002, Fekete 2004, 2006}. Ennek kapcsán korábbi tanulmányok a NO útvonal fontosságát fedték fel, miszerint a NO-nak és endotelinnak kitüntetett szerepe van a vese iszkémiás károsodás során mutatott nem-függő válaszban ^{Müller 2002}. Mitöbb, munkacsoportunk demonstrálta a nem-függő károsodások során a Na⁺/K⁺-ATPáz és hő sokk fehérjék (HSP)72 fontosságát ^{Müller 2002, Fekete 2004, 2006}.

Az EPO esszenciális növekedési faktor a hemopoetikus progenitor sejtek számára ^{Koury 1990}, ám ezen túlmenően extrahemopoetikus hatása is különböző terápiás lehetőségeket rejt magában. Kísérletes adatok gazdag tára bizonyítja az EPO protektív hatását az iszkémiás miokardium ^{Calvillo 2003, Tang 2009}, máj ^{Yilmaz 2004, Schmeding 2010} és vese károsodása ^{Chatterjee 2007, Vesey 2004, Rusai 2010} esetén. Ennek a hatásnak a napi rutinban történő igazolására számos klinikai vizsgálat is folyamatban van. A Hannover Medical School (Hannover, Germany) felmérésében a rekombináns humán eritropoietin (rHuEPO) alfa (a transzplantációt követően három alkalommal adagolva) szignifikánsan megemelte a transzplantált betegek glomeruláris filtrációs rátáját ^{ClinicalTrials.gov number:NCT00425698}. Habár az EPO anti-apoptotikus, anti-oxidatív és anti-inflammatórikus hatása számos labor érdeklődési területét képezi ^{Rusai 2010, Bonventre 1993, Paller 1994, Weight 2004, Versteilen 2004}, a vese I/R károsodásában szerepet játszó molekuláris mechanizmusok teljes mélységig máig nem tisztázottak. Ismert azonban az EPO és a HSP70 család közötti kapcsolat; az EPO megnöveli a HSP70 fehérje szintet ^{Xu 2005}.

javítva ezzel a miokardiális infarktus méretét. Ezzel egyetértésben egy másik tanulmány azt találta, hogy az EPO kezelés kiváltotta HSP70 indukció gátolja az apoptotikus sejthalált patkány iszkémiás vesében ^{Yang 2003}. Munkacsoportunk korábban demonstrálta, hogy a vese I/R károsodása a HSP72 nem-függő expresszió növekedését váltja ki ^{Fekete 2006}, ami az egyik esszenciális tubuláris nátrium transzporternek ^{Skou 1992}, a Na⁺/K⁺ATPáz bazolaterális membrán lokalizációját képes fenntartani. Kimutattuk továbbá azt is, hogy iszkémiás körülmények között, e transzporter enzimaktivitása nem- és idő-függő módon csökken, majd az aktin citoszkeleton felbomlása miatt, a Na⁺/K⁺ATPáz- α 1 a renális tubuláris sejtek citoszóljába internalizálódik, mitöbb a fiziológias bazolaterális elhelyezkedésből, a sejtadhéziós kapcsolatok felbomlása miatt, az apikális membránba transzlokálódik ^{Fekete 2004}. Az 5. *Ábra* mutatja az I/R kiváltotta szignál útvonalak tanulmányunk által vizsgált összefüggéseit.



5. Ábra: A vese iszkémia/reperfúziós károsodásának patomechanizmusa. Alacsonyabb O_2 koncentráció a HIF1 α degradációját gátolja, mely így beléphet a magba és a β alegységgel, a HRE-tel ill. a p300-zal való kötődést követően számos gén átíródását, így az EPO-ét is serkenti. Kísérletünk során exogén EPO-val további jótékony hatást kívántunk elérni. Az EPO receptor a STAT3 útvonalon keresztül többek között a HSE-et is aktiválja következményesen fokozódik a HSP72 termelődése, megőrizve a NaKATPáz integritását és lokalizációját is. HIF: hipoxia indukált faktor, HRE: hipoxiára válaszoló elem, EPO: eritropoietin, STAT: szignál átvívó és transzkripciót aktiváló, PI3K: foszfatidilinozitol 3-kináz, HSE: hő-sokk elem; HSP:hő-sokk fehérje.

Az EPO ismert renális I/R-t kivédő szerepét figyelembe véve, jelen munkánkban célul tűztük ki annak megválaszolását, (1) vajon az EPO kezelés protektív-e súlyos, egyoldali vese I/R károsodás ellen; (2) vajon az EPO hatása különböző-e nőstény ill. hím patkányokban; végül (3) mi a HSP72 és a Na^+/K^+ ATPáz pontos szerepe az EPO hatásában?

2.5. Poszt-transzplantációs diabétesz mellitusz gyermek transzplantáltakban

2.5.1. PTDM

A KAN kialakulásában szerepet játszó alloantigéntől független faktorok közül értekezésem ebben a fejezetében a metabolikus eltérések legjelentősebbikével, a poszt-transzplantációs diabétesz mellitusszal (PTDM) foglalkozom, mely fennállása esetén jelentősen csökken a graft és beteg túlélése, azonban reverzibilitása a betegség felismerését követően definitív terápiára ad lehetőséget ^{Davidson, 2003}. Az American Diabetes Association (ADA) definíciója szerint a DM diagnózisa a következő kritériumok alapján állítható fel ^{Summary of Revisions to the 2011 Clinical Practice Recommendations 2011}: (I) a DM klasszikus tünetei (polyuria, polydypsia, fogyás) és megemelkedett plazma glükóz szint (>11,1 mmol/l) vagy (II) az éhomi plazma glükóz magasabb, mint 7 mmol/l vagy az orális glükóz tolerancia teszt (OGTT) során mért két órás plazma glükóz érték magasabb, mint >11,1 mmol/l. A PTDM értelemszerűen transzplantált betegekben alakul ki és esetükben még egy addicionális kritériummal ki kell, hogy egészítsük a definíciót: az anamnézisben legalább 30 egymást követő napig anti-diabetikus terápia kell, hogy szerepeljen, mivel a transzplantációt követő kezdeti időszakban alkalmazott szteroid terápia nagyban befolyásolja a szénhidrát anyagcserét és 30 napnál rövidebb, átmeneti glükóz szintbeli instabilitások előfordulhatnak. A PTDM patomechanizmusával kapcsolatban ismert, hogy csökkent inzulin szekréciónak és megnövekedett inzulin rezisztenciának a kombinációja. Prevalenciája a felnőtt populációban 2% és 53% között változik ^{Davidson 2003}; a vesetranszplantáltak 4,7/11,5%-ban, a májtranszplantáltak 4,9/15,9%-ban és a szív és tüdő transzplantáltak 15/17,5%-ban (CyA / Tac alapú kezelés) tapasztalták a PTDM megjelenését ^{Heisel 2004}.

A PTDM központi szerepet játszik a poszt-transzplantációs túlélésben, mivel tovább súlyosbítja az immunoszuppresszánsok kiváltotta poszt-transzplantációs magas vérnyomás, nefropátia, fertőzések, malignitások, kardiovaszkuláris események prevalenciáját hozzájárulva a graft és beteg túlélés csökkenéséhez ^{Davidson 2003}. Számszerűsítve

legsúlyosabb következményét, az iszkémiás szívbetegség 20,8-szor gyakrabban fordul elő PTDM-mel szövődött transzplantáltak körében, mint az átlag populációban ^{Davidson 2003, Lindholm 1995}. További tanulmányok írták le, hogy a graft és beteg túlélés tendenciózusan ^{Sezer 2006}, vagy szignifikánsan ^{Matas 2008, Helanterä 2010} csökkent a PTDM-ben szenvedő transzplantáltakban.

Számos rizikó faktor játszhat szerepet a PTDM kialakulásában, úgy mint a 40 év feletti életkor ^{Montori 2002}, az obezitás ^{Montori 2002}, a metabolikus szindróma ^{Reisaeter 2001}, DM-ra vonatkozó pozitív családi anamnézis ^{Al-uzri 2011}, cadaver graft ^{Burroughs 2009}, Afro-Amerikai vagy Hispán rassz ^{Heisel 2004}, hepatitis C fertőzés ^{Al-uzri 2011, Jain 1999} és ami dolgozatomból szempontjából legfontosabb faktorként szerepel és 74%-ban felelős a PTDM kialakulásáért ^{Montori 2002}, az immunosuppresszív terápia ^{Deierhoi 2000}.

2.5.2. Gyermekgyógyászati vonatkozások

A PTDM patogenezise, incidenciája és rizikó faktorai különböznek és sokkal kevésbé ismertek gyermekekben, mint a felnőtt populációban. Irodalmi adatok korlátozott számban állnak rendelkezésünkre. Az elmúlt évtizedekben a gyerekkorban kialakuló PTDM incidenciája szignifikánsan emelkedett: 2,1% (1986-1990), 3,7% (1991-1995), 20% (1996-1999) ^{Greenspan 2002}, habár még mindig alacsonyabb, mint a felnőtt populációban. Két jelentős kohort tanulmány a vese átültetést követő PTDM-et 2,6% ^{Al-Uzri 2001} és 7,1% ^{Burroughs 2009} százalékban írta le. Látnunk kell azt is, hogy a gyermek transzplantáltak különleges farmakokinetikával rendelkeznek. Alacsony gyógyszer abszorpció, felgyorsult metabolizmus és gyors kiürülés jellemzi őket, amely összességében magasabb gyógyszer dózisok bevitelét teszi szükségessé, hogy a felnőttekéhez mérhető gyógyszer szinteket érjünk el. Ugyanakkor különös igény van arra, hogy a gyógyszer szedéshez kapcsolódó adverz hatások kialakulását mérsékeljük, növekedésbeli elmaradást helyreállításuk ^{Jain 1991, Deierhoi 2000}.

A poszt-transzplantációs immunoszuppresszív medikáció mind felnőtt, mind gyermek vesetranszplantáltakban általában egy CNI, mikofenolát mofetil (MMF) /azatioprin (Aza) és szteroid kombinációból áll. A gyógyszer csoportok különböző mellékhatás profillal rendelkeznek, a következőkben a két CNI PTDM kialakulására hajlamosító tulajdonságait jellemzem.

2.5.3. A Tacrolimus (FK506) Diabetogén Hatása

A Tac diabetogén mellékhatása ötször gyakoribb a CyA-nál ^{Davidson 2003, Montori 2002, Webster 2005}. Joggal merül fel a kérdés, hogy mivel magyarázható ez a jelentős diabetogén mellékhatás? Irodalomból ismert, hogy az FK506BP-12-t nem csak a T-sejtek expresszálják, de nagy mennyiségben megtalálható a hasnyálmirigy β -sejtjeiben is ^{Tamura 1995}. Ez magyarázatul szolgálhat arra a tényre, hogy a Tac diabetogén hatása legfőképp a β -sejtek csökkent inzulin szekréciónak tulajdonítható és nem a perifériás inzulin szenzitivitás változásának ^{Oetjen 2003}. Szintén ismert, hogy magasabb koncentrációban jelenlevő Tac (összehasonlítva a klinikai immunoszuppresszív dózissal) jelentősen csökkenti mind a fiziológiás inzulin gén ^{Tamura 1995, Oetjen 2003}, mind az inzulin promoterként bejuttatott CAT reporter gén átíródását ^{Redmon 1996}. A Tac ezen felül szuppresszálja a β -sejtekben zajló glikolízis sebességmeghatározó lépését és így képes meggátolni az inzulin szekréción ^{Radu 2005}. Mindent összevetve, elmondhatjuk, hogy a Tac számos szinten befolyásolja a β -sejt működését; az inzulin mRNS transzkripciójától egész a degranulációjáig.

Milyen jellemzői vannak a Tac diabetogén hatásának és hogyan lehet kialakulását, ill. reverzibilitását befolyásolni? A klinikai gyakorlatban a Tac kezelést a következőképp építik fel, majd csökkentik dózisát: az első héten napi kétszer 0,10–0,15 mg/kg a dózisa, vérszintje pedig el kell hogy érje a 15–20 ng/ml-t, a 2-4 héten 10–15 ng/ml-re és a hatodik hónaptól fokozatosan 4–6 ng/ml-re csökkentve ^{van Hooff 2002}. Számos tanulmány leírta, hogy a Tac diabetogén hatása dózis-függő ^{Redmon 1996, van Hooff 2002, Boots 2002}. Ennek megfelelően a transzplantációt követő néhány hét a legkritikusabb, mivel ebben az időszakban fordulhat elő leginkább 20 ng/ml feletti, PTDM kialakulásra hajlamosító gyógyszer vérszint ^{Rodrigo}

²⁰⁰⁵, Számos tanulmány vizsgálta a Tac megfelelő vérszintjét és úgy találták, hogy még 10 ng/ml alatti dózissal is megfelelő immunosuppresszió biztosítható a graft túlélése szempontjából és egyben alacsonyabb rizikót jelent a PTDM kialakulását tekintve ^{Webster} ²⁰⁰⁵. A terápiás tartományon belül a Tac vérszintjének 33%-os redukciója 36%-os növekedést eredményezett a β -sejt szekréciós kapacitásban ^{Boots} ²⁰⁰². Következésképpen, megfontolandó a Tac vérszintjének 10 ng/ml alá csökkentése a transzplantációt követő minél rövidebb időn belül.

Tekintettel a PTDM reverzibilis voltára, terápiájának egyik módja a kiváltó faktor, Tac elhagyása és helyettesítése, az esetek jelentős részében CyA-val. Ezt a lehetőséget a következő fejezetben tárgyalom.

2.5.4. Gyermek Vonatkozások (Tac)

Négy nagyobb kohort vizsgálat történt a gyermek transzplantáltakban előforduló PTDM incidenciájának és rizikófaktorainak felmérése céljából. A United States Renal Data System alapján 2168 gyermekben (7.1%) fejlődött ki a PTDM Tac kezelés kapcsán ^{Burroughs} ²⁰⁰⁹, míg a North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study 1365 vesetranszplantált gyermek esetében mutatta ki, hogy a Tac kezelés jelentősen gyakoribb (45%) volt a PTDM-ben szenvedő csoportban ^{Al-Uzri} ²⁰⁰¹. A Tac vérszintjét és napi dózisát, mint a PTDM kialakulása szempontjából független rizikófaktort, munkacsoportunk is igazolta. Továbbá szoros negatív korrelációt találtunk a Tac és szérum inzulin szintek között, ami e gyógyszer β -sejteken kifejtett adverz hatására utalt ^{Prokai} ²⁰⁰⁸.

2.5.5. A Cyclosporin-A Diabetogén Hatása

Habár a CyA diabetogén hatása ötöde a Tac-énak ^{Davidson} ²⁰⁰³, mitöbb számos tanulmány demonstrálta, hogy a CyA egyáltalán nem rendelkezik adverz hatással a szénhidrát anyagcserére ^{Robertson} ¹⁹⁸⁹, ^{Esmatjes} ¹⁹⁹¹, mégis úgy véljük, hogy érdemes további részletekben diszkutálni ezen immunosuppresszáns diabetogén hatását is.

Számos faktor szükséges a β -sejtek megfelelő működéséhez magába foglalva különböző poliaminokat, transzkripciós faktorokat (pl.: NFATc), melyeket a CyA jelentősen befolyásol. Egy *in vitro* tanulmány inzulinoma sejtvonalon mutatta ki, hogy a CyA-nak már alacsony dózisa is csökkenti mind az inzulin tartalmat, mind az inzulin szekréciót, feltételezhetően a megnövekedett poliamin szintek miatt, melyek részt vesznek a növekedés szabályozásában és az inzulin termelő sejtek funkciójában ^{Sjöholm 1994}. Másrésztől, nemrégiben bizonyították, hogy az NFATc, ami a CyA legfőbb célmolekulája, képes közvetlenül kötődni és aktiválni a hepatocita nukleáris faktor (HNF) 4 promotor régióját mind *in vitro* mind *in vivo*. A HNF4 expressziójának a hiánya vagy csökkent volta örökletes, monogénes, maturity onset diabetes of the young (MODY) 1 –t ^{Borlak 2009} okoz, ami segíthet magyarázatot adni a CyA diabetogén hatására. Egy másik DM modellben (BB patkányok szolgálták a spontán autoimmun diabétesz modelléül) a CyA progresszív romlást eredményezett a glükóz intoleranciában és az inzulin termelés csökkenésében, míg röviddel a CyA elhagyása után a glükóz intolerancia eltűnt ^{Yale 1985}. A CyA magas adagjai után hasonló csökkenés volt tapasztalható az inzulin tartalomban is ^{Hahn 1989}.

Mint azt fentebb említettem, a CyA-val kapcsolatban bizonyítást nyert, hogy diabetogén hatása ötöde a Tac-énak. Ebből kifolyólag, mikor a Tac dózis redukciójával a DM nem fordítható vissza és a hiperglikémia az inzulin terápia ellenére is tovább fokozódik, a Tac CyA-ra való konvertálása megfontolás tárgya kell, hogy legyen. Egy holland tanulmányban nyolc hónappal a transzplantációt követően szignifikánsan emelkedett volt a vércukor mind a CyA, mind a Tac csoportban. Megjegyzendő, hogy ez az emelkedés sokkal kifejezettebb volt az utóbbi csoportban; a CyA kezelték 40%-a rendelkezett csökkent glükóz toleranciával (impaired glucose tolerance, IGT) a Tac kezelt csoport pedig 40% illetve 30%-ban mutatott IGT-t illetve DM-t. Ez a különbség egy éven belül eltűnt ^{Oetjen 2003}. Ezekben a megfigyeléseken alapulva, a Tac konverziója CyA-ra igen megfontolandó a transzplantációt követő egy éven belül ^{Bouchta 2005, Ramos-Cebrián 2007}, míg később a két kezelés között a PTDM kialakulásának szempontjából már nincs különbség, így a konverzió sem ajánlott ^{Romagnoli 2004, Luan 2008}. Meg kell még említeni egy hat hónapos, nyitott, randomizált,

multi-centrikus tanulmányt, mely keretében 682 vese transzplantált megfigyelése történt Vincenti 2007. A tanulmány elsődleges végpontjaként az IGT és a PTDM kialakulása szolgált, hogy választ kapjanak a címben feltett kérdésre: Diabetes Incidence after Renal Transplantation: Neoral C2 Monitoring Versus Tacrolimus (DIRECT study). Ehhez járult hozzá másik végpontként az immunoszuppresszió hatékonyságának jelzője, a biopsziával bizonyított akut rejekció hiánya. A DIREKT tanulmány felfedte, hogy az IGT vagy PTDM rizikója általánosan jellemző a CNI alapú rezsimekre, ám szignifikánsan alacsonyabb a CyA-MMF versus Tac-MMF kezelés esetén a transzplantációt követő első hat hónapban. Az immunoszuppresszívum hatékonyságát jelző végpontok között nem volt szignifikáns különbség. Egy másik tanulmány is a kezdeti időszak eltérő mellékhatását bizonyította, melyben a Tac kezelt betegekben három héttel a vese transzplantációt követően, az inzulin szekréció csökkent a CyA-val kezeltékhez képest, ám ez a különbség a három éves után követési periódus alatt eltűnt, jelezvén a Tac diabetogén voltának reverzibilitását van Hooff 2002. Ennek megfelelően a PTDM prevenciója szempontjából a transzplantációt követő rövid időn belül megfontolandó a Tac csökkentése ill. CyA-ra való konverziója, azonban egy később kialakult PTDM esetén ennek létjogosultsága már megkérdőjelezendő.

2.5.6. Gyermekgyógyászati Vonatkozások (CyA)

Egy randomizált klinikai vizsgálat szerint CyA és Tac kezelt recipiensek között nem különbözött a PTDM prevalenciája Filler 2005. Az Organ Procurement Transplant Network/ United Network of Organ Sharing database 2726 vese transzplantált gyermeket bevonó tanulmánya nem talált korrelációt a Tac terápia és a PTDM kialakulása között Kuo 2010. Ezzel ellentétes eredményt kapott az a kutatócsoport, aki 14 CyA-val kezelt és 15 Tac immunoszuppresszióban részesülő gyermek vesetranszplantált bevonásával, szignifikáns csökkenést tapasztalt a Tac kezelt csoport inzulin szekréciójának első fázisában összehasonlítva a CyA kezeltékkel, valamint leírták, hogy a Tac vérszintek negatívan korreláltak a plazma glükóz százalékos, percenkénti csökkenésével. Fontos kihangsúlyozni, hogy mindkét paraméter jelentősen javult a Tac szint csökkentését követően. E tanulmány

meggyőző bizonyítékul szolgált a Tac glükóz százalékos, percenkénti csökkenésére és inzulin szekrécióra való dózis-függő hatására ^{Filler 2000}. Amennyiben a PTDM-ben szenvedő recipiens szénhidrát anyagcsere zavara még a Tac és/vagy szteroid csökkentés után sem bizonyul reverzibilisnek, megfontolandó a Tac teljes elhagyása. Egy kaliforniai tanulmányban három vese transzplantált gyermek a PTDM kialakulása után CyA-ra konvertáltak, mindhármójuk DM-a reverzibilissé vált ^{Butani 2000}. Egy mostanában napvilágot látott, 55 vese transzplantált gyermeket felölelő tanulmányban abnormális pre-transzplantációs glükóz toleranciájuk miatt a betegek 32,7%-a részesült CyA terápiában. A transzplantációt követően egyikükben sem fejlődött ki PTDM. Míg a Tac terápiában részesülő betegek közül, habár pre-transzplantációs glükóz háztartásuk zavartalan volt, kettőben is kialakult DM, majd CyA-ra való konverziót követően a szénhidrátanyagcsere zavar megszűnt ^{Shishido 2006}.

Figyelembe véve a krónikus hiperglikémia súlyos kimenetelét vese transzplantáltak körében, előfordulásának megbecslése, rizikófaktorainak meg- ill. felismerése releváns feladatunk.

A gyermekeket vizsgáló, egy centrumos tanulmányunk célja a következő volt (I) felmérni gondozott gyermekeink körében az IGT ill. PTDM incidenciáját (II) megítélni a gyerek vesetranszplantált populációban a hajlamosító rizikófaktorokat, különös tekintettel a CNI-re (III) megbecsülni az OGTT jelentőségét a transzplantáltak gondozása során.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. A FRET-alapú renin szubsztrát specificitásának igazolása és a (pro)renin principális sejtbeli bazolaterális és a lumenális lokalizációján túl a CD-ből való felszabadulásának demonstrálása.
2. Diabéteszes körülmények között vizsgálni, hogy a szukcinát a GPR91 leszálló szignál kaszkádján keresztül a CD-beli lokális RAS legfőbb regulátora, egy új **antifibrotikus terápiás célpontot** tárva fel ezzel **diabétesz mellitusban**.
3. Annak igazolása, hogy a CNI-ok nefrotoxikus hatásukat, legalábbis részben, a lokális RAS-on keresztül fejtik ki, különös tekintettel az összekötő szegmensben és a CD-ban, rámutatva ezzel a **krónikus allograft nefropátia egy terápiás célpontjára**.
4. **Az EPO kezelés protektív hatásának vizsgálata súlyos, egyoldali vese I/R károsodásban;** nőstény ill. hím patkányok különböző EPO hatás elemzése, HSP72 és a Na⁺/K⁺ATPáz szerepének tisztázása az EPO szignálútvonalára való hatásában.
5. **Transzplantáltjaink körében az IGT ill. PTDM incidenciájának felmérése,** a gyerek vesetranszplantált populációra jellemző hajlamosító **rizikófaktorok megítélése, különös tekintettel az immunosuppresszívumokra,** valamint transzplantáltak gondozási protokolljában az OGTT jelentőségének megbecslése.

4. MÓDSZEREK

4.1 Sejtvonalak és kezelésük

Kísérleteinkhez immortalizált, renin-termelő vese tumor sejt vonalat, az As 4.1 sejteket, valamint mind interkaláris, mind principális sejteket tartalmazó CD eredetű sejtvonalat, M1 sejteket használtunk (American Type Culture Collection). A sejteket a következő médiában tenyésztettük: DMEM/4,5 g/l kiegészítve 1,2 g/l NaHCO₃-mal, 10 % borjú szérummal és 1% Penicillin/Streptomicinnel (Pen/Strep) ill. DMEM/F-12 kiegészítve 1,2 g/l NaHCO₃-mal, 5 % borjú szérummal, 1% Pen/Strep-pel és 0,005mM dexamethasonnal (37°C, 5% CO₂). Kísérleteink kivitelezésére a sejtek ~90%-os konfluenciájának elérését követően került sor (mennyiségi valós idejű polimeráz lánc reakció (qPCR), immuncitokémia, Western blot). Az irodalomból már ismert, hogy mind az As 4.1 ^{Peti-Peterdi 2004}, mind az M1 sejtek képesek a renin *de novo* szintézisére ^{Kang 2008}. Általánosan használt vese sejtvonalként makula denza eredetű sejteket (MMDD1) [DMEM/F-12 kiegészítve 1,2 g/l NaHCO₃-mal, 10% borjú szérummal, 1% Penicillin/Streptomicinnel (Pen/Strep) és 0,005mM dexamethasonnal (37°C, 5% CO₂)] és humán embrionális vese sejteket (HEK) [DMEM/4,5 g/l kiegészítve 1,2 g/l NaHCO₃-mal, 10 % borjú szérummal és 1% Penicillin/Streptomicinnel (Pen/Strep)] használtunk. Minden sejtkultúrához szükséges komponens a Sigma Aldrich-től (St. Louis, MO) került rendelésre.

A sejtek kezelése négy protokoll szerint történt. Mind a négynek az alapját 24 órás szérumszűrés adta, hogy a sejteket érzékenyítsük, sejtfelszíni receptoraikat kihelyezésre bírjuk. A kísérletek egy részére ezt követően került sor. A második kísérlet sorozatban a kezelés 5mM glükózt ill. a különböző csoportokban eltérő koncentrációjú szukcinátot (10μM, 100μM és 1mM) foglalt magába 24 órán keresztül. Harmadik sémánk szerint a kezelés 5mM-os glükóz és 1mM-os szukcinát egyszeri dóziséval történt, majd az idő-függés

vizsgálata céljából a sejtek feldolgozása a kezelést követő első, második, harmadik, negyedik és ötödik órában történt. Végül a GPR91 jelátviteli útvonal leírásához a 24 órás szérum megvonást követően 5mM glükóz és 1mM szukcinát kezelés mellett egy-egy csoportban szelektív MEK-1 (MAPK) inhibitor, PD98059 (10 μ M; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) illetve szelektív COX2 inhibitor, a SC58236 (50 μ M; Pfizer, Groton, CT) kezelést alkalmaztunk.

4.2. Állatmodellek

Minden kísérlet elvégzésére a „Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings and approval of University of Southern California Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)” illetve a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottság etikai engedélyével rendelkezünk.

A renin szekréció leírását megcélzó kísérleteink felnőtt hím C57BL/6 (7 hetes, súlyuk: 24,5 \pm 1,3g, 17,6 \pm 2,0g, 22,6 \pm 3,2g, 16,1 \pm 1,8g; WT, DM+WT, KO, DM+KO) vagy 2. típusú diabétesz mellitusz modelljeként használt db/db egereken (10 hetes, 44,1 \pm 2,1g) történtek. C57BL/6 egerek esetében az 1. típusú diabétesz mellitusz kialakulását négy egymás utáni napon, napi egyszeri streptozotocin (STZ) (50 mg/kg i.p.) injekcióval értük el. A diabétesz mellitusz sikeres indukciójának detektálása érdekében (vércukor szintek >400 mg/dl) teszt csíkkal (Freestyle Blood Glucose Monitoring System, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) naponta vér glükóz szinteket mértünk a fark véréből. Az STZ kezelt C57BL/6 egerek esetében az állatkísérletekre négy héttel a diabétesz mellitusz indukcióját követően került sor, míg a db/db egerek esetében tíz hetes korukban végeztük a vizsgálatokat.

A GPR91 tanulmányozásához felnőtt hím, vad típusú és GPR91 génkiütött állatokat használtunk. Az egerek genotípusát fark biopsziájukból történő PCR vizsgálattal karakterizáltuk. A DNS tisztítása Quick-gDNA™ MiniPrep Kit-tel történt (Zymo Research, Orange, CA). A genotipizálást a következő primerekkel végeztük: GPR91 reverse (5'-GCTGCCTTCTGATTCATGTGG-3') és GPR91 forward (5'-

GTCGTCTGGGCCTTAGTGACC-3'). Az 1. típusú diabétesz modell STZ indukcióját a fentebbiekben részleteztem. A minták gyűjtése a DM kialakulását követő negyedik héten történt.

A CNI nefropátia modelljéhez két hetes, hím C57BL/6 egereket (n=15) három csoportba osztottunk: kontroll, 2 x 0,075 mg/kg/nap Tac-szal kezelt és 1 x 2mg/kg/nap CyA-val kezelt egerek. Az állatok képalkotása vagy további feldolgozás céljából leölésük a kezelés harmadik hetének végén történt (kontroll, Tac kezelt, CyA kezelt; $14g \pm 0,5$, $17,5g \pm 0,7$, $15,3g \pm 0,6$).

Az I/R vizsgálat során az állatkísérletek nemileg érett (7 hetes) nőstény (súlyuk: 182 ± 5 g) és hím (súlyuk 182 ± 4 g) Wistar patkányokon történtek. A patkányok *ad libitum* standard labor diétát és vizet kaptak. Kísérleti protokollunknak megfelelően a patkányok rHuEPO- β -val [1000 IU/kg intraperitóneálisan (i.p.)] (Roche Budapest, Magyarország) illetve vehikulummal való kezelése az 50 perces bal vese iszkémiás károsodást megelőzőleg 24 órával történt. Általános anesztézia bevezetése 50 mg/kg pentobarbital i.p. adagolásával történt (Nembutal; Abbott Laboratories, Budapest, Magyarország). Az anesztézia ideje alatt az állatok testhőmérsékletét melegítő pad segítségével végig 37°C -on tartottuk. A vese iszkemizálását a bal renális artéria és véna atraumatikus vaszkuláris klippel való 50 perces lekötése által értük el. Az iszkémia letelte előtt röviddel, a kontralaterális vesét eltávolítottuk. A klipp levételét követően, a hasüreget bezártuk és az állatot hagytuk felébredni. A kísérletek első szériájában hét napon keresztül a túlélést vizsgálatuk. A második kísérletsorozatban a patkányoknál ismételt anesztéziát végeztünk (50 mg /kg i.p. Nembutal; Abbott Laboratories), majd az abdominális aortából vért vettünk és a vesét a reperfüzió második (T2) és huszonnegyedik (T24) órájában eltávolítottuk (n=8/csoport). Kontrollként egyik veséjüket eltávolított (uninefrektomizált) patkányok szolgáltak (n=8/csoport). A további vizsgálatokhoz a vesemintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk le vagy 4%-os formalinban (pH: 7,4) fixáltuk.

4.3. Sejtkultúra mintagyűjtése

Az mRNS izolálása Total RNA Mini Kit-tel (BioRad Laboratories, Hercules, CA) a manufaktúra utasításai szerint történt. Ezt követően 1 µg total mRNS-ből iScript cDNS Synthesis Kit használatával cDNS-t írtunk át, majd a manufaktúra utasításai szerint 20 µl végtérfogatba hígítottuk ki (BioRad Laboratories, Hercules, CA).

Immunohisztokémiai kiértékelés céljából a sejteket 4%-os parafinban fixáltuk.

A Western blot-hoz szükséges minta előkészítéséhez a használati utasítás szerint proteáz inhibitor (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) (1:50) tartalmazó CellLytic-M lysis buffer-ben (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) oldottuk fel a sejteket, majd lecentrifugáltuk őket 13.000 Percenkénti fordulattal (RPM) és a felülúszóból végeztük az összfehérje koncentrációjának és a számunkra érdekes fehérjéknek mennyiségi meghatározását.

4.4. Szöveti minták gyűjtése

A renin termelés vizsgálatát GPR91^{+/+} vad típusú és GPR91^{-/-} knock out (KO) egereken végeztük, melyek vagy egészségesek voltak vagy négy héten keresztül DM-ban szenvedtek (diabétesz indukciója az alábbiakban részletes leírásra kerül). Minden állat vércukor értékét rögzítettük, vizelet mintákat gyűjtöttünk és -80°C-on tároltuk őket. Csoportonként n=5 egér veséje megfelelő anesztéziában képalkotásra került, ezen állatok veséi nem kerültek további feldolgozásra. Csoportonként a maradék n=5 egérnek egyik veséjét immunohisztokémiai vizsgálatok céljából 4%-os paraformaldehidben fixáltuk. Az ellenoldali vesék kérgét és velőjét különválasztottuk, majd a kettő közül csupán a velő szövetét homogenizáltuk, hogy elkerüljük a JGA-ban található reninnel való kontamináció lehetőségét. A fehérje kivonása NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) és proteáz inhibitor (1:50) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) felhasználásával történt. Később a minták -80°C-on kerültek tárolásra. Ugyanezen vizsgálat részeként anesztéziában levő db/db egerek veséje került képalkotásra, veséjüknek, szérumuknak, vizeletüknek további feldolgozására nem került sor.

A CNI nefropátiához kapcsolódó méréseink során minden állatból szérumból mintát gyűjtöttünk, melyeket -20°C -on tároltuk. Csoportonként $n=4$ egér veséje került képalkotásra. Az egerek másik felének ($n=4$) egyik veséjét 4% paraformaldehidben fixáltuk, míg a másik veséjüket 4°C -os foszfáttal pufferált sóoldatban (PBS) tároltuk a áramlási citometria (FACS) analízis fél órán belüli kezdetéig.

I/R vesekárosodást leíró tanulmányunk kapcsán minden patkánytól szérumból mintát gyűjtöttünk és további felhasználásig -20°C -on tároltuk ($n=8$). Az iszkemizált vesét három, mind kérget, mind velőt tartalmazó részre osztottuk. Egyik felét 4%-os paraformaldehidben fixáltuk hisztológiai festések céljából, a második harmadot folyékony nitrogénben gyors fagyasztottuk az immunofluoreszcens metodikához, a harmadik harmadot szintén -80°C -on tároltuk a fehérje izolálásig.

4.5. Gén kifejeződés vizsgálatok

A cDNS 1 μl -ét 20 μl teljes térfogatban sokszoroztuk fel C1000 Thermal Cycler (BioRad Laboratories, Hercules, CA) és IQ SYBR Green Supermix (BioRad Laboratories, Hercules, CA) segítségével. A primerek végső koncentrációja 0,5 $\mu\text{mol/l}$, szekvenciája pedig a következő volt: sense: 5'-GGTTGGCAACAGAGGCTATC-3', anti-sense: 5'-GCCAAACACCACAGTGACA-3'. PCR protokollunk a következőképp nézett ki: 95°C 10 percig, majd 40 cikluson keresztül 95°C 10 sec-ig / 55°C 30 sec-ig, az utolsó lépésként pedig olvadási görbe analízist végeztünk (65°C -ról 95°C -ra, $0,1^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ meredekséggel). A keresztesi pont meghatározása második derivációs módszer alapján történt. A GPR91 gén PCR hatékonyságának és standard görbéjének a számolása a minták sorozat hígításának amplifikációjával történt. Minden minta esetén a GPR91 gén expressziójának és az endogén kontrollként szolgáló β -aktin expressziójának hányadosát számoltuk. A minták relatív expressziós szintjét a kontroll HEK sejtek mintáihoz normalizáltuk, melyeket 1-nek vettünk.

4.6. Western blot

A szukcinát vizsgálatokhoz a fehérje meghatározás tripletekben Bradford elemzéssel történt, mely kontrolljaként borjú szérum albumin szolgált (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). A Western blot vizsgálathoz 30 µg kiindulási fehérjét használtunk. A minták elválasztását 4-20% SDS-PAGE gélen végeztük, majd polyvinylidene difluoride membránra vittük át őket. A membránokat egy órán keresztül Odyssey Blocking Buffer-rel (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) blokkoltuk szobahőmérsékleten (RT). Ezt követően elsődleges antitesttel inkubáltuk (1:500 phosphorylated extracellular regulated kinase [pERK] ½ [Cell Signaling Technology, Danvers, MA]; 1:500 phosphorylated p38 [Cell Signaling Technology, Danvers, MA]; 1:500 COX2 [Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA]; 1:500 (pro)renin [AnaSpec, Fremont, CA]; 1:500 (P)RR [Nguyen G nagyvonalú ajándéka, Institut de la Santé et de la Recherche Médicale, Collège de France, Paris, France ^{Nguyen 2006}]), 1:5000 β-aktin (Ambion, Austin, TX) egy éjszakán át, a következő oldatban való kihígítással: 20ml 1x PBS (OmniPUR, VWR, San Dimas, CA), 20ml Odyssey Blocking Buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) és 20µl Tween-20 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Inkubációt követően a blotokat PBS-T-vel (1x PBS és 1:1000 Tween-20) mostuk, majd 20ml PBS, 20ml Blocking Buffer, 20µl Tween 20 és 20µl 10% SDS oldatában oldva a kecske egér-ellenes (1:15,000; LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) és kecske nyúl-ellenes (1:15000; LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) másodlagos antitestekkel inkubáltuk őket. A blotokat ezt követően Odyssey Infrared Imaging System-mel (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) analizáltuk. Az értékeket β-actinra normalizáltuk és relatív optikai denzitásként tüntettük fel az eredményeket.

