

A gyűjtőcsatorna renin termelésének vizsgálata a vese allograft diszfunkció kialakulásában

Doktori értekezés

Dr. Csohány Rózsa

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Sulyok Endre DSc, egyetemi tanár

Dr. Maurovich-Horváth Pál PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tordai Attila Dsc, egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szíjártó Attila PhD, egyetemi adjunktus

Dr. Szabó László DSc, egyetemi tanár

Budapest
2016

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	6
1.1. A vesetranszplantáció indikációja – krónikus vesebetegség	7
1.2. Vesetranszplantáció	8
1.2.1. A graft túlélést befolyásoló tényezők.....	9
1.2.1.1. Iszkémia/reperfúziós károsodás.....	11
1.2.1.2. A nem szerepe a krónikus allograft nefropátiában	12
1.2.1.3. Calcineurin inhibitor nefrotoxicitás.....	14
1.3. A renin-angiotenzin rendszer	17
1.3.1. A renin-angiotenzin rendszer klasszikus értelmezése	17
1.3.2. Renin termelés a vese más sejtjeiben	18
1.3.3. A renin-angiotenzin rendszer lokális szerepe. A (pro)renin receptor.	19
2. CÉLKITŰZÉSEK	22
3. METODIKA	23
3.1. Az iszkémia/reperfúziós nefropátia állatmodellje és szöveti minták gyűjtése	23
3.2. A CNI nefropátia állatmodellje és szöveti minták gyűjtése.....	24
3.3. Szérum kreatinin szint meghatározása.....	25
3.4. Hisztológiai analízis.....	26
3.4.1. Perjódsav-Schiff festés	26
3.4.2. Masson-féle trichrome festés	26
3.5. Áramlási citometria.....	27
3.6. Multifoton excitációs, lézerpasztázó mikroszkópia.....	28
3.6.1. A multifoton mikroszkóp működésének alapelve.....	28
3.6.2. Multifoton mikroszkópia a vesekutatásban.....	29
3.6.3. Multifoton mikroszkópia az iszkémia/reperfúziós és CNI vesekárosodás vizsgálatában	31
3.7. Vizelet fehérje meghatározás	32
3.8. Vérnyomásmérés	32

3.9. Calcineurin inhibitor vérszintek meghatározása.....	33
3.10. Reverz transzkripciót követő valós idejű polimeráz lánreakció	33
3.11. Plazma renin aktivitás mérése.....	34
3.12. Statisztikai analízis	35
4. EREDMÉNYEK.....	36
4.1. Iszkémia/reperfúziós vesekárosodás.....	36
4.1.1. Vesefunkció.....	36
4.1.2. Szöveti károsodás – Perjódsav-Schiff festés.....	37
4.1.3. Renin tartalom változása a reperfúzió különböző időpontjaiban – áramlási citometria.....	37
4.1.4. Renin tartalom változása a reperfúzió különböző időpontjaiban – multifoton mikroszkóp.....	39
4.1.5. Renin termelés a gyűjtőcsatornában – multifoton mikroszkóp.....	41
4.1.6. Peritubuláris érátmérők változása – multifoton mikroszkóp.....	42
4.2. Calcineurin inhibitor nefropátia.....	43
4.2.1. Vesefunkció, testsúly, vérnyomás.....	43
4.2.2. Calcineurin inhibitor vérszint.....	43
4.2.3. Renin tartalom a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben – áramlási citometria.....	45
4.2.4. Renin tartalom a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben – multifoton mikroszkóp.....	45
4.2.5. Plazma renin aktivitás	47
4.2.6. Peritubuláris kapilláris átmérők – multifoton mikroszkóp.....	47
4.2.7. Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor pozitív sejtek aránya a principális sejtek között – multifoton mikroszkóp, áramlási citometria	48
4.2.8. Kollagén I mRNSexpresszió – RT-PCR	50
4.2.9. Kollagén kimutatás – Masson festés	50
5. MEGBESZÉLÉS	52
5.1. A renin feltételezett szerepe renális allograft diszfunkció kialakulásában	53
5.2. Iszkémia/reperfúziós graft károsodás	54
5.2.1. Renin termelés időbeli változása iszkémia/reperfúziós vese károsodás esetén	55
5.2.2. Nemi különbségek a renin termelésében.....	55
5.2.3. Nemi különbségek a peritubuláris érátmérők változásában.....	56

5.2.4. Renin gátlás feltételezett szerepe iszkémia/reperfúziós vesekárosodásban ..	57
5.3. Calcineurin inhibitor nefropátia	59
5.3.1. Renin termelés a gyűjtőcsatornában CNI nefropátia kialakulása során	60
5.3.2. Lokális hipoxia kialakulása CNI nefropátiában	61
5.3.3. Kóros VEGF termelés CNI nefropátiában	62
5.3.4. Lokális hipoxia hatására kialakuló fibrózis	63
5.3.5. Direkt renin inhibitor jótékony hatása CNI nefropátiában	63
6. KÖVETKEZTETÉSEK	67
7. ÖSSZEFOGLALÁS	68
8. SUMMARY	69
9. IRODALOMJEGYZÉK	70
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	85
11. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	87

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CNI	calcineurin inhibitor
CyA	Cyclosporin A
JGA	juxtaglomeruláris apparátus
NS	nem szignifikáns
(P)RR	(pro)renin receptor
RT-PCR	reverz transzkripciót követő valós idejű polimeráz láncreakció
SEM	átlag szórása
Tac	Tacrolimus
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

1. BEVEZETÉS

A krónikus veseelégtelenség egyre növekvő gyakorisága miatt világszerte jelentős népegészségügyi és gazdasági probléma. A közelmúlt nagy epidemiológiai vizsgálatai szerint a fejlett országok lakosságának 10%-a szenved a krónikus veseelégtelenség valamelyik stádiumában (Levey et al. 2007; Schieppati and Remuzzi 2005). A krónikus veseelégtelenség ötödik stádiuma a végállapotú vesebetegség, mely során a túlélés csak vesepótló kezeléssel lehetséges. A művese (dialízis) kezelés részben pótolhatja az elvesztett vesefunkciót, ugyanakkor a korszerű immunszuppresszióknak köszönhetően a transzplantáció jobb életminőséget és hosszabb távú túlélést biztosíthat a betegek számára. A szervátültetést követően azonban a graft túlélését számos tényező befolyásolja. Korábban az esetek nagy részében akut kilökődés állt a graft veszteség hátterében, azonban az új immunszuppresszív szerek elterjedésének hatására, napjainkban a graftok hosszú távú túlélését leginkább a krónikus allograft nefropátia limitálja (Cecka and Terasaki 1995). Az allograft nefropátia következtében kialakuló kilökődést hagyományosan az allogenikus szövetre adott kismértékű válaszok ismétlődésének tartjuk. Számos bizonyíték támasztja azonban alá, hogy alloantigén-független faktorok szintén hozzájárulhatnak patogeneziséhez (Fellström and Larsson 1993). Egy fontos alloantigén-független faktor, a transzplantáció során fellépő iszkémia/reperfúziós károsodás lezajlása nemi különbséget mutat, amelynek hátterében álló patomechanizmusok közül többet laboratóriumunkban már vizsgáltak (Fekete et al. 2006; Fekete et al. 2004; Müller et al. 2002; Prókai et al. 2011; Rusai et al. 2010), a pontos kórfolyamatot azonban még ma sem ismerjük. Hosszú távon az immunszuppresszív gyógyszerek krónikus allograft károsodást okozhatnak, mely gyakran krónikus veseelégtelenséghez vagy akár a graft kilökődéséhez vezet. A graft kilökődés alloantigén-független okai között tehát kitüntetett szerepük van az immunszuppresszáns gyógyszerek mellékhatásainak, különös tekintettel a calcineurin inhibitor (CNI) okozta nefrotoxicitásra (Chapman et al. 2005). A CNI nefrotoxicitás patomechanizmusa jelenleg nem teljesen tisztázott. Számos determináns közül ezen két alloantigén-független faktor nefrotoxikus hatása került vizsgálataink előterébe, amely mindkettő jelentős, ám egyúttal módosítható faktor is.