Az I/R vizsgálatok során a fehérje meghatározás tripletekben Bradford elemzéssel történt, mely kontrolljaként borjú szérum albumin szolgált (Sigma Aldrich Co., Budapest, Magyarország). A Western blothoz szükséges minden további reagens a Sigma Aldrich Co.-tól származott. A minták (10 µg) szétválasztását elektroforetikusan végeztük 12,5%-os poliakrilamid gélen, majd nitrocellulóz membránra való átvitelüket követően egy óráig

Western pufferben (20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 0.5% Tween 20, 0,1% borjú szérum albumin) blokkoltuk őket (RT). A membránokat HSP72 poliklonális nyúlban termelt antitesttel inkubáltuk (Dr. Laszlo nagyvonalú ajándéka, ELTE, Budapest, Magyarország ^{Erdely 2003}) 1:9000-es hígításban (60 perc, RT). Ezt követően kecskében termeltetett nyúl-ellenes IgG-HRP másodlagos antitesttel (BIO-Kasztel Ltd., Budapest, Magyarország) 1:8000-as hígításban inkubáltuk (30 perc, RT). Ezzel párhuzamosan, Na⁺/K⁺ATPáz- α 1 alegység ellenes egér monoklonális antitestet (BIOKasztel Ltd., Budapest, Magyarország) használtunk 1:1000-es hígításban (60 perc, RT), majd kecskében termeltetett egér-ellenes IgG-HRP másodlagos antitest (BIO-Kasztel Ltd., Budapest, Magyarország) 1:15000-es hígításban (30 perc, RT) alkalmaztunk. A membránokat kemilumineszcens technikával hívtuk elő (APBitech, Buckinghamshire, UK), majd a specifikus csíkokat Gel-Pro Analyzer 3.2 software segítségével komputerizált denzitometriával értékeltük ki. Az értékeket β -actinra normalizáltuk és relatív optikai denzitásként tüntettük fel az eredményeket.

4.7. Spektrofluorometria

Huszonnégy órás szérum elvonást követően M1 sejteket 1:50 Baculo Gold proteáz inhibitorban (BD Biosciences, San Diego, CA) oldottunk, majd a felülúszót összegyűjtöttük. A mintákat közvetlen a tripszinizáció előtt, majd tíz perccel utána (50 g/L, RT) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) vizsgáltuk. Az utóbbi esetben a reakció leállítására szójabab tripszin inhibitor (100 g/l, 5 percig, RT) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) használtunk. Az előbbi csoport reprezentálta a renin, az utóbbi a (pro)renin aktivitását, a következőkben leírt módon. A (pro)renin aktivitás becslésére küvetta alapú fluorometriát (Quantamaster-8, Photon Technology, Inc, Rockwall, Texas) valamint FRET-alapú renin szubsztrát assay-t (AnaSpec, Fremont, CA) alkalmaztunk. A specificitás validálása céljából, direkt renin inhibitor, Aliskiren (50 mmol/l, Novartis; Basel, Switzerland) kezelést végeztünk. A végső koncentráció 100 μ M és 250 μ M volt, mellyel 24 óra alatt kétszer kezeltük a 37°C-on inkubált sejteket. A FRET-alapú renin szubsztrát főlegben (1 μ M)

volt jelen, így a kezdeti reakció sebessége (40 µg fehérje adását követően az első 50 másodperc) a renin aktivitás mértéke szerint alakult. A kiértékelést Felix softver (Photon Technology International, Inc., Birmingham, NJ) segítségével végeztük.

4.8. Fluorofórok

LysoTracker Red-et (Invitrogen, Carlsbad, CA) és a fentebb említett FRET-alapú renin szubsztrátot használtuk kísérleteink során a savas granulomok és a renin aktivitás megjelölése céljából. A FRET-alapú renin szubsztrát működésének elvét a bevezető részleteiben tárgyalom (4. *Ábra*). A festék specificitását a direkt renin inhibitor, Aliskiren (Novartis; Basel, Switzerland) adagolásával bizonyítottuk. Egyrészt M1 sejtek-et kezeltünk 100 és 250µM-os koncentrációban, másrészt hét hetes, hím, db/db egerek két hétig intraperitoneálisan részesültek Aliskiren kezelésben (50mg/kg/nap). Mindkét kísérleti felállásban a FRET-alapú renin szubsztráttal detektálható renin aktivitás változást követtük. A sejtmagokat Hoechst 33342-vel (Invitrogen, Carlsbad, CA) festettük meg.

A CNI nefropátia vizsgálata során 70 kDa rodamin dextran (Life Technologies Magyarország Kft, Budapest, Hungary) szolgálta az érrendszer, a quinacrin (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Hungary) pedig a savas granulomok, így a renint tartalmazó vezikulumok megfestését. A Hoechst 33342 segítségével festettük a sejtmagokat.

A fluoreszcens festékeket a carotiszon keresztül fecskendeztünk be, bolus fiziológiás sóoldat kíséretében.

4.9. Immunocitokémia és immunohisztokémia

A renin szekréció vizsgálatához huszonnégy órával a szérum elvonást követően a sejteket 10 µM adenil-cikláz serkentő forskolinnal (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) és 500 µM foszfodiészteráz inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine-nal (IBMX) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) kezeltük 24 órán keresztül, napi kétszer, hogy magasabb cAMP koncentrációval fokozott renin termelésre serkentsük a sejteket. A képkalkotás ezt követően

történt. Az egyik kísérleti felállásban a sejteket 100nM LysoTracker Red-del 37°C-on, 5% CO₂-ban, egy órán keresztül inkubáltuk, majd 10 perccel a vizsgálat megkezdése előtt 10 µM FRET-alapú renin szubsztrát és Hoechst 33342-t adtunk a sejtek felszínére. A renin aktivitást és szekréciót Leica TCS SP2 (Leica-microsystems, Wetzlar, Germany) konfokál/multi-foton lézer szkennelő mikroszkóp rendszerrel értékeltük ki. A másik kísérleti felállásban 10 µM FRET-alapú renin szubsztráttal 30 percig RT-n inkubáltuk a sejteket, melyet 20 percig 4%-os paraformaldehid fixálás követett, végül 1% Triton-X-szel 10 percig decellularizáltuk őket. A nem-specifikus kötődés csökkentése érdekében sejteinket normál kecske szérummal (1:20) előinkubáltuk, melyet egy 12 órás festés követett nyúlban termeltetett renin-ellenes IgG-vel (AnaSpec, Fremont, CA) 1:100 hígításban. A metszeteket PBS-ben mostuk és kecskében termeltetett 1:200-as hígítású nyúl-ellenes-IgG-vel (Molecular Probes, Eugene, OR) inkubáltuk fél óráig, melyet 10 perces Hoechst 33342 festéssel fejeztünk be. A metszeteket Leica TCS SP5 (Leica-microsystems, Wetzlar, Germany) konfokál/multi-foton lézer szkennelő mikroszkóp rendszerrel értékeltük ki.

A szukcinát jelátviteli útjának vizsgálatához szintén immunocito- és hisztokémiai festéseket végeztünk. Immunocitológia esetén a sejteket 4%-os parafinban fixáltuk. Immunohisztológiához a szövetet egy napig 4%-os parafinban áztattuk, majd 4-µm-vastag metszeteket vágunk és deparafinizáltunk xylénnel, majd csökkenő koncentrációjú etanol sorral. A metszeteket ezt követően PBS-ben rehidráltuk és mikrohullámú sütőben való forralással nyitottuk fel a még fel nem tárt epitópokat, elősegítve ezzel az antitestek bekötődését. Ezt követően mind a metszeteket, mind a sejteket 1%-os Triton-X-szel decellularizáltuk. Az aspecifikus kötődések elkerülése végett, normál kecske szérummal (1:20) blokkoltuk a metszeteket, majd egy éjszakán keresztül inkubáltuk őket: 1:100 hígítású nyúlban termeltetett GPR91 ellenes antitesttel (Novus Biologicals, LLC, Littleton, CO), nyúlban termeltetett phospho- pERK1/2ellenes antitesttel (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) és kecskében termeltetett aquaporin2 (AQP2) ellenes antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Ezt követően a metszeteket PBS-sel mostuk és 1:200 hígítású kecskében termelt nyúl-ellenes, számarban termelt kecske-ellenes antitesttel

(Molecular Probes, Eugene, OR) és 1:1000 hígítású Hoechst 33342 festékekkel (Invitrogen, Carlsbad, CA) inkubáltuk őket. A metszetek képalkotása Leica TCS SP5 (Leica-microsystems, Wetzlar, Germany) konfokális/multi-foton lézer szkennelő mikroszkóp rendszerrel történt.

Az I/R vizsgálatok során a veseminták Shandon cryomatrixba (Life Science Ltd., Budapest, Magyarország) való ágyazását követően 5- μ m vastag metszeteket készítettünk. Hatvan percig inkubáltuk őket (RT) a Western blotnál használt antitestekkel (HSP72 ellenes nyúl poliklonális antitest 1:1000-es hígításban; és Na⁺/K⁺-ATPáz- α 1 ellenes egér monoklonális antitest 1:100-as hígításban). Többszöri PBS-sel való mosás után a másodlagos antitestekkel való inkubálás következett: kecskében termeltetett nyúl-ellenes IgG Alexa Fluor 568 F (ab')₂ fragment (Invitrogen, Carlsbad, CA) 1:100-as hígításban és kecskében termeltetett egér-ellenes Alexa Fluor 488 F(ab')₂ fragment (Csertex Ltd., Budapest, Magyarország) (harminc perc, RT). A DNS-t 1:1000-es hígítású Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) segítségével tettük láthatóvá (10 perc, RT). A festékek specificitásának igazolása végett és az autofluoreszcencia elkerülése céljából elsődleges antitest elhagyásával és csupán a másodlagos antitest felhasználásával is végeztünk festést. A metszetek vizualizálása Zeiss LSM 510 Meta konfokális lézer szkennelő mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Germany) történt.

4.10. A gyűjtőcsatorna elválasztása (disszekció)

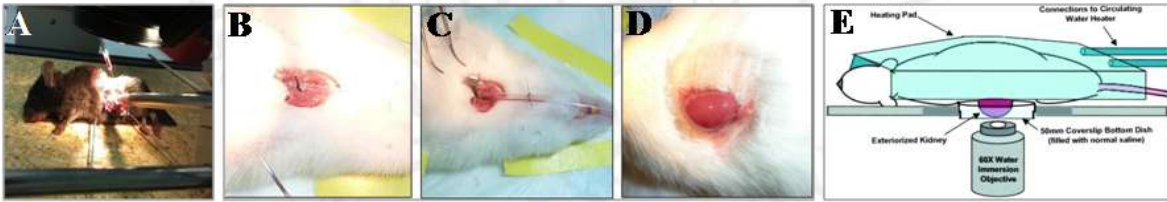
A disszekciót DMEM mixture F-12 média (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) felhasználásával, borjú főtális szérummal kiegészítve, 3%-os végső koncentrációra hígítva készítettük. A mosófolyadék módosított Krebs-Ringer-HCO₃ puffer volt, ami 115 mM NaCl-t, 25 mM NaHCO₃-t, 0,96 mM NaH₂PO₄-t, 0,24 mM Na₂HPO₄-t, 5 mM KCl-t, 1,2 mM MgSO₄-t, 2 mM CaCl₂-t, 5,5 mM D-glukózt és 100 μ M L-arginint tartalmazott. A preparátummal a disszekciós oldatban dolgoztunk és a CD teljes kipreparálásáig a hőmérsékletet 4°C-on stabilizáltuk. A CD-t ezt követően Leica invert mikroszkópra (Leica, Wetzlar, Germany) helyezett hőregulált Lucite kamrába helyeztük át. A mosófolyadékot

95%-os O₂-nel és 5%-os CO₂-dal 45 percig levegőztettük át és pH-ját 7,4-re állítottuk, majd a vizsgálat alatt is 95%-os O₂-nel és 5%-os CO₂-dal folyamatosan áramoltattuk. A már korábbiakban említett FRET-alapú renin szubsztrátot használtuk a renin granulumok és a renin aktivitás kimutatása céljából.

4.11. Vese feltöltését szolgáló mikropunkciós technika

Az egereket Ketamine és Xylazine kombinációjával (37,5mg/kg és 2,5mg/kg, i.p.) altattuk. A sikeres indukciót követően homotermiás műtőasztalra (Vestavia Scientific, Birmingham, AL) helyeztük őket és a teljes-testhőmérsékletüket elektromos melegítő paddal tartottuk ~37°C-on. Betadinnal fertőtlenítettük őket, majd a bal hátsó oldalukat leborotváltuk. Tizenhat mm-es bemetszést ejtettünk a bal bordaív alatti régióban, majd két horizontális közép bemetszést végeztünk, hogy a vesét elérhető közelségbe hozzuk. A bal vesét finoman kiemeltük, kipreparáltuk a vese pedikulumot, majd a vesét magát. A peritoneális üregeken belül egy tizenkét mm-es tálkába (Vestavia Scientific, Birmingham, AL) pozícionáltuk a bal vesét, hogy a kísérlet alatt végig rögzítve legyen, majd nedves gézlapocskákat helyeztünk köré. A vese a mikropunkció alatt folyamatosan meleg 0,9%-os fiziológiás sóoldatba volt áztatva.

Üvegkapilláris tubusokat használtunk (0,084" x 0,064") (Drummond Scientific Company, Broomall, PA), melyeknek hegyét O.D. ~20-25µm-re kalibráltuk. Az üveg mikropipettákat 1mM-os FRET-alapú fluorogén renin szubsztráttal (AnaSpec, Fremont, CA) és 1mM Lyso-Tracker Red-del (Invitrogen, Carlsbad, CA) töltöttük fel, majd mikromanipulátorba helyeztük őket (Leica, Wetzlar, Germany). Az üveg mikropipetta hegyét a vese kapszulán keresztül ~50-150 mikrométer mélységbe, vagyis a vesekéreg szintjébe szúrtuk, épp olyan mélyre hatolva ezzel, hogy a peritubuláris és mikrovaszkuláris üreget perfundálni tudjuk. Állatonként 3-6 punkciós helyet 0,02 Hgmm állandó nyomású infúziós sebességgel, tizenöt percig injektáltunk (6. *Ábra*). Ez a módszer lehetővé tette számunkra, hogy a FRET-alapú renin szubsztrátot közvetlenül injektáljuk a CD-be, elkerülve ezzel a festék szisztémás degradációját és a glomeruláris filtrációs barrier szűrő funkcióját.

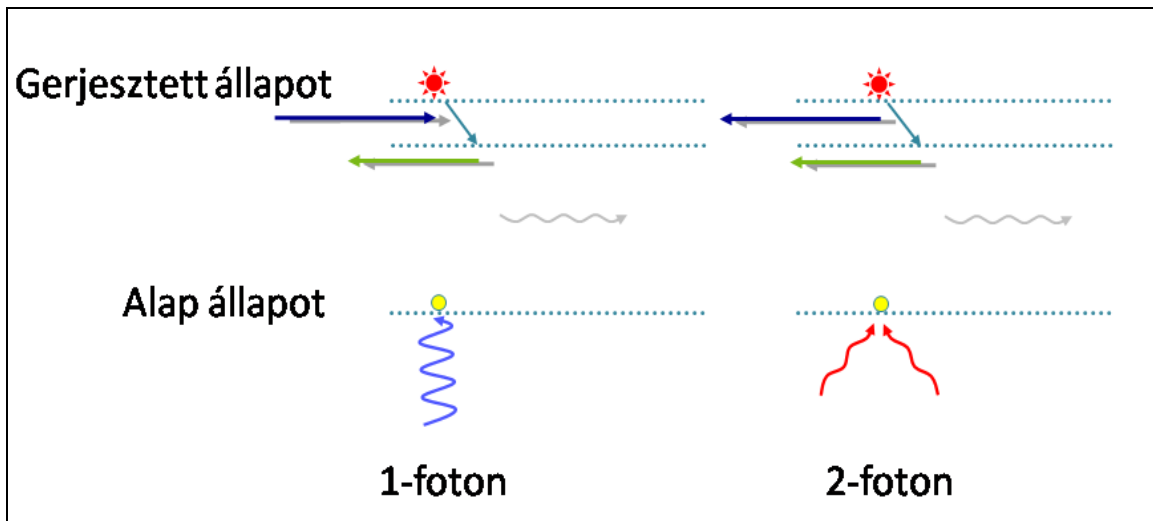


6. Ábra: Az állatok műtéti előkészítése. A fluorofór bejuttatása céljából első lépésként a vese több pontjának mikropunkciója történik (**A Panel**), ennek alternatívája hogy intravénásan juttatjuk be a fluorofort, ezért a trachea kanülálásával szabadon átjárható légutakat biztosítunk (**B Panel**), majd a karotis kireparálása történik, melyen egy kanül bevezetését követően a fluoroforok bejuttatása megoldottá válik (**C Panel**), végül mindkét típusú adminisztrációt követően a vesét dorzális irányba kiemeljük (**D**) és az objektivre helyezzük (**E Panel**, Peti-Peterdi János engedélyével) további képalkotás céljából.

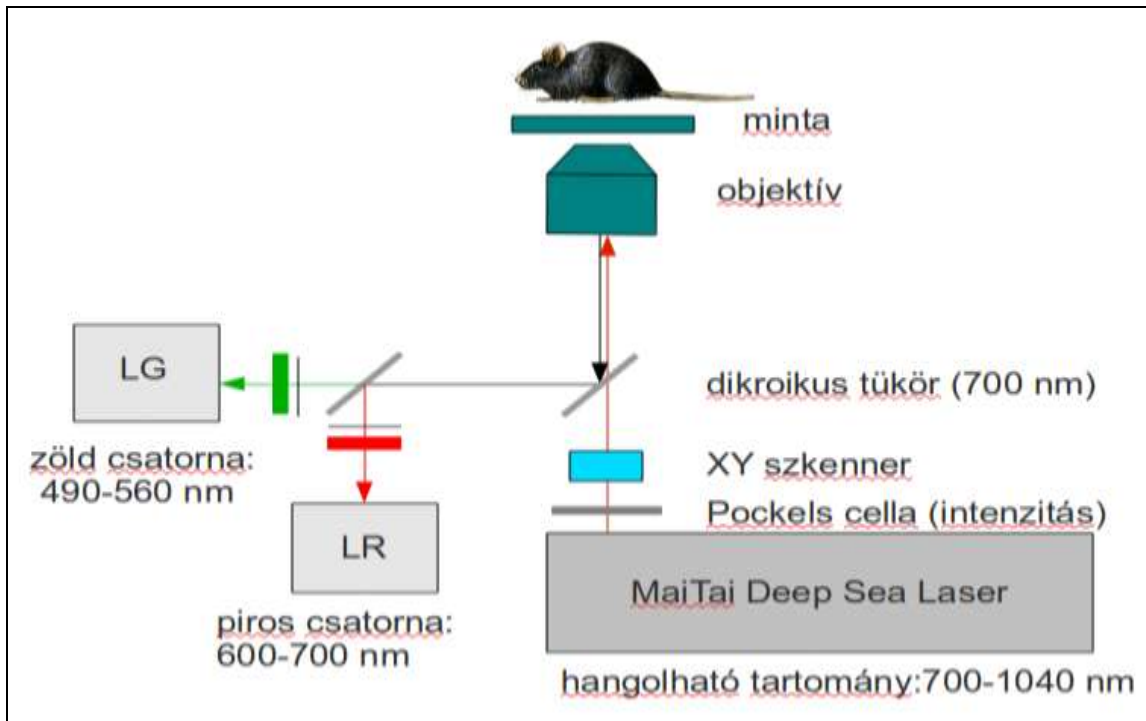
4.12. A vese in vivo multi-foton fluoreszcens képalkotása

A multi-foton mikroszkópia egy konfokális, lézerpasztázó fluoreszcens képalkotó technika, ami különösen alkalmas az élő szövetek mély optikai felbontására. A multi-foton képalkotás a fluoreszcens jel intakt szervekben történő, az intracelluláris organelumokig terjedő, nagy felbontású, igen érzékeny detektálását biztosítja. A technológia azon az elven alapul, hogy két, azonos energiájú foton egyidejű elnyelődése ugyanazt a fluorofor gerjesztést vagy excitációt képes létrehozni, mint egy dupla energiájú fotoné (7. Ábra) ^{Peti-Peterdi 2004}. Ennek megfelelően a multi-foton excitáció 680-1080 nm tartományú infravörös fényel történik, a hagyományos egy foton fluoreszcens képalkotással szemben, ahol UV és látható fényt (193-694 nm) használunk e célból. Multi-foton képalkotás során a dupla vagy tripla hullámhosszú (fele vagy harmad energiájú) fotonok kevésbé szóródnak, így mélyebb szöveti penetranciát tesznek lehetővé és károsító hatásuk is kisebb. Mivel a multi-foton excitáció főként, ha nem kizárólag a fokális síkban történik, a kibocsátott vagy emittált fluoreszcencia 100%-a detektálható. Így a hagyományos mikroszkóppal ellentétben a multi-foton mikroszkópia alkalmazása esetén nem szükséges a beérkező fotonok retesz általi szűrése. A multi-foton technikával az olyan áttetsző szövetek, mint az agy, akár milliméteres mélységben is könnyen megjeleníthetők. Ezzel szemben a nagy fényelnyelésű és -szóró vesestruktúrák vizsgálata e technológiával korlátozottabb, így a vesekéreg csupán

a felszín kezdeti 100-200 μm mélységében tanulmányozható. Habár az optika, a fluoreszcens detektálás és a lézer technológia folyamatos fejlesztése nagymértékben elősegíti az intakt vese mélyrehatóbb vizsgálatát is. Erre példa a diszperziós kompenzáció (pl.: a lézer pulzusok rövidek, 100 femtoszekundumosak), ami számos jelenleg elérhető rendszerben megtalálható (pl.: Mai Tai DeepSee a Spectra-Physics/Newport-tól és a Chameleon Vision a Coherent-től). A másik fontos előrelépés, ami elősegíti a mélyebbre hatoló képalkotást, a jelentősen megnövekedett kimenő lézerintenzitás ($>4,000$ mW a Chameleon Ultra-II or Vision esetén, ami 10 évvel ezelőtt az első Tsunami lézerek esetén még 350 mW volt) ^{Helmchen 2005, Zifel 2003}. A kísérleteink során használt két multi-foton mikroszkóp működési vázlatát és típusát a 8. és 9. Ábrán látható.



7. Ábra: A fluoreszcencia és multi-foton képalkotás alapelve. Egy-foton gerjesztés esetén a fluorofór egy elektronja magasabb energia állapotba kerül. Azonban instabilitására való tekintettel az elektron energiájának leadására törekszik és némi energiavesztést követően egy fotont bocsát ki, mely hullámhossza a fluorofórra jellemző. A két-foton gerjesztés ettől annyiban tér el, hogy a gerjesztést két, az előzőhöz képest fele energiával, ennek megfelelően dupla hullámhosszal rendelkező foton szimultán abszorpciója hozza létre.



8. Ábra: A multi-foton mikroszkóp működésének vázlatja. A mikroszkóp az infravörös módus-szinkronizált lézerfény és két egymásra merőlegesen mozgó tükör segítségével pásztázza a mintát az infravörös tartományra korrigált szkenlencsén, tubuslencsén és objektíven keresztül. A két-foton effektus által keltett fluoreszcens fotonokat dikroikus tükrök segítségével választjuk szét a gerjesztő infra sugárzástól, majd további színszűrő üveg(ek) használata után fotoelektron sokszorozókkal (PMT) detektáljuk őket. LG: low green , LR:low red. Köszönet dr. Kis-Petik Katalin segítségéért.

Az állatok fluoreszcens képalkotását Leica TCS SP5 (Leica-Microsystems, Wetzlar, Germany) konfokál/ multi-foton lézer szkennelő mikroszkóp rendszerrel végeztük, amely fluoreszcens excitáló modelocked titanium-sapphire lézerrel (Coherent Chameleon Ultra2) (Coherent, Inc., Santa Clara, CA) és Leica DMI6000B Invert mikroszkóppal volt kiegészítve. A megfigyelésekhez Leica 63x glycerin immerziós objektívet (numerikus apertúra: 1,3) alkalmaztunk, valamint külső fotodetektorokat használtunk 12 bites intenzitás spektrummal. A fotodetektor gain-t a piros csatornában 836 V-ra, a zöld csatornában 975 V-ra állítottuk és amennyiben egyszer beállításra kerültek többé nem változtattunk rajtuk. (9. Ábra).

A CNI kísérlet sorozathoz a Femto 2D magas szenzitivitású galvanoscanner-alapú multi-foton mikroszkóp rendszerrel (FemtonicsInc, Budapest, Hungary) és Olympus Invert mikroszkóp kiegészítésével készítettük a fluoreszcens képeket. Fluoreszcens excitációt a modelocked titanium-sapphire lézer (Spectra-Physics Inc., Irvine, CA) biztosított. A megfigyeléseket Olympus 60x glycerin immerziós objektívvel tettük (numerikus apertúra: 1,3), a fotonokat pedig külön foton sokszorozók gyűjtötték be pinhole felhasználása nélkül, 12 bit-es intenzitás skálával és 100 μm -es maximális mélységből. A képeket és adatokat Matlab és Image J software-rel véglegesítettük. (9. Ábra).



9. Ábra: *Kísérleteink során használt multi-foton mikroszkópok típusai. Az állatok fluoreszcens képalkotása egyrészt Leica TCS SP5 (Leica-microsystems, Wetzlar, Germany) konfokál/ multi-foton lézer szkennelő mikroszkóp rendszerrel történt, amely fluoreszcens excitáló módus-szinkronizált titanium-sapphire lézerrel (Coherent, Inc., Santa Clara, CA) és Leica DMI6000B Invert mikroszkóppal volt kiegészítve; másrészt Femto 2D magas szenzitivitású galvanoscanner-alapú multi-foton mikroszkóp rendszerrel történt (Femtonics Inc, Budapest, Hungary), amely módus-szinkronizált titanium-sapphire lézerrel (Spectra-Physics Inc.,Irvine, CA) és Olympus Invert mikroszkóppal volt kiegészítve.*

4.13. Spektrofluorometria a vizelet renin aktivitás mérésére

A vizelet renin aktivitást küvetta-alapú fluorometriával (Quantamaster-8, Photon Technology Inc., Rockwall, Texas) becsültük meg, FRET-alapú renin szubsztrát segítségével. A szubsztrát főlegben volt jelen ($1\mu\text{M}$), így a kezdeti reakció sebesség (10 μl vizelet adását követő 50 másodperc) a renin aktivitást mutatta meg Felix softver segítségével.

4.14. PGE₂ vizeletbe történő szekréciója

PGE₂ szekréció meghatározásához 24 órás vizelet mintát gyűjtöttünk, majd az előírásnak megfelelően duplikátumokban határoztuk meg a PGE₂ koncentrációját egy kereskedelmi forgalomban elérhető enzim-kötött immunoszorbens assay segítségével (ELISA) (Prostaglandin E Metabolite EIA Kit) (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI).

4.15. Vesefunkciós paraméterek

A CNI kísérlet sorozathoz szérum kreatinin szintet határoztunk meg kereskedelmi forgalomban elérhető kit (Diagnosticum Ltd., Budapest, Magyarország) és Hitachi-712 automata spektrofotométer segítségével.

Az I/R vizsgálatok során a szérum EPO szintek meghatározását EPO-DPC automata kemilumineszcens immunoassay-vel végeztük (Olympus Ltd., Budapest, Magyarország), amely mind az endogén, mind az exogén EPO szinteket képes volt detektálni. A szérum karbamid és kreatinin szintjeinek fotometriás meghatározásához kereskedelembe is elérhető kittet alkalmaztunk (Diagnosticum Ltd., Budapest, Magyarország) és Hitachi-712 automatával spektrofotometráltuk.

4.16. Hisztológiai analízis

A CNI kísérlet sorozathoz parafinba ágyazott, 5- μ m vastag vese metszeteket Masson reagenssel festettük meg. A mintákat kódoltuk és fénymikroszkóppal 0-tól 4-ig terjedő skála segítségével szemi-kvantitatívan ítéltük meg a fibrózis mértékét.

Az I/R vizsgálatok során parafinba ágyazott, 5- μ m vastag vese szeleteket perjódsvav-Schiff reagenssel festettük meg. A mintákat kódoltuk és szemi-kvantitatívan becsültük meg károsodásuk mértékét (a tubuláris szerkezet degenerációját, a kefeszegély elvesztését, a tubuláris dilatációt, a sejtduzzadást valamint a vakuolizációt és hialinizációt mind a tubuláris sejteken belül, mind kívül).

4.17. Áramlási citometria (FACS analízis)

A CNI kísérlet sorozat esetében három hetes kezelést követően az állatok veséit kollagenáz II-vel (Sigma) emésztettük, majd a lecentrifugált sejteket PBS-sel mostuk (2000g, 5 perc, 24 °C). Az intracelluláris jelölés céljából a sejteket ezután 10 percig RT-n fixáltuk/permeabilizáltuk (FACS Permeabilizing Solution 2, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), majd az ilyen módon a jelölő antitestek számára átjárhatóvá tett sejteket újból centrifugáltuk (2000 g, 5 perc, 24 °C). Ezt követően mintáinkat specifikus nyúlban termelt renin ellenes (AnaSpec, Bio-Kasztel, Budapest, Magyarország) ill. kecskében termelt AQP2 ellenes (Santa Cruz, Bio-Kasztel, Budapest, Magyarország) elsődleges antitestekkel inkubáltuk (2 µl) 30 percen keresztül, RT-n. A felesleges illetve nem kötődött antitesteket permeabilizáló pufferrel történő mosással távolítottuk el (2000 g, 5 perc, 24 °C). Az elsődleges antitestre specifikus, 1 µl Alexa 488-al konjugált csirkében termelt, nyúl ellenes és Alexa 647-tel konjugált számban termelt, kecske ellenes (Invitrogen, Life Technologies, Budapest, Magyarország) másodlagos antitesteket, 30 percig, RT-n használtunk. A negatív kontroll mintákat csak másodlagos antitesttel inkubáltuk. A felesleges illetve nem kötődött antitesteket permeabilizáló pufferrel történő mosással távolítottuk el (2000 g, 5 perc, 24 °C), majd FACS pufferben (PBS) vettük fel a sejteket. A mérést BD FACSAria™ áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) végeztük. Az élő sejteket méret (forward scatter) és granuláltság szerinti (side scatter) szórás alapján határoltuk be. Minden kezelési csoportból 30.000 sejtet számoltunk le. Az eredményeket ezután BD CellQuest™ Pro (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) szoftver segítségével értékeltük ki.

4.18. Statisztikai analízis

Az adatok kiértékelését STATISZTIKA 8 programmal (StatSoft Inc, Tulsa, OK) végeztük. Faktoriális variancia analízist (ANOVA) végeztünk a többszörös összehasonlításokra, amit Fisher-féle post-hoc teszt követett. A hisztológiai változásokat Kruskal-Wallis teszttel analizáltuk, melyet többszörös pár-illesztett összehasonlítás követett Fisher-féle post hoc

teszt alapján. Szignifikánsnak tartottunk egy különbséget, amennyiben a $p \leq 0,05$ volt. Az adatokat a diagramokon és táblázatokban átlag és \pm SEM –ben (renin szekréció és GPR91 tanulmányban) ill. \pm SD-ben (CNI és I/R tanulmányban) tüntettük fel.

4.19. Humán vizsgálat

A PTDM vizsgálatát célzó felmérésünket a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága elfogadta és egyetértésben levőnek találta az 1975-ös Orvos-Világszövetség Helsinkii deklarációjával.

4.20. A beteg populáció és immunoszuppresszió

Retrospektív, keresztmetszeti tanulmányunk a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati és a Transzplantációs és Sebészeti Klinikáján végeztük. 1990 és 2006 között 45 beteg (20 lány/25 fiú, $17,3 \pm 6,4$ év) esetében került sor vese transzplantációra, melyet követően standard immunoszuppresszív terápia indukált. A bázis immunoszuppresszió részeként alkalmazott CNI kezelés a következőképp alakult: CyA (dózis: 4–6 mg/kg/nap napi két adagban, az első hat hétben a vérszintet 150–250 ng/mL, azt követően 100–150 ng/mL között tartva) vagy Tac (0,3 mg/kg/nap napi két adagban; az első két hétben a vér szintet 10–20 ng/l, ezt követően 8–12 ng/l, majd 4–6ng/l között tartva). A szteroid kezelés szintén részét képezte az immunoszuppresszióknak. A kezdő szteroid lökés terápia 10 mg/kg bólus Metil-prednizolont (500 mg felső határral) jelentett a 0. és az 1. napon i.v adagolással, később az orális Metil-prednizolont 0,5 mg/kg-ról (2–14 nap) 0,3 mg/kg-ra csökkentettük (3-10. hétre), a 11. héttől pedig 0,1 mg/kg dózisban kapták a gyermekek, végső 4 mg összdózis Metil-prednizolon adagban. Aza vagy MMF szintén részét képezte az immunoszuppresszióknak, valamint két beteg Rapamicint (Rap) terápiában részesült. Az akut rejekció terápiájaként bólus Metil-prednizolont alkalmaztunk.

4.21. Labor paraméterek

Minden betegnek a tájékoztatás és bejegyző nyilatkozat aláírását követően, elvégeztük rutin éhomi vércukor mérését és OGTT a PTDM kialakulására való esély felmérése céljából. Ez utóbbi során a szükséges glükóz mennyiségét a testsúly alapján számoltuk ki (1,75 g/kg 75 g felső határral); szérumban vércukor és inzulin szintet a 0., 60., és 120. percen vettünk. Az IGT és PTDM diagnózisa az ADA klasszifikációk alapján történt ^{Summary of Revisions to the 2011 Clinical Practice Recommendations, 2011}, azzal a kiegészítéssel, hogy inzulin 30 napon túli használatát belefoglaltuk a kritérium rendszerünkbe. A betegeknek glükóz metabolizmusuk alapján két csoportot különböztettünk meg: normál (NGT) vagy csökkent (PTDM+IGT) szénhidrátanyagcseréjű transzplantáltak. Tanulmányunk során az éhomi plazma glükóz, szérumban koleszterin, triglicerid, húgysav, kreatinin és urea nitrogén rutin labor mérése történt kereskedelemben elérhető kitekkel Hitachi-712 automata spektrométeren (Roche Magyarország Ltd., Budaörs, Magyarország). A HOMA indexet szintén kalkuláltuk ($HOMA\ index = FBG * inzulin / 22,5$). Értékét, amennyiben $> 2,5$ fölöttinek adódott perifériás inzulin rezisztencia fennállásaként értékeltük ^{Hosker 1985}.

A glomerulus filtrációs ráta (GFR), a testtömeg index (BMI) és a BMI z-score-okat szintén kiszámoltuk, a vérnyomást monitorizáltuk. A nemre vonatkozó, saját korábbi, családi és transzplantációs (transzplantációk száma, cadaver/élő donor, immunoszuppresszív kezelés, hepatitis C fertőzés) anamnesztikus adatokat rögzítettük. A szteroid folyamatos és pulzus terápiáját, illetve a CyA-nak, Tac-nak és Rap-nak a napi dózisát és vérszintjét nyomon követtük.

4.22. Statisztikai analízis

Az adatokat a Statistica 6 szoftverrel értékeltük (StatSoft—Inc., StatSoft Magyarország Ltd., Budapest, Magyarország). A változók, amelyeket multivariáció analízisre használtunk a következők voltak: kor (év), a transzplantáció óta eltelt idő, a dialízisen eltöltött idő, szisztolés és diasztolés vérnyomás értékek, szérumban

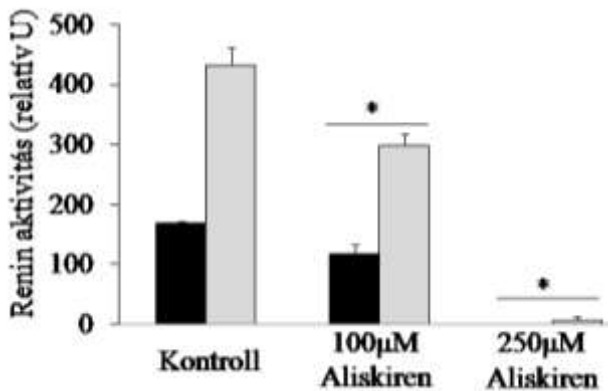
kreatinin, koleszterin, triglicerid, BMI z-score-ra vonatkoztatva, éhomi vércukor, Homeostasis model assessment (HOMA-R) index, szteroid napi dózis és a szteroid lökés terápiák száma, a Tac napi dózisa és vérszintje, vércukor szint az OGTT 0., 60., 120. percében és az inzulin szintek 0., 120. percében. Szignifikánsnak értékeltük őket, amennyiben $p < 0,05$ volt.

5. EREDMÉNYEK

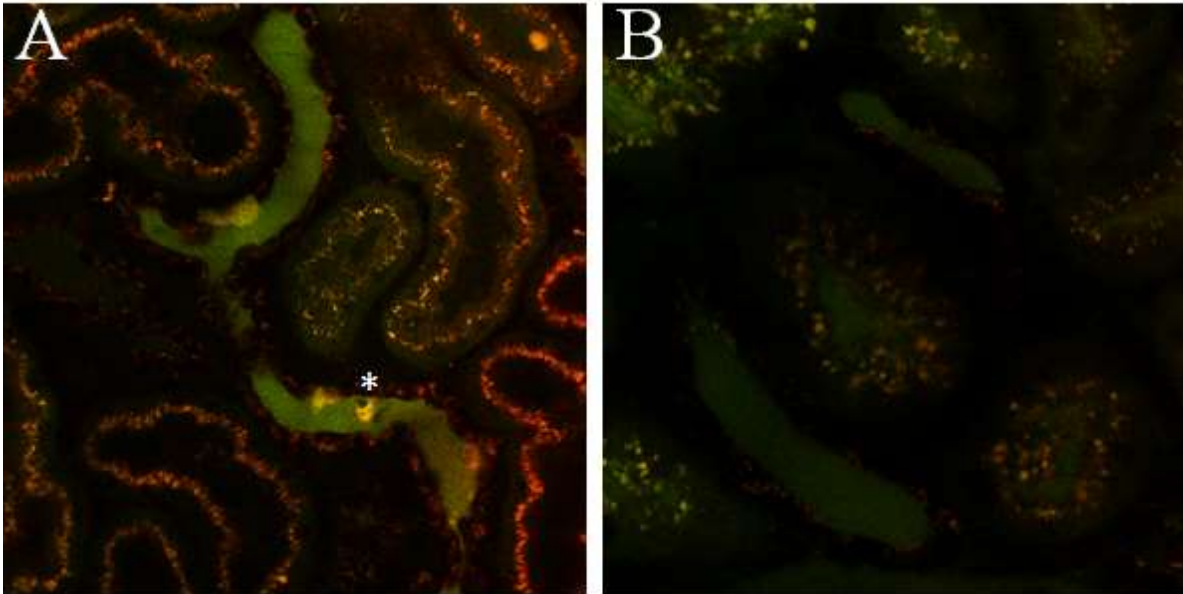
5.1. A renin aktivitás direkt vizualizálása; multi-foton mikroszkópia és a FRET-alapú renin szubsztrát

5.1.1. A FRET-alapú fluorogén renin szubsztrát specificitásának vizsgálata spektrofluorometriával és multi-foton mikroszkópiával

Kontroll állatokban a mért endogén renin aktivitáshoz képest a renin és aktivált prorenin aktivitás együttesen több, mint kétszeres volt. A minták 100 $\mu\text{mol/l}$ Aliskirennel történt pre-inkubációja hatvan százalékra csökkentette a renin aktivitást, míg a 250 $\mu\text{mol/L}$ Aliskiren teljes mértékben meggátolta az aktivitás fluoreszcens jelét (10. *Ábra*). A FRET-alapú renin szubsztrát specificitását intakt vesébe történt mikropunkcióval *in vivo* is bizonyítottuk. Míg a kontroll db/db egér kifejezett granulációt és lumináris renin aktivitást mutatott (11. *Ábra, A Panel*), két hét Aliskiren kezelés (50mg/kg/nap, i.p.) szignifikáns csökkenést váltott ki a lumináris renin aktivitásban (11. *Ábra, B Panel*).



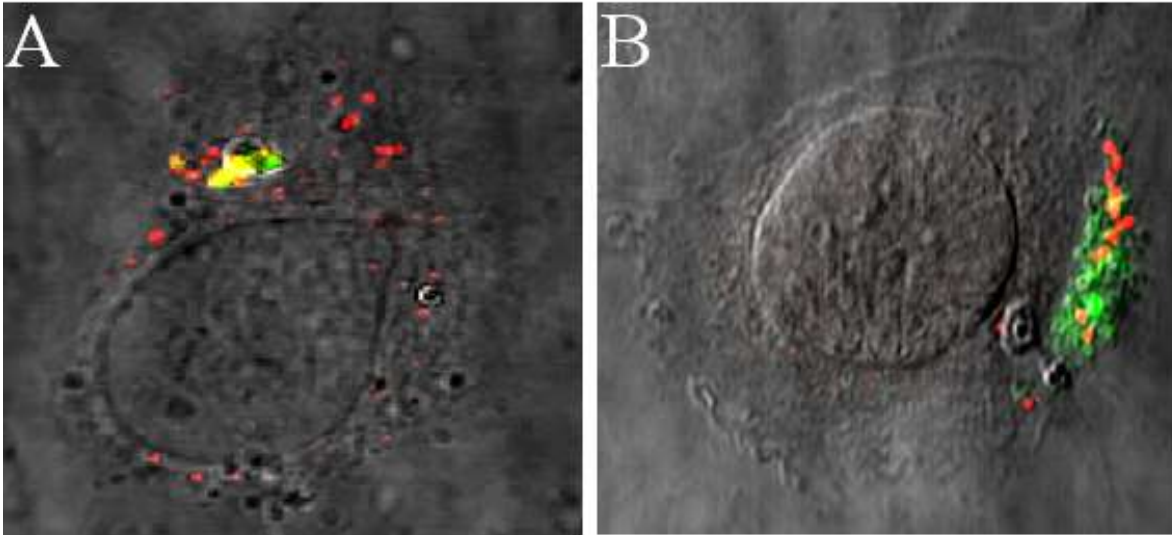
10. *Ábra:* A fluoreszcens rezonancia-energiatranszfer (FRET)-alapú fluorogén renin szubsztrát specificitásának spektrofluorometriával való vizsgálata. A pre-tripszinizációs aktivitás az endogén renin aktivitást mutatta (fekete), a poszt-tripszinizációs aktivitás pedig mind a renin, mind az aktivált prorenin aktivitását jelezte (szürke). Kontroll M1 sejtekben a (pro)reninnek két és félszer nagyobb volt az aktivitása, mint a már jelenlevő reniné. A kísérlet második felállításában a FRET-alapú renin szubsztrát proteázokon belüli (pro)renin specificitását igazoltuk. A minták pre-inkubációja 100 $\mu\text{mol/l}$ direkt renin inhibitor Aliskirennel hatvan százalékra csökkentette a renin aktivitást, míg 250 $\mu\text{mol/l}$ Aliskiren teljesen eltüntette az aktivitást jelző fluoreszcens jelet. * $p \leq 0,05$ vs. kontroll M1 sejtek.



11. Ábra: A fluoreszcens rezonancia-energiatranszfer (FRET)-alapú fluorogén renin szubsztrát specificitásának multi-foton mikroszkópiával való igazolása. A FRET-alapú renin szubsztrát (zöld) specificitását *in vivo* is bizonyítottuk intakt vesébe történt mikropunkciója segítségével. Míg kontroll db/db egerek kifejezett granulációt (*) és lumináris renin aktivitást mutattak (**A Panel**), két hét Aliskiren kezelés (50mg/kg/nap, i.p.) szignifikáns csökkenést váltott ki a lumináris renin aktivitásban (**B Panel**).

5.1.2. A FRET-alapú fluorogén renin szubsztrát specificitásának konfokális mikroszkópiával történő vizsgálata

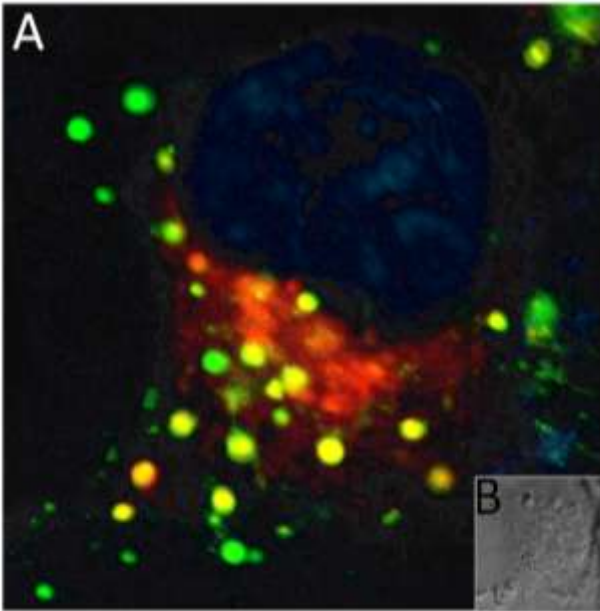
A FRET-alapú renin szubsztrát vesebeli specificitás vizsgálatának további lépéseként As 4.1 (12. Ábra, A Panel) és M1 (12. Ábra, B Panel) sejteken folytattuk kísérleteinket. Beállítás során több koncentrációban és időtartamig (adatok nem kerülnek bemutatásra) kezeltük sejtjeinket az adenilcikláz-aktivátor forskolin és a foszfodiészteráz-inhibitor IBMX kevert oldatával. A renin termelés maximális stimulációját 24 órán keresztül napi kétszeri 10 μ M forskolin és 500 μ M IBMX adagolás esetében tapasztaltuk. Ebben a modellben mind a JGA, mind a CD eredetű sejtvonalonban megnövekedett intracelluláris cAMP aktiválta *de novo* renin szintetizáló mechanizmust tapasztaltunk. A renin antitest (piros) és a FRET-alapú renin szubsztrát (zöld) intracelluláris granulumokban/felett nagy közelséget mutatott.



12. Ábra: *A fluoreszcens rezonancia-energiatranszfer (FRET)-alapú fluorogén renin szubsztrát specifikitásának konfokális mikroszkópiával történő vizsgálata. JGA eredetű As4.1 (A Panel) és gyűjtőcsatorna (CD) eredetű M1 sejteket (B Panel) kezeltünk 24 órán keresztül napi kétszer 10 μ M forskolinnal és 500 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine-nal (IBMX). Mind a JGA, mind a CD eredetű sejtvonalban a megnövekedett intracelluláris cAMP a renin szintetizáló mechanizmus aktivációját eredményezte. A kettős antitest jelölt, renin pozitív intracelluláris granulumok (piros) és a sejtek felszínén felszabadulásra kerülő aktív renin (zöld) közelsége alátámasztotta a FRET-alapú fluorogén renin szubsztrát specifikitását.*

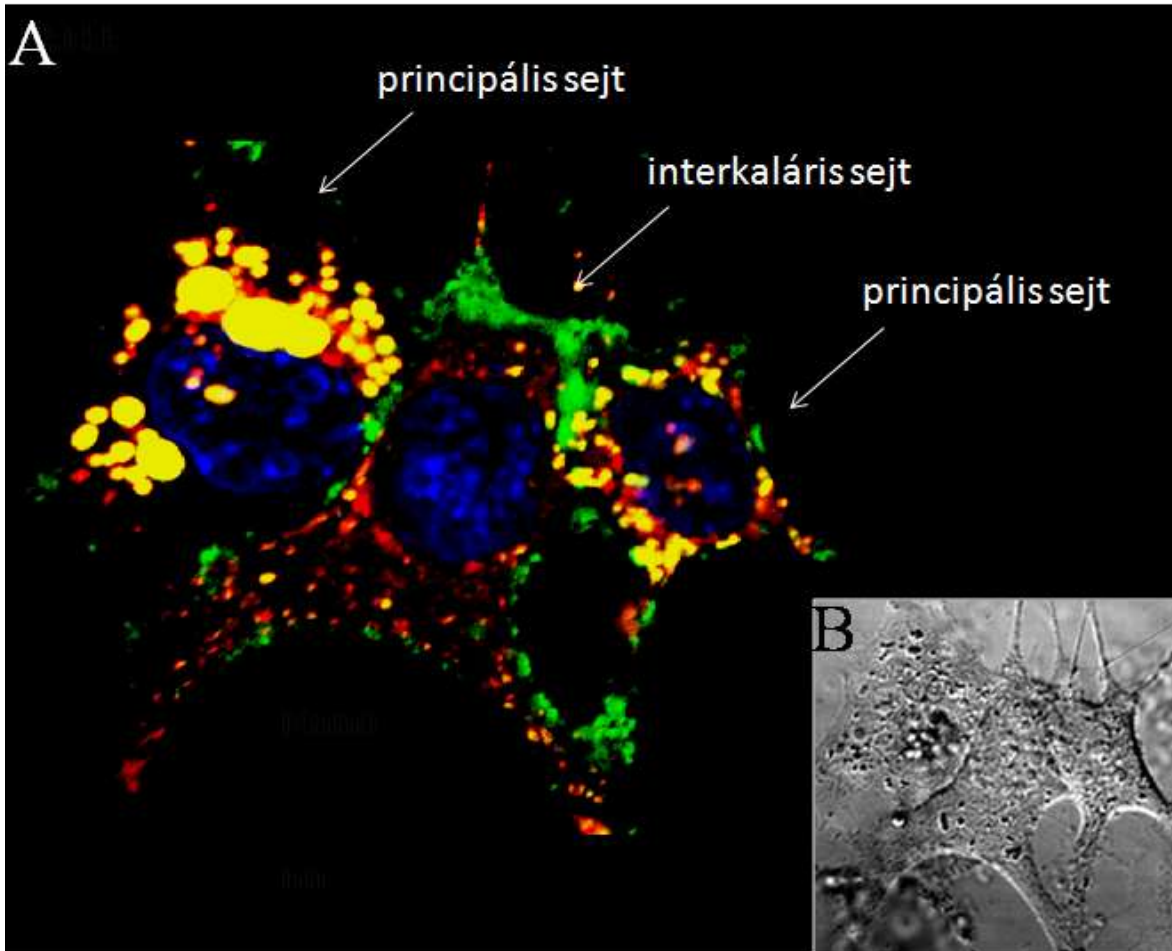
5.1.3. A renin tárolásának, felszabadulásának és aktivitásának direkt kimutatása As4.1 és M1 sejtekben in vitro

A forskolin és IBMX indukálta renin felszabadulást tanulmányoztuk élő sejtvonalakban. A renin aktivitás megjelenítése céljából FRET-alapú renin szubsztrátot (zöld) adtunk a médiumhoz a képződést megelőzően tíz perccel (13. Ábra, A Panel). A sejtek retikuláris mintázattal festődtek mintegy felfedve az endoplazmás retikulum és a Golgi apparátus szintetizáló mechanizmusát. Az acidikus, maghoz közel LysoTracker Red pozitív (piros) vezikulák fokozatosan sárgává, vagyis aktívvá váltak. Míg a sejt felszínhez egész közel a sejtmembránnal fuzionált vezikulumok helyezkedtek el, melyek készek voltak aktív renin tartalmuk szekréciójára. A 13. Ábra, B Panel átmenő fényben ábrázolja a szóban forgó As4.1 sejtet.



13. Ábra: *A renin in vitro direkt kimutatása AS4.1 sejtekben cAMP indukálta renin termelés megjelenítése céljából fluoreszcens rezonancia-energiatranszfer (FRET)-alapú renin szubsztrátot használtunk. **A Panel:** A sejtek retikuláris mintázattal festődtek felfedve az endoplazmás retikulum és a Golgi apparatus szintetizáló mechanizmusát. Az acidikus, maghoz közel még piros vezikulák (Lyso Tracker Red) fokozatosan sárgává váltak, jelezve a (pro)renin érése befejeződött és a fehérje már aktivitással (zöld) rendelkezik. A sejtmembránnal fuzionált vezikulumok zöldre váltak jelezvén az aktív renin szekrécióját. **B Panel** a szóban forgó AS4.1 sejt Differential Interference Contrast (DIC) képét mutatja.*

14. Ábra, A Panel a CD két reprezentatív sejt típusát és azok lokális RAS-ban betöltött szerepét mutatja. Az ábra két oldalán elhelyezkedő principális sejtekben jelentős granulációt láthatunk, mely granulumok nem csak tárolják az aktív renint (zöld), de az apikális lumen felé szekretálják is azt. A szekretált renin hozzákötődik az interkaláris sejt felszínéhez (ábránkon a középső epithel sejt) és ahogy azt a renin aktivitást jelző zöld sáv mutatja, további aktivitást nyer. *A 14. Ábra, B Panel* átmenő fényben ábrázolja a szóban forgó M1 sejtet.

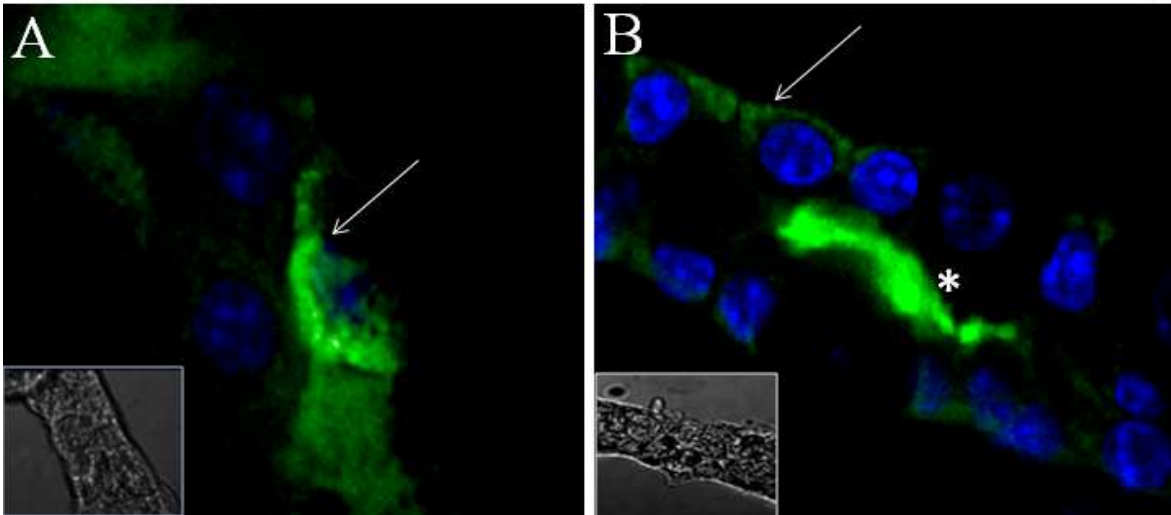


14. Ábra: A renin *in vitro* direkt vizualizációja M1 sejtekben. **A Panel:** Az ábra két oldalán elhelyezkedő princípális sejtek jelentős granulációt mutatnak, mely savas granulumok (LysoTracker Red, piros) nem csak tárolják az aktív renint (fluoreszcens rezonancia-energiatranszfer -alapú renin szubsztát, zöld), de nyilvánvalóan szekretálják is azt az „apikális” lumen felé. A szekretált renin hozzájárul a helyi RAS aktivációhoz, mitöbb, az interkaláris sejtekhez (ábránkon a középső epithel sejt) kötődve, ahogy azt a zöld sávszerű festődés jelzi, további aktivációra tud szert tenni. **B Panel:** a szóban forgó M1 sejtek Differential Interference Contrast (DIC) képét mutatja.

5.1.4. Gyűjtőcsatornabeli renin aktivitás *ex vivo* vizsgálata

Multi-foton lézer szkennelő mikroszkóp alkalmazásával és FRET-alapú renin szubsztát felhasználásával disszekált gyűjtőcsatornában vizsgáltuk a renin aktivitását *ex vivo*. A 15. Ábra két diabéteszes egér reprezentatív CD-jét mutatja. A 15. Ábra, A Panel-én látható princípális sejt nagy mennyiségű renin granulációt mutatott. Granulumjai nem csak tárolták

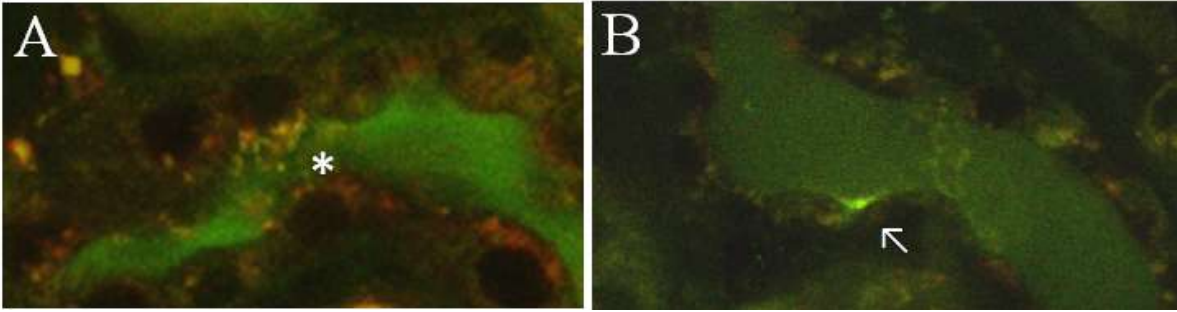
a (pro)renint, de jelentős aktivitással is rendelkeztek (zöld fluoreszcencia). Az aktív renin, felszabadulását követően, felhalmozódott a lumen folyadékban és hozzákötődött az interkaláris sejtek felületéhez (15. *Ábra, B Panel*).



15. *Ábra:* *A renin direkt vizualizációja disszekált gyűjtőcsatornában. Mind az A Panel, mind a B Panel jelentős bazolaterális és citoplazmatikus renin tartalmú (fluoreszcens rezonancia-energiatranszfer -alapú renin szubsztrát, zöld, nyíl) principális sejteket ábrázol, míg a B Panel közepén elhelyezkedő interkaláris sejt (csillag) az apikális felületén megköti a szekretált (pro)renint, így az aktiválódhat illetve tovább aktiválódhat ábránkon zölddel jelezve. A Panelek bal alsó részében a szóban forgó preparátumok Differential Interference Contrast (DIC) képe látható.*

5.1.5. Gyűjtőcsatornabeli renin aktivitás *in vivo* vizsgálata

Diabéteszes egér reprezentatív CD-je renin termelő kapacitást és nagy mennyiségű granulációt mutatott a principális sejtekben (*) (16. *Ábra, A Panel*). Mitöbb, a kolokalizációs mintázat (sárga) alapján tudjuk, hogy a granulumok nem csak tárolták a (pro)renint, de ez az enzim már aktivitással is rendelkezett. Az aktív renin felszabadulását követően felhalmozódott a lumen folyadékban és hozzákötődött az interkaláris sejtek felületéhez (→) (16. *Ábra, B Panel*).

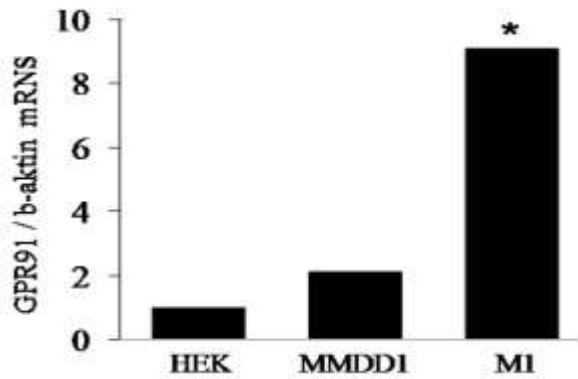


16. Ábra: *A renin in vivo direkt kimutatása gyűjtőcsatornában. A renin aktivitást jelző fluoreszcens rezonancia-energiatranszfer (FRET)-alapú renin szubsztrátot (zöld) közvetlenül mikroinjektáltuk diabéteszes egér gyűjtőcsatornájába (CD). A Lyso Tracker Red által megfestett savas granulomokat piros színben tüntettük fel. A reprezentatív CD-kben elhelyezkedő principális sejtek jelentős renin termelő kapacitást mutattak (*) (A Panel). Mitöbb, a ko-lokalizációs mintázat alapján (sárga) tudjuk, hogy ezek a granulomok nem csak tárolták a (pro)renint, de ez az enzim már aktivitással is bírt. Az aktív (pro)renin, felszabadulását követően, felhalmozódott a lumenáris folyadékban és hozzákötődött az interkaláris sejtek felszínén elhelyezkedő, feltehetőleg PRR-hoz (→) (B Panel).*

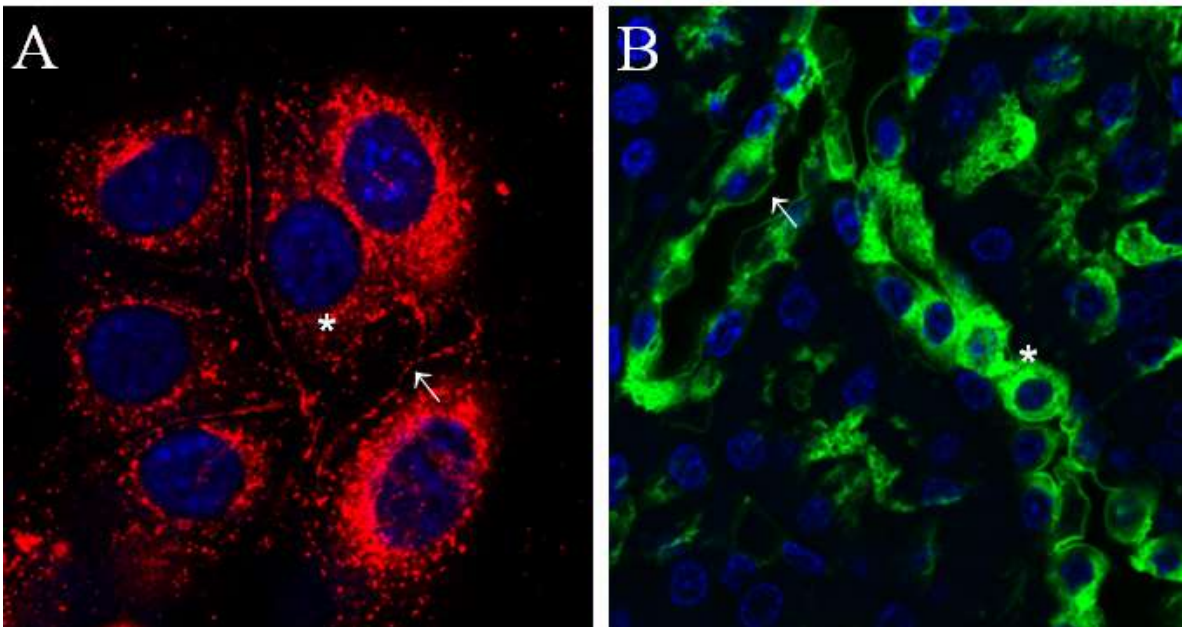
5.2. A szukcinát GPR91-en keresztüli hatása a vese lokális renin-angiotenzin rendszerére

5.2.1. GPR91 mRNS expresszió és lokalizáció M1 sejtekben és a vesében

17. Ábra más releváns vese eredetű sejtvonalak összevetésével mutatja az M1 sejtek kifejezett *de novo* GPR91 szintézisét (* $p \leq 0,05$ vs. MMDD1). E fehérje lokalizációja a következő ábrán (18. Ábra) látható; M1 sejtekben a GPR91 fehérje az átíródást biztosító endoplazmás retikulumban, a glikozilációt végző Golgi apparátusban, majd egy része, funkciójának megfelelően a sejtmembránban volt detektálható (18. Ábra, A Panel). Diabéteszes egér veséjének immunohisztokémiai vizsgálata hasonló lokalizációt mutatott. Továbbá az összekötő szegmenst és a CD-t a GPR91 vese kifejeződésének legfontosabb szakaszaiként azonosítottuk (18. Ábra, B Panel).



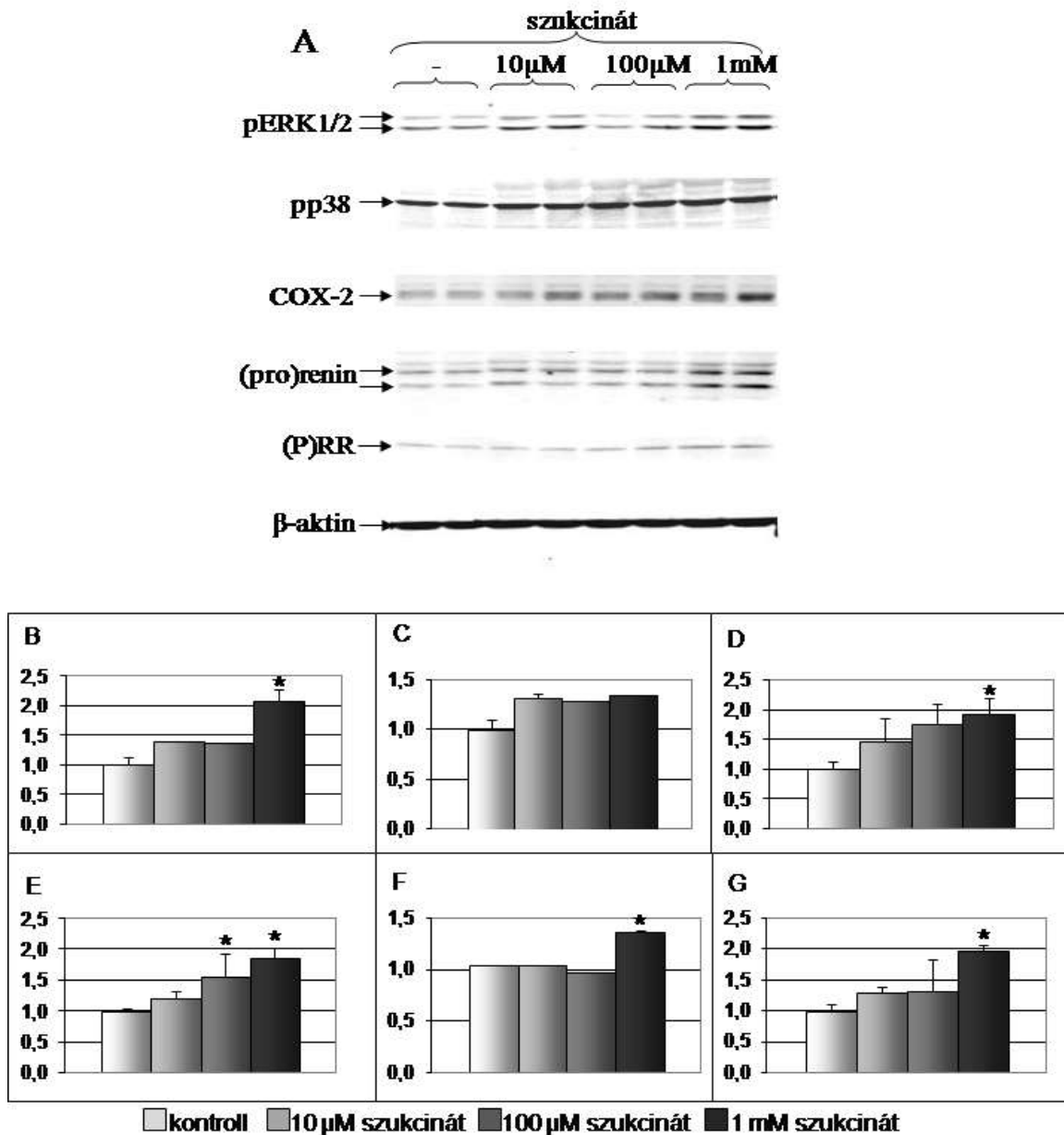
17. Ábra: *GPR91* mRNS expresszió releváns vese eredetű és M1 sejtvonalakban. q-PCR metodikát alkalmazva demonstráltuk, hogy humán embrionális vese sejtvonallal (HEK) vagy makula denza eredetű sejtvonallal (MMDD1) összehasonlítva a gyűjtőcsatorna eredetű M1 sejtvonalat, ez utóbbiban a *GPR91* mRNS ötszörös mennyiségben expresszálódik. * $p \leq 0,05$ vs. ($n=1$) *GPR91*: G protein kapcsolt receptor



18. Ábra: *GPR91* fehérje lokalizáció M1 sejtekben és a vese összekötő szegmensében ill. gyűjtőcsatornájában (CD). Az **A Panel** immunocitokémiai bizonyítékul szolgál a *GPR91* fehérje átíródására és lokalizációjára, mely az endoplazmás retikulumba, majd további glikoziláció (8. és 168. aminosavon) céljából a Golgi apparátusba kerül (*). Érését követően az átíródott *GPR91* egy része kihelyeződik a sejtmembránba (→). A **B Panel**-en diabéteszes egér vesekérgéből készült immunohisztokémiai vizsgálat mutatja ugyanezt a sejten belüli mintázatot (*, →) és felfedi, hogy az összekötő szegmens és a CD a *GPR91* kifejeződésének legjelentősebb két kifejeződési helye. *GPR91*: G protein kapcsolt receptor

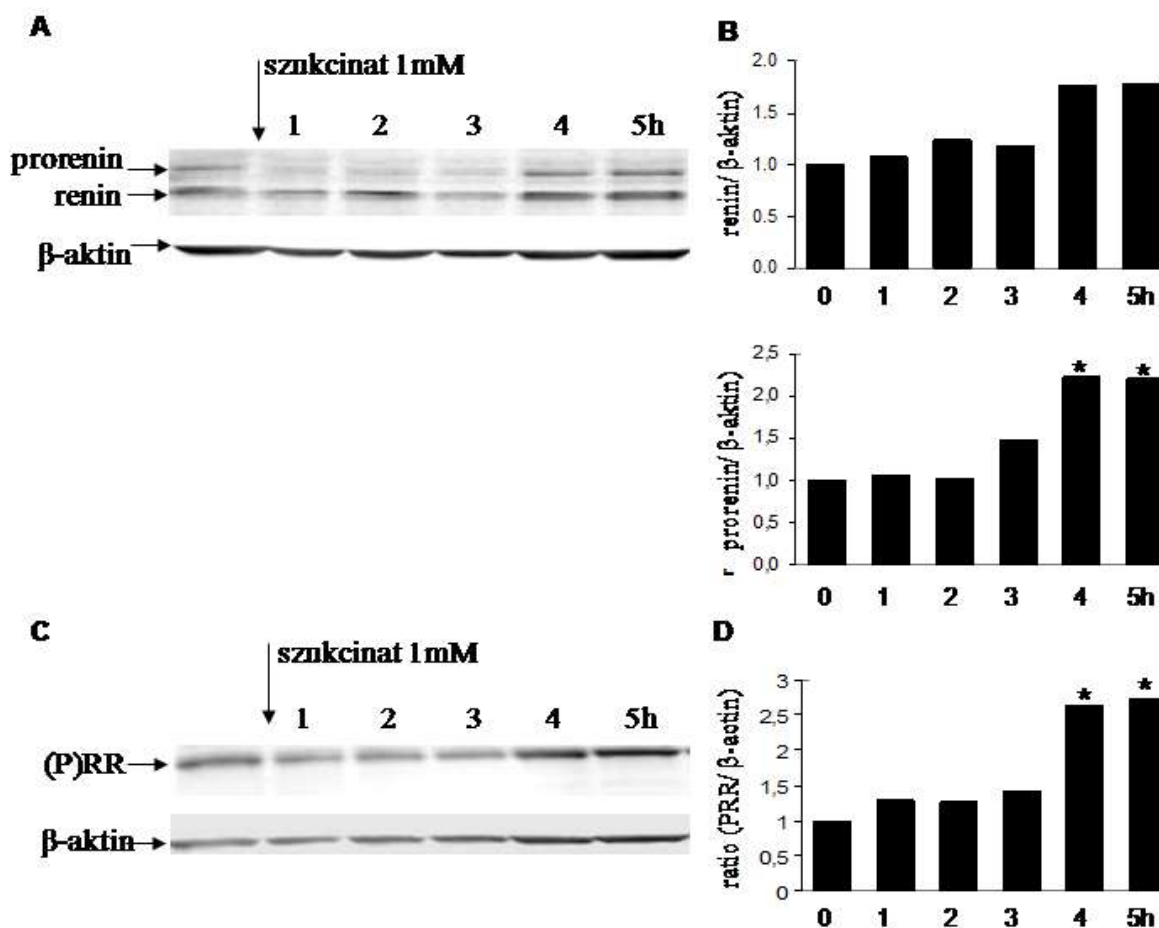
5.2.2. Szukcinát aktiválta intra-renális RAS jelátviteli útvonal M1 sejtekben

A 19. *Ábra, A Panel* reprezentatív immunoblottjai M1 sejtekben mutatja a renin szekréció irányába mutató jelátviteli útvonal tagjait szukcinát kezelést követően: pERK1/2szintje 1,28-, 1,38-, 2,08-szorosra ($p \leq 0,05$ vs. kontroll; 19. *Ábra, B Panel*), pp38 szintje 1,31-, 1,29-, 1,35-szorosra ($p \leq 0,05$ vs. kontroll; 19. *Ábra, C Panel*) és a COX2 szintje 1,45-, 1,76-, 1,91-szörösre ($p \leq 0,05$ vs. kontroll; 19. *Ábra, D Panel*) nőtt a kontroll mintákhoz képest (10 μ M, 100 μ M és 1mM szukcinát kezelést követően). A szukcinát a renin szignifikáns emelkedését eredményezte már olyan alacsony koncentrációban is, mint 10 μ M (1,30-, 1,32-, 1,98-szoros a kontrollokhoz képest; $p \leq 0,05$ vs. kontroll 19. *Ábra, F Panel*), míg a prorenin felhalmozódása csak 1mM-os szukcinát kezelés hatására történt meg (1,00-, 0,98-, 1,36-szoros a kontrollokhoz képest; 19. *Ábra, E Panel*). A (P)RR hasonló választ mutatott a különböző szukcinát koncentrációkra (1,20-; 1,56-; 1,86-szoros a kontrollhoz képest; 19. *Ábra, G Panel*).