1.1. A vesetranszplantáció indikációja – krónikus vesebetegség

Krónikus vesebetegségnek nevezzük a vese strukturális vagy funkcionális eltéréseit, melyek a vese vizeletkiválasztó és hormonális funkciójának beszűkülésével járnak és három hónapnál hosszabb ideje fennállnak. Definíció szerint krónikus veseelégtelenségről beszélünk, ha i) a glomerulus filtrációs ráta $60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ -nél alacsonyabb legalább három hónapon keresztül vagy ii) akár fiziológiás, akár csökkent glomerulus filtrációs ráta mellett vesekárosodás áll fenn több mint három hónapja. A vesekárosodás lehet szövettani vagy képalkotó vizsgálattal felismert strukturális károsodás, illetve a vese funkcionális rendellenességére utaló egyéb eltérés (proteinuria, albuminuria, vizelet üledék vagy elektrolit eltérés) (Levey et al. 2003). A glomerulus filtrációs ráta értéke alapján a krónikus vesebetegség öt stádiumát különböztetjük meg, $15 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ alatti glomerulus filtrációs ráta esetén végállapotú vesebetegségről beszélhetünk, ami vesepótló kezelés nélkül a beteg halálához vezet.

A krónikus veseelégtelenség háttérében álló két legjelentősebb kóroki tényező, a diabétesz mellitusz és a hipertónia, melyek az esetek több mint 50%-áért felelősek. Krónikus vesebetegséghez vezethetnek ezen kívül a glomeruláris és a tubulointersticiális betegségek, például a vesemedence gyulladás vagy reflux nefropátia, illetve a tisztás vesebetegségek és a vesetranszplantáció után fellépő kórfolyamatok (krónikus allograft nefropátia). Az esetek egy részében alapbetegség nem deríthető ki (Levey et al. 2003).

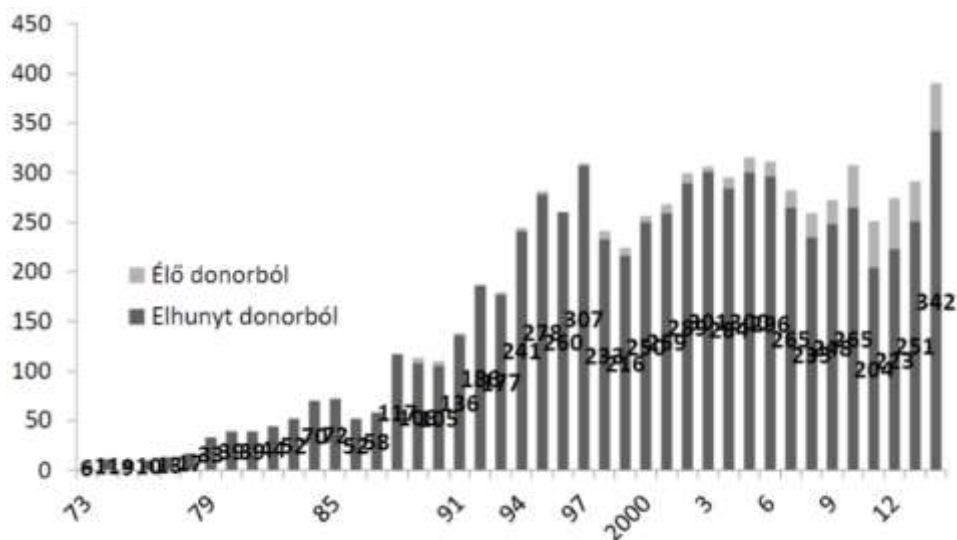
A krónikus veseelégtelenség egészségügyi jelentőségét jól érzékelteti, hogy az Amerikai Egyesült Államokban a vesebetegségek jelentik a nyolcadik leggyakoribb halálokat. A lakosság megközelítőleg 14%-a szenvedett krónikus vesebetegségben az Egyesült Államokban 2013-ban, ami közel 45 millió főt jelent (Saran et al. 2015). Ezen betegségcsoport legnagyobb veszélye, hogy kezdeti stádiumaiban nem, vagy alig jár klinikai tünetekkel, ezért a betegek túlnyomó többsége nem fordul orvoshoz. Magyarországon a Nemzeti Vese Program több mint félmillióra becsüli a krónikus vesebetegek számát, akik közül vesepótló kezelésben körülbelül tízezren részesülnek. A magyar betegek 60%-a dialízis kezelés alatt áll.

Az Amerikai Vese Alapítvány adatai alapján, 2013-ban az Egyesült Államokban a betegek megközelítőleg kétharmada részesült konzervatív vesepótló kezelésben, azaz peritoneális dialízisben vagy hemodialízisben, egyharmaduk pedig vesetranszplantáción

esett át (Saran et al. 2015). A dializált betegek halálozása 6,7-8,5-szerese az azonos életkorú átlagpopulációénak, míg a transzplantált betegek halálozása csak 1,3-1,6-szor nagyobb az egészségesekhez képest, ugyanakkor a transzplantáció költsége harmada a dialízis költségének (Collins et al. 2012). Továbbá a konzervatív vesepótló kezelés csak részben és időlegesen képes pótolni a vesék sokrétű funkcióját, tehát az előbbi adatok megerősítik azt a tényt, hogy azon betegeknél, akik megfelelnek a veseátültetés kritériumainak, mindenképpen a transzplantáció részesítendő előnyben. A fenti adatok is bizonyítják, hogy a krónikus veseelégtelenség milyen jelentős egészségügyi tényező, ami hatalmas anyagi és szociális terhet jelent az egészségügynek és a társadalomnak, ezért kulcsfontosságú a legelőnyösebb terápia lehetőségének a megteremtése.

1.2. Vesetranszplantáció

A végállapotú vesebetegség valódi terápiás megoldása a transzplantáció. Amennyiben a becsült glomerulus filtrációs ráta $15\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ alá csökken (ha az etiológia diabétesz mellitusz, $<20\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$) indokolt a vesetranszplantáció (Perner and Petrányi 2013). A transzplantációk számát azonban elsősorban a donorok száma korlátozza. A Nemzeti Szervdonációs Regiszter adatai alapján 2014-ben összesen 390 veseátültetés történt Magyarországon. Ennek csupán 10%-a (48 eset) volt élődonoros transzplantáció (Szelestei et al. 2011) és 342 esetben cadaver donorból származó vese került beültetésre (1. ábra).



1. ábra: Veseátültetések száma Magyarországon 1973-2014 között. (Országos Vérellátó Szolgálat Szervkoordinációs Iroda)

Hazánk Eurotransplant hálózathoz való 2012-es csatlakozása óta a cadaver donorból történő vesebeültetések éves száma megközelítőleg 50%-kal emelkedett.