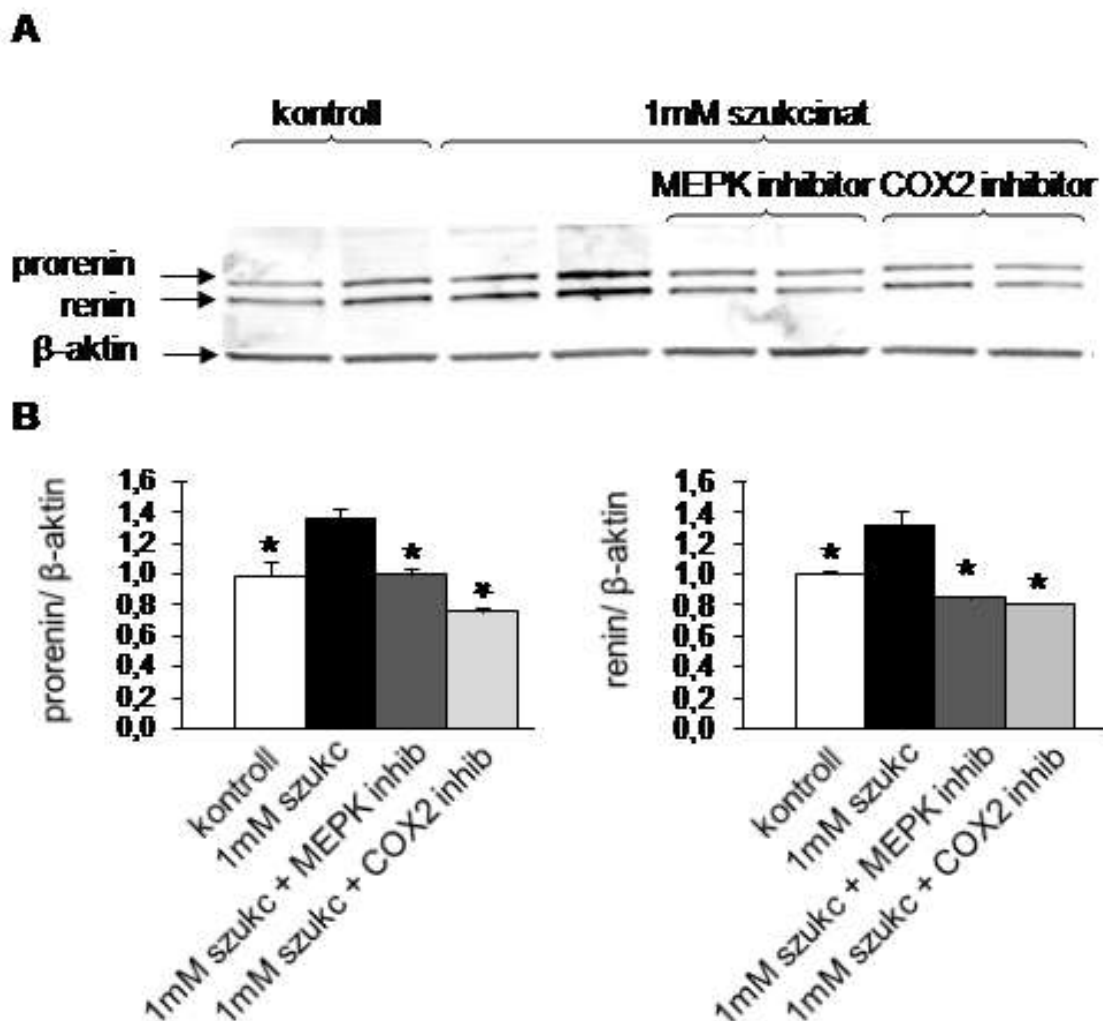
19. Ábra: Dózis-függő sukcinát hatás az M1 sejtek RAS aktivációjában. A sukcinát GPR91 receptorán keresztül triggereli azt az intra-renális szignál kaskádát, mely magába foglalja mindkét MAP kinázt, az ERK $\frac{1}{2}$ -t és a p38-at, következményes COX2 emelkedést váltva ki, mely végső soron (pató)fiziológiás RAS aktivációt eredményez. Az **A Panel** reprezentatív immunoblottokkal demonstrálja e szignál útvonal lépéseit. A **B, C, D, E, F, G Panel** az ERK $\frac{1}{2}$ foszforilációját, a p38 foszforilációját, a COX-2, a prorenin, renin és prorenin receptor termelődését mutatja 10 μ M, 100 μ M és 1mM sukcinát kezelést követően. * $p \leq 0,05$ vs. kontroll. (n=2) ERK $\frac{1}{2}$: extracelluláris szignál regulálta protein kináz, p38: 38kDa fehérje, COX2:ciklooxigenáz 2.

A szukcinát jelátviteli út idő-függésének leírására a leghatásosabb, 1 mM-os koncentrációt alkalmaztuk M1 sejteken. A negyedik órára szignifikáns emelkedést tapasztaltunk mind a (pro)renin (1,07-, 1,02-, 1,46-, 2,23-, 2,21-szoros és 1,08-, 1,24-, 1,18-, 1,76-, 1,78-szoros; prorenin és renin az 1- 5 órában; $p \leq 0,05$ vs. kontroll; 20. *Ábra, A,B Panel*), mind a (P)RR szintekben (1,29-, 1,26-, 1,43-, 2,64-, 2,72-szoros az 1- 5 órában; $p \leq 0,05$ vs. kontroll; 20. *Ábra, C,D Panel*)



20. *Ábra:* Idő-függő szukcinát hatás az M1 sejtek RAS aktivációjában A szukcinát GPR91 receptorán keresztül idő-függően serkenti a prorenin, renin (A, B Panel) és (pro)renin receptor ((P)RR) (C, D Panel) termelődését. 1mM-os szukcinát kezelést követő 4. órára mindhárom fehérje szintje szignifikánsan megemelkedett a kontroll csoporthoz képest. * $p \leq 0,05$ vs. kontroll.

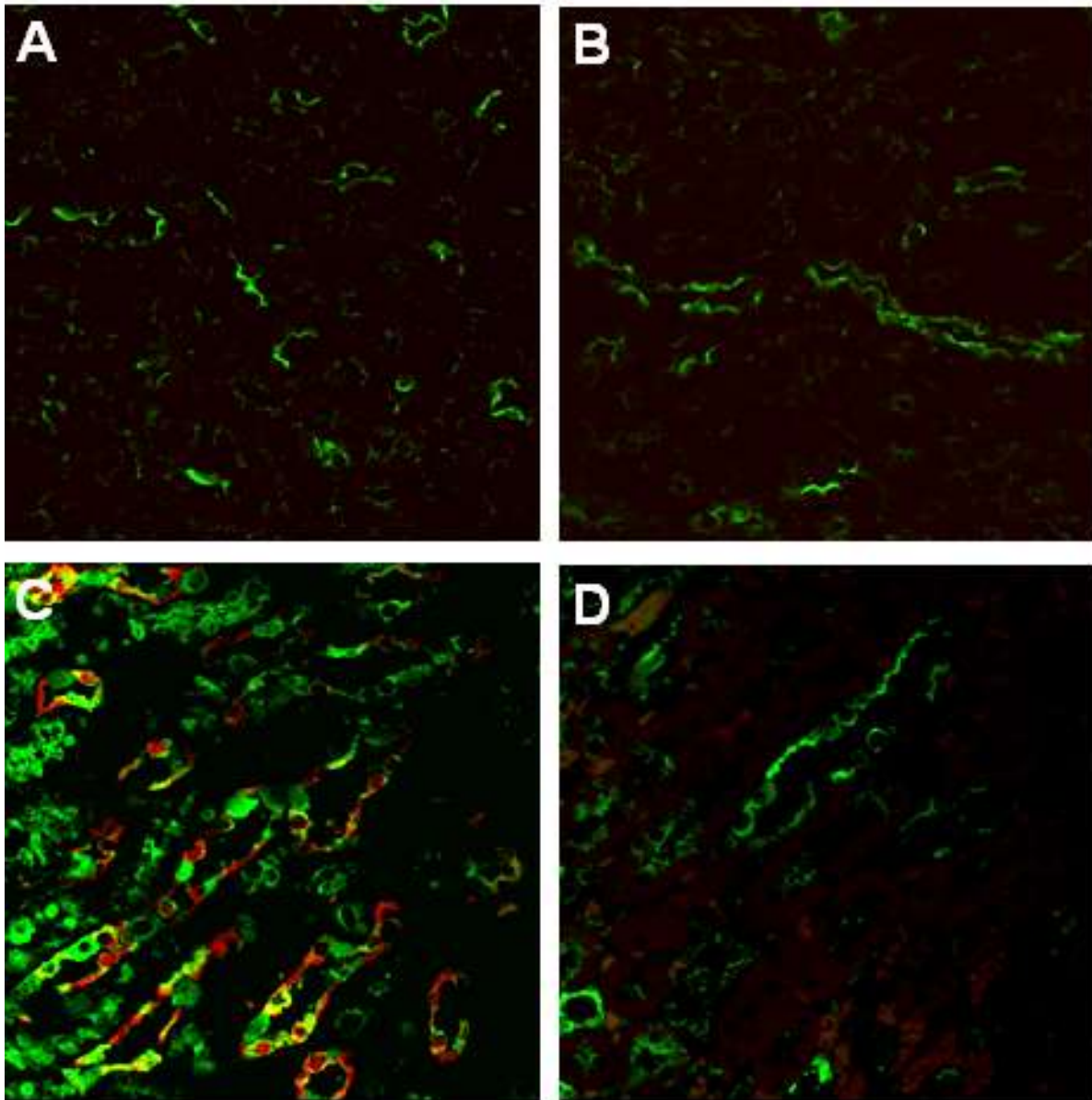
A szukcinát hatása a (pro)reninre teljes mértékben eltűnt 10 μ M PD98059, egy MEK-1 inhibitor és 50 μ M SC58236, egy szelektív COX2 inhibitor kezelés hatására (1,36-; 0,76-; 1,00-szeres növekedés a proreninben; 1,32-; 0,81-; 0,85-szeres növekedés a reninben, $p \leq 0,05$ vs. kontroll; 21. Ábra, A, B Panel) (Ábra 4).



21. Ábra: A szukcinát specificitása a MEK és COX2 útvonalra a RAS aktivációjában. 1mM-os szukcinát kezelést követő 24. órára a szignifikáns (pro)renin fehérje szintézis emelkedés elmaradt 10 μ M PD98059, MEK-1 inhibitor és 50 μ M SC58236, szelektív COX2 inhibitor kezelés következtében, e két fehérje GPR91 jelátviteli útvonalban betöltött eszenciális szerepét bizonyítva. **A Panel:** reprezentatív immunoblottok, **B Panel:** a (pro)renin denzitometriás analízise. * $p \leq 0,05$ vs. 1mM szukcináttal kezelt csoport. MAPK: mitogén aktiválta proteinkináz; COX2: ciklo-oxigenáz 2.

5.2.3. Gyűjtőcsatornabeli GPR91 kiváltotta pERK1/2 szignál

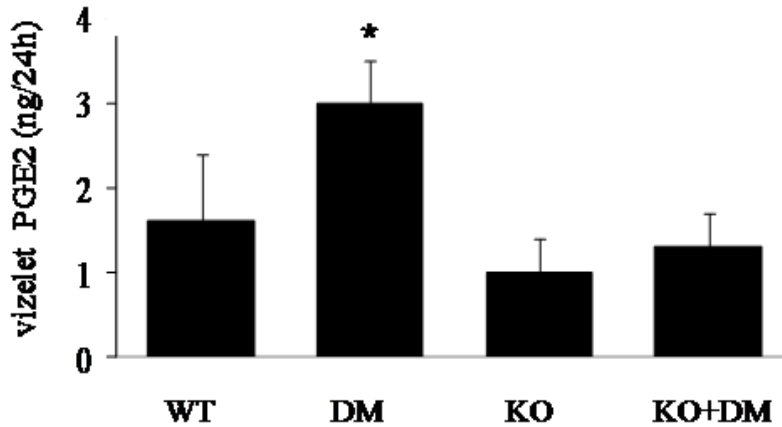
A GPR91-kiváltotta útvonal első szignál lépésének, a pERK1/2-nek a mennyisége jelentősen megemelkedett diabéteszes állat veséjében; az AQP2 festés rámutatott az összekötő szegmens és a CD azon tubulus szakaszokra, melyek kifejezett emelkedést mutattak az ERK $\frac{1}{2}$ foszforilálása szempontjából a diabéteszes GPR91^{+/+} egerekben. Ebben a csoportban a sejtek ötvenhat százalékában az ERK $\frac{1}{2}$ útvonal aktiválódott (22. *Ábra, C Panel*). A pERK1/2szintek a detektálás határa alatt voltak diabéteszes, de GPR91^{-/-} egerekben (22. *Ábra, D Panel*).



22. Ábra: *GPR91* aktiváció kiváltotta *pERK1/2* foszforiláció a gyűjtőcsatornában. Az aquaporin-2 festés (zöld) azonosította az összekötő szegmenst és a gyűjtőcsatornát, melyekben az *ERK1/2* foszforilációja (piros) kifejezett emelkedést mutatott diabéteszes *GPR91*^{+/+} egerekben; a sejtek ötvenhat százaléka az *ERK1/2* útvonal aktivációját mutatta (**C Panel**), míg mind a kontroll állatokban (**A, B Panel**), mind diabéteszes, ám *GPR91*^{-/-} egerekben a *pERK1/2* mennyisége a detektálás határa alatt volt (**D Panel**). *pERK1/2*: extracelluláris szignál regulálta protein kináz; *GPR91*: G protein kapcsolt receptor

5.2.4. *PGE₂ termelés, mint a renin szekréció végső triggere*

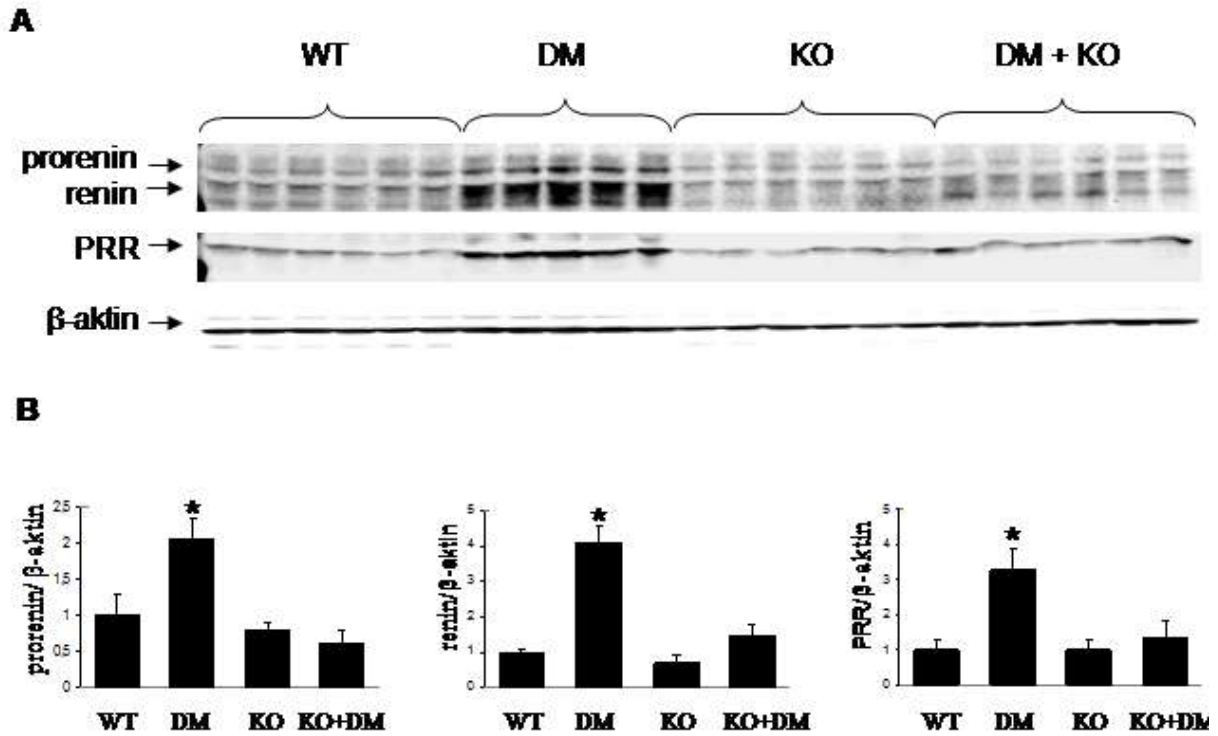
A PGE₂ szignifikánsan emelkedett diabéteszes állatok vizelet mintáiban. Ezzel szemben a GPR91 hiánya kivédte ezt az emelkedést (1,6±0,8; 3,0±0,5; 1,0±0,4; 1,3±0,4; WT; DM; KO; DM+KO; $p \leq 0,05$ vs.WT) (23. *Ábra*).



23. *Ábra*: A PGE₂ szekréció, mint a renin kiválasztás végső triggere. WT (vad-típus), DM (diabétesz mellitusz), KO (knock out) és KO+DM állatok vizelet mintáin végeztünk ELISA mérést. A PGE₂ szignifikánsan megemelkedett diabéteszes állatok vizelet mintáiban, míg a GPR91 hiánya kivédte ezt az emelkedést. * $p \leq 0,05$ vs.WT. GPR91: G protein kapcsolt receptor Köszönet Sarah Vargas segítségéért.

5.2.5. *A szukcinát befolyásolja a lokális RAS aktivációját in vivo*

Mind a (pro)renin, mind a (P)RR fehérje expressziója kifejezett emelkedést mutatott (1,00-, 2,06-, 0,8-, 0,62-szoros, 1,00-, 4,12-, 0,68-, 1,47-szoros és 1,00-, 3,26-, 0,98-, 1,34-szoros, prorenin, renin, PRR; WT, DM, KO, DM+KO) négy héttel a STZ kezelés által sikeresen indukált DM kialakulását követően. Ezzel szemben a STZ-kezelt, de GPR91^{-/-} állatok nem mutatták jelét a lokális RAS aktiválódásának (24. *Ábra*).

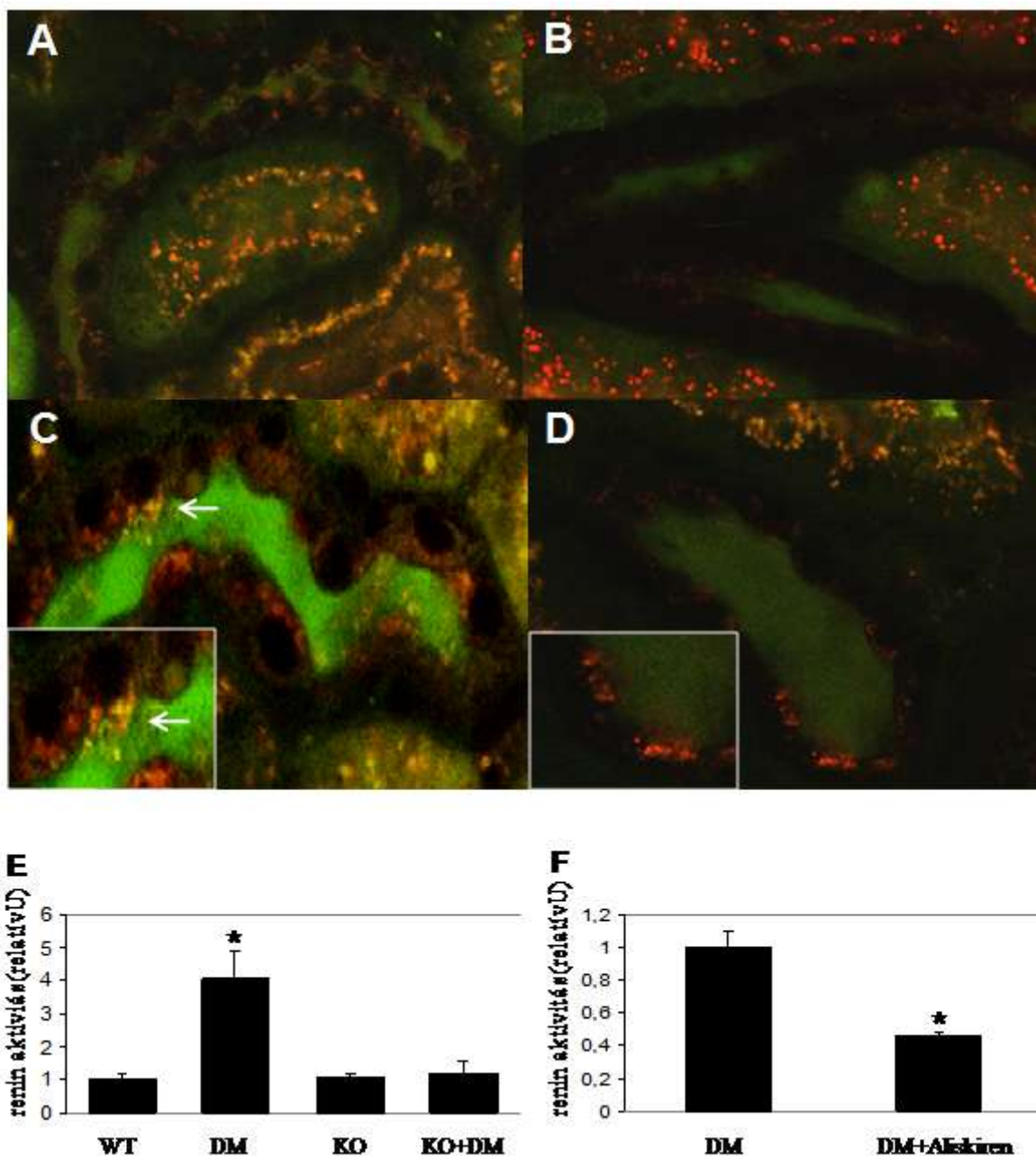


24. Ábra: Szukcinát hatása a lokális RAS aktivációjában. *A Panel:* reprezentatív immunoblottok mutatják a medulláris prorenin, renin és (pro)renin receptor ((P)RR) fehérje mennyiségeit vad típus (WT), DM, knock out (KO) és KO+DM csoportokban. Mind a (pro)renin, mind a (P)RR fehérje expressziója robosztus emelkedést mutatott négy héttel a streptozotocin (STZ) kezelés indukálta diabétesz mellitusz kialakulása után. Míg a STZ-kezelt, de GPR91 KO állatok nem mutatták jelét a lokális RAS aktiválódásának jelezvén, hogy a szukcinátnak a GPR91-en keresztül alapvető szerepe van ebben a kaszkádban. *B Panel:* denzitometriás analízis eredményeinek grafikus ábrázolása a proreninre, reninre és prorenin receptorra vonatkozólag. * $p \leq 0,05$ vs. WT. GPR91: G protein kapcsolt receptor

5.2.6. Renin aktivitás a gyűjtőcsatornában és a vizeletben

A multi-foton fluoreszcens lézer szkennelő mikroszkóppal és a mikropunkció finom technikájával a FRET-alapú renin szubsztrátot közvetlenül a CD-be injektáltuk, majd *in vivo* vizualizáltuk a veseszövetet. A kontroll állatok CD-jében érdemben nem találtunk renin granulációt (25. Ábra, A Panel). A GPR91^{-/-} egerekben még az összekötő szegmens sem, ami egyébként a legnagyobb renin termelő kapacitással bíró szegmens, mutatott

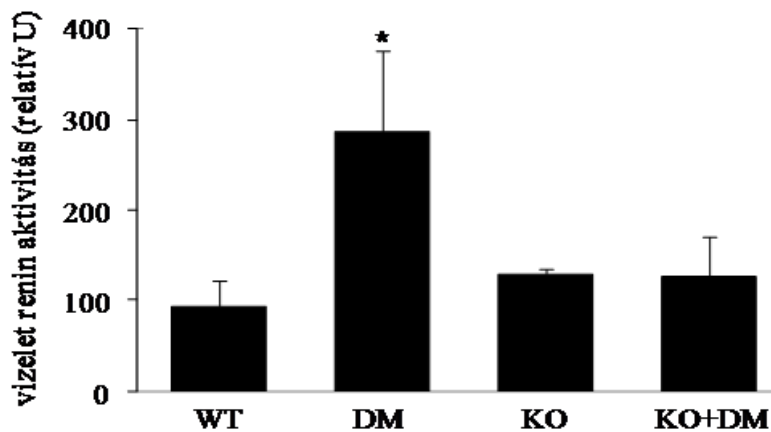
szignifikáns granulációt vagy aktív renint (25. *Ábra, B Panel*). Ezzel ellentétben a GPR91 WT diabéteszes egerek CD-je hatalmas mértékű granulációt mutatott a principális sejtekben (25. *Ábra, C Panel*). Továbbá, ahogy a ko-lokalizáció feltárta (sárga), ezek a granulumok nem csak prorenint tároltak, hanem már aktív reninné konvertálódott hormont is. Negyedik csoportunkban a GPR91^{-/-} DM egerekben, a GPR91 hiánya kivédte a megnövekedett renin aktivitást (25. *Ábra, D Panel*). (1,00-, 4,05-, 1,08-, 1,20-szoros; WT, DM, KO, DM+KO; * $p \leq 0,05$ vs.WT) (25. *Ábra, E Panel*). A FRET-alapú fluorogénikus renin szubsztrát specificitását Aliskiren kezelést követően bizonyítottuk, 50mg/kg/nap, i.p., két héten keresztül adagolás a renin aktivitás 46%-os csökkenését eredményezte (25. *Ábra, F Panel*).



25. Ábra: A gyűjtőcsatornabeli renin aktivitás multi-foton mikroszkóppal történő *in vivo* kimutatása. Négy héttel a streptozotocin (STZ) kezelést követően, a diabétesz mellitusz kialakulása után a renin aktivitást jelző fluoreszcens rezonancia-energiatranszfer (FRET)-alapú renin szubsztrátot (zöld) és a savas organelumokat megfestő Lyso Tracker Red-et (piros) mikroinjektáltunk vad típus (WT), diabétesz mellitusz (DM), és knock out (KO)+DM csoportok veséjének kortikális gyűjtőcsatornájába (CD), majd multi-foton mikroszkóppal vizualizáltuk azt. A kontroll állatok CD-jében nem volt granuláció (A Panel). A GPR91 KO egerekben még az

összekötő szegmens sem mutatott granulációt vagy aktív renint (**B Panel**). Ezzel ellentétesen egy GPR91 WT diabéteszes egér reprezentatív CD-jében a principális sejtek jelentős mértékben tartalmaztak granulációt (→) (**C Panel**). Ezek a granulumok nem csak prorenint tároltak, de már aktív renin tárolóvá is váltak. GPR91 KO DM egerekben, a GPR91 hiánya kivédte a renin aktivitás növekedését (**D Panel**). Az **E Panel** a képalkotással nyert renin aktivitást számszerűsítve ábrázolja. * $p \leq 0,05$ vs.WT Az **F Panel** a FRET-alapú fluorogénikus renin szubsztrát specificitását bizonyítja Aliskiren (50mg/kg/nap, i.p., két héten keresztül) kezelést követően. * $p \leq 0,05$ vs.WT DM. GPR91: G protein kapcsolt receptor Köszönet Jim Burford segítségéért.

Spektrofluorometriával kimutatható volt, hogy a kontroll egerekre jellemző alacsony renin aktivitás robusztusan megemelkedett diabéteszes állatok vizeletében (94,7±29,4; 286,7±88,5; 129,8±6,5; 125,8±44,8; WT; DM; KO; DM+KO; $p \leq 0,05$ vs.WT), a GPR91 hiánya pedig kivédte a renin aktivitás jelentős növekedését (26. Ábra).

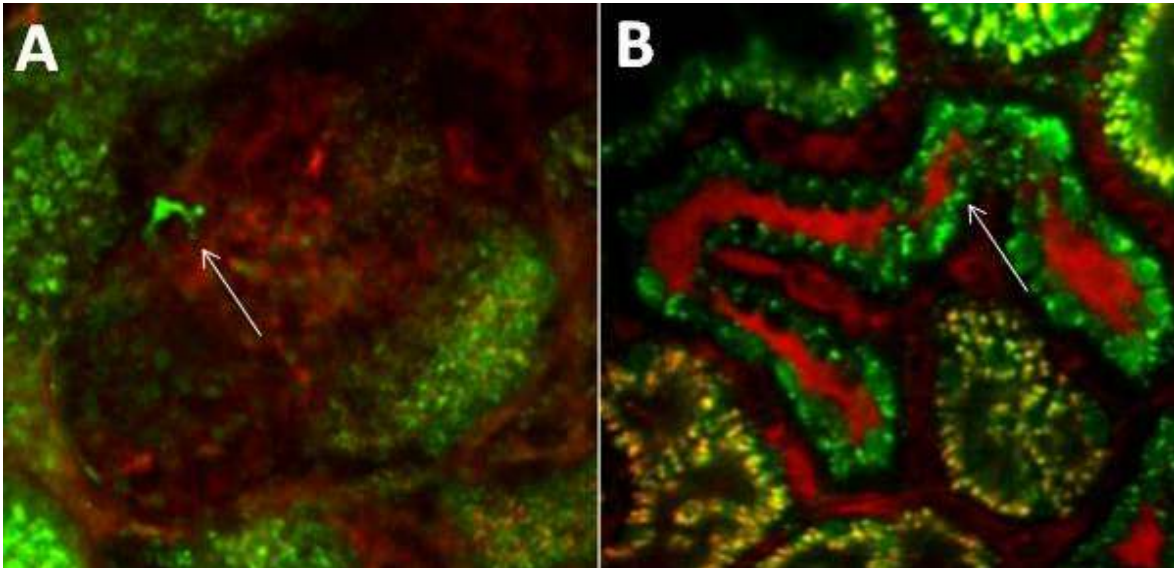


26. Ábra: A szukcinát hatása a vizelet renin aktivitásra. Spektrofluorometriával vad típus (WT), diabétesz mellitusz (DM), knock out (KO) és KO+DM csoportok vizelet renin aktivitását hasonlítottuk össze. A kontroll egerek alacsony renin aktivitása szignifikánsan megemelkedett diabéteszes állatok vizeletében, míg a GPR91 hiánya a renin aktivitást a kontroll állatokéhoz mérhetővé tette. * $p \leq 0,05$ vs.WT. GPR91: G protein kapcsolt receptor

5.3. A calcineurin inhibitorok hatása a vese renin-angiotenzin rendszerére

5.3.1. A JGA és gyűjtőcsatornabeli renin képződésének beállítása

Itthon végzett multi-foton vizsgálatainknak is első lépése volt a renin két lokalizációban történő kimutatása. A savas granulumokat megfestő quinacrin kirajzolta a renin jelenlétét egyrészt a JGA-ban (27. *Ábra, A Panel, nyíl*), másrészt feltételezhetően a principális sejtekben a gyűjtőcsatorna bazolaterális oldalán és apikális felszínén vonalszerű, valamint a citoszólban granuláris mintázatot mutatva (27. *Ábra, B Panel, nyíl*).

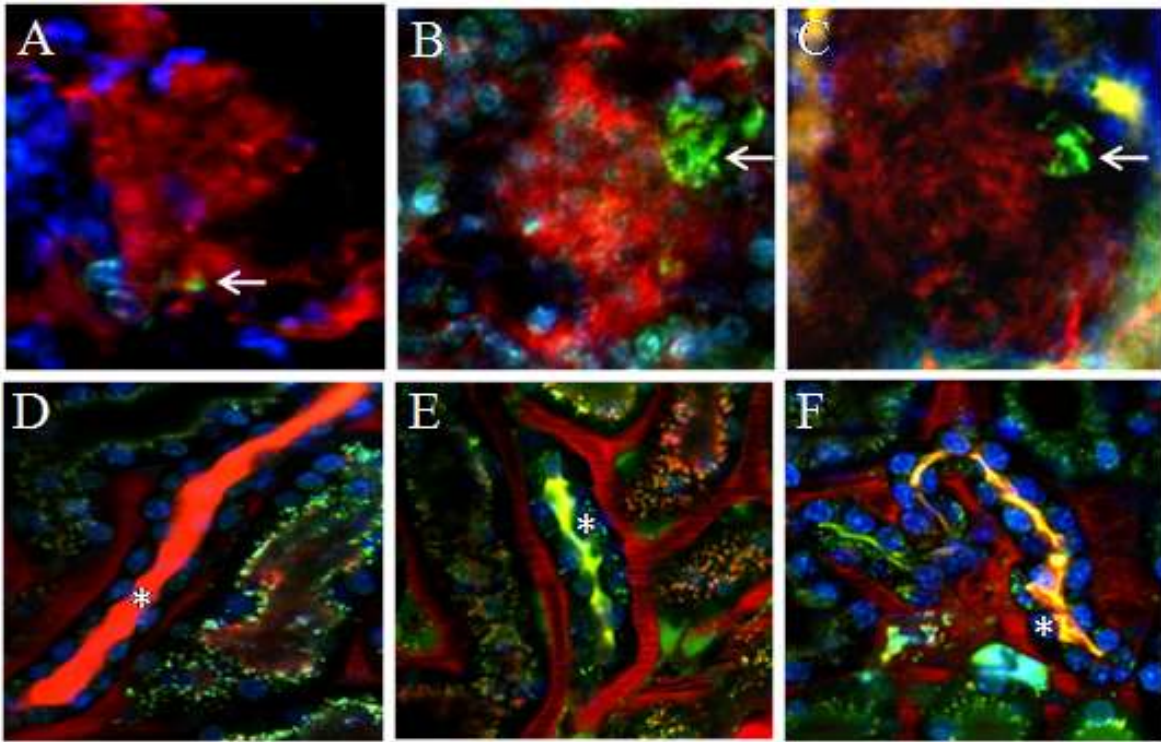


27. *Ábra:* A JGA és gyűjtőcsatornabeli renin képződésének beállítása A savas granulumokat megfestő quinacrint (zöld) használtuk, hogy méréseinkkel a renin termelést vizualizáljuk. 70 kDa Rhodamin dextran (piros) tette lehetővé az intravaszkuláris tér képződését. Az **A Panel** JGA-ban elhelyezkedő, 2-3 sejtől álló granuláris renin termelő sejtcsoportot mutatja (→), míg a **B Panel** egy festéktörmelék halmozó gyűjtőcsatornát jelez, melynek némely, feltehetőleg principális sejtjében, a quinacrin jelentős renin granulációt fed fel (→).

5.3.2. Immunoszuppresszívumok kiváltotta renin termelés multi-foton mikroszkóppal való detektálása

A multi-foton technika és a renin kimutatás beállítását követően kísérleti felállásunkban három csoportban vizsgáltuk az immunoszuppresszívumok okozta renin mennyiségének,

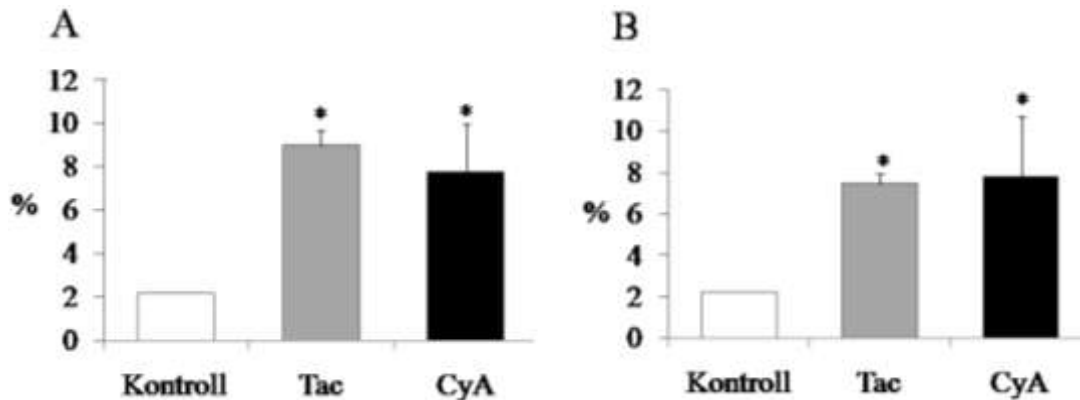
termelésének és szekréciójának változását (28. *Ábra*). Kontroll egerek JGA-jában csupán néhány renint szekretáló granuláris sejtet láttunk, ám gyűjtőcsatornájukban alig, ha egyáltalán látható volt granuláció (28. *Ábra*, *A és D Panel*). Ezzel szemben a Tac kezelt csoport állatainak JGA-ja nagyobb számú, renin termelő sejtekké visszadifferenciálódott granuláris sejtet tartalmazott (28. *Ábra*, *B Panel*). Kétségtelenül a gyűjtőcsatorna lokalizációban is fokozott granuláció volt megfigyelhető (28. *Ábra*, *E Panel*). A CyA kezelt csoport hasonló képet mutatott, mindkét általunk vizsgált lokalizációban a kontroll egerekhez képest szignifikánsan megnőtt a renin jelenléte (28. *Ábra*, *C és F Panel*).



28. *Ábra*: Calcineurin inhibitorok kiváltotta renin termelés multi-foton mikroszkóppal való in vivo kimutatása. Egerek három csoportját kezeltük három hétig fiziológias sóoldattal, 2 x 0,075 mg/kg/nap Tacrolimus-szal (Tac) és 1 x 2mg/kg/nap Cyclosporin A-val (CyA). Kontroll egerek JGA-jában csupán néhány renint szekretáló granuláris sejt látható (*A Panel*, →) és gyűjtőcsatornájukban alig, ha egyáltalán van granuláció (*D Panel*, *). Ezzel szemben a Tac kezelt csoport állatainak JGA-ja nagyszámú, renin termelő sejtekké visszadifferenciálódott granuláris sejtet tartalmaz (*B Panel*, →). A gyűjtőcsatorna lokalizációban is fokozott granuláció figyelhető meg (*E Panel*, *). A CyA kezelt csoport hasonló képet mutatott, mindkét általunk vizsgált lokalizációban, a kontroll egerekhez képest szignifikánsan megnőtt a renin jelenléte (*C, F Panel*, granularis sejt renin tartalma →, principalis sejt renin tartalma *).

5.3.3. Immunoszuppresszívumok kiváltotta renin termelés áramlási citometriával való mérése

Áramlási citometriával elkülönítettük a fentebb vizsgált képleteket. AQP2-t használtunk a principális sejtek szeparálásához, mellyel lehetővé vált e sejtpopulációnak a vesében található minden más sejttől való külön vizsgálata. Ezt követően a két sejtpopuláción belüli renin termelő sejteket különítettük el. A 29. *Ábra, A Panel* mutatja, míg kontroll állatok principális sejtjeinek csupán 2%-a termelt és szekretált renint, addig ez három hetes immunoszuppresszáns kezelést követően már szignifikánsan megnőtt, négyszerese volt mindkét kezelt csoportban. A renin tartalom hasonlóan alakult a JGA esetében is (29. *Ábra, B Panel*).

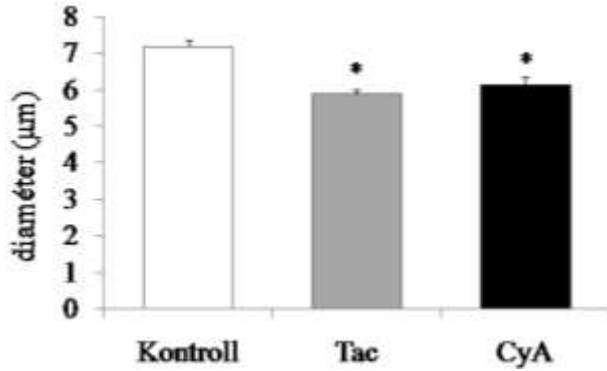


29. *Ábra:* Calcineurin inhibitorok kiváltotta renin termelés áramlási citometriával való megítélése. Három hétig kezeltünk egereket fiziológias sóoldattal, 2 x 0,075 mg/kg/nap Tacrolimus-szal (Tac) és 1 x 2mg/kg/nap Cyclosporin A-val (CyA). FACS analizissel AQP2 antitestet használtunk a principális sejtek elkülönítéséhez. Ezt követően a két sejtpopuláción belüli renin termelő sejteket választottuk el. Az **A Panel** kontroll állatok principális sejtjeit mutatja, melyeknek csupán 2%-a termel és szekretál renint. Három hetes immunoszuppresszáns kezelést követően ez az arány szignifikánsan megnőtt, négyszerese volt mindkét kezelt csoportban. A renin tartalom hasonlóan alakult a JGA esetében is (**B Panel**). * $p \leq 0,05$ vs. kontroll.

5.3.4. Fokozott renin termelés következtében kialakuló vazokonstriktió multi-foton mikroszkóppal való detektálása

A renin közvetlen hatásának egyikeként, az érátmérők változását multi-foton technika felhasználásával vizsgáltuk. Az 30. *Ábra* szépen demonstrálja, miszerint a kontroll állatok

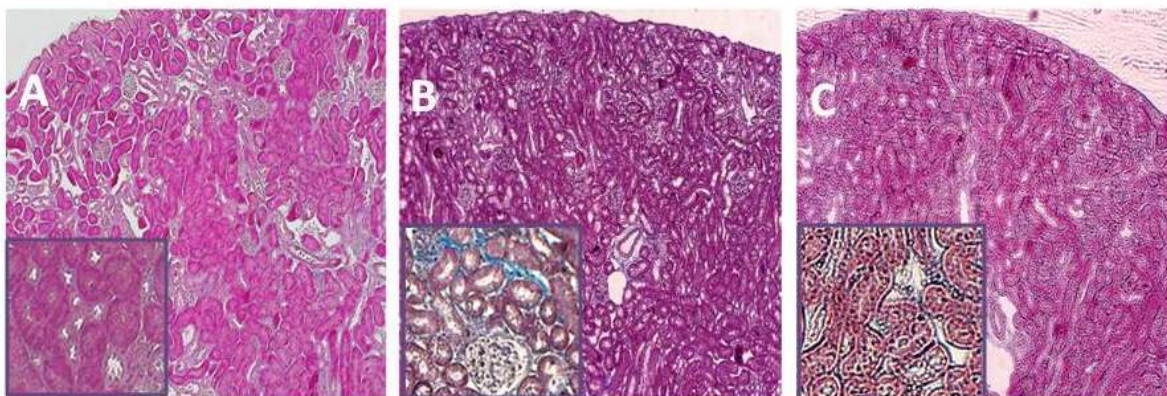
megközelítőleg 7 μm -es átlagos érátmérője közel 2 μm -t csökkent, a megnövekedett renin szekréció így 50%-os kontrakciót hozott létre mindkét vizsgált csoportban.



30. Ábra: Fokozott Renin Termelés Következtében Kialakuló Vazokonstriktió Multi-Foton Mikroszkóppal való Detektálása. Egerek három hetes fiziológiás sóoldattal, 2 x 0,075 mg/kg/nap Tacrolimus-szal (Tac) és 1 x 2mg/kg/nap Cyclosporin A-val (CyA) való kezelése történt. Az érátmérők közvetlen megítélésére a multi-foton mikroszkópia által volt lehetőségünk. A kontroll állatok megközelítőleg 7 μm -es átlagos érátmérője közel 2 μm -t csökkent, a megnövekedett renin szekréció ilyen fokú kontrakciót hozott létre mindkét vizsgált csoportban. * $p \leq 0,05$ vs.kontroll.

5.3.5. Fokozott renin termelés következtében kialakuló vazokonstriktió és hipoxia hisztológiai leírása

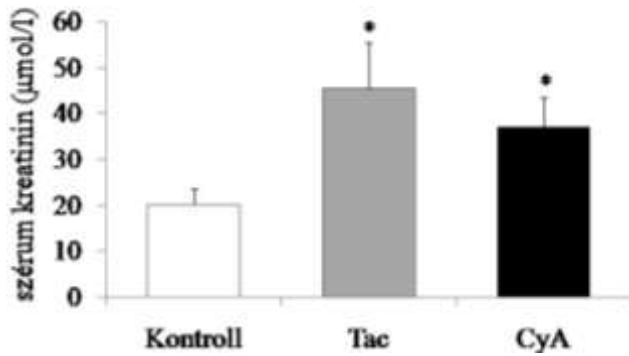
A 31. Ábra-n jól látható, hogy kontroll állatok Masson festése nem mutatott fibrotikus elváltozást (31. Ábra, A Panel), míg a két kezelt csoportban fellelhetők voltak az erek mellett futó köteges, kollagén rostok kék színben való festődése (31. Ábra, B, C Panel),



31. Ábra: Fokozott renin termelés következtében kialakuló vazokonstrikció és következményes hipoxia hisztológiai leírása. Három hétig fiziológias sóoldattal, 2 x 0,075 mg/kg/nap Tacrolimus-szal (Tac) és 1 x 2mg/kg/nap Cyclosporin A-val (CyA) kezeltünk egereket, majd Masson szerint festettük meg az érkontrakció következtében kialakuló makroszkóposan köteges megjelenésű elkötszövetesedést. Kontroll állatok veséje nem mutatott fibrotikus elváltozást (**A Panel**), míg a két kezelt csoportban fellelhetők voltak a köteges, erek mellett futó kék kollagén rostjai (**B, C Panel**).

5.3.6. Immunoszuppresszívumok kiváltotta vesefunkció romlás labor paramétereivel való megítélése

Kísérleti felállásunk utolsó lépéseként a vese funkcionális változását vizsgáltuk. A kontroll állatok szérum kreatinin szintjéhez képest mind a CyA, mind a Tac kezelt csoportban szignifikánsan megnőtt ezen vesefunkciós paraméterek szintje (* $p \leq 0,05$ vs.kontroll; 32. Ábra).

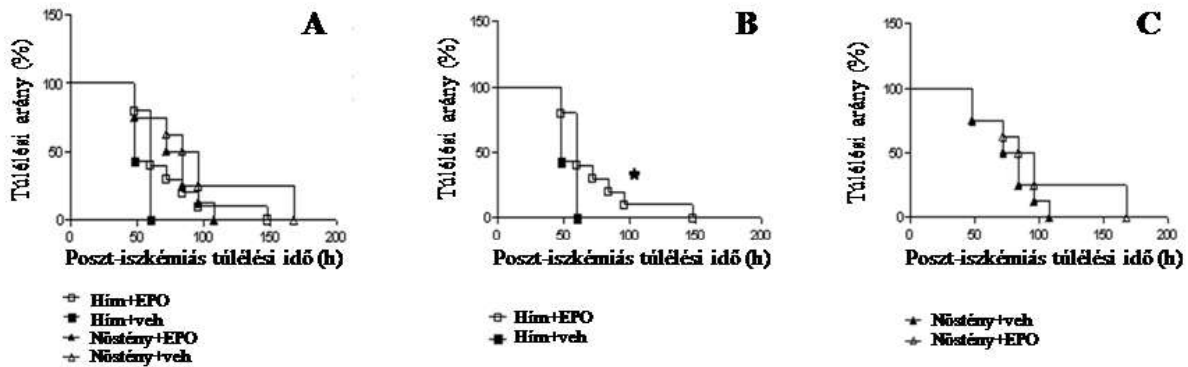


32. Ábra: Calcineurin inhibitorok kiváltotta vesefunkció romlás labor paramétereivel való megítélése. Három hétig fiziológias sóoldattal, 2 x 0,075 mg/kg/nap Tacrolimus-szal (Tac) és 1 x 2mg/kg/nap Cyclosporin A-val (CyA) kezeltünk egereket. Kontroll állatok szérum kreatinin szintjéhez képest mind a CyA, mind a Tac kezelt csoportban szignifikánsan megnőtt ezen vesefunkciós paraméter szintje. * $p \leq 0,05$ vs. kontroll.

5.4. Az eritropoietin szerepe a vese iszkémia/reperfúziós károsodásában

5.4.1. EPO kezelt hím és nőstény patkányok iszkémia/reperfúziós károsodást követő túlélése

Az EPO kezelés jelentős javulást eredményezett a hímek poszt-iszkémiás túlélésében ($p \leq 0,05$ vs. vehikulum kezelt hím). Míg minden kezelésben részesült hím akut veseelégtelenség (ARF) következtében a harmadik napra meghalt, az EPO kezelésben részesülők kétszer annyi ideig, a hatodik napig túléltek (36. Ábra, C Panel). Az EPO enyhe növekedést eredményezett nőstények túlélésében is. Megjegyzendő azonban, hogy függetlenül az EPO kezeléstől, a nőstények túlélése minden esetben szignifikánsan jobb volt, mint hím társaiké (33. Ábra).



33. Ábra: EPO kezelt hím és nőstény patkányok 50 perces egyoldali vese iszkémia/reperfúziós károsodást követő túlélése. Az **A Panel** a nőstény+veh, nőstény+EPO, hím+veh és hím+EPO csoportok összehasonlítását mutatja, a **B Panel** a hím+veh és hím+EPO csoportok túlélését ábrázolja és a **C Panel** a nőstény+veh és a nőstény+EPO csoportok összehasonlítását mutatja ($n=8/\text{csoport}$). Szignifikánsan jobb túlélést tapasztaltunk a hím+EPO állatoknál összevetve a hím+veh csoporttal. $*p < 0.05$ vs. hím+veh kezelt csoport. EPO: eritropoietin

5.4.2. Szérum EPO szintek

Az endogén szérum EPO szintek magasabbak voltak hímekben, mint nőstényekben nem csak a kontroll állatokban, de mindkét poszt-iszkémiás időpontban is ($p \leq 0,05$). Az EPO kezelés mindkét nemben megnövelte a kontroll és a T2-es EPO szinteket (kezeletlen vs. kezelt $p \leq 0,05$), míg T24-ben az exogén EPO hatása eltűnt. A szérum EPO szintek poszt-iszkémiás változásának dinamikája különbözött; hímekben az eleve magasabb EPO szintek csupán a T24-ben váltak szignifikánsan alacsonyabbá (kontroll vs. T24 $p \leq 0,05$), míg nőstényekben az EPO szintek már T2-ben a kontroll értékek harmadára zuhantak le (kontroll vs. T2, T24 $p \leq 0,05$, 1. Táblázat).

1. Táblázat: Endogén és exogén szérumban EPO szintek östény+veh, nőstény+EPO, hím+veh és hím+EPO csoportokban. A hormonértékeket kontroll állatokban illetve 50 perces egyoldali vese iszkémiát követően a reperfüzió 2. és 24. órájában mértük (n=8/csoport). Az endogén EPO szintek a hímekben magasabbak voltak mind pre-, mind poszt-iszkémiásan. Az exogén EPO adása a kontroll és T2 időpontban bizonyult addicionálisnak. Jelentős nemi különbség volt az EPO változásának dinamikájában. *p <0.05 vs. kontroll, # p <0.05 vs. T2, § p <0.05 vs. nőstény; ± SD. EPO: eritropoietin

Szérumban EPO (mIU/mL)	Kontroll	T2	T24
Nőstény + vehikulum	7,7 ± 4,1	2,5 ± 0,8 §	0,3 ± 0,6 §
Hím + vehikulum	11,9 ± 4,2 *	10,0 ± 2,4 *	1,4 ± 1,7 *§
Nőstény + EPO	15,2 ± 4,7 #	7,3 ± 3,1 §#	1,4 ± 0,6 §#
Hím + EPO	24,7 ± 15,0 #	25,7 ± 6,6 *#	1,17 ± 0,3 §

5.4.3. Szérumban karbamid és kreatinin szintek

Mint azt a vesefunkciós paraméterek progresszív emelkedése jelezte, ötven perc iszkémia mindkét nemből a T2 időpontra ARF-et eredményezett (kontroll, T2 vs. T24 p ≤ 0,05; 2. Táblázat). Hímekben, az EPO kezelés mérsékelte a poszt-iszkémiás veseelégtelenséget, ahogy azt az alacsonyabb BUN és kreatinin szintek mutatták (T24 vehikulum vs. EPO kezelt p ≤ 0,05), míg a nőstényekben az EPO-nak nem volt hatása. Mitöbb, T24-ben EPO kezelés mellett a vesefunkciós paraméterek még alacsonyabbak is voltak a hímekben, mint a nőstényekben.

2. Táblázat: Endogén szérum karbamid és kreatinin szintek nőstény+veh, nőstény+EPO, hím+veh és hím+EPO csoportokban. A laborparamétereket kontroll állatokban illetve 50 perces egyoldali vese iszkémiát követően a reperfüzió 2. és 24. órájában mértük (n=8/csoport). A laborparaméterek minden iszkemizált állatban igazolták az akut veseelégtelenség meglétét. Vehikulum kezelt nőstényekben alacsonyabb vesefunkciós paramétereket mértünk a hímekkel összevetve, míg az EPO kezelés kivédte ezt a jelentős nemi különbséget. *p < 0.05 vs. kontroll, # p < 0.05 vs. T2, § p < 0.05 vs. nőstény, & p < 0.05 vs. vehikulum kezelt; ± SD EPO: eritropoietin

Szérum Karbamid (mmol/l)	Kontroll	T2	T24
Nőstény+veh	4,6 ± 0,3	7,5 ± 0,73	36,2 ± 4,5*#
Hím+veh	4,6 ± 0,3	10,2 ± 1	55,8 ± 10,2*#§
Nőstény+EPO	4,5 ± 0,9	8,4 ± 1,9	41,3 ± 7,0 *#&
Hím+EPO	3,6 ± 0,5	6,3 ± 1,2	24,9 ± 4,5 *#&§
Szérum kreatinin (µmol/l)			
Nőstény +veh	60,0 ± 5,6	94,8 ± 4,7	262,3 ± 24,4 *#
Hím +veh	53,0	107,2 ± 7,3	368,0 ± 16,0 *#§
Nőstény +EPO	50,5 ± 9,0	88,9 ± 18,0	324,4 ± 40,0 *#&
Hím +EPO	48,7 ± 4,1	84,7 ± 10,0	261,0 ± 50,0 *#&§

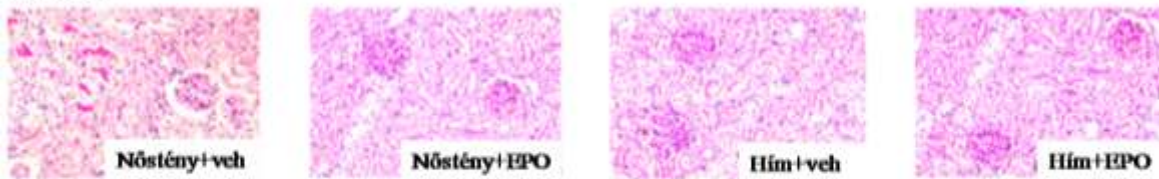
5.4.4. Vese Hisztológia

Minden kontroll csoportra normál vesestruktúra volt jellemző (34. Ábra). Ötven perc iszkémiát követően jelentős progressziót figyeltünk meg a tubulus epitélis károsodás kiterjedésében (kefeszegély eltűnése, tubulus vakuolizálódás, a mag integritásának elvesztése és a sejt halál) valamint a hialin törmelék mennyiségének növekedésében T24 időpontig bezárólag (kontroll vs. T2 vs. T24 minden csoportban $p \leq 0,05$; 3. Táblázat). Az EPO minden vizsgált paraméter értékén javított nemi különbség nélkül ($p \leq 0,05$ vs. vehikulum). Nem volt olyan veseminta, ami glomeruláris vagy releváns intersticiális elváltozást mutatott volna (nincs bemutatva).

3. Táblázat: A vesekárosodás hisztológiai kiértékelése nőstény+veh, nőstény+EPO, hím+veh és hím+EPO csoportokban. A pontszámokat kontroll állatok esetén illetve 50 perces egyoldali vese iszkémiát követően a reperfüzió 2. és 24. órájában összesítettük (n=8/csoport). Mindegyik iszkémiás csoportban szignifikánsan károsodott a tubulus epitél sejt integritása (kefeszegély eltűnése, tubulus vakuolizálódás, a mag szétesése és sejt halál), megnőtt a hialin törmelék mennyisége már T2 és tovább súlyosbodott a T24 időpontra. *p < 0.05 vs. kontroll, # p < 0.05 vs. T2, § p < 0.05 vs. nőstény, & p < 0.05 vs. vehikulum kezelt; (median). EPO: eritropoietin

Tubulus epitél sejt károsodás	Kontroll	T2	T24
Nőstény+veh	0,0 (0-0)	2,0 (2-2) *	7,0 (7-7) *#
Hím +veh	0,0 (0-0)	2,0 (2-2) *	7,0 (6-8) *#
Nőstény +EPO	0,0 (0-1)	2,5 (0-4) *	5,0 (4-7) *#&
Hím +EPO	0,0 (0-1)	2,5 (0-4) *	5,0 (4-7) *#&
<i>Epitelialis hialin törmelék</i>			
Nőstény +veh	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)	2,0 (2-2) *#
Hím +veh	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)	2,0 (2-2) *#
Nőstény +EPO	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)	0,5 (0-2) *# &
Hím +EPO	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)	0,5 (0-2) *# &

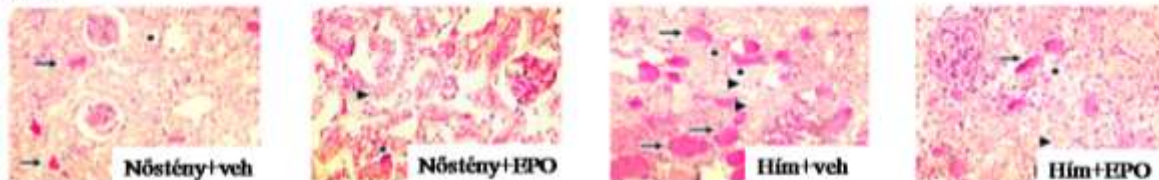
Kontroll



T2



T24

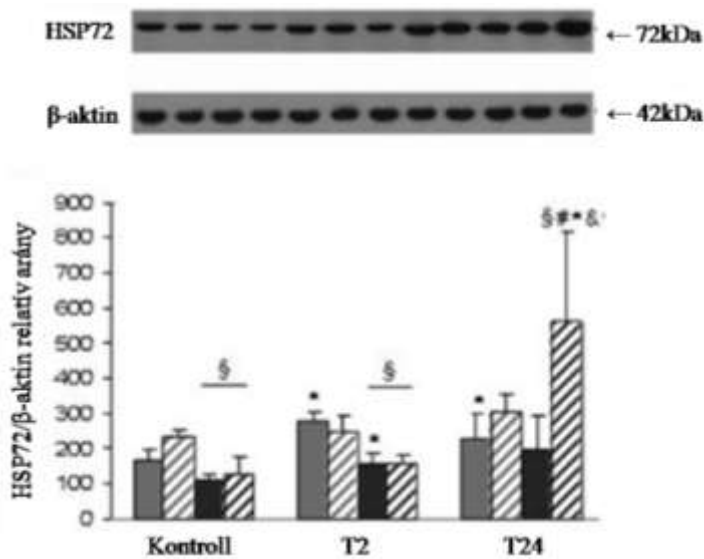


4. Ábra: A vesekárosodás hisztológiai képe nőstény+veh, nőstény+EPO, hím+veh és hím+EPO csoportokban. A reprezentatív képeket kontroll állatokban illetve 50 perces egyoldali vese iszkémiát követően a reperfüzió 2. és 24. órájában készítettük (n=8/csoport). Mindegyik vizsgált csoportban szignifikánsan károsodott a tubulus epitél sejt integritása (kefeszegély eltűnése, tubulus vakuolizálódás, a mag szétesése és sejt halál), a hialin törmelék mennyisége megnőtt már T2 és tovább súlyosbodott a T24 időpontra. * kefeszegély elvesztése, mag integritásának elvesztése, → epiteliális törmelék. EPO: eritropoietin



5.4.5. HSP72 fehérje nem-függő változása iszkémia/reperfúziós vesekárosodást követően

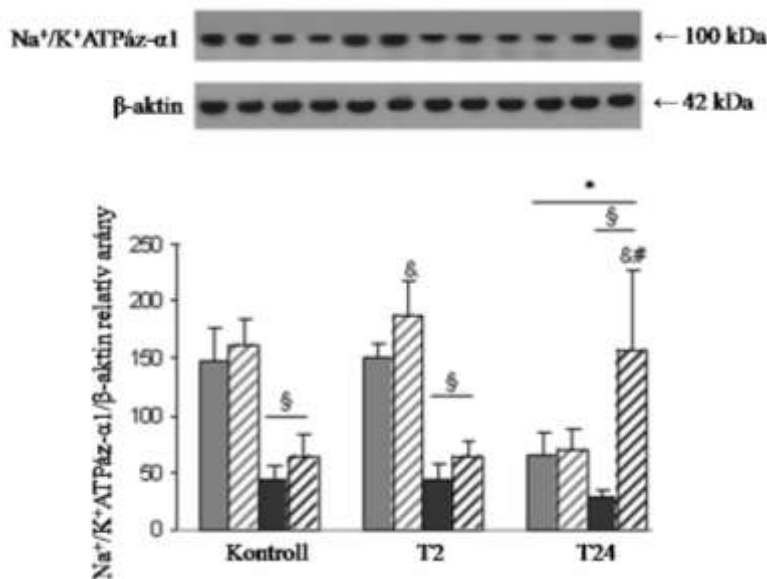
A HSP72 szint minden időpontban magasabbnak bizonyult a nem kezelt nőstényekben, mint a hímekben. Az iszkémiás inzultust követően, a HSP72 fehérje szint megemelkedett (kontroll vs. T2 $p \leq 0,05$) nem-függő módon. Nőstényekben a HSP72 maximumát a T2 időpontra érte el, míg hímekben, a növekedési ráta lassabb volt tekintet nélkül az EPO kezelésre (nőstény vs. hím $p \leq 0,05$; 35. *Ábra*). Az EPO hímekben megnövelte a HSP72 fehérje szinteket T24-re, míg nőstényekben, a már eleve magasabb HSP72 szint nem növekedett tovább (hím vs. nőstény $p \leq 0,05$).



35. *Ábra:* *Hő-sokk fehérje (HSP) 72 fehérje nem-függő változása iszkémia/reperfúziós vesekárosodást követően nőstény+veh, nőstény+EPO, hím+veh és hím+EPO csoportokban. Western blottal történő fehérje meghatározás kontroll állatok esetén illetve 50 perces egyoldali vese iszkémiát követően a reperfúzió 2. és 24. órájában történt (n=8/csoport). Felső Panel: Reprezentív HSP72 és belső kontrollként használt β-aktin immunoblottok. Alsó Panel: a HSP72 fehérje mennyiségének denzitometriás értékeit a β-aktin denzitometriás értékeire normalizáltuk. Nőstény+veh (szürke), Nőstény+EPO (szürke csíkos), Hím+veh (fekete) és Hím+EPO (fekete csíkos) * $p < 0.05$ vs. kontroll, # $p < 0.05$ vs. T2, § $p < 0.05$ vs. nőstény, & $p < 0.05$ vs. vehikulum kezelt. EPO: eritropoietin*

5.4.6. Na^+/K^+ ATPáz- $\alpha 1$ fehérje aleggység nem-függő változása iszkémia/reperfúziós vesekárosodást követően

Hasonlóan a HSP72 fehérjéhez, a poszt-iszkémiás Na^+/K^+ ATPáz- $\alpha 1$ fehérje szintek változása különbözött a nemekben. Minden időpontra igaz volt, hogy a Na^+/K^+ ATPáz- $\alpha 1$ fehérje szintek magasabbak voltak a nem kezelt nőstényekben, mint a hímekben ($p \leq 0,05$; 36. Ábra). Ezzel ellentétben az EPO kezelés csupán a hímekben bizonyult hatásosnak, s úgy megemelte a T24-es időpontra a Na^+/K^+ ATPáz- $\alpha 1$ szintjét (kontroll és T2 vs. T24; $p \leq 0,05$), mint az EPO kezelt nőstényekben volt látható ($p \leq 0,05$).

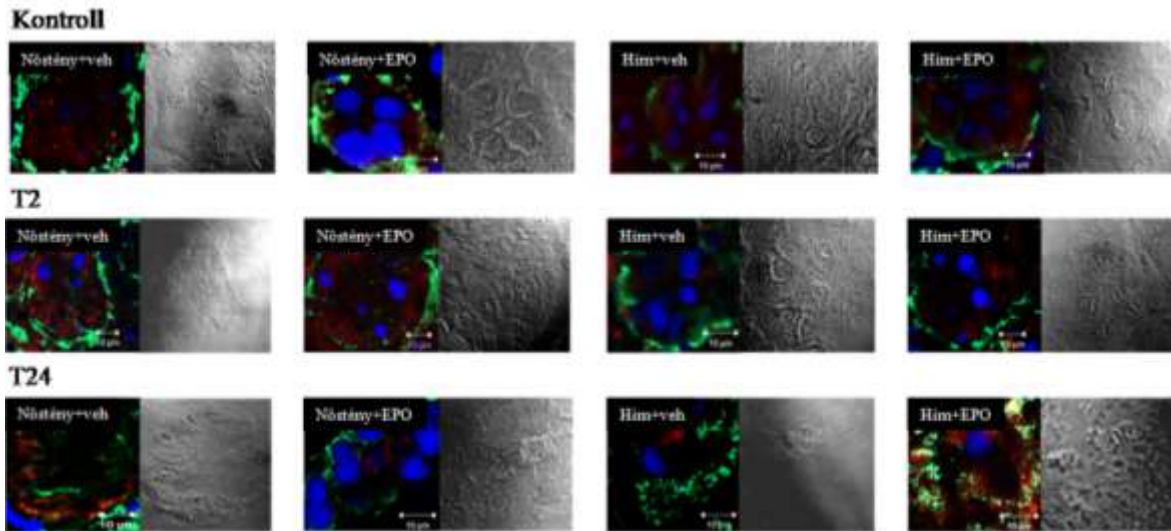


36. Ábra: Na^+/K^+ ATPáz- $\alpha 1$ fehérje aleggység nem-függő változása iszkémia/reperfúziós vesekárosodást követően. Western blottal történő fehérje meghatározás kontroll állatok esetén illetve 50 perces egyoldali vese iszkémiát követően a reperfúzió 2. és 24. órájában történt ($n=8/\text{csoport}$). **Felső Panel:** Reprerzentatív Na^+/K^+ ATPáz- $\alpha 1$ és belső kontrollként használt β -aktin immunoblottok. **Alsó Panel:** a Na^+/K^+ ATPáz- $\alpha 1$ fehérje mennyiségének denzitometriás értékeit β -aktin denzitometriás értékeire normalizáltuk. Nőstény+veh (szürke), Nőstény+EPO (szürke csíkos), Hím+veh (fekete) és Hím+EPO (fekete csíkos) * $p < 0.05$ vs. kontroll, # $p < 0.05$ vs. T2, § $p < 0.05$ vs. nőstény, & $p < 0.05$ vs. vehikulum kezelt. EPO: eritropoietin

5.4.7. A HSP 72 és a Na^+/K^+ ATPáz- $\alpha 1$ aleggység immunolokalizációja

A HSP72 és a Na^+/K^+ ATPáz- $\alpha 1$ közötti lehetséges kapcsolatot immunofluoreszcens festéssel vizsgáltuk (37. Ábra). Kontroll patkányok tubulusában a Na^+/K^+ ATPáz- $\alpha 1$ a

tubulus sejtek bazolaterális membrándoménjába lokalizálódott, minimális festődést mutatva a citoszolban és az apikális doménben. Ebben az időpontban nemi különbséget nem tapasztaltunk. HSP72 festés nem volt detektálható a kontroll állatok tubulus sejtjeiben. Iszkémiás károsodást követően a Na^+/K^+ ATPáz- $\alpha 1$ -ben jelentős változás következett be, kifejezettebbé vált a citoszolban. Ez az internalizáció azonban kevésbé volt látható a vehikulum kezelt nőstényekben, mint hímeekben. Az EPO kezelés fontos következményeként hímeekben a Na^+/K^+ ATPáz- $\alpha 1$ lokalizációja sokkal megtartottabb maradt a bazolaterális membránon.



37. Ábra: A Hő-sokk fehérje (HSP) 72 (piros) és a Na^+/K^+ ATPáz- $\alpha 1$ (zöld) lokalizációja tubulus sejtekben immunofluoreszcens festés és konfokális lézer szkennelő mikroszkóp felhasználásával. A képalkotás kontroll állatok esetén illetve 50 perces egyoldali vese iszkémiát követően a reperfüzió 2. és 24. órájában történt (Kontroll, T2, T24), Nőstény+veh, Nőstény+EPO, Hím+veh, Hím+EPO csoportokban ($n=8$ /csoport). Sejtmagok Hoechst festéssel (kék) kerültek jelölésre. Scale bar: 10 μm . EPO: eritropoietin

5.5. Poszt-transzplantációs diabétesz mellitusz gyermek transzplantáltakban

5.5.1. Vesetranszplantált gyermekek demográfiai és anamnesztikus adatai

1990 és 2006 között, negyvenöt vesetranszplantált beteget gondoztunk az I. sz. Gyermekgyógyászati Klinikán. A transzplantáció okai a következők voltak: fokális szegmentális glomeruloszklerózis (n=10), hipoplaziás vese (n=9), policisztás vese (n=8), obstruktív nefropátia (n=5), intersticiális nefritis (n=3), Alport szindróma (n=2), Prune-belly szindróma (n=2), juvenilis nefronoftísis (n=1), idiopátiás rapidan progrediáló glomerulonefritisz (n=1), membranózus glomerulonefritisz (n=1), nefrokalcinózis (n=1), cisztinózis (n=1) és akut tubuláris nekrozis (n=1). Az 4. Táblázat összegzi vesetranszplantáltjaink demográfiai adatait. Negyvenötből harminckettő gyermeknél (71%, 20 fiú/12 lány) találtunk normális glükóz toleranciát. IGT hét esetben volt kimutatható (16%, 3 fiú/4 lány). Az IGT-ben szenvedő betegekben az OGTT során a szérum glükóz szint $5,3 \pm 0,95$ mmol/l (0 perc), $10,9 \pm 1,3$ mmol/l (60 perc) és $9,6 \pm 0,6$ mmol/l (120 perc) értéknek adódott. PTDM hat betegben fejlődött ki (13%, 2 fiú /4 lány). A PTDM átlag kialakulása 25,8 hónappal a transzplantáció után volt (0,5–119); habár ez az időszak a betegek 70%-ban rövidebb volt, mint egy év.

4. Táblázat: Szénhidrát-háztartásuk alapján két csoportba sorolt transzplantált gyermekeink demográfiai adatai. Szignifikáns különbség adódott a DM-ra való pozitív családi anamnézisben, a szteroid lőkésterápiák számában, a HOMA-R indexben, a szisztolés vérnyomás értékekben és a szérum triglicerid szintekben. HD: haemodialízis, CAPD: folyamatos ambuláns peritoneális dialízis, Tx: transzplantáció, DM: diabétesz mellitusz, BMI: testtömeg index, GFR: glomeruláris filtrációs ráta, HOMA-R: homeostasis model assessment, mint az inzulin rezisztencia indexe, * $p \leq 0,05$ vs. nem-PTDM csoport; \pm SD vagy a Shapiro-Wilk alapján nem normal eloszlású Tx száma és szteroid bolus száma esetén (median).

	Nem-PTDM csoport	PTDM + IGT csoport	p-érték
Betegek száma (lány/fiú)	32 (12/20)	13 (8/5)	
Kor (év)	18,4 \pm 6,3	14,1 \pm 4,4	* 0,03
Kor Tx időpontjában (év)	11,3 \pm 4,0	10,6 \pm 2,9	NS
Dialízis típusa	11 HD, 17 CAPD, 4 HD + CAPD	3 HD, 6 CAPD, 4 HD + CAPD	NS
Dialízis hossza (hó)	18 \pm 16	19 \pm 18	NS
Tx száma	1,16 [1–2]	1,08 [1–2]	NS
Cadaver/ élő donor	27/5	13/0	NS
DM családi anamnézisben	3	6	* 0.03
BMI (kg/m ²)	21,05 \pm 4,3	25,0 \pm 11	0,09
BMI z-score	0,06 \pm 1,23	0,5 \pm 1,06	NS
Szteroid bólus száma	0,41 [1–3]	1,15 [1–4]	* 0,04
Szérum kreatinin (umol/l)	119 \pm 51	112 \pm 41	NS
GFR (ml/min)	44,4 \pm 25	43,5 \pm 19	NS
HOMA-R	3,16 \pm 0,94	1,76 \pm 1,01	* 0,02
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	116 \pm 14	127 \pm 14	* 0,03
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	76 \pm 9	80 \pm 13	NS
Szérum koleszterin (mmol/l)	4,6 \pm 1	5,4 \pm 2,5	NS
Szérum triglicerid (mmol/l)	1,4 \pm 0,5	2,17 \pm 1,5	* 0,04
Szérum húgysav (mmol/l)	369 \pm 134	388 \pm 126	NS
Hepatitisz C fertőzés	0	0	NS

A PTDM+IGT-ben szenvedő betegek fiatalabbak voltak ($14,1 \pm 4$ év), mint azok, akik normális glükóz háztartással rendelkeztek ($18,4 \pm 6$ év; $p = 0,02$). Nem találtunk ellenben különbséget a dialízis típusában, a dialízis időtartalmában vagy a cadaver/élő donációban. Diabétesz mellitusz szempontjából pozitív családi anamnézissel több PTDM+IGT beteg rendelkezett, mint normál glükózháztartású gyermek ($p = 0,03$). A PTDM+IGT betegekben a szisztémás vércukor és szérum triglicerid szintek emelkedettek voltak összehasonlítva azokkal, akikben nem volt metabolikus eltérés ($p = 0,02$ és $0,039$). Más vizsgált paraméterekben nem találtunk szignifikáns különbséget (4. Táblázat).