A transzplantáció hosszabb túlélést (Rabhat et al. 2000; Wolfe et al. 1999), jobb életminőséget (Gumber et al. 2013), kevesebb egészségügyi költséget jelent a betegeknek (Jensen et al. 2014) és az egészségügynek, mint a konzervatív vesepótló kezelések. Az utóbbi években az immunfarmakológia és a klinikai orvostudományok folyamatos fejlődése fontos előrelépéseket eredményezett a vesetranszplantáció területén. A recipiensek alkalmasságának alapos vizsgálatára és a donor immunológiai profiljának pontosabb feltérképezésére kerül sor, a műtéti technikák fejlődésének köszönhetően rövidül az iszkémiás idő. A korszerű immunszuppresszáns terápia a betegek és a transzplantált szervek, azaz graftok rövid távú túlélését jelentősen javítja. Néhány súlyos nehézség azonban megoldatlan maradt. A graft a legkorszerűbb terápia ellenére is számos okból kilökődhet. A transzplantált vesékben olyan válaszreakciók alakulhatnak ki, amelyek krónikus allograft nefropátia kialakulásához vezetnek, mely kórkép a transzplantált szerv túlélését limitálja (Szabó and Müller 2002).

1.2.1. A graft túlélést befolyásoló tényezők

A veseátültetés sikerét nagymértékben a recipiens és a donor immunológiai tulajdonságai szabják meg. A graft túlélését azonban ezen kívül még számos tényező befolyásolja. A transzplantációt követő graft vesztés időbeli bekövetkezése szempontjából megkülönböztetünk rövid távú és hosszú távú túlélést befolyásoló faktorokat.

Rövid távú túlélést befolyásoló tényezők

A rövid távú graft túlélés egyik legjelentősebb rizikó tényezője a humán leukocita antigén és vércsoportantigén-kompatibilitás (Terasaki and Ozawa 2004), mely a graft immunkompatibilitását határozza meg. Emellett nagy hangsúlyt kap az akut rejekció kialakulásának felismerésében a megkésett allograft funkció (Quiroga et al. 2006; Siedlecki et al. 2011), melynek hátterében állhat akut tubuláris nekrozis, korai vénás trombózis, uréter- vagy katéterelzáródás, anasztomózis varratelégtelenség vagy gyógyszer vesetoxicitás. Az akut tubuláris nekrozis megelőzésének egyik legfontosabb eleme a minél rövidebb iszkémiás idő, melynek időtartama nem csak a rövid, de a hosszú távú túlélést is befolyásolja (Szabo and Heemann 1998). A nem immunológiai faktorok

közül szintén kiemelendő tényező az átültetés típusa. Az élő donoros átültetések graft túlélése ugyanis jobb, mint a cadaver donációból származó szervek túlélése (Naderi et al. 2009). A Kidney Donor Profile Index 10 szempont alapján osztályozza a cadaver donoroktól származó graftokat, aminek köszönhetően biopszia nélkül is precízen tudják értékelni a graftok minőségét (Lee and Abramowicz 2015). Ilyen szempont a donor kora, etnicitása, testsúlya, testmagassága, társbetegségei (hipertónia, diabétesz mellitusz, hepatitis B és C vírus fertőzés, szérum kreatinin szint), halálának oka, illetve módja (szívleállást követően vagy dobogó szívű donorból történt-e a donáció) (Bernat et al. 2006). A graft rövid távú túlélésére nagy befolyással lehet az ún. center effect (központ hatás), tehát a recipiens gondozásában résztvevő intézmény bizonyos tulajdonságainak összessége (Kim et al. 2004). A graft túlélésére szintén hatással lehet, hogy a szervátültetést megelőzően a recipienst dializálták-e, ez esetben ugyanis nő a graft vesztés kockázata (Vats et al. 2000).

Hosszú távú túlélést befolyásoló tényezők – krónikus allograft nefropátia

Az akut kilökődés visszaszorítása mára ugyan egyre eredményesebb, azonban a késői graft diszfunkció előfordulása még mindig komoly problémát jelent (Serur et al. 2011), azaz a vesetranszplantáció sikerességét alapvetően a hosszú távú graft túlélés határozza meg. A krónikus allograft nefropátia kifejlődése során az átültetett vese működése progresszíven beszűkül. Ezt több funkcionális paraméter is jelezheti, mint például a kreatinin clearance csökkenése, a proteinuria megjelenése vagy a hipertónia, melyek súlyossága szoros összefüggést mutat a graft funkcionális és szövettani állapotával (Kreis and Ponticelli 2001). A leggyakoribb szövettani eltérések krónikus allograft nefropátiában a glomeruláris léziók mellett a peritubuláris kapillárisok falának megvastagodása, az intersticiális fibrózis, valamint a tubuláris atrófia (Paul 1999). Sokáig úgy tartották, hogy a krónikus graft vesztés hátterében kizárólag alloantigén-függő folyamatok állnak, így a korábbi évek irodalmában a krónikus kilökődés kifejezést alkalmazták. Napjainkra azonban tisztázódott, hogy az alloantigén-független faktorok is jelentős szerepet játszanak a folyamat létrejöttében vagy felgyorsulásában (Ponticelli et al. 2002). Mivel azonban e folyamatok szorosan összefüggnek, önálló szerepüket igen nehéz megítélni. Az 1. táblázatban a graft hosszú távú túlélését befolyásoló alloantigén-

függő és alloantigén-független faktorok kerülnek felsorolásra, melyek közül csak a dolgozat témájához szorosan kapcsolódó tényezőket részletezem.

1. táblázat: A graft hosszú távú túlélését befolyásoló tényezők.

I. Alloantigéntől függő faktorok
1. Hisztóinkompatibilitás
2. Akut rejekciók száma és intenzitása
3. Szenzitizáció
II. Alloantigéntől független faktorok
1. Agyhalál hatása a donor vesére
2. <i>Iszkémia/reperfúziós károsodás</i>
3. <i>Nem</i>
4. <i>Immunszuppresszív terápia, gyógyszer toxicitás</i>
5. Metabolikus faktorok (hiperlipidémia, diabétesz mellitusz)
6. Hipertónia
7. Infekciók
8. Működő nephronszám csökkenése, hiperfiltráció
9. Donor, illetve recipiens életkora
10. Non-compliance

1.2.1.1. Iszkémia/reperfúziós károsodás

A transzplantáció elkerülhetetlen velejárója az iszkémia, majd az azt követő reperfúzió, mely hatások mind rövid, mind hosszú távon befolyásolják a graft túlélését. Az iszkémia/reperfúzió okozta szöveti károsodás függ az iszkémiás periódus típusától (hideg, meleg), hosszától és az azt követő reperfúziótól, illetve a recipiens nemétől (Kher et al. 2005; Müller et al. 2002; Müller et al. 1999; Szabó and Müller 2002).

Az iszkémiás szakaszban a sejtek oxigénhiánya miatt az adenzin-5'-trifoszfát raktárak kimerülnek, intracelluláris acidózis alakul ki, mely folyamatok számos következménnyel járnak. A sejtek homeosztázisát adenzin-5'-trifoszfát -igényes folyamatok tartják fenn. Ezek lehetnek membrántranszport folyamatok vagy a fehérje, illetve lipidszintézis lépései. Ezen folyamatok lassulásának illetve leállításának következtében nő az