A 5. Táblázatban a különböző immunoszuppresszívumokkal kezelt csoportokba tartozó betegek demográfiai adatai találhatók. Tac-kezelt betegek fiatalabbak voltak ($p = 0,0001$), DM anamnézise szempontjából pedig magasabb incidenciával rendelkeztek ($p = 0,002$). Tac kezelt gyermekeknek magasabb volt a GFR-jük ($p = 0,04$) és a HOMA-R indexük ($p = 0,05$), valamint alacsonyabb a szérum koleszterin szintjük ($p = 0,05$) összehasonlítva a CyA kezelt csoportokkal. Más vizsgált paraméterben nem volt különbség.

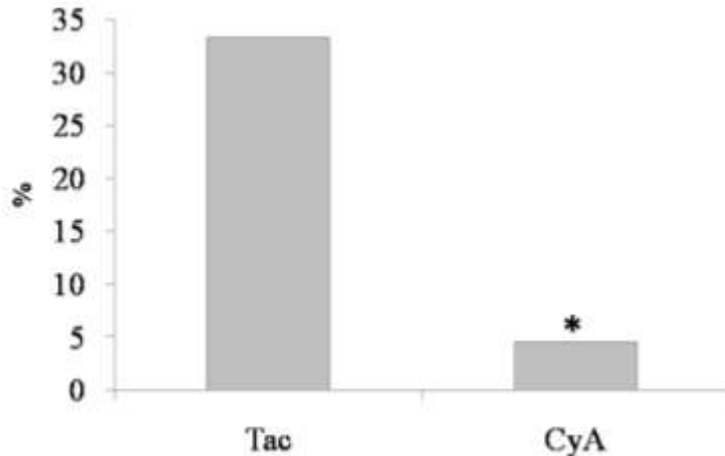
5. Táblázat: Immunoszuppressziós bázisterápiájuk alapján két csoportba sorolt transzplantált gyermekeink demográfiai adatai. Szignifikáns különbség adódott a DM-ra való pozitív családi anamnézisben, a szérum kreatinin szintekben, a HOMA-R indexben és a szérum koleszterin szintekben. HD: haemodialízis, CAPD: folyamatos ambuláns peritoneális dialízis, Tx: transzplantáció, DM: diabétesz mellitusz, BMI: testtömeg index, GFR: glomerulus filtrációs ráta, HOMA-R: homeostasis model assessment, mint az inzulin rezisztencia indexe, * $p \leq 0,05$ vs. nem-PTDM csoport; \pm SD vagy a Shapiro-Wilk alapján nem normal eloszlású Tx száma és szteroid bolus száma esetén (median).

	Tac	CyA	p-érték
Betegek száma (lány/fiú)	34 (14/20)	11 (6/5)	NS
Kor (év)	15,4 \pm 5	23 \pm 5	* 0,0001
Kor Tx időpontjában (év)	11,5 \pm 4	12,5 \pm 3	NS
Dialízis típusa	9 HD, 19 CAPD, 5 HD + CAPD	5 HD, 4 CAPD, 1 HD + CAPD	NS
Dialízis hossza (hó)	16 \pm 17	17 \pm 10	NS
Tx száma	1,18 [1–2]	1	NS
Cadaver/ élő donor	3/32	2/9	NS
DM családi anamnézisben	7	2	* 0,002
BMI (kg/m ²)	22,2 \pm 8	22,2 \pm 3	NS
BMI z-score	0,16	0,09	NS
Szteroid bolus száma	0,71 [0–4]	0 [0–1]	NS
Szérum kreatinin (umol/l)	111 \pm 44	138 \pm 50	* 0,04
GFR (ml/min)	46,3 \pm 25	38,3 \pm 22	NS
HOMA-R	2,07 \pm 1	1 \pm 0,34	* 0,05
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	120 \pm 13	118 \pm 18	NS
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	76 \pm 12	80 \pm 10	NS
Szérum koleszterin (mmol/l)	4,6 \pm 2	5,7 \pm 1,2	* 0,05
Szérum triglicerid (mmol/l)	1,6 \pm 1	1,8 \pm 0,7	NS
Szérum húgysav (mmol/l)	367 \pm 128	405 \pm 133	NS
Hepatitisz C fertőzés	0	0	NS

5.5.2. Immunoszuppresszívumok szerepe a poszt-transzplantációs diabétesz mellitusz kialakulásában

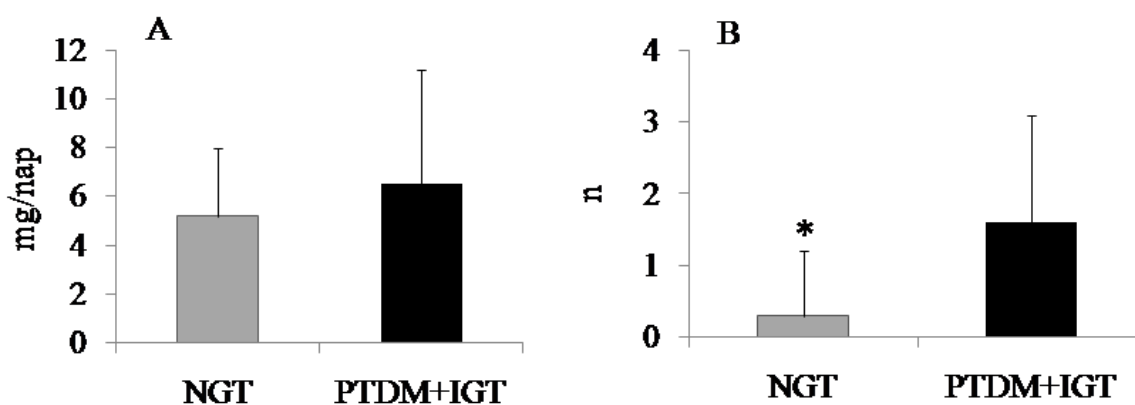
Tanulmányunk következő lépéseként megbecsültük a különböző immunoszuppresszív rezsimok és a glükóz metabolizmus eltérései (PTDM + IGT) közötti kapcsolatot: 38. Ábra szerint harmincnégy Tac kezelt betegből tizenkettőben (35%) alakult ki PTDM+IGT-t; a CyA kezelték esetén tizenegyből csak egy esetben találtunk eltérést (9%; $p < 0,05$) (35.

Ábra, A Panel). A Tac vérszintek magasabbak voltak a PTDM+IGT csoportban, mint azokban, ahol normális glükóz háztartást diagnosztizáltunk ($p = 0,04$) (*39. Ábra, B Panel).*

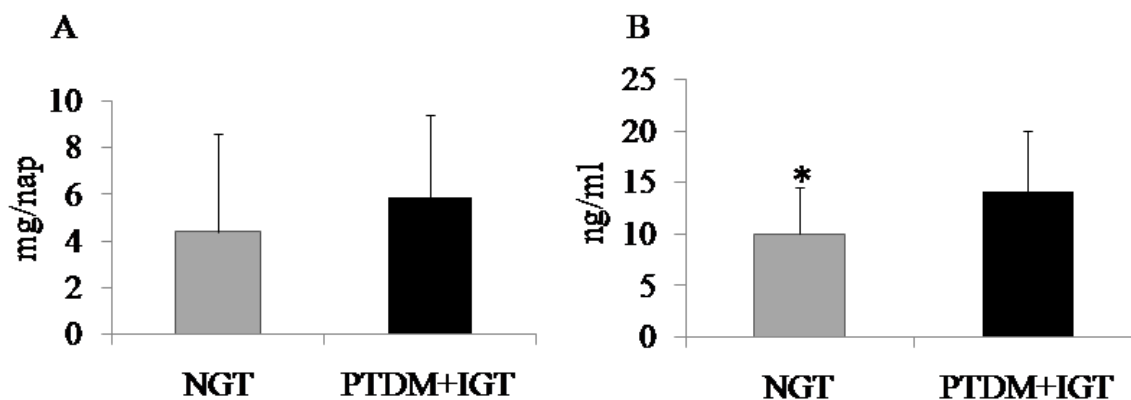


38. Ábra: A PTDM+IGT incidenciája a Tacrolimus és Cyclosporin A kezelt csoportokban. Harmincnégy Tac kezelt betegből tizenkettőben (35%) alakult ki PTDM+IGT, ellenben a CyA kezelték esetén tizenegyből csak egy esetben találtunk eltérést. * $p < 0,05$ vs. Tac kezelt betegek.

Tanulmányunk szerint a Tac vérszintje szignifikáns kapcsolatot mutatott az inzulin alacsony szintjeivel (T = 0 perc, $p = 0,015$; T = 120 perc, $p = 0,041$). A szteroid terápia glükóz metabolizmus zavarában betöltött szerepének vizsgálata céljából összehasonlítottuk a napi szteroid adagokat és a szteroid pulzus terápiák számát normál ill. csökkent glükóztoleranciájú transzplantált gyermekekben. A *40. Ábra* szerint a szteroid lökésterápiák száma magasabb volt a PTDM+IGT betegekben, mint a normál glükóz háztartással rendelkezőknél ($p = 0,036$, *40. Ábra, B Panel*); ellenben a szteroid napi dózisaiban nem volt szignifikáns a különbség (*40. Ábra, A Panel*). Többlépcsős regressziós analízist követően, függetlenül más faktoroktól szignifikáns kapcsolat adódott a szteroid napi dózisa és az emelkedett éhomi glükóz szintek ($p = 0,0002$) valamint a szteroid lökésterápiák és HOMA-R ($p = 0,038$) között.



39. Ábra: A szteroid napi dózisa (A Panel) és a szteroid lökés terápiák száma (B Panel) normál glükóz toleranciával (NGT) illetve PTDM+IGT-vel rendelkező gyermekekben. A szteroid napi dózisaiban nem adódott különbség, míg a szteroid lökés terápiák száma szignifikánsan különbözött. * $p < 0,05$ vs. PTDM+IGT csoport.



40. Ábra: A Tacrolimus (Tac) napi dózisa (A Panel) és a Tac vérszint (B Panel) normál glükóz toleranciával (NGT) illetve PTDM+IGT-vel rendelkező gyermekekben. A Tac napi dózisa nem, míg a vérszintje szignifikánsan befolyásolta a PTDM kialakulását. * $p < 0,05$ vs. PTDM+IGT csoport.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. A renin aktivitás direkt vizualizálható multi-foton mikroszkópiával és FRET-alapú renin szubsztráttal

Vizsgálatunk alapján a renin felszabadulás, mint a RAS aktiváció sebesség meghatározó lépése, a klasszikus JGA lokalizáción túl a CD principális sejtjeiben is detektálható volt, mely patológiás állapotokban, így diabéteszes nefropátiában a (pro)renin legfőbb forrásául szolgálhat. Tanulmányunk célja volt megválaszolni, vajon a CD a tubuláris folyadék felé szecernál-e (pro)renint, hozzájárulva ezzel a megnövekedett intratubuláris Ang II képződéshez. Elsőként spektrofluorometriával, majd konfokális és multi-foton mikroszkópiával bizonyítottuk a FRET-alapú renin szubsztrát (pro)renin aktivitásra való specificitását, majd vizsgálatainkkal a principális sejtekből felszabaduló, lumen felé irányuló aktív (pro)renin szekréciót írtuk le.

A multi-foton mikroszkópia, a nefrológiai alap kutatásban nemrégiben meghonosodott state-of-the-art módszer, mely lehetővé teszi a veseszövet *in vivo* vizualizálását, valamint az intakt vese (pato)fiziológiai alapfunkcióinak direkt kvantitatív képalkotását. A molekuláris, sejtszintű és transzgenikus állat kísérletekkel kiegészített multi-foton mikroszkópia új, komplex vizsgálómódszerül szolgál a RAS és (pro)renin tanulmányozásához fiziológias és patofiziológias körülmények között. Jelen kutatásban a FRET-alapú renin szubsztrát finom mikropunkciós adagolásával kiegészített multi-foton mikroszkópiával a nemrégiben leírt ^{Rohrwasser 1999, Prieto-Carrasquero 2004, 2008} CD-beli renin tartalmat kívántuk vizualizálni. Méréseink első lépése a JGA-beli és CD-beli lokális RAS megjelenítése volt ^{Peti-Peterdi 2004, Kang 2006, Toma 2008, Vargas 2009}, majd ezen szegmens polarizált sejtjeinek lumináris irányú renin felszabadulását és a következményes lumináris renin aktivitást detektálni. A CD-ben található (pro)renin forrása ugyan kettős lehet; egyrészt filtrálódhat a glomeruluson keresztül ^{Navar 2011}, másrészt, hipotézisünk szerint, jelentősebb

mértékű a principális sejtekből a lumen irányába való renin felszabadulás, így patológiás körülmények között központi helyet tölthet be a renin termelésben. Valóban, spektrofluorometriás vizsgálat igazolta a gyűjtőcsatorna eredetű M1 sejtek renin termelő képességét, jelentős prorenin tároló kapacitását, valamint Aliskiren kezelést követően fluoroforunk, a FRET-alapú renin szubsztrát specificitását (10. *Ábra*). Ez utóbbi további megerősítést nyert, mivel mind a pozitív kontrollként szolgáló As4.1, mind az érdeklődésünk előterében levő M1 sejtekben a kettős antitest jelölt renin pozitív intracelluláris granulumok (piros) és a sejtek felszínén felszabadulásra kerülő aktív renin (zöld) közelségét tapasztaltuk (12. *Ábra*). E renin aktivitásra specifikus fluorofor felhasználásával vizsgáltuk tovább a CD (pro)renin termelését. Feltehetőleg principális irányba differenciálódott sejtekben a renin granulumok felhalmozódtak, majd a membrán felé közeledtek, végül kiürülve a lumináris renin aktivitáshoz járultak hozzá és egy részük a (P)RR-hoz kötődve további aktivációra tett szert (14. *Ábra*). Ezt a mechanizmust disszekált CD-ben is megerősítettük, ahol a principális sejtek jelentős granulációt mutattak, majd tartalmuk, a (pro)renin, szekrécióra került és az interkaláris sejtek felszínén lévő, feltételezhetően (P)RR-hoz kötődött (15. *Ábra*). A FRET-alapú fluorogén renin szubsztrát specificitásának és a lumináris (pro)renin szekréciónak végső bizonyítéka gyanánt intakt vesében is demonstráltuk a festék ugyanezen mintázatát (16. *Ábra*), a renin felszabadulását és lumináris aktivitását, ami szignifikánsan csökkent két héten keresztül adagolt 50 mg/kg/nap dózisú Aliskiren hatására (11. *Ábra*). A lokális RAS aktivációjának kiváltó faktorára következő tanulmányunkban kerestünk választ.

Összegezve, a multi-foton mikroszkópia és a nemrégiben kifejlesztett, laborunk által validált FRET-alapú renin szubsztrát felhasználásával identifikáltuk és demonstráltuk nem csak a CD-ben található (pro)renin bazolaterális és lumináris lokalizációját, de ennek a lumen irányába történő felszabadulását is.

6.2. A szukcinát, a GPR91-en keresztül aktiválja a vese lokális renin-angiotenzin rendszerét; antifibrotikus terápiás lehetőség diabéteszes nefropátiában

Következő tanulmányunk a citrát-ciklus intermedier szukcinátot, a RAS sebesség-meghatározó (pro)renin és a (P)RR CD-beli termelésének fontos szabályozójaként írta le. A szukcinát (pro)renin és a (P)RR fehérje expresszióra kifejtett erőteljes serkentő hatása magába foglalta a sejtfelszíni receptor GPR91-et, MAPK-okat, ERK1/2 és a COX2 szignál útvonalat. A CD sejtvonalon végzett mérések *in vivo* funkcionális jelentőségét DM állatmodellben a pERK1/2, (pro)renin és (P)RR expressziójának ill. a PGE₂ exkréciójának GPR91 függésével igazoltuk a vese medulláris CD-jében ill. a vizeletben. Eredményeink a diabéteszesre jellemző stressz kondíciók és a veseszövetben zajló folyamatok között egy új kapcsolatot mutattak meg: mitokondriális stressz, szukcinát akkumuláció, GPR91 szignál és a diabéteszes patológia fontos fémjelzőjeként ismert lokális intra-renális RAS aktivációja Gurley 2007, Navar 2011, He 2004, Toma 2008, Peti-Peterdi 2010, 2012, Hebert 2004

A GPR91 kiváltotta CD-beli RAS aktivációjára vonatkozó jelen eredményeink egyetértésben vannak egy korábban leírt kortikális, JGA-beli reninre ható, GPR91 közvetítette metabolikus kontrollal ^{Toma 2008, Vargas 2009, Peti-Peterdi 2010, 2012}. Jelen tanulmányunk ehhez képest az intra-renális (pro)renin szintézis egy új anatómiai helyét írta le a CD-ben, ahol a renin a szukcinát és GPR91 szignál, pERK1/2, COX2 és PGE₂ által szabályozott (19. *Ábra*), hasonlóan a korábban már leírt JGA-beli renin regulációhoz ^{Toma 2008, Vargas 2009, Peti-Peterdi 2012}. A STZ-indukált diabétesz mellituszban a CD-beli renin kifejezett, GPR91-dependens stimulációja (24. *Ábra*) egybe cseng a vese medullában található diabétesz mellituszra jellemző citrát-ciklus súlyos zavarával ^{Peti-Peterdi 2010, Palm 2009}, következményes helyi szukcinát akkumulációval ^{Toma 2008} és a medulláris CD-ben található magasabb intra-renális GPR91 expresszióval ^{Robben 2009}.

Már a diabétesz mellitusz korai stádiumára (4 héttel az STZ kezelést követően) jellemző lokális CD RAS aktiváció azt sugallja, hogy a CD szöveti szinten a metabolikus stressz

korai szenzoraként funkcionál és a RAS szignál első lépésének patológiás aktivációján keresztül központi szabályozó szerepet játszik a diabéteszes nefropátia kifejlődésében és progressziójában. Vizsgálatunk rávilágított arra, hogy a szukcinát/GPR91 jelátviteli útvonal néhány órán belül M1 sejtekben a MAPK-ok és COX2 aktivációját, a (pro)renin és a (P)RR szintézisét váltja ki (19,20 *Ábra*), *in vivo* pedig, négy héttel a diabétesz mellitusz indukcióját követően a MAPK-ok aktivációját, a PGE₂ szintézisét és felszabadulását valamint a (pro)renin és (P)RR expresszió fokozódását eredményezi (22,23,24. *Ábra*).

Habár a PGE₂ a JGA-ban történő renin szekréció jól ismert parakrin mediátora ^{Kurtz 2011, Castrop 2010, Peti-Peterdi 2010, Peti-Peterdi 2003}, CD-beli RAS-ban játszott szerepe ez idáig nem került leírásra. Jelen vizsgálataink során a COX2 mediátor szerepének bizonyítása a szukcinát-kiváltotta (pro)renin szintézisben (21. *Ábra*) ill. *in vivo* tapasztalt GPR91-dependens vizelet PGE₂ exkréció növekedés (23. *Ábra*) a PGE₂-t a CD (pro)renin mediátoraként azonosította. Eredményeink fényében, a szukcinát és PGE₂ a CD RAS aktivációjának legújabb mediátorai kiegészítik a korábbról már ismert Ang II szerepét ^{Prieto-Carrasquero 2004, 2005}.

Jelen kísérletünk a CD-beli RAS-nak csupán az egy központi szereplőjére fókuszált, a sebesség-meghatározó (pro)reninre és a RAS egyik legújabb résztvevőjére, a (P)RR-ra. A mindig gyarapodó számú és komplex RAS kaszkád más szereplői azért nem képezték tanulmányunk tárgyát, mert irodalmi adatok alapján úgy tűnik e szignál kaszkádban a (pro)renin szerepel a GPR91 célmolekulájaként ^{He 2004, Toma 2008, Vargas 2009, Peti-Peterdi 2010}. Diabétesz mellituszban a (pro)renin fehérje kifejezett növekedést mutatott (24. *Ábra*). Az Ang fehérje *de novo* konverziója Ang II-vé ENaC stimulációt eredményez a CD lumenben, mint azt korábbi irodalmi adatok mutatják ^{Peti-Peterdi 2002, Komlósi 2003}. Továbbá, a (P)RR, mely jelentős mennyiségben expresszálódik diabétesz mellituszban, GPR91-dependens módon triggerel egy Ang II-független intracelluláris útvonalat és a sejt felszínén a prorenint non-proteolitikus úton aktiválja, a renin aktivitást pedig tovább fokozza ^{Nguyen 2002, 2008, 2010, Kaneshiro 2007, Huang 2011}. Mivel mind a GPR91, mind a (P)RR szignál a MAPK-okon keresztül hat, magas szöveti RAS kiváltotta ko-aktivációjuk és szimultán szignáljuk profibrotikus

útvonalak igen kifejezett aktivációjához és diabéteszes nefropátia kialakulásához vezethet Nguyen 2008. Erre utal munkacsoportunk egy disszertációmban nem szereplő mérési eredménye, miszerint GPR91 KO db/db egerek proteinuriája szignifikánsan kisebb mértékű volt, mint a GPR91 szempontjából vad típusú állatoknak.

Jelen tanulmány elsőként vizualizálta *in vivo* közvetlenül és mennyiségileg a (pro)renin aktivitás változását intakt egér CD-beli tubuláris folyadékában és felfedte e folyamat GPR91-dependenciáját (25. *Ábra*). A vese intra-vitális, multi-foton mikroszkóppal való képalkotása az elmúlt évtizedben, mint a vesefunkciós paraméterek, így a renin tartalmának és aktivitásának Kang 2006, 2008, Peti-Peterdi 2004, 2009, nagy erejű, non-invazív, imaging módszere vált ismertté Peti-Peterdi 2002. Vizsgálatunk során a vese direkt képalkotását klasszikus mikropunkciós technikával kombináltuk (9. *Ábra*), hogy a fluorogén renin szubsztrátot közvetlenül juttassuk be a tubuláris folyadékba és helyileg, szisztémás hatásoktól függetlenül mérjük meg a renin aktivitást. Összehasonlítva az alacsony alapszinttel, STZ-diabéteszre adott válaszként a CD lumenben levő (pro)renin mennyisége GPR91-függő módon, jelentősen megemelkedett (25. *Ábra*). Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányában kimutatta, hogy a (pro)renin legfontosabb forrása diabétesz mellituszban a CD Kang 2008. A kifejezetten CD tubuláris lumenben detektálható magas renin aktivitás a (pro)renin szintézisért felelős principális sejtekből való lumináris renin felszabadulására Rohrwasser 1999, Prieto-Carrasquero 2004, 2005, 2008 Kang 2008, Navar 2011, a prorenin interkaláris sejtek apikális membránjában expresszálandó (P)RR általi non-enzimatikus aktiválódására Nguyen 2002, végül mindkét forma szolubilis formájának CD tubuláris folyadékában való dúsulására utalt. E jelentős renin szubsztrát fluoreszcencia Aliskiren kezelést követően nagy részben eltűnt (25. *Ábra*) a festék renin specificitását jelezve. Mivel a renin szubsztrát jelét az Aliskiren nem teljes mértékben eliminálta, feltételezhetően a fluoroszscens fragmentnek egyéb forrása is létezik, mely érdekes és további vizsgálatokat igénylő eredmény. Ugyanazon állatok vizeletéből történő renin aktivitás mérése (26. *Ábra*) megerősítette *in vivo* képalkotásból származó adatainkat (25. *Ábra*). A fluorogén szubsztrát magas renin specificitása korábbi renin aktivitás mérések során már leírásra került Kang 2008. Érdekes és előremutató további

eredmény, hogy a vizelet renin aktivitás jelentősen emelkedett volt négy héttel a diabétesz mellitusz indukálását követően, így a jövőben ez az új paraméter figyelemreméltó jelöltté léphet elő, mint az intra-renális RAS aktivációt és diabéteszes nefropátiát előrejelző igen korai biomarker.

A GPR91-et kifejező M1 sejtekben (17,18. *Ábra*) ill. *in vivo* diabéteszes állat medulláris CD-ben (18. *Ábra*) a szukcinát/GPR91 útvonalon keresztül, folyamatosan triggerelt ERK1/2, MAPK konzisztens a makula denzában ^{Vargas 2009}, MDCK sejtekben ^{Robben 2009} és a kortikális CD-ben ^{Robben 2009} nemrégiben leírt mechanizmusokkal. A dózis-függő szukcinát hatás (19 *Ábra*) alátámasztotta a szukcinát-kiváltotta GPR91 aktiváció korábban leírt EC₅₀ értékét (20-300 µM a detektáló módszertől függően ^{He 2004, Toma 2008}) valamint a magas vizelet szukcinát szint diabétesz mellituszban tapasztalt biológia elérhetőségét ^{Toma 2008}. A MEK-1 és COX2 inhibitorral való kezelés (21. *Ábra*) azt mutatta, hogy a GPR91 szignál a MAPK-ok és COX2 aktivációján keresztül okozati szerepet játszik a szukcinát-kiváltotta, CD-beli *de novo* (pro)renin és (P)RR szintézisben. A másik MAPK, mely ismertén részt vesz a GPR91 szignálban ^{Vargas 2009}, a p38, egy protein, mely funkciója leginkább a gyulladásához és fibrózishoz köthető ^{Ma 2009}. Mind humán, mind kísérletes DM-ban szintje magasra emelkedett és a renin szabályozásához és intersticiális fibrózis elindításához kapcsolódott ^{Adhikary 2004, Komers 2007}. Jelen tanulmányunk felfedte, hogy a makula denza sejtei mellett, a CD-eredetű M1 sejtek fokozott p38 foszforilációval szintén válaszolnak a szukcinát adására, habár a folyamatos pp38 szint 24 órás szukcinát kezelés alatt nem volt olyan erőteljes, mint az ERK1/2 esetén (19. *Ábra*).

Összefoglalásként elmondhatjuk, tanulmányunk a szukcinát/GPR91 szignált, mint a CD (pro)renin és (P)RR, a helyi RAS első tagjainak új és fontos szabályozóit írta le. In vivo fontosságát és funkcionális jelentőségét a vese medulláris CD-ben levő ERK1/2, (pro)renin és (P)RR expressziójának ill. vizelet PGE₂ mennyiségének GPR91 függőségével igazoltuk. Ezen megfigyelésünket a fokozott szukcinát expozíció következtében megemelkedett CD tubuláris renin aktivitás is alátámasztotta.

Vizsgálatunkkal elsőként vizualizáltuk közvetlenül és mennyiségileg e hatást, in vivo intakt egér veséjében multi-foton mikroszkóp felhasználásával. A szukcinát/GPR91 jelátvitel új patofiziológias mechanizmus DM-ban, ami szabályozza a helyi CD RAS aktivitását és a későbbiekben új terápiás célpontként szolgálhat a diabéteszes nefropátia kezelésében.

6.3. A calcineurin inhibitorok aktiválják a vese renin-angiotenzin rendszerét; terápia célpont krónikus allograft nefropátiában

A fenti eredményeket alapul véve feltételeztük, hogy a transzplantációt követően immunosuppresszívumként alkalmazott CNI nefrotoxikus hatásukat, legalábbis részben, az összekötő szegmensre és a gyűjtőcsatornára lokalizálódó RAS-on keresztül fejtik ki. Méréseink alapján valóban elmondható, hogy a CNI-ok károsító hatással bírnak a vese parenchymára, ami összefüggésbe hozható nem csak a JGA-ban, de a gyűjtőcsatornában is megnövekedett renin aktivációval, mely utóbbi új leírás az irodalomban. A nagyobb sejtpopulációt magába foglaló gyűjtőcsatorna fokozott renin termelődése jelentős vazokonstriktiót, következményes hipoxiát és ezáltal fibrogenézist indukál, mely hatások eredőjeként a vese funkciója romlik.

A KAN kialakulása igen komplex folyamat, mely számos kaszkádot, regulációs faktort foglal magába, ám patomechanizmusa máig nem ismert minden részletre kiterjedően. A KAN kialakulását befolyásoló, bevezetőben részletezett, alloantigén-függő és független faktorok közül munkánk a CNI-ok által kiváltott nefrotoxicitást vizsgálta. Calne 1978-ban az első humán felhasználás kapcsán írta le a CNI nefrotoxikus hatását; 15mg/nap dózisban a betegek jelentős részében romlott a vesefunkció, ám amennyiben a kezdeti súlyosan károsodott funkcionális paraméterek ellenére is folytatták a CyA adagolását, a szérum kreatinin érték nem emelkedett tovább, mint más nefrotoxikus ágensek esetén várható lett volna ^{Calne 1978}, így feltételezték, hogy inkább funkcionális, mint strukturális elváltozásról volt szó. Calne tanulmányát követő negyed évszázaddal később a CyA még mindig a bázis immunosuppresszívum része, így célul kell kitűznünk, hogy feltárjuk nefrotoxikus hatásának patomechanizmusát, s ennek fényében lehetőség szerint annak kivédését, de legalábbis mérséklését. Az irodalmat olvasva azonban joggal merül fel a kérdés; valóban létezik-e a CNI nefrotoxikus hatása? Vajon a reverzibilis arterioláris vazokonstriktió és hialinózis, a következményesen kialakuló tubuláris atrófiával járó köteges, intersticiális fibrózis nem csak egy eddig fel nem ismert immunfolyamatnak a részjelenségei, hisz a CESAR ^{Ekberg 2007} és ORION ^{Flechner 2011} tanulmány rámutat, hogy a CyA kezelés mellett tapasztalt renális funkció

bármilyen más alternatív protokollal összevethető, a nefrotoxicitás e kemény pontjában szignifikáns különbség nem adódott. Mégis kell, hogy legyen CNI-nak tulajdonítható neftoxikus hatás, hisz extra-renális transzplantáció estén is kialakul a vesében a CNI nefrotoxicitásra jellemző hisztológiai kép ^{Calne 1978}. Az irodalmi adatok patognomikus tényezőként a közvetlen tubuláris hatást, a RAS rendszerben történt változásokat, reaktív oxigén termékeket (ROS), transzformáló növekedési faktor beta (TGF- β) termelődését és az apoptózis indukcióját említik ^{Busauschina 2004}, melyek, ahogy arra Curtis rámutatott, egy ideig az arterioláris vazokonstriktió által csak reverzibilis, funkcionális károsodást hoznak létre (akut CNI nefrotoxicitás) ^{Curtis 1983}, azonban hosszú ideig tartó alkalmazásuk esetén, bár az irodalom ellentmondásos, de feltehetőleg önálló rizikófaktoroként is KAN-hoz vezethetnek (krónikus CNI nefrotoxicitás) ^{Prokai 2012, Gaston 2009}.

Tanulmányunk során a CNI és a lokális RAS közötti kapcsolatot vizsgáltuk. Ismert, hogy a CyA adminisztráció során már akut hatásként megemelkedik a plazma renin aktivitás ^{Perico 1986, Young 1995, Mervaala 1999} és következményesen az Ang II szint is megnő. RAS gátlás alkalmazásakor pedig a CNI nefrotoxicitás kivédéséről, de legalábbis mérsékléséről számolnak be a tanulmányok ^{Deniz 2006, Hamar 1999, Szabo 2000}. Az irodalom azonban ezt a hatást kizárólagosan a CNI afferens arteriolára kifejtett vazokonstriktor hatásából eredezteti. Jelen tanulmányunkban a CNI vese érrendszerére kifejtett hatását ennél kiterjedtebbnek feltételeztük. A 30. *Ábra* mutatja, hogy mindkét CNI kezelés esetén már három hét elteltével szignifikáns vazokonstriktió jött létre a vese kérgi arterioláiban, kapillárisaiban (ami lehet minden kísérre kiterjedő CNI direkt hatás vagy a CNI afferens arteriolára kifejtett vazokinstriktor hatásából fakadó alacsonyabb GFR következménye). Ennek megfelelően relatív hipoxia jön létre a vese jelentős területén, ami az oxigén részleges hiányát és fentebbi tanulmányunk alapján minden vesesejtben a citrát-ciklus zavarát eredményezi, következményesen a szukcinát felhalmozódik és kilép a mitokondriumból először a citoplazmába, majd az extracelluláris térbe ^{Hebert 2004} (5. *Ábra*). A szukcinát a GPR91 receptorán keresztül triggereli többek közt a renin termelődést is. Lévéen az összekötő szegmensben és a gyűjtőcsatornában is igen nagy mennyiségben található a GPR91 receptor ^{He 2004, Robben 2009} (17. *Ábra*), az általa triggerelt és hatalmas, proliferációra képes sejtpopuláció

által termelt renin, melyet diabéteszes modellben már leírtak ^{Kang 2008} és saját fentebbi és jelen tanulmányunkban is megerősítettünk (25,27,28. *Ábra*), egyike lehet a legfontosabb jelátvivőknek, mely a hipoxiára adott válasz egyik fontos képviselője lehet. A renin az Ang II-n keresztül tovább súlyosbítja a vazokonstriktiót, majd egy későbbi lépésben profibrotikus útvonalakat indít be (31. *Ábra*).

E gondolatmenetet a következőképp jártuk körbe. A multi-foton mikroszkópia lehetőséget teremtett arra, hogy a gyűjtőcsatornabeli renin mennyiségét és ami fontosabb a szekrécióját láthatóvá tegyük. A CNI kezelést követően szignifikánsan nagyobb mennyiségben termelt és bazális, illetve lumináris irányba szekrécióra kerülő renint detektáltunk a CD-ban, mint ahogy azt diabéteszes egér gyűjtőcsatornájában is leírták korábban ^{Kang 2008} (28. *Ábra*). A szekréció iránya ezidáig nem volt ismert, tanulmányunk azonban rámutatott, hogy mind apikális (luminális), mind bazális (szisztémás) irányban történik szekréció. Multi-foton mikroszkópiával nyert eredményeink objektívizálása céljából teljes veseszövetből áramlási citometriát végeztünk. Méréseink során a principális sejteket AQP2 jelöléssel választottuk el, így kvantitatív tudtuk értékelni a principális sejtek renin termelését (29. *Ábra*). Mindkét CNI kezelt csoportban három hetet követően már ötszörös emelkedést mutatott a renin pozitív sejtek száma, amely további magyarázatul szolgált az irodalomból ismert következményes magas Ang II szinteknek ^{Calo 2002}. Multi-foton mikroszkóppal élő állatban tudtuk detektálni a kapillárisok és arteriolák átmérőjének várt csökkenését (30. *Ábra*), ami fentebb részletezett okok miatt mind oka, mind okozata lehet a jelentős renin szekréciónak. A Masson festés fibrotikus szigetek hosszú, kötegezett formátumait tárta fel (31. *Ábra*). Ez a morfológia tovább erősítette az egy-egy ér ellátási területének iszkémiás károsodását. Irodalomból ismert, hogy a CNI hosszútávon a vesefunkció romlását eredményezi ^{Fairbanks 2003}. Jelen munkánkban is a szérum kreatinin emelkedését tapasztaltuk (32. *Ábra*).

Vizsgálataink által leírt apikális renin szekréció az interkaláris sejt felszínén elhelyezkedő (P)RR-on keresztül elősegítheti profibrotikus útvonalak aktiválódását, amely tudjuk, hogy metodikától függően ^{Nguyen 2006} mind a bazális, mind az apikális felszínen detektálható. Továbbá a renin a szisztémás keringésbe kerülve angiotenzint hasít, majd ANGI-en keresztül

megnöveli az ANGII vérszintjét is, ami az Ang II R₁-on hatva vezethet vazokonstrikcióhoz ill. érújdonképződéshez ^{Touyz 2000}. Az előbbi eset nem kíván további magyarázatot a hypoxia kialakulására, az utóbbi esetben pedig feltételezhetően egy vaszkuláris endothelialis növekedési hormon (VEGF) mediált folyamat során az újdontan képződött erek nagy része kóros növekedést mutat. A hypoplasias, csökevényes érátmérővel rendelkező, vaskos falú, dysplasias erek még egy-egy hyperplasias nagyobb véráramlásnak lehetőséget adó ér ellenére sem képesek ellátni oxigénnel a szövetet és hypoxiához, hypoplasias erek mentén kialakuló köteges fibrózishoz vezetnek.

Jelenleg betegeink és graftjaik túlélésének, lévén az allograft elleni immunfolyamatok finom hangolására még nem vagyunk képesek, az effektív immunosuppresszív terápia az alappillére. Így a gyógyszeres rezsimek bázisát képző CNI nefrotoxikus hatásával számolnunk kell, s a patomechanizmus és terápiás megoldások felfedésére törekedni.

E kérdés megválaszolása céljából bevezettük és elindítottuk a multi-foton metodikát a magyar nefrológiai alap kutatásban. A JGA mellett a nagyobb sejtpopulációt magába foglaló, a vese mélyebb rétegeiben is megtalálható CD-ban is megjelenítettük a renin termelődését és szekrécióját. A CNI CyA és Tac is fokozta a juxtaglomeruláris és CD renin szekrécióját, mellyel krónikus renin hatásokat kiváltva ronthatják a vese működését. Így a renin direkt gátlása terápiás lehetőség lehet az immunosuppresszívumok okozta nefrotoxicitás kivédésében, mérséklésében.

6.4. Az eritropoietin védő szerepe a vese iszkémia/reperfúziós károsodásában; nemi különbségek

Az iszkémia kiváltotta ARF máig megoldatlan magas morbiditási és mortalitási aránnyal járó klinikai probléma. A transzplantáció során fellépő iszkémiás károsodás a posztoperatív ARF legfőbb oka és hosszú-távon KAN kialakulását eredményezheti ^{Perico 2004}. Az EPO-val kapcsolatban korábbi tanulmányok leírták, hogy védő hatással rendelkezik a központi idegrendszer ^{Sakanaka 1998}, a szív ^{Calvillo 2003} és máj ^{Yilmaz 2004, Schmeding 2010}. poszt-iszkémiás károsodásában. Nemrégiben vált ismertté az EPO jótékony hatása a vese poszt-iszkémiás károsodása esetén is ^{Nemoto 2001, Johnson 2006, Sharples 2004}. Kiemelendő, hogy hím patkányokban az EPO kezelés negyven perces kétoldali vese artéria elzárást követően kivédte az aquaporinok és nátrium transzporterek csökkent expresszióját ^{Gong 2004}. Nőstényekben azonban ezzel épp ellenkezőleg, nem lehetett EPO hatást kimutatni miokardiális infarktust követően ^{Hale 2005}. Mindezen adatok ellenére, ezidáig nem történt átfogó összehasonlító tanulmány az EPO, vese iszkémiás károsodással szembeni protektív, és hangsúlyt érdemlően, a nemi különbségre rámutató szerepével kapcsolatban.

Tanulmányunk az első, amely leírja, hogy az EPO protektív hatása nem-kapcsolt és sokkal kifejezettebb hím, mint nőstény patkányokban. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a hímek sokkal esendőbbek a vese I/R károsodásával szemben ^{Müller 2002}. Jelen tanulmányunkban azt feltételeztük, majd bizonyítottuk, hogy az iszkémiát megelőző EPO kezelés hímeiben jótékonyabb. Az EPO szignifikánsan meghosszabbította a hímeik poszt-iszkémiás túlélését (36. *Ábra*), ezzel párhuzamosan javította a vesefunkciót (4. *Táblázat*). A poszt-iszkémiás hisztológiai kép esetén azonban nem tapasztaltunk nemi különbséget az EPO adminisztrációt követően (5. *Táblázat*, 37. *Ábra*). Elképzelésünk szerint az ARF morfológiai változásai megközelítőleg 24 órával az iszkémiás inzultust követően fejlődnek ki, így feltételezhetjük, hogy az EPO kezelés lehetőséget biztosít a későbbi fázisban való jobb felgyógyuláshoz. Tovább lépve korábbi rágcsáló és humán tanulmányok felé, az EPO

magasabb szintjeit találták hímeekben ^{Kumagai 1999, Pequignot 1997}. Ezekkel az eredményekhez hasonlóan, mi is szignifikáns nemi különbséget mutattunk ki a kontroll állatok EPO szintjeiben összevetve a nőstényekkel (3. Táblázat). Mitöbb, tanulmányunk jelentős nemi különbséget fedett fel a vese I/R-ös károsodása során is (3. Táblázat). Az exogén EPO, amit a már eleve magasabb bazális szintekhez adtunk a hím patkányokban magasabb EPO koncentrációt eredményezett iszkémiát követően is. Egyrészt, feltételezzük, hogy a magasabb EPO szint a hímeiben egy EPO-alapú, sejt védő mechanizmust biztosít, ami a nőstényekben sokkal kevésbé kifejezett. Másrészt, ha figyelembe vesszük, hogy hemodialízisen levő nők alacsonyabb EPO szinteket mutatnak ^{Kumagai 1999, Pequignot 1997}, továbbá magasabb adag EPO-t igényelnek, hogy a férfiakhoz hasonló hematokrit szinteket érjenek el ^{Ifudu 2001}, feltételezhetjük, hogy a mi tanulmányunkban is magasabb exogén EPO szintek lennének szükségesek, hogy ugyanazt a protektív hatást érhük el, amit hímeiben találtunk. Ennek megítélésére további tanulmányok lennének szükségesek és szükséges lenne figyelembe venni, hogy nagyobb adag EPO kezelést követően az adverz hatások gyakoribb előfordulásával számolhatunk.

Feltételeztük, hogy az EPO a védő hatását hímeiben részben a megnövekedett HSP72 szinteken keresztül fejt ki, ami elősegíti a Na⁺/K⁺ATPáz- α 1 védelmét. Jelen tanulmányunkban kimutattuk, hogy az EPO hímeiben szignifikáns HSP72 emelkedést váltott ki az I/R károsodás reperfüziójának 24. órájára (38. Ábra). Eredményeink hasonlóak a korábbi adatokkal, amelyek megemelkedett HSP72 szintről számolnak be rHuEPO adását követően, mely maximális protektív hatását a reperfüzió 24. órájára érte el ^{Yang 2003}. Feltételezhetően az EPO ezen hatását a janus arcú kinázon (JAK) és a transzkripciós szignál transzducser és aktivátor (STAT)-on keresztül fejt ki, amelyek nem csupán az EPO szignál résztvevőiként ismertek ^{Breggia 2008, Tsuji-Takayama 2006}, de a HSP72 aktivátoraiként is ^{Madamanchi 2001}. Ezt az elképzelést támasztja alá az a tanulmány is, ami demonstrálja májban a hímeiben meglévő tízszer aktívabb STAT5 útvonalat összevetve nőstényekkel ^{Choi 2000}. Így könnyen elképzelhető, hogy az EPO az I/R károsodás ellen a JAK/STAT/HSP72-n keresztül fejt ki védő hatását. A Na⁺/K⁺ATPáz- α 1 poszt-iszkémiás expresszió és funkció

csökkenése, valamint internalizációja jól ismert jelenség^{Molitoris 1992, Kwon 2000}. Párhuzamosan a Na⁺/K⁺ATPáz- α 1 internalizációjával, a HSP72 a tubulus sejtek citoszkeleton frakciója felé mozdul el, elősegítve a citoszkeleton újraépülését, ami esszenciális a nátrium transzporter megfelelő lokalizációjához és funkciójához^{Aufricht 1998, Bidmon 2002, Riordan 2004}. Jelen tanulmányban 24 órával az I/R-t követően, a Na⁺/K⁺ATPáz- α 1 fehérje integritása jelentősen megőrződött az EPO kezelt hímekben a kontroll állatokkal összevetve. Továbbá, az EPO kezelés következtében az enzim poszt-iszkémiás internalizációja és transzlokációja nem-függő módon nem vagy kisebb mértékben jött létre; hím patkányok kifejezettebb választ mutattak az EPO-ra, mint nőstény társaik (39. *Ábra*). Párhuzamosan ezzel a fenoménnal a HSP72 a plazma membrán felé transzlokálódott, ahol a poszt-iszkémiás periódusban a Na⁺/K⁺ATPáz- α 1-gyel ko-lokalizálódott (40. *Ábra*). Ez a ko-lokalizáció a T24 EPO kezelt hímekben volt a legkifejezettebb és éles kontrasztban állt a HSP72 kontroll állatokban tapasztalt citoplazmatikus lokalizációjával. Így feltételezhetjük, hogy az EPO a megnövekedett HSP72-n keresztül segít megőrizni a tubuláris sejtek integritását, továbbá megemeli a Na⁺/K⁺ATPáz- α 1 fehérje szintjét és elősegíti stabilitását.

Ezen megfigyelések alátámasztják azokat a korábbi eredményeinket, miszerint a HSP72 részt vesz a citoszkeleton stabilizálásában, valamint a Na⁺/K⁺ATPáz- α 1 lokalizációjának és ezáltal a funkciójának a megőrzésében^{Fekete 2006}. A meglévő irodalmi adatok fényében tudjuk, hogy a HSP72 más csaperon-fehérjékkel is (HSP25, HSP90) asszociálódik a Na⁺/K⁺ATPáz- α 1 citoszkeletonális kihorgonyozása érdekében^{Bidmon 2002, Riordan 2004}. Egy *in vitro* tanulmányban, a HSP72 és a Na⁺/K⁺ATPáz- α 1 közeli kapcsolatát immunprecipitációval bizonyították, a HSP70 és a Na⁺/K⁺ATPáz- α 1 kötődését dinamikusnak és specifikusnak találták^{Riordan 2005}. A megnövekedett HSP72 szint az EPO kezelés után tehát képes stabilizálni a Na⁺/K⁺ATPáz- α 1 citoszkeletonhoz való kihorgonyozódását és helyreállítani az aggregált enzim struktúráját, ami valószínűleg fontos útvonala az EPO hímekben kifejtett protektív hatásának.

Összegezve, eredményeink a túlélésen és molekuláris tanulmányokon alapulva azt sugallják, hogy az EPO-nak védő szerepe van a súlyos, egyoldali I/R vesekárosodással szemben, különös tekintettel hímeiben. Továbbá feltételezhető, hogy védő funkciója részben az EPO HSP72-mediált Na⁺/K⁺ATPáz- α 1-ra való hatásának tudható be. A jövőre való tekintettel, a hatékony és biztonságos EPO és EPO mimetikus gyógyszerek adagolásának terápiás potenciáljai lehetnek, hogy kivédjük a vese iszkémiás károsodását olyan klinikai helyzetekben, mint nyitott szív műtét, aorta műtét és vese transzplantáció. A hímek és nőstények közötti individualizált EPO kezelés szintén megfontolandó a mindennapi klinikai gyakorlatban.

6.5. Poszt-transzplantációs diabétesz mellitusz gyermek transzplantáltakban; calcineurin inhibitorok patológiás szerepe

A PTDM az immunoszuppresszív kezelés jelentős mellékhatása lehet. Súlyos kardiovaszkuláris rizikófaktorként szerepelhet transzplantált gyermekekben, a graft kilökődéséhez, a beteg kardiovaszkuláris betegségeihez és végső soron akár halálához is vezetve. A PTDM incidenciája az adott centrum, az alkalmazott definíció és a vizsgált populáció függvényében világszerte 3% és 46% között változik ^{Montori 2002, Greenspan 2002, Shishido 2006}, Az I. sz. Gyermekklinikán végzett felmérésünk alapján vesetranszplantált gyermekeink között a PTDM hat betegben (13%), míg az IGT hét gyermekben (15,5%) alakult ki, így a megzavart glükóz háztartással rendelkező recipiensek (PTDM+IGT) összincidenciája 28,5%-nak adódott. A fentiek közül tíz betegben (76%) a diabétesz mellitusz reverzibilisnek bizonyult, azonban három gyermek még a vizsgálat időpontjában is inzulin terápiaiban részesült.

A Tac-nak ugyan szűkebb a mellékhatás profilja: a vérnyomásra, szérum lipid szintekre és renális funkcióra kevésbé káros, mint a CyA, ám használata során a hiperglikémia incidenciája magasabb nem csak felnőtt, de gyermek populációban is. Jelen tanulmány alapján is elmondhatjuk a Tac PTDM-ben betöltött szerepéről; a Tac terápia drámai, hétszer magasabb PTDM+IGT összincidenciát eredményezett a CyA-val kezelt gyermekekkel összevetve (35% vs. 9%); a tizenhárom PTDM+IGT gyermekből tizenkettő részesült Tac terápiaiban, míg csupán egy kapott CyA alapú immunoszuppressziót (1,2. Táblázat). A Tac napi dózisa és vérszintje szintén magasabb volt ezekben a betegekben, mint a normál glükóz toleranciájú transzplantáltakban. Korrelációt találtunk továbbá a Tac és a szérum inzulin szintek között, mely eredmény a Tac diabetogén hatását a hasnyálmirigy β -sejtjeinek inzulin szekrécióra kifejtett gátlásával magyarázza (35. Ábra). A Tac diabetogén hatásáról ismert továbbá, hogy reverzibilis és dózis-függő. Korábbi *in vitro* tanulmányokban a Tac csökkentette az inzulin mRNS transzkripcióját, ezáltal az inzulin termelését ^{Van Hoff 2005, Tamura 1995}, kimutatták azt is, hogy a Tac két hetes adagolását, majd felfüggesztését követően az inzulin termelés visszatért a normális szintre ^{Tamura 1995}. Egy

másik tanulmányból ismert, hogy a Tac csökkenti a glükokináz aktivitást és így mérsékli a glükóz kiváltotta inzulin szekréciót ^{Van Hoff 2005} ellenben nem változtatja meg a hasnyálmirigy β -sejtek apoptózisát vagy nekrozisát ^{Uchizono 2004}.

A Tac kezelt gyermekek GFR-je magasabb volt, a szérum kreatinin értékeik pedig alacsonyabbak, mint a CyA kezelt betegek esetén, ami valószínűleg az előbbi csoportra jellemző transzplantáció óta eltelt szignifikánsan rövidebb időnek tulajdonítható (2. Táblázat). Továbbá, a PTDM hamarabb alakult ki a Tac-szal, mint a CyA-val kezelt csoportban. A családi anamnézis nagy számban volt pozitív a Tac kezelt csoportban, ami felveti a gyógyszer mellékhatás mellett a glükóz metabolizmus eltérésére vonatkozó addicionális genetikai predispozíció lehetőségét. Betegeinkben a CyA-ra való konverzió a glükóz metabolizmus jelentős javulását eredményezte és hat esetből háromszor a PTDM reverzibilisnek bizonyult. Érdekes megfigyelés volt, hogy a PTDM azokban a betegekben bizonyult irreverzibilisnek, akik több, mint hat hónapja kapták a Tac alapú immunosuppressziós kezelésüket. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a transzplantáció követő első három hónapban a CyA konverzió vagy CNI mentes immunosuppresszió megfelelő alternatíva lehet a PTDM kivédésére, ám ennél későbbi konverzió jótékony hatása kérdéses, mivel ezt követően a Tac glükóz metabolizmusra kifejtett hatása már nem számottevő és mértéke összevethető a CyA-val ^{Van Hoff 2005}. Tanulmányunk tovább erősítette korábbi vizsgálatok eredményeit a Tac elhagyás jótékony hatásával kapcsolatban.

Vizsgálatunk során egyetlen Rap kezelt gyermekben alakult ki PTDM, ami a Rap elhagyását követően rövid időn belül visszafejlődött. Irodalmi adatok is megerősítik megfigyelésünk, s felvetik a Rap diabetogén voltát. A Rap gátolja a mammalian target of rapamycin (mTOR) kinázt, ami szerepet játszik az inzulin szignál kaszkádjában, s végső soron a p70 riboszómális S6 kináz (P70S6K) keresztül hat. Továbbá a Rap teljes mértékben kivédi az inzulin mediálta glükóz transzporter (GLUT) - 1 fehérje szintézis emelkedést megakadályozva ezzel az inzulin független glükóz transzportot ^{Teutonico 2005}.

A kortikoszteroidokról jól ismert tény, hogy növelik a PTDM incidenciáját. Fokozzák az inzulin rezisztenciát azáltal, hogy csökkentik az inzulin receptorok számát és funkcióját,

fokozzák a hepatikus glükóz kibocsájtást és csökkentik a glükóz felvételt az izom sejtekbe Jindal 1997. A PTDM előfordulása a kortikoszteroid terápiában részesülő betegekben akár a 39%-ot is elérheti Gunnarsson 1980, habár ez a hatás úgy tűnik, hogy dózis- és idő-függő Hjelmseath 2001. Korábbi tanulmányok azt sugallják, hogy a szteroid elhagyása csökkenti az inzulin rezisztenciát Boots 2002, ezáltal csökkenti a PTDM kialakulását Walczak 2005, Heilman 2005. Jelen tanulmányunk is rámutatott a kortikoszteroid kezelés és a PTDM+IGT incidenciája közötti kapcsolatra (34. Ábra). Tanulmányunkban a transzplantáció és a PTDM+IGT kialakulása között eltelt idő a betegek 70%-ban rövidebb volt, mint egy év, míg 40%-ban még hat hónapnál is rövidebbnek bizonyult. Ez megerősíti azon irodalmi adatokat, melyek szerint a PTDM kialakulása szempontjából a legnagyobb rizikó a transzplantációt követő első hat hónapban áll fenn, ami magyarázható a kezdeti magas szteroid (20 mg/nap + lehetséges pulzus terápia) és Tac dózissal (0,1–0,15 mg/kg naponta kétszer) és magasabb vérszintekkel Van Hoff 2005. A kezdeti magas dózisokhoz járult hozzá, hogy betegcsoportunkban fellépett akut rejekeciós epizódokat protokoll szerinti szteroid lökés terápiával kezeltük, melyet követően átlagosan 22,8 hónap (0–78 hónap) telt el a PTDM+IGT kialakulásáig. A jelentős inzulin rezisztenciára utaló magas HOMA-R indexek, tovább erősítették a szteroid oki szerepét, habár a kis esetszám miatt nem tudunk közvetlen kapcsolatot kimutatni a szteroid pulzus terápia és a poszt-transzplantációs glükóz metabolizmus zavarok között.

A glükóz háztartás zavarának kialakulása abban az esetben volt a legvalószínűbb, mikor a kortikoszteroidot Tac-szal való kombinációban alkalmaztuk. Ennek kivédéséül szolgálhat a szteroid csökkentése vagy elhagyása olyan korán, amilyen korán csak lehetséges, míg a Tac dózis redukcióját szintén megfontolás tárgyává tehetjük, különös tekintettel a magas rizikóval rendelkező betegekben. A Tac és a Rap, lévén mindkettő az FK506BP-hoz kötődik, így szinergisták a diabetogén hatást illetően is, magas rizikójú betegekben egy időben történő adásukat tanácsos elkerülni.

Joggal merül fel a kérdés, hogyan érdemes szűrni a diabétesz szempontjából magas rizikóval rendelkező transzplantáltakat? Tanulmányunk során úgy gondoltuk, az IGT lehetséges prediktora a PTDM kialakulásának ^{Lorenzo 2003, Bunt 2007}, s mivel az OGTT egyike a legérzékenyebb szénhidrát anyagcserét leíró módszereknek, vizsgálatunk alapján a transzplantált betegeinknél az OGTT-t az éves kontroll vizsgálat rutin lépésévé tettük. Mitöbb a transzplantációt megelőző OGTT is megfontolandó lenne, mivel a veseátültetést megelőzően még jelentős életstílus változtatást lehetne alkalmazni, másrésről az immunosuppressziót az OGTT eredményének függvényében alakítani. Egy vizsgálat során a végstádiumú vesebetegségben szenvedő gyermekeknek a 33%-a megzavart glükóz toleranciával rendelkezett. Ezen betegek CyA alapú kezelést kaptak és egyikükben sem fejlődött ki PTDM, szemben azokkal a recipiensekkel, akik ugyan a transzplantációt megelőzőleg normál glükóz háztartással rendelkeztek, ám Tac alapú immunosuppresszióban részesültek később ^{Shishido 2006}. Szintén jól ismert tény, hogy az éhomi glükóz szintekkel összevetve a kardiovaszkuláris rizikó megítélése szempontjából az OGTT eredményei sokkal megbízhatóbbak. Egy mostanában napvilágot látott elemzés kimutatta, hogy nem csak a diabetes mellitusz, de az IGT is szignifikánsan több poszt-transzplantációs kardiális és perifériás vaszkuláris eseménnyel társul ^{Cosio 2005}. Eredményeink, egyetértésben az irodalmi adatokkal tovább hangsúlyozzák az OGTT relevanciáját mind a pre- mind a poszt-transzplantációs követés során.

Összegésképp elmondhatjuk, hogy a Klinikánkon gondozott vesetranszplantált gyermekeink esetén a glükóz metabolizmus zavarának incidenciája magas. A PTDM+IGT kialakulása szoros kapcsolatot mutatott a Tac és kortikoszteroid terápiával. Mivel a Tac-t egyre szélesebb körben alkalmazzák gyermek transzplantáltak esetén is, a gyakori vércukor meghatározás és OGTT elengedhetetlen nem csak a transzplantációt követően, de azt megelőzően is, különösen azokban a betegekben, ahol DM-ra pozitív a családi anamnézis. Az alapos monitorizálás és módosított protokollok segítségünkre lehetnek ezen immunosuppresszánsok diabetogén mellékhatásának csökkentésében. A rizikófaktorok megítélése, a korai glükóz metabolizmus zavar diagnózisa és a

diagnosztizált PTDM megfelelő kezelése visszafordíthatja a betegséget, megakadályozhatja a hosszú-távú következmények kifejlődését és javíthatja betegeink életminőségét.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A multi-foton mikroszkópia és a nemrégiben kifejlesztett, laborunk által validált FRET-alapú renin szubsztrát felhasználásával identifikáltuk és demonstráltuk a CD-ben található (pro)renin bazolaterális és lumináris lokalizációját.
2. Tanulmányunk a szukcinát/GPR91 szignált, mint a CD (pro)renin és (P)RR, a helyi RAS első tagjainak új és fontos szabályozóit írta le. *In vivo* fontosságát és funkcionális jelentőségét a vese medulláris CD-ben levő ERK1/2, (pro)renin és (P)RR expressziójának ill. vizelet PGE2 mennyiségének GPR91 függőségével igazoltuk. Ezen megfigyelésünket a megemelkedett CD tubuláris renin aktivitás is alátámasztotta. Vizsgálatunkkal elsőként vizualizáltuk közvetlenül és mennyiségileg e hatást, *in vivo* intakt egér veséjében multi-foton mikroszkóp felhasználásával.
3. A JGA mellett a nagyobb sejtpopulációt magába foglaló, a vese mélyebb rétegeiben is megtalálható CD-ban is megjelenítettük a renin termelődését és szekrécióját. A CNI CyA és Tac is fokozta a CD renin szekrécióját, mellyel krónikus renin hatásokat kiváltva ronthatják a vese működését.
4. Az EPO-nak védő szerepét írtuk le a súlyos, egyoldali I/R vesekárosodással szemben, különös tekintettel hímeiben. Továbbá igazoltuk, hogy védő funkciója részben az EPO HSP72-mediált Na⁺/K⁺ATPáz- α 1-re való hatásának tudható be.
5. A Klinikánkon gondozott vesetranszplantált gyermekeink esetén a glükóz metabolizmus zavarának incidenciája magasnak találtuk. A PTDM+IGT kialakulása szoros kapcsolatot mutatott a Tac és kortikoszteroid terápiával.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Értekezésem során először magyarázatot keresek a magas glükóz és a fokozott gyűjtőcsatornabeli (CD) renin szekréció közötti kapcsolatra, melyben a G-fehérje kapcsolt receptor (GPR91), szukcinát receptor szerepét feltételezem. Ezt követően a vese transzplantáció hosszú-távú kimenetelét befolyásoló rizikófaktorok közül hármat tárgyalok a gyógyszeres terápia aspektusából: a calcineurin inhibitorok (CNI) okozta nefrotoxicitás, a CNI és egyéb rizikófaktorok kiváltotta poszt-transzplantációs diabétesz mellituszt (PTDM) és az eritropoietin (EPO) védő mechanizmusát iszkémia/reperfúziós (I/R) vesekárosodásban. Munkám során a fenti kérdések megválaszolása részben sejtes modelleken, részben állatkísérletek által, részben klinikai vizsgálatok segítségével történt. Tanulmányunk a **szukcinát/GPR91 szignált, mint a CD-beli (pro)renin és (P)RR, a helyi RAS első tagjainak új és fontos szabályozóját írta le. *In vivo* szerepét és funkcionális jelentőségét a vese medulláris CD-ben levő ERK1/2, (pro)renin és (P)RR expressziójának ill. vizelet PGE₂ mennyiségének GPR91 függőségével igazoltuk, melyet a fokozott szukcinát expozíció következtében megemelkedett CD tubuláris renin aktivitás is alátámasztott. Multi-foton mikroszkóp felhasználásával *in vivo* intakt egér veséjében elsőként vizualizáltuk e hatást közvetlenül és mennyiségileg. Feltételezzük, hogy a szukcinát/GPR91 jelátvitel új patofiziológiás mechanizmus diabetes mellitusban, mely szabályozza a helyi CD renin aktivitását. Hasonló eredményre jutottunk a CNI neforotoxicitás esetén is, **mindkét alkalmazott CNI fokozta a juxtaglomeruláris és a nagyobb sejtpopulációt magába foglaló CD renin szekrécióját.** Következő kísérletsorozatunk túlélés és molekuláris tanulmányokon alapulva azt sugallja, hogy az **EPO-nak védő szerepe van a súlyos, egyoldali I/R vesekárosodással szemben, különös tekintettel hímeekben.** Továbbá feltételezhető, hogy védő funkciója részben **az EPO HSP72-mediált Na⁺/K⁺ATPáz- α 1-ra való hatásának tudható be.** Klinikai tanulmányunk alapján elmondhatjuk, hogy gondozott vesetranszplantált gyermekeink esetén a **glükóz metabolizmus zavarának incidenciája magas. A PTDM+IGT kialakulása szoros kapcsolatot mutatott a Tac és kortikoszteroid terápiával.****

9. SUMMARY

In my Ph.D. dissertation I look for an explanation for the relationship between the high level of glucose and the increased renin production in the collecting duct (CD) and hypothesize a crucial role of the G-coupled succinate receptor in this process. Afterwards from the therapeutic point of view I discuss three risk factors influencing the long-term outcome of the transplantation: the nephrotoxicity of the calcineurin inhibitors (CNI), the post-transplant diabetes mellitus (PTDM) caused by immunosuppressive treatment as well as other risk factors and the protective effect of erythropoietin (EPO) in case of ischemia/reperfusion (I/R) kidney injury. The object of my work was investigated by cell culture and animal experiments followed by clinical studies. These studies established **succinate and GPR91 signaling as novel and important regulators of CD (pro)renin and (pro)renin receptor [(P)RR], the first key elements of the local RAS.** *In vivo* relevance and functional significance of this new signaling mechanism were demonstrated by finding GPR91-dependent up-regulation of pERK1/2, (pro)renin and (P)RR expression in the renal medullary CD, urinary PGE₂ excretion, and increased renin activity in the tubular fluid of the CD in diabetes that was directly and quantitatively visualized for the first time using multi-photon microscopy of the intact mouse kidney *in vivo*. Succinate and GPR91 signaling are novel pathophysiological mechanisms in DM that regulate the activity of the local CD renin. Our studies also revealed that CNIs possess nephrotoxic effect on the kidney parenchyma supposedly due to the fact that **both CNIs increased the renin production in both juxtaglomerular and CD.** Further results based on both survival and molecular studies suggest that **EPO protects against severe, unilateral renal I/R injury, especially in male rats.** We believe this beneficial effect partly **might be the result of EPO's HSP72-mediated impact on Na⁺/K⁺ATPase- α 1.** Finally, our studies indicated that **the incidence of glucose metabolic disorder is relatively high in renal-transplanted children. The development of PTDM + IGT seems to be clearly associated with Tac and corticosteroid therapy.**

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Adhikary L, Chow F, Nikolic-Paterson D, Stambe C, Dowling J, Atkins R, Tesch G. (2004) Abnormal p38 mitogen-activated protein kinase signalling in human and experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia*, 47:1210-1222.
2. Allen I. Arieff. (2009) Chapter 30 – Diabetic Nephropathy and Treatment of Hypertension, *Endotext*
3. Al-Uzri A, Stablein DM, Cohn RA. (2001) Post-transplant diabetes mellitus in pediatric renal transplant recipients: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study (NAPRTCS). *Transplant*, 72:1020–1024.
4. American Diabetes Association (2011) Summary of Revisions to the 2011 Clinical Practice Recommendations, *Diab Care*, 34.
5. Andoh TF, Burdmann EA, Bennett WM. (1997) Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: experimental and clinical observations. *Semin Nephrol*, 17:34-45.
6. Aufricht C, Lu E, Thulin G, Kashgarian M, Siegel NJ, Van Why SK. (1998) ATP releases HSP-72 from protein aggregates after renal ischemia. *Am J of Physiology - Renal Physiology*, 274:268-274.
7. Batenburg WW, Danser AH. (2012) (Pro)renin and its receptors: pathophysiological implications. *Clin Sci (Lond)*, 123:121-33.
8. Bennett WM, DeMattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM. (1996) Chronic cyclosporine nephropathy in renal transplantation. *Transplant Proc*, 28:2100-2103.
9. Bidmon B, Endemann M, Müller T, Arbeiter K, Herkner K, Aufricht C. (2002) HSP-25 and HSP-90 stabilize Na,K-ATPase in cytoskeletal fractions of ischemic rat renal cortex. *Kidney Int*, 62:1620-1627.
10. Bonventre JV. (1993) Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int*, 43:1160-1178.

11. Boots JM, Van Duijnhoven EM, Christiaans MH, Wolffenbuttel BH, Van Hooff JP. (2002) Glucose metabolism in renal transplant recipients on tacrolimus: The effect of steroid withdrawal and tacrolimus trough level reduction. *J Am Soc Nephrol*, 13: 220–227.
12. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H. (1976) Biological effects of cyclosporine A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions*, 6:468–475.
13. Borlak J, Niehof M. (2009) HNF4alpha and HNF1alpha dysfunction as a molecular rationale for cyclosporine induced post-transplantation diabetes mellitus. *PLoS One*, 4:4662.
14. Bouchta NB, Ghisdal L, Abramowicz D, Broeders N, Surquin M, Hoang AD, Wissing KM. (2005) Conversion From Tacrolimus to Cyclosporin Is Associated With a Significant Improvement of Glucose Metabolism in Patients With New-Onset Diabetes Mellitus After Renal Transplantation. *Transplant proc*, 37:1857-1860.
15. Breggia, A.C., D.M. Wojchowski, and J. Himmelfarb, (2008) JAK2/Y343/STAT5 signaling axis is required for erythropoietin-mediated protection against ischemic injury in primary renal tubular epithelial cells. *Am J of Physiology - Renal Physiology*, 295:1689-1695.
16. Bunt JC, Krakoff J, Ortega E, Knowler WC, Bogardus C. (2007) Acute insulin response is an independent predictor of type 2 diabetes mellitus in individuals with both normal fasting and 2-h plasma glucose concentrations. *Diab/Metab Research and Reviews*, 23:304-310.
17. Burroughs TE, Swindle JP, Salvalaggio PR, Lentine KL, Takemoto SK, Bunnapradist S, Brennan DC, Schnitzler MA. (2009) Increasing Incidence of New-Onset Diabetes After Transplant Among Pediatric Renal Transplant Patients. *Transplant*, 88:367-373.
18. Busauschina A, Schnuelle P, van der Woude FJ. (2004) Cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc*, 36:229-233.
19. Butani L, Makker SP. (2000) Conversion from tacrolimus to neoral for post-renal transplant diabetes. *Pediatr Nephrol*, 15:176–178.
20. Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Pentlow BD, Rolles K. (1978) Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet*, 2:1323-1327.

21. Calò LA, Davis PA, Giacon B, Pagnin E, Sartori M, Riegler P, Antonello A, Huber W, Semplicini A. (2002) Oxidative stress in kidney transplant patients with calcineurin inhibitor-induced hypertension: effect of ramipril. *J Cardiovasc Pharmacol*, 40:625-631.
22. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M. (2003) Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *PNAS*, 100:4802-4806.
23. Castrop H, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. (2010) Physiology of Kidney Renin. *Physiol Reviews*, 90:607-673.
24. Cecka JM, Terasaki PI. (1995) The UNOS scientific renal transplant registry. *United Network for Organ Sharing. ClinTranspl*, 1-18.
25. Chatterjee, P., (2007) Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacology*, 376:1-43.
26. Choi HK, Waxman DJ. (2000) Plasma growth hormone pulse activation of hepatic JAK-STAT5 signaling: developmental regulation and role in male-specific liver gene expression. *Endoc*, 141:3245-3255.
27. ClinicalTrials.gov number:NCT00425698
28. Cosio FG, Kudva Y, van der Velde M, Larson TS, Textor SC, Griffin MD, Stegall MD. (2005) New onset hyperglycemia and diabetes are associated with increased cardiovascular risk after kidney transplantation. *Kidney Int*, 67: 2415-2421.
29. Curtis JJ, Luke RG, Dustan HP, Kashgarian M, Whelchel JD, Jones P, Diethelm AG. (1983) Remission of essential hypertension after renal transplantation. *N Engl J Med*, 309:1009-1015.
30. Davidson J, Wilkinson A, Dantal J, Dotta F, Haller H, Hernández D, Kasiske BL, Kiberd B, Krentz A, Legendre C, Marchetti P, Markell M, van der Woude FJ, Wheeler DC; International Expert Panel. (2003) New-Onset Diabetes After Transplantation: 2003 International Consensus Guidelines. *Transplant*, 75:3-24.

31. de Mattos AM, Olyaei AJ, Prather JC, Golconda MS, Barry JM, Norman DJ. (2005) Autosomal-dominant polycystic kidney disease as a risk factor for diabetes mellitus following renal transplantation. *Kidney Int*, 67:714-720.
32. Deierhoi, M.H. and M. Haug Iii, (2000) Review of select transplant subpopulations at high risk of failure from standard immunosuppressive therapy. *Clin Transplant*, 14:439-448.
33. Deniz H, Oğütmen B, Cakalağaoğlu F, Tuğlular S, Ozener C, Akoğlu E. (2006) Inhibition of the renin angiotensin system decreases fibrogenic cytokine expression in tacrolimus nephrotoxicity in rats. *Transplant proc*, 38:483-486.
34. Ekberg H, Grinyó J, Nashan B, Vanrenterghem Y, Vincenti F, Voulgari A, Truman M, Nasmyth-Miller C, Rashford M. (2007) Cyclosporine sparing with mycophenolate mofetil, daclizumab and corticosteroids in renal allograft recipients: the CAESAR Study. *Am J Transplant*, 7:560-570.
35. Eltzschig HK, Eckle T. (2011) Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*, 17:1391-1401.
36. Erdely A, Greenfeld Z, Wagner L, Baylis C. (2003) Sexual dimorphism in the aging kidney: effects on injury and nitric oxide system. *Kidney Int*, 63:1021-1026.
37. Esmatjes E, Ricart MJ, Ferrer JP, Oppenheimer F, Vilardell J, Casamitjana R. (1991) Cyclosporine's effect on insulin secretion in patients with kidney transplants. *Transplant*, 52:500-503.
38. Fairbanks KD, Eustace JA, Fine D, Thuluvath PJ. (2003) Renal function improves in liver transplant recipients when switched from a calcineurin inhibitor to sirolimus. *Liver Transplant*, 9:1079-1085.
39. Fekete A, Vannay A, Vér A, Rusai K, Müller V, Reusz G, Tulassay T, Szabó AJ. (2006) Sex differences in heat shock protein 72 expression and localization in rats following renal ischemia-reperfusion injury. *Am J of Physiology - Renal Physiology*, 291:806-811.

40. Fekete A, Vannay A, Vér A, Vásárhelyi B, Müller V, Ouyang N, Reusz G, Tulassay T, Szabó AJ. (2004) Sex differences in the alterations of Na⁺,K⁺-ATPase following ischaemia–reperfusion injury in the rat kidney. *The J of Physiology*, 555:471-480.
41. Fellström BC, Larsson E. (1993) Pathogenesis and treatment perspectives of chronic graft rejection (CVR). *Immunol Rev*, 134:83-98.
42. Filler G, Neuschulz I, Vollmer I, Amendt P, Hocher B. (2000) Tacrolimus reversibly reduces insulin secretion in paediatric renal transplant recipients. *NDT*, 15:867-871.
43. Filler G, Webb NJ, Milford DV, Watson AR, Gellermann J, Tyden G, Grenda R, Vondrak K, Hughes D, Offner G, Griebel M, Brekke IB, McGraw M, Balzar E, Friman S, Trompeter R. (2005) Four-year data after pediatric renal transplantation: A randomized trial of tacrolimus vs. cyclosporin microemulsion. *Pediatric Transplant*, 9:498-503.
44. Flechner SM, Glyda M, Cockfield S, Grinyó J, Legendre Ch, Russ G, Steinberg S, Wissing KM, Tai SS. (2011) The ORION study: comparison of two sirolimus-based regimens versus tacrolimus and mycophenolate mofetil in renal allograft recipients. *Am J Transplant*, 11:1633-1644.
45. Friis UG, Jensen BL, Aas JK, Skøtt O. (1999) Direct Demonstration of Exocytosis and Endocytosis in Single Mouse Juxtaglomerular Cells. *Circ Research*, 84:929-936.
46. Gaston RS. (2009) Chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity: reflections on an evolving paradigm. *Clin J Am Soc Nephrol*, 4:2029-2034.
47. Gomez RA, Lynch KR, Sturgill BC, Elwood JP, Chevalier RL, Carey RM, Peach MJ. (1989) Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. *Am J Physiol*, 257:850-858.
48. Gong H, Wang W, Kwon TH, Jonassen T, Li C, Ring T, Frøkiær J, Nielsen S. (2004) EPO and [alpha]-MSH prevent ischemia/reperfusion-induced down-regulation of AQP_s and sodium transporters in rat kidney. *Kidney Int*, 66:683-695.
49. Greenspan LC, Gitelman SE, Leung MA, Glidden DV, Mathias RS. (2002) Increased incidence in post-transplant diabetes mellitus in children: a case-control analysis. *Pediat Nephrology*, 17:1-5.