intracelluláris Na^+ koncentráció, mely a szabad víz beáramlását is eredményezi. Ez az endotél sejtek duzzadásához vezet (Kosieradzki and Rowiński 2008). A Na^+ mellett a Ca^{2+} koncentráció is megemelkedik a sejtekben, aminek hatására fokozódik a reaktív oxigéngyökök képződése (Peng and Jou 2010). Az iszkémiát követő periódus kritikus a sejtek túlélése szempontjából. Paradox módon a reperfúzió szintén számos káros hatással rendelkezik, ugyanis a kialakuló „oxigéndömping” hatására további reaktív oxigéngyökök keletkeznek. A reaktív oxigéngyökök lipidperoxidációt, DNS károsodást és a poliszacharidok depolimerizációját okozzák (Weight et al. 1999). Emellett tovább emelkedik a sejtek Ca^{2+} szintje, ami a reaktív oxigéngyökökkel együtt különböző folyamatokon keresztül végül a sejt halálához vezet (Kalogeris et al. 2012). Reperfúzió során a legjellemzőbb károsodás az endotél sérülés, mely folyamat során számos mediátor szabadul fel (endotelin, platelet activating factor, citokinek, hisztamin), melyek rontják a szöveti oxigenizációt. Ezek közül kiemelendő az endotelin, mely érszűkítő hatásával különösen hozzájárul a kapilláris keringés romlásához. Ugyanakkor a reperfúzió során a károsodott endotél sejtekben csökken a nitrogén monoxid, illetve más vazodilatátor anyagok szintje, ami tovább fokozza a vazokonstriktációt (Molitoris 2004), és ez által tovább csökkenti a szövet oxigén ellátását. Az eddig leírt folyamatokkal párhuzamosan jelentős szerepe van a renin-angiotenzin rendszer aktiválódásának is az iszkémia/reperfúziós károsodás, így a krónikus allograft nefropátia kialakulásában (Altunoluk et al. 2006; Efrati et al. 2012; Fouad et al. 2010; Lutz et al. 2006). Az inzultus hatására megnövekedett mennyiségű angiotenzin II számos folyamatban vesz részt, így gyulladásszerű folyamatok beindításában, sejt proliferációban, extracelluláris mátrix és reaktív oxigéngyökök termelésében, illetve apoptózis kiváltásában, melyek mind hozzájárulhatnak a krónikus allograft nefropátia kialakulásához.

1.2.1.2. A nem szerepe a krónikus allograft nefropátiában

A hosszú távú graft túlélésben jelentős nemi különbség áll fenn. Egy több mint 70'000 mintát feldolgozó vizsgálat kimutatta, hogy az akut rejekciók száma a nőknél, míg a krónikus allograft nefropátia kialakulásának veszélye a férfiaknál magasabb (Meier-Kriesche et al. 2001). Hosszú ideig azt feltételezték, hogy ennek kizárólagos oka a nők és férfiak nefronszámbeli eltérése. Azonban később kiderült, hogy a hiperfiltrációs elmélet önmagában nem állja meg a helyét, azaz női donor és férfi recipiens esetében a nők kisebb

veséje és kevesebb nefronszáma önmagában nem magyarázza a férfi recipienseknél gyakrabban kialakuló krónikus allograft nefropátiát (Neugarten et al. 2002). A nem szerepét leginkább a kardiovaszkuláris rendszer tekintetében vizsgálták. A kezdeti eredmények az ösztrogének protektív hatását mutatták (Rosano and Panina 1999), azonban a nemi hormonok hatása az iszkémia indukálta folyamatokra nem egyértelmű. Fiatal nők védettebbek tűnnek az akut fellépő iszkémia/reperfúziós károsodás ellen, azonban a tesztoszteron protektív hatását is leírták a folyamatban (Bell et al. 2013). Valószínűleg a genetikailag meghatározott nem és a hormonális milió együtt határozza meg a szervezet választ a stresszhelyzetre. Ezen elméleti ismeretek alapján a nemi hormonok, elsősorban az ösztrogén a graftban jelentkező krónikus szklerotikus folyamatokat is lassíthatják az endotél védelmén és növekedési faktorok felszabadulásának mérséklésén keresztül (Müller et al. 1999). Emellett a graft túlélésbeli különbségeire magyarázatot adhat az is, hogy a nemek közötti eltérő testsúly miatt az immunszuppresszív szerek dózisában is jelentős különbség lehet. Ebből következően azok nefrotoxikus hatásai is változó mértékben következhetnek be.

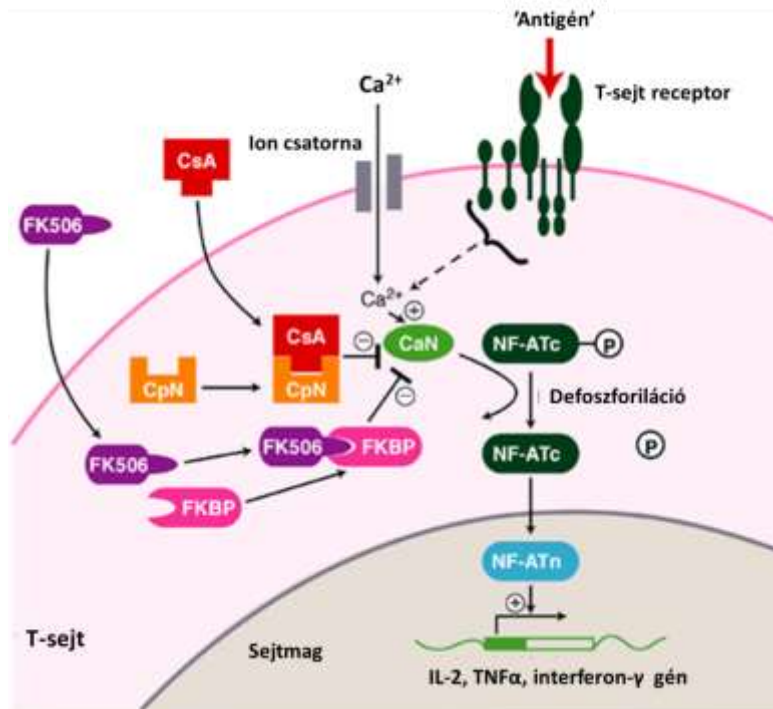
A hemodinamikai szabályozást illetően a két nem között ugyan sok a hasonlóság, az iszkémia/reperfúziós károsodásra adott válaszban mégis jelentős nemi különbség mutatható ki. Kutatócsoportunk korábban leírta, hogy a nőstény patkányok relatív védelmet élveznek a poszt-iszkémiás veseelégtelenséggel szemben, részben az ösztrogén protektív hatásának köszönhetően, míg a hímekben androgének hatására termelődő vazokonstriktor hatású endotelin okozta érelváltozások súlyosbítják az iszkémiás vesekárosodás kialakulását (Müller et al. 2002). Ezzel összhangban a nitrogén oxid termelődés fokozott a nőstényekben (Sullivan 2008). Ugyanakkor az intrarenális renin-angiotenzin rendszer aktivációja hangsúlyosabb a hímekben (Maric-Bilkan and Manigrasso 2012), ami azzal is magyarázható, hogy az androgének emelik a plazma renin szintjét, míg az ösztrogének csökkentik azt (Komukai et al. 2010).

Összefoglalva tehát a recipiens neme számtalan módon befolyással lehet a graft hosszú távú túlélésére. PhD munkám során ennek egyik aspektusát, az akut iszkémia/reperfúziós vesekárosodásban létrejövő renin-angiotenzin rendszer aktivációban megjelenő nemi eltéréseket vizsgáltuk.

1.2.1.3. Calcineurin inhibitor nefrotoxicitás

A CNI-k gombákból (*Tolypocladium inflatum* és *Streptomyces tsukubaensis*) kivont, a sejtes immunválaszt befolyásoló molekulák. A Tacrolimus (Tac) egy 23 tagú makrolid antibiotikum, míg a Cyclosporin A (CyA) egy 11 aminosavból álló ciklikus peptid (Borel 2002; Pritchard 2005). Számos egyéb indikációjuk mellett a veseátültetést követő terápia szerves részei. Leggyakrabban kortikoszteroiddal (általában orális prednisolon), azathioprinnal, mycophenolat mofetillel, ritkán everolimussal vagy sirolimussal kettes vagy hármas kombinációban alkalmazzák őket (Denton et al. 1999; Wong et al. 2005).

A CNI-ok immunszuppresszáns hatásukat főként a T-sejteken keresztül fejtik ki (2. ábra). Legnagyobb mértékben a T-helper sejtek működését gátolják, de hatással vannak a citotoxikus és szupresszor T-sejtekre is. Amikor egy antigén kötődik a T-sejt receptor komplexhez, aktiválódik a foszfolipáz C γ enzim, mely foszfatidil-inozitol biszfoszfát membrán foszfolipidból diacil-glicerolt és inozitol 4,5,6-triszfoszfátot hasít le. Az inozitol 4,5,6-triszfoszfát hatására megnövekszik az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció. Az ionizált kalcium kalmodulinnal képez komplexet, mely aktiválja a calcineurin enzimet. A calcineurin egy szerin-treonin foszfatáz, ami transzkripció faktor aktiválására képes (aktivált T-sejt nukleáris faktor), így járul hozzá a T-sejtek proliferációjához és differenciálódásához többek között interleukin-2, interferon- γ és tumor nekrózis faktor- α transzkripción keresztül. Mindkét CNI az eukarióta sejtek egy-egy citoplazmatikus fehérjéjéhez kötődik: a CyA ciklofillinhez, a Tac pedig egy ún. FK506-kötő fehérje molekulához. Komplexük a calcineurin enzimátikus működését gátolja (Schreiber and Crabtree 1992; Timmerman et al. 1996).



2. ábra: A calcineurin inhibitorok farmakodinámiája. A Cyclosporin A ciklofillinhez, a Tacrolimus pedig FK kötő fehérjéhez kötődve gátolja az aktivált T-sejt nukleáris faktor calcineurin általi indukcióját az antigén által aktivált T-sejtben. CaN: calcineurin; CpN: ciklofillin; CsA: Cyclosporin A; FK506: Tacrolimus; FKBP: FK kötő fehérje; IL2: interleukin 2; NFAT: aktivált T-sejt nukleáris faktor; TNF α : tumor nekrozis faktor- α . (Stepkowski 2000)

A CNI-ok számos mellékhatással rendelkeznek. A nefrotoxicitás az egyik legjelentősebb nem kívánt hatás, de fontos megemlíteni többek között a hipertenziót, a diabétesz mellitust, hiperkalémiát, hipomagnezémiát, illetve az infekciók és malignitások előfordulásának fokozott kockázatát (Armenti et al. 1994; Eidelman et al. 1991; Hojo et al. 1999; Hoorn et al. 2011; Kainz et al. 2000; Prommer 2012; Schwartz et al. 1995; Thomas et al. 2000; Tricot et al. 2005; Weir and Fink 1999). A CNI-ok alkalmazott dózisa és vérszintje összefüggést mutat mellékhatásaik súlyosságával, ezért szűk terápiás ablakban használhatók. Mivel farmakokinetikai tulajdonságaik nagy egyéni variabilitást mutatnak, a gyógyszer vérszint szoros monitorozást igényel (Kershner and Fitzsimmons 1996; Laskow et al. 1996). A CNI-ok számos mellékhatása közül jelen dolgozatban a nefrotoxicitásról lesz szó. A krónikus allograft nefropátia kialakulásában fontos tényező a CNI nefrotoxicitás, melyről számos irodalmi adattal rendelkezünk (Liptak and Ivanyi 2006), ám a CNI nefropátia hátterében meghúzódó pontos patomechanizmus még mindig nem teljesen tisztázott.

A CNI nefrotoxicitás akut és krónikus formában jelentkezhethet. Akut formájában elsősorban hemodinamikai hatások dominálnak. Irodalmi adatok szerint a CNI-ok felborítják az egyensúlyt az érszűkítő és értágító faktorok között. Emelik az érszűkítő hatású endotelin és tromboxán szintet, valamint közvetlenül aktiválják a renin-angiotenzin rendszert, de csökkentik a prosztglandin E₂, prosztaciklin valamint a nitrogén-monoxid szintet. Ennek hatására szűkülnek az afferens glomeruláris arteriolák. Így a Tac és a CyA csökkenti a renális vérátáramlást és a glomeruláris filtrációs rátát, ami a vesefunkció beszűkülését és a tubuláris működés romlását eredményezheti. Emelkedik a szérum kreatinin szint, és hipertónia alakulhat ki. Ez a folyamat reverzibilis és dóziszfüggő (Bennett et al. 1996).

A krónikus CNI nefrotoxicitás kapcsán Myers és mtsai 1984-ben elsőként írták le, hogy szívtranszplantált betegekben CyA hosszú távú használata irreverzibilis vesefunkció romlást eredményez a visszafordíthatatlan és progresszív tubulointersticiális károsodás, illetve glomeruloszklerózis következtében (Myers et al. 1984). Később megerősítésre került, hogy a hosszú távú CyA és Tac terápia a vesék mindhárom fő struktúráját, a glomerulusokat, a tubulointersticiumot és az ereket is károsítja. Lehetséges szövettani elváltozások krónikus CNI nefrotoxicitásban az intersticiális fibrózis, melyet tubuláris atrófia kísér, az arteriolák hialinózisa, globális vagy fokális szegmentális glomeruloszklerózis valamint tubuláris kalcifikációk (Morozumi et al. 2004; Randhawa et al. 1993). A CyA és a Tac rontja a tubuláris funkciókat és zavart okoznak a szervezet ion homeosztázisában. Calcineurin inhibitor nefrotoxicitás során kialakulhat hiperurikémia, hiperkalémia és hiperklorémiás metabolikus acidózis a tubuláris epiteliális sejtek Na⁺-K⁺-2Cl⁻-kotranszporterének csökkent expressziója és a gyűjtőcsatornák Na⁺-K⁺-ATP-ázának gátlása miatt (Deppe et al. 1997; Heering and Grabensee 1991). Hipomagnezémia renális magnéziumvesztés miatt jöhet létre, a paracellin-1 expresszió csökkentésén keresztül (Chang et al. 2007). Mindemellett a CNI-ok apoptózis géneket is indukálnak a tubuláris és intersticiális sejtekben (Yang et al. 2002). A renin-angiotenzin rendszer aktivációja a krónikus CNI nefrotoxicitásban is részt vesz. Az angiotenzin II amellet, hogy csökkenti a renális vérátáramlást, profibrotikus és proinflammatorikus útvonalakat is indukál, mivel az angiotenzin 1-es típusú receptorán keresztül serkenti a transzformáló növekedési faktor β expressziót (Wolf 2006). A renin-angiotenzin rendszer aktiváció emeli a szérum aldosteron szintet, ami szintén hozzájárulhat a kórfolyamathoz:

az aldosteron növekedési faktorok és reaktív oxigén gyökök képződését indukálja és csökkenti az extracelluláris mátrix degradációt, tovább rontva az intersticiális fibrózist (Remuzzi et al. 2008). A kutatások középpontjában sokáig a renin-angiotenzin rendszer egyik végrehajtó funkcióját betöltő molekula, az angiotenzin II állt, és a renin-angiotenzin rendszer fokozott működése során, a feltételezhetően szintén megemelkedett renin szerepe kevésbé volt ismert. Mostanra azonban az is ismertté vált, hogy patkányokban a CNI kezelés a juxtaglomeruláris apparátus (JGA) renin termelő granuláris sejtjeinek hipertrófiáját okozza (Ryffel et al. 1994). A juxtaglomeruláris sejtek továbbá képesek olyan calcineurin izoformákat kifejezni, melyek gátlása CyA-val renin felszabadulást eredményez a granuláris sejtekben *in vitro* körülmények között (Madsen et al. 2010). Ezt az eredményt *in vivo* körülmények között is sikerült alátámasztani: CyA-val kezelt patkányok afferens arteriolájában emelkedett renin tartalmat írtak le, jelentős hemodinamikai változást okozva a vese mikrovaskulaturájában (Norling et al. 1996). Hasonló eredményeket közöltek Tac kezelés kapcsán is, azaz a plazma renin aktivitása megemelkedett Tac hatására (Andoh and Bennett 1998). Fontos azonban megjegyezni, hogy mindegyik korábbi tanulmány a JGA renin termelésére fókuszált, és nem vizsgálta a renin más, intrarenális forrásának lehetőségét.