50. Gunnarsson R, Lundgren G, Magnusson G, Ost L, Groth CG. (1980) Steroid diabetes: A sign of over-treatment with steroids in the renal graft recipient? *Scand J Urol Nephrol*, 54:135–138.
51. Gurley SB, Coffman TM. (2007) The Renin-Angiotensin System and Diabetic Nephropathy. *Semin in Nephrology*, 27:144-152.
52. Hahn HJ, Laube R, Klöting I. (1989) Is the cyclosporine A toxicity on rat pancreatic B-cells modulated by the MHC? *Exp Clin Endocrinol*, 93:203–207.
53. Hale, S.L., C. Sesti, and R.A. Kloner. (2005) Administration of Erythropoietin Fails to Improve Long-Term Healing or Cardiac Function After Myocardial Infarction in the Rat. *J of Cardiovasc Pharm*, 46:211-215.
54. Hamar P, Peti-Peterdi J, Rázga Z, Kovács G, Heemann U, Rosivall L. (1999) Coinhibition of immune and renin-angiotensin systems reduces the pace of glomerulosclerosis in the rat remnant kidney. *J Am Soc Nephrol*, 11:234-238.
55. He W, Miao FJ, Lin DC, Schwandner RT, Wang Z, Gao J, Chen JL, Tian H, Ling L. (2004) Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature*, 429:188-193.
56. Hebert SC. (2004) Physiology: Orphan detectors of metabolism. *Nature*, 429:143-145.
57. Heilman RL, Mazur MJ, Reddy KS, Moss A, Post D, Mulligan D. (2005) Steroid Avoidance Immunosuppression in Low-Risk Kidney Transplant Recipients. *Transplant proc*, 37:1785-1788.
58. Heisel O, Heisel R, Balshaw R, Keown P. (2004) New onset diabetes mellitus in patients receiving calcineurin inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant*, 4:583–595.
59. Helanterä I, Ortiz F, Räisänen-Sokolowski A, Koskinen P. (2010) Impact of glucose metabolism abnormalities on histopathological changes in kidney transplant protocol biopsies. *Transplant International*, 23:374-381.
60. Helmchen F, Denk W. (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods*, 2:932–940.

61. Hems DA, Brosnan JT. (1970) Effects of ischaemia on content of metabolites in rat liver and kidney in vivo. *Biochem J*, 120:105-111.
62. Hjelmesaeth J, Hartmann A, Kofstad J, Egeland T, Stenstrøm J, Fauchald P. (2001) Tapering off prednisolone and cyclosporin the first year after renal transplantation: the effect on glucose tolerance. *NDT*, 16:829-835.
63. Hosker JP. (1985) Homeostasis model assessment: Insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologica*, 28:412-419.
64. http://www.fresenius.hu/files/sk_nvp_05_12.pdf
65. Huang J, Matavelli LC, Siragy HM. (2011) Renal (pro)renin receptor contributes to development of diabetic kidney disease through transforming growth factor- β 1 – connective tissue growth factor signalling cascade. *Clinical and Exper Pharm and Physiology*, 38:215-221.
66. Ifudu O, Uribarri J, Rajwani I, Vlacich V, Reydel K, Delosreyes G, Friedman EA. (2001) Gender modulates responsiveness to recombinant erythropoietin. *Am J of Kidney Diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 38:518-522.
67. Ingelfinger JR, Pratt RE, Ellison K, Dzau VJ. (1986) Sodium regulation of angiotensinogen mRNA expression in rat kidney cortex and medulla. *JCI*, 78:1311-1315.
68. A.B. Jain, J.J. Fung, A.G. Tzakis, R. Venkataramanan, K. Abu-Elmagd, M. Alessiani, J. Reyes, W. Irish, V. Warty, S. Mehta, S. Todo, and T.E. Starzl. (1991) Comparative study of cyclosporine and FK 506 dosage requirements in adult and pediatric orthotopic liver transplant patients. *Transplant proc*, 23:2763-2766.
69. Jindal, R.M., R.A. Sidner, and M.L. Milgrom. (1997) Post-Transplant Diabetes Mellitus The Role of Immunosuppression. *Drug Safety*, 16:242-257.
70. Johnson DW, Pat B, Vesey DA, Guan Z, Endre Z, Gobe GC. (2006) Delayed administration of darbepoetin or erythropoietin protects against ischemic acute renal injury and failure. *Kidney Int*, 69:1806-1813.
71. Johnson RN, Chappell JB. 1973 The transport of inorganic phosphate by the mitochondrial dicarboxylate carrier. *Biochem J*, 134:769-774.

72. Kaneshiro Y, Ichihara A, Sakoda M, Takemitsu T, Nabi AHMN, Uddin MN, Nakagawa T, Nishiyama A, Suzuki F, Inagami T, Itoh H: Slowly. (2007) Progressive, Angiotensin II–Independent Glomerulosclerosis in Human (Pro)renin Receptor–Transgenic Rats. *J of Am Soc Neph*, 18:1789-1795.
73. Kang JJ, Toma I, Sipos A, McCulloch F, Peti-Peterdi J. (2006) Quantitative imaging of basic functions in renal (patho)physiology. *Am J of Phys - Renal Physiology*, 291:495-502.
74. Kang JJ, Toma I, Sipos A, McCulloch F, Peti-Peterdi J. (2006) Quantitative imaging of basic functions in renal (patho)physiology. *Am J of Phys - Renal Physiology*, 291:495-502.
75. Kang JJ, Toma I, Sipos A, Meer EJ, Vargas SL, Peti-Peterdi J. (2008) The Collecting Duct Is the Major Source of Prorenin in Diabetes. *Hypert*, 51:1597-1604.
76. Kang JJ, Toma I, Sipos A, Peti-Peterdi J. (2008) From in vitro to in vivo: imaging from the single cell to the whole organism. *Curr Protoc Cytom*, Chapter 12:Unit 12.12.
77. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. (2007) The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. *Pharmac Reviews*, 59:251-287.
78. Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Cohen DM, Anderson S. (2007) Renal p38 MAP kinase activity in experimental diabetes. *Lab Invest*, 87:548-558.
79. Komlosi P, Fuson AL, Fintha A, Peti-Peterdi J, Rosivall L, Warnock DG, Bell PD. (2003) Angiotensin I Conversion to Angiotensin II Stimulates Cortical Collecting Duct Sodium Transport. *Hypert*, 42:195-199.
80. Koury, M. and M. Bondurant. (1990) Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science*, 248: 378-381.
81. Kumagai J, Yorioka N, Kawanishi H, Moriishi M, Komiya Y, Asakimori Y, Takahashi N, Tsuchiya S. (1999) Relationship between Erythropoietin and Chronic Heart Failure in Patients on Chronic Hemodialysis. *JASN*, 10: 2407-2411.
82. Kuo HT, Poommipanit N, Sampaio M, Reddy P, Cho YW, Bunnapradist S. (2010) Risk Factors for Development of New-Onset Diabetes Mellitus in Pediatric Renal

Transplant Recipients: An Analysis of the OPTN/UNOS Database. *Transplant*, 89:434-439.

83. Kurtz, A. (2011) Renin Release: Sites, Mechanisms, and Control. *Annual Review of Physiology*, 73:377-399.

84. Kwon TH, Frøkiaer J, Han JS, Knepper MA, Nielsen S. (2000) Decreased abundance of major Na⁺ transporters in kidneys of rats with ischemia-induced acute renal failure. *Am J of Physiology - Renal Physiology*, 278:925-939.

85. Lorenz JN, Weihprecht H, Schnermann J, Skøtt O, Briggs JP. (1991) Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport. *Am J of Physiology - Renal Physiology*, 260:486-493.

86. Lorenzo C, Okoloise M, Williams K, Stern MP, Haffner SM; San Antonio Heart Study. (2003) The Metabolic Syndrome as Predictor of Type 2 Diabetes. *Diab Care*, 26:3153-3159.

87. Luan FL, Zhang H, Schaubel DE, Miles CD, Cibrik D, Norman S, Ojo AO. (2008) Comparative risk of impaired glucose metabolism associated with cyclosporine versus tacrolimus in the late posttransplant period. *Am J Transplant*, 8:1871–1877.

88. Ma FY, Liu J, Nikolic-Paterson DJ: (2009) The role of stress-activated protein kinase signaling in renal pathophysiology. *Braz J of Medical and Biological Research*, 42:29-37.

89. Madamanchi NR, Li S, Patterson C, Runge MS. (2001) Reactive Oxygen Species Regulate Heat-Shock Protein 70 via the JAK/STAT Pathway. *Arterioscler, Thromb, and Vasc Biology*, 21:321-326.

90. Madsen K, Friis UG, Gooch JL, Hansen PB, Holmgaard L, Skøtt O, Jensen BL. (2010) Inhibition of calcineurin phosphatase promotes exocytosis of renin from juxtaglomerular cells. *Kidney Int*, 77:110-117.

91. Matas AJ, Gillingham KJ, Humar A, Ibrahim HN, Payne WD, Gruessner RW, Dunn TB, Sutherland DE. (2008) Posttransplant Diabetes Mellitus and Acute Rejection: Impact on Kidney Transplant Outcome. *Transplant*, 85:338-343.

92. Mendez M, Gross KW, Glenn ST, Garvin JL, Carretero OA. (2011) Vesicle-associated membrane protein-2 (VAMP2) mediates cAMP-stimulated renin release in mouse juxtaglomerular cells. *J Biol Chem*, 286:28608-28618.
93. Mervaala E, Lassila M, Vaskonen T, Krogerus L, Lähteenmäki T, Vapaatalo H, Karppanen H. (1999) Effects of ACE inhibition on cyclosporine A-induced hypertension and nephrotoxicity in spontaneously hypertensive rats on a high-sodium diet. *Blood Press*, 8:49-56.
94. Molitoris, B.A., R. Dahl, and A. Geerdes. (1992) Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase during ischemia. *Am J of Physiology - Renal Physiology*, 263:488-495.
95. Montori VM, Basu A, Erwin PJ, Velosa JA, Gabriel SE, Kudva YC. (2002) Posttransplantation Diabetes. *Diab Care*, 25:583-592.
96. Müller V, Losonczy G, Heemann U, Vannay A, Fekete A, Reusz G, Tulassay T, Szabó AJ. (2002) Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: Possible role of endothelin. *Kidney Int*, 62:1364-1371.
97. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. (2003) The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*, 349:2326-2333.
98. Nava LG, Kobori H, Prieto MC, Gonzalez-Villalobos RA. (2011) Intratubular renin-angiotensin system in hypertension. *Hypert*, 57:355-362.
99. Nemoto T, Yokota N, Keane WF, Rabb H. (2001) Recombinant erythropoietin rapidly treats anemia in ischemic acute renal failure. *Kidney Int*, 59:246-251.
100. Nguyen G, Danser AHJ. (2008) Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents. *Exper Physiology*, 93:557-563.
101. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. (2002) Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *JCI*, 109:1417-1427.
102. Nguyen G, Muller DN. (2010) The biology of the (pro)renin receptor. *JASN*, 21:18-23.

103. Nguyen G, Muller DN. (2010) The Biology of the (Pro)Renin Receptor. *JASN*, 21:18-23.
104. Nguyen G. (2006) Increased cyclooxygenase-2, hyperfiltration, glomerulosclerosis, and diabetic nephropathy: put the blame on the (pro)renin receptor? *Kidney Int*, 70:618-620.
105. Norling LL, Tufro-McReddie A, Ariel Gomez R, Moore LC, Kaskel FJ. (1996) Accumulation of acidic renin isoforms in kidneys of cyclosporine-A-treated rats. *JASN*, 7:331-337.
106. Oetjen E, Baun D, Beimesche S, Krause D, Ciorny I, Blume R, Dickel C, Wehner S, Knepel W. (2003) Inhibition of Human Insulin Gene Transcription by the Immunosuppressive Drugs Cyclosporin A and Tacrolimus in Primary, Mature Islets of Transgenic Mice. *Molec Pharm*, 63:1289-1295.
107. Pajor AM. (1999) Sodium-coupled transporters for Krebs cycle intermediates. *Annu Rev Physiol*, 61:663-682.
108. Paller MS. (1994) The cell biology of reperfusion injury in the kidney. *J Investig Med*, 42:632-639.
109. Palm F, Teerlink T, Hansell P. (2009) Nitric oxide and kidney oxygenation. *Curr Opin in Neph and Hypert*, 18:68-73.
110. Pequignot JM, Spielvogel H, Caceres E, Rodriguez A, Semporé B, Pequignot J, Favier R. (1997) Influence of gender and endogenous sex steroids on catecholaminergic structures involved in physiological adaptation to hypoxia. *Pflüg Archiv Europ J of Physiology*, 433:580-586.
111. Perico N, Benigni A, Bosco E, Rossini M, Orisio S, Ghilardi F, Piccinelli A, Remuzzi G. (1986) Acute cyclosporine A nephrotoxicity in rats: which role for renin-angiotensin system and glomerular prostaglandins? *Clin Nephrol*, 25:83-88.
112. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. (2004) Delayed graft function in kidney transplantation. *The Lancet*, 364:1814-1827.
113. Peti-Peterdi J, Fintha A, Fuson AL, Tousson A, Chow RH. (2004) Real-time imaging of renin release in vitro. *Am J of Physiology - Renal Physiology*, 287:329-335.

114. Peti-Peterdi J, Gevorgyan H, Lam L, Riquier-Brison A. (2012) Metabolic control of renin secretion. *Pflugers Arch*, 465:53-58.
115. Peti-Peterdi J, Komlosi P, Fuson AL, Guan Y, Schneider A, Qi Z, Redha R, Rosivall L, Breyer MD, Bell PD. (2003) Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE2 release from macula densa cells. *JCI*, 112:76-82.
116. Peti-Peterdi J, Morishima S, Bell PD, Okada Y. (2002) Two-photon excitation fluorescence imaging of the living juxtaglomerular apparatus. *Am J of Physiology - Renal Physiology*, 283:197-201.
117. Peti-Peterdi J, Toma I, Sipos A, Vargas SL. (2009) Multiphoton Imaging of Renal Regulatory Mechanisms. *Physiology*, 24:88-96.
118. Peti-Peterdi J. (2010) High glucose and renin release: the role of succinate and GPR91. *Kidney Int*, 78:1214-1217.
119. Prieto MC, Williams DE, Liu L, Kavanagh KL, Mullins JJ, Mitchell KD. (2011) Enhancement of renin and prorenin receptor in collecting duct of Cyp1a1-Ren2 rats may contribute to development and progression of malignant hypertension. *Am J of Physiology - Renal Physiology*, 300:581-588.
120. Prieto-Carrasquero MC, Harrison-Bernard LM, Kobori H, Ozawa Y, Hering-Smith KS, Hamm LL, Navar LG. (2004) Enhancement of Collecting Duct Renin in Angiotensin II-Dependent Hypertensive Rats. *Hypert*, 44:223-229.
121. Prieto-Carrasquero MC, Kobori H, Ozawa Y, Gutiérrez A, Seth D, Navar LG. (2005) AT1 receptor-mediated enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats. *Am J of Physiology - Renal Physiology*, 289:632-637.
122. Prokai A, Fekete A, Kis E, Reusz GS, Sallay P, Korner A, Wagner L, Tulassay T, Szabo AJ. (2008) Post-transplant diabetes mellitus in children following renal transplantation. *Ped Transplant*, 12:643-649.
123. Radu RG, Fujimoto S, Mukai E, Takehiro M, Shimono D, Nabe K, Shimodahira M, Kominato R, Aramaki Y, Nishi Y, Funakoshi S, Yamada Y, Seino Y. (2005) Tacrolimus suppresses glucose-induced insulin release from pancreatic islets by reducing glucokinase activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288:365-371.

124. Ramos-Cebrián M, Torregrosa JV, Gutiérrez-Dalmau A, Oppenheimer F, Campistol JM. (2007) Conversion From Tacrolimus to Cyclosporine Could Improve Control of Posttransplant Diabetes Mellitus After Renal Transplantation. *Transplant proc*, 39:2251-2253.
125. Redmon JB, Olson LK, Armstrong MB, Greene MJ, Robertson RP. (1996) Effects of tacrolimus (FK506) on human insulin gene expression, insulin mRNA levels, and insulin secretion in HIT-T15 cells. *JCI*, 98:2786-2793.
126. Reid, I.A., B.J. Morris, and W.F. Ganong. (1978) The Renin-Angiotensin System. *Annual Review of Physiology*, 40:377-410.
127. Reisaeter AV, Hartmann A. (2001) Risk factors and incidence of post-transplant diabetes mellitus. *Transplant Proc*, 33:8-18.
128. Riordan M, Garg V, Thulin G, Kashgarian M, Siegel NJ. (2004) Differential Inhibition of HSP72 and HSP25 Produces Profound Impairment of Cellular Integrity. *JASN*, 15:1557-1566.
129. Riordan M, Sreedharan R, Wang S, Thulin G, Mann A, Stankewich M, Van Why S, Kashgarian M, Siegel NJ. (2005) HSP70 binding modulates detachment of Na-K-ATPase following energy deprivation in renal epithelial cells. *Am J of Physiology - Renal Physiology*, 288:1236-1242.
130. Robben JH, Fenton RA, Vargas SL, Schweer H, Peti-Peterdi J, Deen PM, Milligan G. (2009) Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells. *Kidney Int*, 76:1258-1267.
131. Robertson RP, Franklin G, Nelson L. (1989) Intravenous glucose tolerance and pancreatic islet beta-cell function in patients with multiple sclerosis during 2-yr treatment with cyclosporine. *Diabetes*, 38:58-64.
132. Rodrigo E, Piñera C, de Cos MA, Sánchez B, Ruiz JC, Fernández-Fresnedo G, Palomar R, González-Cotorruelo J, Gómez-Alamillo C, de Castro SS, de Francisco AL, Arias M. (2005) Evolution of tacrolimus blood levels and concentration-dose ratios in patients who develop new onset diabetes mellitus after kidney transplantation. *Transplant Int*, 18:1152-1157.

133. Rohrwasser A, Morgan T, Dillon HF, Zhao L, Callaway CW, Hillas E, Zhang S, Cheng T, Inagami T, Ward K, Terreros DA, Lalouel JM. (1999) Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypert*, 34:1265-1274.
134. Romagnoli J, Citterio F, Violi P, Nanni G, Castagneto M. (2004) Post-transplant diabetes mellitus after kidney transplantation with different immunosuppressive agents. *Transplant proc*, 36:690–691.
135. Rusai K, Prókai A, Szebeni B, Fekete A, Treszl A, Vannay A, Müller V, Reusz G, Heemann U, Lutz J, Tulassay T, Szabó AJ. (2010) Role of serum and glucocorticoid-regulated kinase-1 in the protective effects of erythropoietin during renal ischemia/reperfusion injury. *Biochem Pharmacology*, 79:1173-1181.
136. Ryffel B, Weber E, Mihatsch MJ. (1994) Nephrotoxicity of immunosuppressants in rats: comparison of macrolides with cyclosporin. *Exp Nephrol*, 2:324-333.
137. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. (1998) In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *PNAS*, 95:4635-4640.
138. Schmeding M, Rademacher S, Boas-Knoop S, Roecken C, Lendeckel U, Neuhaus P, Neumann UP. (2010) rHuEPO Reduces Ischemia-Reperfusion Injury and Improves Survival After Transplantation of Fatty Livers in Rats. *Transplant*, 89:161-168.
139. Sezer S, Akgul A, Altinoglu A, Arat Z, Ozdemir FN, Haberal M. (2006) Posttransplant Diabetes Mellitus: Impact of Good Blood Glucose Regulation on Renal Transplant Recipient Outcome. *Transplant proc*, 38:533-536.
140. Sharples EJ, Patel N, Brown P, Stewart K, Mota-Philipe H, Sheaff M, Kieswich J, Allen D, Harwood S, Raftery M, Thiemermann C, Yaqoob MM. (2004) Erythropoietin Protects the Kidney against the Injury and Dysfunction Caused by Ischemia-Reperfusion. *JASN*, 15:2115-2124.
141. Shishido S, Sato H, Asanuma H, Shindo M, Hataya H, Ishikura K, Hamasaki Y, Goto M, Ikeda M, Honda M. (2006) Unexpectedly high prevalence of pretransplant abnormal glucose tolerance in pediatric kidney transplant recipients. *Ped Transplant*, 10:67-73.

142. Sjöholm A. (1994) Inhibitory effects of cyclosporine A on rat insulinoma cell proliferation, polyamine content and insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol*, 99:21–24.
143. Skou JC, Esmann M. (1992) The Na, K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr*, 24:249-261.
144. Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataramman R, Jain A. (1989) FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet*, 2:1000–1004.
145. Szabo A, Lutz J, Schleimer K, Antus B, Hamar P, Philipp T, Heemann U. (2000) Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on growth factor mRNA in chronic renal allograft rejection in the rat. *Kidney Int*, 57:982-991.
146. Tamura K, Fujimura T, Tsutsumi T, Nakamura K, Ogawa T, Atumaru C, Hirano Y, Ohara K, Ohtsuka K, Shimomura K. (1995) Transcriptional inhibition of insulin by FK506 binding protein-12 in pancreatic beta-cell. *Transplant*, 59:1606–1613.
147. Tang YD, Hasan F, Giordano FJ, Pfau S, Rinder HM, Katz SD. (2009) Effects of recombinant human erythropoietin on platelet activation in acute myocardial infarction: Results of a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Am Heart J*, 158:941-947.
148. Taugner R, Bührle CP, Nobiling R. (1984) Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell Tissue Res*, 237:459-472.
149. Teutonico, A., P.F. Schena, and S. Di Paolo. (2005) Glucose Metabolism in Renal Transplant Recipients: Effect of Calcineurin Inhibitor Withdrawal and Conversion to Sirolimus. *JASN*, 16:3128-3135.
150. Toma I, Kang JJ, Sipos A, Vargas S, Bansal E, Hanner F, Meer E, Peti-Peterdi J. (2008) Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *JCI*, 118:2526-2534.
151. Touyz RM, Schiffrin EL. (2000) Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*, 52:639-672.
152. Tsuji-Takayama K, Otani T, Inoue T, Nakamura S, Motoda R, Kibata M, Orita K. (2006) Erythropoietin induces sustained phosphorylation of STAT5 in primitive but not definitive erythrocytes generated from mouse embryonic stem cells. *Exp Hematology*, 34:1323-1332.

153. Uchizono Y, Iwase M, Nakamura U, Sasaki N, Goto D, Iida M. (2004) Tacrolimus Impairment of Insulin Secretion in Isolated Rat Islets Occurs at Multiple Distal Sites in Stimulus-Secretion Coupling. *Endoc*, 145:2264-2272.
154. van Hooff, J.P., M.H.L. Christiaans, and E.M. van Duijnhoven. (2004) Evaluating mechanisms of post-transplant diabetes mellitus. *NDT*, 19:8-12.
155. Vargas SL, Toma I, Kang JJ, Meer EJ, Peti-Peterdi J. (2009) Activation of the Succinate Receptor GPR91 in Macula Densa Cells Causes Renin Release. *JASN*, 20:1002-1011.
156. Versteilen AM, Di Maggio F, Leemreis JR, Groeneveld AB, Musters RJ, Sipkema P. (2004) Molecular mechanisms of acute renal failure following ischemia/reperfusion. *Int J Artif Organs*, 27:1019-1029.
157. Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobé G, Johnson DW. (2004) Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *NDT*, 19:348-355.
158. Vincenti F, Friman S, Scheuermann E, Rostaing L, Jenssen T, Campistol JM, Uchida K, Pescovitz MD, Marchetti P, Tuncer M, Citterio F, Wiecek A, Chadban S, El-Shahawy M, Budde K, Goto N. (2007) DIRECT (Diabetes Incidence after Renal Transplantation: Neoral C Monitoring Versus Tacrolimus) Investigators. Results of an International, Randomized Trial Comparing Glucose Metabolism Disorders and Outcome with Cyclosporine Versus Tacrolimus. *Am J of Transplant*, 7:1506-1514.
159. Walczak D, Calvert D, Oberholzer J, Testa G, Sankary H, Benedetti E. (2005) Effect of Race on the Occurrence of Posttransplant Diabetes in Kidney Transplant Recipients Treated With Early Steroid Discontinuation. *Transplant proc*, 37:819-821.
160. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. (2005) Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ*, 331:810.
161. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. (2004) Renal ischemiareperfusion injury. *Br J Surg*, 83:162-170.
162. Xu B, Dong GH, Liu H, Wang YQ, Wu HW, Jing H. (2005) Recombinant Human Erythropoietin Pretreatment Attenuates Myocardial Infarct Size: A Possible Mechanism

Involves Heat Shock Protein 70 and Attenuation of Nuclear Factor-kappaB. *Ann Clin Lab Sci*, 35:161-168.

163. Yale JF, Roy RD, Grose M, Seemayer TA, Murphy GF, Marliss EB. (1985) Effects of cyclosporine on glucose tolerance in the rat. *Diabetes*, 34:1309–1313.

164. Yang CW, Li C, Jung JY, Shin SJ, Choi BS, Lim SW, Sun BK, Kim YS, Kim J, Chang YS, Bang BK. (2003) Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J*, 17:1754-1755.

165. Yilmaz S, Ates E, Tokyol C, Pehlivan T, Erkasap S, Koken T. (2004) The protective effect of erythropoietin on ischaemia/reperfusion injury of liver. *HPB (Oxford)*, 6:169-173.

166. Yosypiv IV. (2011) Renin-angiotensin system in ureteric bud branching morphogenesis: insights into the mechanisms. *Pediatr Nephrol*, 26:1499-1512.

167. Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Alpers CE, Giachelli CM, Eng E, Andoh T, Bennett WM, Couser WG. (1995) Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int*, 48:439-448.

168. Zifel WR, Williams RM, Webb WW. (2003) Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol*, 11:1369–1377.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

Csohany R, **Prokai A**, Kosik A, Szabo J.A. (2013) A gyűjtőcsatorna meghatározó szerepe a vese lokális renin-angiotenzin rendszerében. *Orvosi hetilap*. Közlésre elfogadva. (IF:0)

Csohany R, **Prokai A**, Kosik A, Szabo J.A. (2013) Multi-foton mikroszkópia a vesekutatásban. *Gyermekgyógyászat*. Közlésre elfogadva. (IF:0)

Prokai A, Berta N, Vannay A, Sziksz E, Kis-Petik K, Fekete A, Toma I, Tulassay T, Kellermayer M, Peti-Peterdi J, Szabó J.A. (2012) Multifoton-képalkotás a vese szabályozó mechanizmusának vizsgálatában. *Hypertonia és Nephrologia*, 16:4-9. (IF:0)

Prokai A, Himer L, Berta N, Kosik A, Vannay A, Kis-Petik K, Szabo J.A. (2012) A reninszekréció vizsgálata multifoton-mikroszkóppal a vese akut és krónikus kórfolyamataiban. *Orvosképzés*, 87:35-40 (IF:0)

Prokai A, Himer L, Berta N, Kosik A, Vannay Á, Kis-Petik K, Szabo J.A. (2012) A renin szekréció vizsgálata multi-foton mikroszkóppal a vese akut és krónikus kórfolyamataiban. *Magyar Tudomány*, 5-16. (IF:0)

Prokai A, Fekete A, Pasti K, Rusai K, Banki N, Reusz G, Szabo A. (2012) The importance of different immunosuppressive regimens in the development of posttransplant diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*, 13:81-91. (IF: 2,628, független citáció:2)

Prokai A, Burford J, Gevorgyan H, Peterfi Z, Vargas SL, Peti-Peterdi J. (2011) Succinate activates the collecting duct renin-angiotensin system (RAS). *FASEB*, Washington, DC

Prokai A, Fekete A, Banki NF, Muller V, Vér A, Degrell P, Rusai K, Wagner L, Vannay A, Rosta M, Heemann U, Langer RM, Tulassay T, Reusz G, Szabo AJ. (2011) Renoprotective effect of erythropoietin in rats subjected to ischemia/reperfusion injury: gender differences. *Surgery*, 150:39-47. (IF: 3,603, független citáció:1)

Prokai A, Burford J, Gevorgyan H, Peterfi Z, Vargas SL, Peti-Peterdi J. (2010) Succinate activates the collecting duct renin-angiotensin system (RAS). *ASN Renal Week*, Denver, CO

Prokai A, Burford J, Gevorgyan H, Peterfi Z, Vargas SL, Peti-Peterdi J. (2010) Succinate activates the collecting duct renin-angiotensin system (RAS) *FASEB Summer Research Conference on Renal Hemodynamics*, Saxtons River, VT

Prokai A, Peti-Peterdi J. (2010) Recent advances in tissue (pro)renin imaging. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2:1227-1233. (IF: 3,603)

Prokai A, Fekete A, Kis E, Reusz GS, Sallay P, Korner A, Wagner L, Tulassay T, Szabo AJ. (2008) Post-transplant diabetes mellitus in children following renal transplantation. *Pediatr Transplant*, 12:643-649. (IF: 1,862, független citáció: 11)

Prokai A, Reusz G, Sallay P, Korner A, Madacsy L, Szabo JA. (2007) Poszttranszplantációs diabetes mellitus vesetranszplantált gyermekekben. *Hypertonia és Nephrologia*, 11: 7-12. (IF:0)

Fekete A, Vannay A, Ver A, Muller V, **Prokai A**, Rusai K, Banki NF, Vasarhelyi B, Tulassay T, Reusz Gy, Szabó AJ. (2007) Nemi különbségek a vese iszkémia/reperfúziós károsodásában: a Na/K ATPáz és a HSP72 szerepe. *Hypertonia és Nephrologia*, (IF:0)

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

Prókai A. Miért nem lesz urémiás a téli álmot alvó, anuriás medve? (2013)
Gyermekgyógyászat. 64:92. (IF:0)

Linkermann A, Heller JO, **Prókai A**, Weinberg JM, De Zen F, Himmerkus N, Szabo AJ, Brasen JH, Kunzendorf U, Krautwald S (2013) Osmotic nephrosis and contrast-induced acute kidney injury are prevented by the RIP1 kinase inhibitor necrostatin-1 in mice. *JASN*, epub ahead of print (IF:9,663)

Rusai K, **Prókai A**, Juanxing C, Meszaros K, Szalay B, Pasti K, Muller V, Heemann U, Lutz J, Tulassay T, Szabo AJ. (2013) Dexamethasone protects from renal ischemia/reperfusion injury: a possible association with SGK-1. *Acta Physiol Hung*, 23:1-13. (IF:0)

Wagner L, Banki N F, Ver A, **Prókai A**, Koszegi S, Hosszu A, Szabo A, Fekete A. (2012) Az aldoszteron-antagonisták monoterápiában is hatékonyak diabeteses nephropathiában. *Diabetologia Hungarica*, 20:162. (IF:0)

Banki NF, Ver A, Wagner LJ, Rosta M, Vannay A, Degrell P, **Prókai A**, Nagy Szakal D, Rosta K, Reusz G, Szabo AJ, Tulassay T, Baylis C, Fekete A. (2012) Aldosterone antagonists in monotherapy are protective against STZ-induced diabetic nephropathy: the potential role of the sigma-1 receptor – Akt – Na/K ATPase pathway. *PloS One*, epub ahead of print (IF: 4,411)

Rusai K, Schmaderer C, Baumann M, **Prókai A**, Kis E, Szabo AJ, Leban J, Doblhofer R, Ammendola A, Lutz J, Heemann U. (2012) Immunosuppression with 4SC-101, a novel

inhibitor of dihydroorotate dehydrogenase in a rat model of renal transplantation. *Transplantation*, 93:1101-1107. (IF:3,676, független citáció:1)

Rusai K, **Prokai A**, Szebeni B, Mészáros K, Fekete A, Szalay B, A, Degrell P, Muller V, Tulassay T, Szabo AJ. (2011) Gender differences in serum and glucocorticoid regulated kinase-1 (SGK-1) expression during renal ischemia/reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem*, 27:727-738. (IF: 3,560, független citáció:1)

Sziksz E, Veres G, Vannay A, **Prokai A**, Himer L, Onody A, Korponay-Szabo I, Reusz G, Szabo A, Arato A, Szebeni B. (2011) Fokozott hőszokk fehérje 72 expresszió gyermekkori lisztérzékenységekben. *Gyermekgyógyászat*, 62:30-34 (IF: 0)

Sziksz E, Veres G, Vannay A, **Prokai A**, Gal K, Onody A, Korponay-Szabo IR, Reusz G, Szabo A, Tulassay T, Arato A, Szebeni B. (2010) Increased Heat Shock Protein 72 Expression in Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 51:573-578. (IF: 2,183)

Rusai K, Banki NF, **Prokai A**, Podracka L, Szebeni B, Tulassay T, Reusz GS, Sallay P, Körmendy R, Szabo AJ, Fekete A. (2010) Heat shock protein polymorphism predisposes to urinary tract malformations and renal transplantation in children. *Transplant Proc*, 42:2309-2311. (IF: 0,994)

Vannay A, Sziksz E, **Prokai A**, Veres G, Molnar K, Szakal DN, Onody A, Korponay-Szabo IR, Szabo A, Tulassay T, Arato A, Szebeni B. (2010) Increased expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in coeliac disease. *Pediatr Res*, 68:118-122. (IF: 2,607)

Szebeni B, Vannay A, Sziksz E, **Prokai A**, Cseh A, Veres G, Dezsofi A, Gyorffy H, Szabo IR, Arato A. (2010) Increased expression of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 in the duodenal mucosa of children with coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 50:147-153. (IF: 2,183, független citáció:1)

Rusai K, **Prokai A**, Szebeni B, Fekete A, Treszl A, Vannay A, Muller V, Reusz G, Heemann U, Lutz J, Tulassay T, Szabo AJ. (2010) Role of serum and glucocorticoid-regulated kinase-1 in the protective effects of erythropoietin during renal ischemia/reperfusion injury. *Biochem Pharmacol*, 79:1173-1181. (IF: 4,254, független citáció: 8)

Peterfi Z, Donko A, Orient A, Sum A, **Prokai A**, Molnar B, Vereb Z, Kovacs KJ, Muller V, Szabo AJ, Geiszt M. (2009) Peroxidasin is secreted and incorporated into the extracellular matrix of myofibroblasts and fibrotic kidney. *Am J Pathol*, 175:725-735. (IF: 5,673, független citáció: 10)

Fekete A, Rosta K, Wagner L, **Prokai A**, Degrell P, Ruzicska E, Vegh E, Toth M, Ronai K, Rusai K, Somogyi A, Tulassay T, Szabo AJ, Ver A. (2008) Na⁺,K⁺-ATPase is modulated by angiotensin II in diabetic rat kidney-another reason for diabetic nephropathy? *J Physiol*, 586:5337-5348. (IF: 4,605, független citáció: 7)

12. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Dr. Tulassay Tivadar Prof.

Dr. Szabó J. Attila

Dr. Fekete Andrea és Dr. Peti-Peterdi János Prof.

Dr. Vannay Ádám, Dr. Rusai Krisztina, Dr. Bánki Nóra Fanni
Dr. Csohány Rózsa

Dr. Vér Ágota
Dr. Müller Veronika
Dr. Wagner László
Dr. Reusz György Prof.
Dr. Kellermayer Miklós Prof.
Dr. Ligeti Erzsébet Prof.
Dr. Pásty Krisztina
Dr. Péterfi Zalán
Dr. Sziksz Erna
Dr. Himer Leonóra
Dr. Degrell Péter
Dr. Kis Éva
Dr. Cseprekál Orsolya
Dr. Molnár Krisztina
Dr. Kerti Andrea
Dr. Gál Krisztina
Dr. Szebeni Beáta

Bernát Mária, Végh Edit

Anush Gevorgian
Jim Burford
Dr. Toma Ildikó
John Koo
Dr. Per Sveningsen
Dr. Sípos Arnold
Dr. Daisuke Nakano

Köszönettel tartozom továbbá kedves családomnak, szüleimnek, húgomnak.