1.3. A renin-angiotenzin rendszer

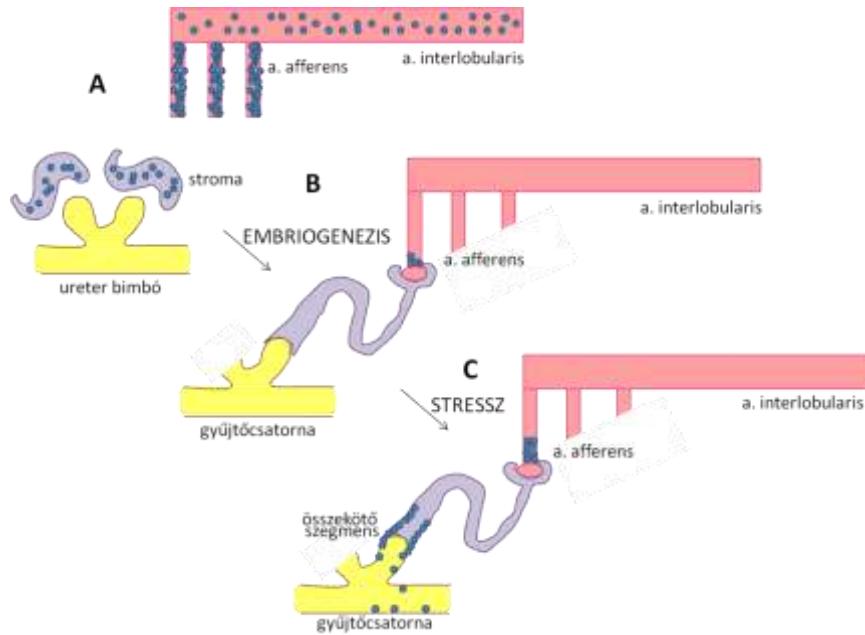
1.3.1. A renin-angiotenzin rendszer klasszikus értelmezése

A renin-angiotenzin rendszer az extracelluláris folyadéktér egyik legfontosabb hormonális szabályozója. Elsődleges feladata a só-víz háztartás és a vérnyomás szabályozása. Mivel a rendszert alkotó hormonok többsége a veséhez hasonlóan más szervekben is feleslegben találhatóak meg, a renin-angiotenzin rendszer sebesség meghatározó eleme a renin szintézis, mely túlnyomó részben a vesében történik, hagyományos ismeretek szerint a JGA-ban. Ezen komplex apparátus elemei az afferens arteriola renin termelő juxtaglomeruláris epitelioid sejtjei, a macula densa sejtek, melyek szenzoros funkciót töltenek be, illetve a finomhangolást lehetővé tevő extraglomeruláris mezangiális sejtek (Kurtz 2011). A renin egy szelektív aszpartil-proteáz enzim, amely angiotenzinogénből angiotenzin I-et hasít le, melyet az angiotenzin konvertáló enzim alakít tovább angiotenzin II-vé (Kurtz 2011). Az angiotenzin II növeli a Na⁺ visszaszívást a vesében az epiteliális Na⁺ csatorna és a Na⁺/H⁺ cserélő serkentésével, valamint az

aldoszteron elválasztásának fokozásával. Az angiotenzin II érösszehúzó hatású mind a renális arteriolákon, mind szisztémásan, így képes növelni a perifériás ellenállást és a szisztémás vérnyomást (Reid et al. 1978). A rendszernek több gátlószere ismert, legelterjedtebbek az angiotenzin konvertáló enzim gátlók és az angiotenzin receptor blokkolók. Kevésbé közismert a renin enzimátikus működését gátló, ún. direkt renin inhibitor, Aliskiren, mely a renin S3bp kötőhelyéhez kapcsolódva, gátolja annak működését (Rahuel et al. 2000).

1.3.2. Renin termelés a vese más sejtjeiben

Embrionális korban a renin kiemelt szerepet tölt be a vese szerkezetének kialakulásában. A renin felelős az uréterbimbó mezenhimába való betöréséért, valamint a vese érhalozatának kifejlődéséért (Reddi et al. 1998; Yosypiv 2011). Ennek megfelelően a renin az uréter bimbó körüli stroma sejtjeiben illetve a nagyobb proximális hiláris artériák falában halmozódik fel. (3. ábra/A). A mezenhima stromalis sejtjeinek renin termelése megnöveli az uréterbimbó környezetében levő angiotenzin II szintjét, amely az uréterbimbó sejtjein elhelyezkedő 1-es típusú angiotenzin receptoron keresztül túlélési szignálokat beindítva (extracelluláris szignál szabályozta kináz 1 és -2, Janus kináz 2 / szignál transzdukció és transzkripció aktivátor, foszfatidil inozitol-4,5-biszfoszfát 3-kináz/protein kináz B) elősegíti a csúcsi sejtek proliferációját, túlélését, migrációját és ágrendszerének morfogenezisét (Yosypiv 2009). Születést követően a vese érésével párhuzamosan a renin termelés lokalizációja visszahúzódik, előbb az interlobáris artériák, majd az afferens arteriolák falába (3. ábra/B), melyet néhány évvel ezelőttig az egészséges érett vese egyetlen renin termelő helyének véltünk. Jól ismert, hogy egyes patofiziológiás esetekben a vese képes lehet jelentősen megnövelni a renin termelő és raktározó kapacitását. (Gomez et al. 1991). Az afferens arteriola simaizom sejtjei ugyanis képesek újra renin termelő sejtekké alakulni, amellyel reagálni tudnak a szervezetet érő nagymértékű sóvesztésre és vízhiányra (Gomez et al. 1991) (3. ábra/C). Azóta azonban azt is kimutatták, hogy bizonyos stressz hatásokra az érett vesében is megjelenhet a JGA-n kívül renin termelés (Rohrwasser et al. 1999). Diabétesz mellitusz (Kang et al. 2008) és hipertónia (Prieto-Carrasquero et al. 2004) esetében leírták, hogy az összekötő szegmens sejtjei és a gyűjtőcsatorna principális sejtjei is képesek visszanyerni az embrionális korra jellemző renin termelő kapacitásukat (Rohrwasser et al. 1999) (3. ábra/C).



3. ábra: A renin termelés lokalizációjának változása. A vese embriogenezise során (A) az uréterbimbó környezetében a stroma sejtek renint termelnek. A stromába a másik oldalról betörő érrendszer szintén képes renin termelésére, ami szükséges az érhálózat kifejlődéséhez. Az érett vese (B) kizárólag a juxtaglomeruláris apparátus granuláris sejtjeiben tartalmaz renint. Stressz hatására (C) az afferens arteriola simaizom sejtjei és az eredetileg a stromából kifejlődő összekötő szegmens sejtjei valamint a gyűjtőcsatorna principális sejtjei visszanyerik renin termelő képességüket. Piros: érrendszer, lila: stroma/tubulus rendszer, sárga: uréterbimbó/összekötő szegmens és gyűjtőcsatorna, kék: renin granulumok (Csohány et al. 2013).

A gyűjtőcsatorna principális sejtjeinek renin termelésének jelentőségét az adja, hogy a kapacitása meghaladja a JGA-ban történő renin termelést, mind mennyiségében, mind időbeli lefutásában (Kang et al. 2008), így főleg lokális, krónikus hatásokért, úgymint a gyulladás, trófikus és profibrotikus folyamatokért lehet felelős. Fontos hangsúlyozni, hogy a gyűjtőcsatornában a renin termelés szabályozása éppen ellentétes a JGA szabályozásával. Míg a JGA-ban az emelkedett angiotenzin II szint negatív visszacsatolás útján csökkenti a renin termelést, addig a gyűjtőcsatornában 1-es típusú receptorán keresztül az angiotenzin II fokozza a renin termelődését, melyet angiotenzin receptor blokkolóval kivédhetőnek találtak (Prieto-Carrasquero et al. 2005).

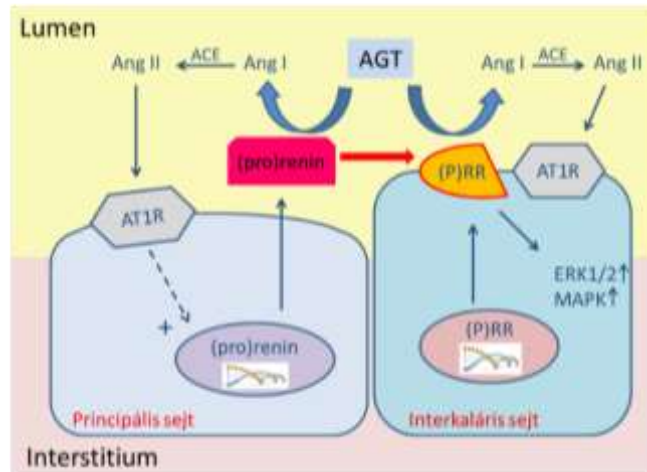
1.3.3. A renin-angiotenzin rendszer lokális szerepe. A (pro)renin receptor.

A nefron disztális szakaszának jelentős szerepe van a vizelet összetételének szabályozásában. Ugyan a só- és víz visszaszívás 90%-a a proximális tubulusban zajlik, azonban a disztális tubulusban történő só- és víztranszport szabályozása ugyanannyira,

ha nem kifejezettebben hangsúlyos, mivel itt történik a vizelet végső összetételének finom szabályozása (Geibel et al. 1990). A renin-angiotenzin rendszer jelenléte a disztális szakaszon mára elfogadott tény (Rohrwasser et al. 1999). A proximális tubulusban termelődött angiotenzinogén a tubulus rendszerbe kerülve eljut a disztális szakaszig, ahol a gyűjtőcsatornában képződött reninnek köszönhetően lokálisan angiotenzin II-vé konvertálódik (Peti-Peterdi et al. 2002; Rohrwasser et al. 1999). Az így keletkező angiotenzin II az epiteliális Na^+ csatornán keresztül hozzájárulhat a disztális nefron só visszaszívásának finom szabályozásához, kóros esetben pedig ez a renin – angiotenzin II – epiteliális Na^+ csatorna tengely fontos szerepet játszhat a magas vérnyomás kialakulásában (Peti-Peterdi et al. 2002).

Egy nemrégiben azonosított receptor a gyűjtőcsatorna principális sejtjeinek renin termelésének újabb jelentőségére hívhatja fel a figyelmet. Leírásra került ugyanis a renin saját, sejt felszíni receptora, a (pro)renin receptor [(P)RR]. Elnevezésének oka, hogy ehhez a receptorhoz nem csak a renin, hanem előalakja, a prorenin is kötődik (a (pro)renin egy kifejezés, amely egyszerre utal a reninre és a proreninre is). A (P)RR-t először a glomeruláris mesangiális sejtekben, a veseartériák szubendotéliumában és a podocytákban mutatták ki (Advani et al. 2009; Ichihara et al. 2008), azonban később fény derült arra, hogy legnagyobb részben a gyűjtőcsatorna interkaláris sejtjein lokalizálódik (Advani et al. 2009). Különösen fontos, hogy a renin termelő principális sejtek és az azt érzékelő, interkaláris sejtek közvetlenül egymás mellett helyezkednek el a vese gyűjtőcsatornáiban, ami igen szenzitív renin-angiotenzin rendszer szabályozást tesz lehetővé. A renin gén elsődleges transzkriptuma a preprorenin molekulát kódolja, mely az endoplazmatikus retikulumban enzimatikusan inaktív proreninné alakul. Később a proreninről extracellulárisan lehasadva képződik az aktív renin (Pratt et al. 1987). A (P)RR megismerésével derült fény arra, hogy a renin nem csupán proteázként, hanem saját receptorán, ligandként is funkcionál (4. ábra), ráadásul e kettős funkció a proreninre is igaz, mivel a receptorhoz való bekötődést követően a prorenin konformáció-változáson megy keresztül, és hasítás nélkül is aktív enzim keletkezik belőle (Nguyen et al. 2002). A receptorhoz kötődött (pro)renin lényegesen nagyobb katalitikus aktivitásra tesz szert, így fokozott mértékben van lehetőség angiotenzin I termelésre. Mindeközben a receptor intracelluláris alegysége foszforilálódik, és a mitogén aktivált protein kináz valamint az extracelluláris szignál szabályozta kináz 1 és -2 jelátviteli útvonalakat aktivál (Nguyen et

al. 2002), aminek hatására végeredményben hipertrófia, hiperplázia és fibrózis irányába mutató folyamatok indulnak be (Nguyen et al. 2002). Ez különösen fontos, hiszen ezáltal az angiotenzin II mellett a (pro)reninnek is jelentős szerepe lehet más kórképekhez társuló vesekárosodás kialakulásában, ahogyan azt már diabétesz mellitusz és hipertónia esetében leírták (Huang et al. 2011; Kaneshiro et al. 2007).



4. ábra: A lokális renin-angiotenzin rendszer szabályozása a gyűjtőcsatornában. A principális sejtek által termelt prorenin és renin kötődése a (pro)renin receptorhoz egyrészt serkenti az angiotenzin II képződést, mely hagyományos hatásain túl fokozza a renin lokális termelődését, másrészt a szomszédos, interkaláris sejteken található (pro)renin receptoron keresztül fibrotikus jelátviteli útvonalakat, illetve lokális folyamatokat indukál. ACE: angiotenzin konvertáló enzim, AGT: angiotenzinogén, Ang I: angiotenzin I, Ang II: angiotenzin II, AT1R: angiotenzin II 1-es típusú receptora, ERK: extracelluláris szignál szabályzott kináz, MAPK: mitogén aktivált proteinkináz, (P)RR: (pro)renin receptor (Csohány et al. 2013).

2. CÉLKITŰZÉSEK

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

Iszkémia/reperfúziós vesekárosodás:

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

Calcineurin inhibitor nefropátia:

1. Calcineurin inhibitor kezelés előidézi-e a gyűjtőcsatornában a renin termelést?
2. A megnövekedett renin tartalom a gyűjtőcsatornában hozzájárulhat a CNI-kozoszt vesekárosodás kialakulásához?
3. Milyen mechanizmusok aktiválásával vehet részt a lokálisan termelődő renin a CNI nefropátia kialakulásában?

3. METODIKA

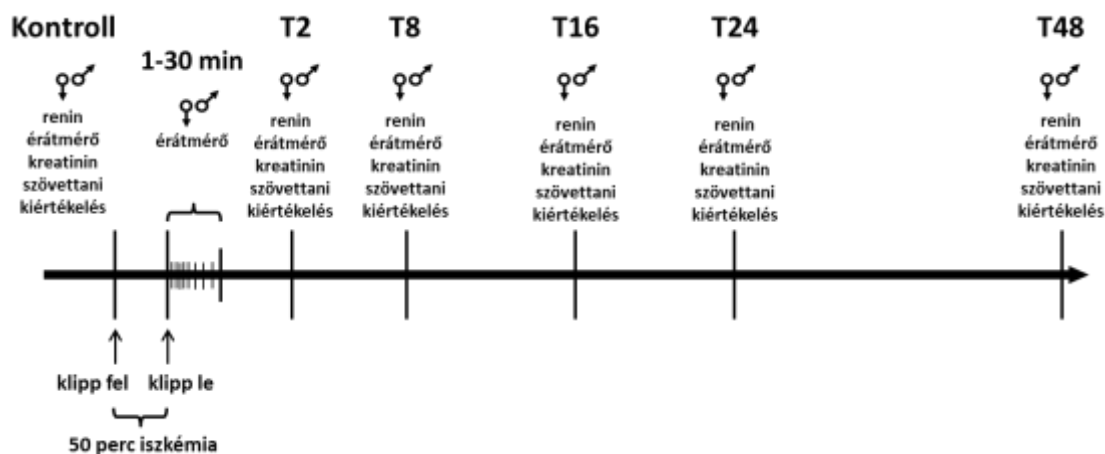
A kísérletekben használt patkányokat és egereket standard körülmények között tartottuk, hőmérséklet kontrollált ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) szobákban, 12 óránként váltakozó világos és sötét periódusok mellett. Az állatoknak állandóan elérhető standard rágsálótápot és csapvizet biztosítottunk. Minden állatkísérletre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

3.1. Az iszkémia/reperfúziós nefropátia állatmodellje és szöveti minták gyűjtése

A vese iszkémia/reperfúziós modelljéhez 10 hetes Wistar hím és nőstény patkányokat ($194 \pm 10\text{g}$, $160 \pm 5\text{g}$, sorrendben) vizsgáltunk (Toxi-Coop Zrt., Budapest, Magyarország). Intraperitoneálisan adott ketamin ($100\text{mg}/\text{tkg}$) és xylazin ($10\text{mg}/\text{tkg}$) anesztéziát követően az állatokat elektromos melegítő padra helyeztük (Vestavia Scientific, Birmingham, AL), ahol a beavatkozás alatt a testhőmérsékletüket állandó szinten tartottuk. Medián laparotómiát követően (megtartott jobb vese mellett) a bal oldali veseartériát- és vénát óvatosan preparáltuk. Majd két atraumatikus, mikrovaszkuláris klip felhelyezésével leszorítottuk az ereket. Ötven perc meleg iszkémiát követően a klipeket eltávolítottuk, majd rétegesen zártuk a hasüreget. Kontrollként áloperált állatok szolgáltak.

A vese iszkémia/reperfúziós károsodás kísérletében 12 csoportot alakítottunk ki: a reperfúzió 2., 8., 16., 24. és 48. órájában végezett méréseknél minden időpontban, illetve a kontrollcsoportban is hím és nőstény állatok kerültek vizsgálatra (5. ábra). Vizsgálatonként minden csoportban 5-5 állatot dolgoztunk fel. A vizsgálatok egyik részében multifoton mikroszkópos technikával *in vivo* renin tartalom kimutatást és érátmérő mérést végeztünk, a másik részében pedig áramlási citometriai vizsgálattal meghatároztuk a gyűjtőcsatorna principális sejtjeinek renin tartalmát, szövettani kiértékelést végeztünk, illetve szérum kreatinin koncentrációt határoztunk meg. Ezen kívül egy külön csoportnál az iszkémia/reperfúziós inzultust közvetlenül követő érátmérő változásokat mértük az első 10 percben percenként, majd a 30. percig 5 percenként. Ennél a csoportnál a többitől eltérően minden reperfúziós időpontban azonos állatokból (3 hím, 3 nőstény) nyertük az adatokat.

Ezt követően ezeket az állatokat további minták gyűjtésére nem használtuk. A szérumban gyűjtés az aorta abdominális punkciójával történt. Az iszkemizált vesék eltávolítását követően 4 °C-os, foszfáttal pufferált sóoldatban tároltuk az áramlási citometriai vizsgálat fél órán belüli kezdetéig. A JGA és a gyűjtőcsatorna renin tartalmának képzéséhez az állatok újabb műtéti előkészítésen estek át.



5. ábra: Az iszkémia/reperfúziós nefropátia állatmodell csoportjainak beosztása. A kontroll csoportban és a reperfúzió 2. (T2), 8. (T8), 16. (T16), 24. (T24) és 48. (T48) órájában a renin tartalmat, az érátmérők változását, illetve a vesefunkciót vizsgáltuk mindkét nemben, illetve szövettani kiértékelést végeztünk. Az iszkémia/reperfúziós inzultust közvetlenül követő fél órában csupán az érátmérő változásokat követtük nyomon az első 10 percben percnként, majd a 30. percig 5 percnként hímekben és nőstényekben.

3.2. A CNI nefropátia állatmodellje és szöveti minták gyűjtése

A CNI nefrotoxicitás vizsgálata során háromhetes, hím C57 black 6 egereket ($19 \pm 0,6$ gramm) 5 csoportba osztottunk a következő kezelési sémák alapján. Mindegyik kezelést három héttel zajlott naponta végzett intraperitoneális adagolással:

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

Célunk volt, hogy az alkalmazott CNI dózissal olyan gyógyszer vérszintet érjünk el, ami megközelíti a vesetranszplantációt követő céltartományt, és így kiváltjuk az ebből adódó nem kívánt mellékhatásokat. Az Aliskiren dózisát korábbi, C57 black 6 egereken végzett vizsgálatok alapján választottuk aszerint, hogy a szisztémás vérnyomást nem befolyásolja, azonban hatékonyan gátolja a renint (Westermann et al. 2008).

Vizsgálatonként minden csoport 4-6 állatból állt, és feldolgozásuk során az iszkémia/reperfúziós vizsgálatoknál már leírt anesztéziát alkalmaztuk. A vizsgálatok egyik részében vér, vizelet és vese mintát gyűjtöttünk. Az eltávolított veséket egyenlő részekre osztottuk és i) 4 °C-os foszfáttal pufferált sóoldatban tartottuk az áramlási citometriai vizsgálat fél órán belüli kezdetéig, illetve ii) 4%-os pufferolt paraformaldehidben a szövettani feldolgozás kezdetéig (pH=7,4), vagy iii) szárazjégen történő gyorsfagyasztást követően -80°C-on tároltuk további felhasználásig. A vérmintákat itt is az aorta abdominálisból nyertük és plazma renin aktivitás, illetve CNI vérszint meghatározást végeztünk. A vizelet mintákban fehérjekoncentrációt (albumin) vizsgáltunk. A veseminták feldolgozása során a kollagén mRNS expresszióját reverz transzkripciót követő valós idejű polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) mértük. A vizsgálatok másik részében a kezelést megismételtük és a 3 hét leteltével multifoton mikroszkópos képalkotást végeztünk a renin tartalom kimutatására, ezen állatokat további minták gyűjtésére nem használtuk.

3.3. Szérum kreatinin szint meghatározása

Eredményeink objektivizálása céljából szérum kreatinin szintet mértünk. A vese iszkémia/reperfúziós károsodása során a szérum kreatinin szint meghatározásához kereskedelmi forgalomban kapható kit-et (Diagnosticum Ltd., Budapest, Magyarország) és Beckmann Coulter AU480 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) kémiai analizátort használtunk.

A CNI nefropátia vizsgálata során a szérum kreatinin szintet nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrométerrel határoztuk meg. A szűrőpapírra szárított mintából belső standard-et (d3-kreatinin) tartalmazó metanolos oldattal extraháltuk a kreatinint (30 min, 450 rpm), az extraktumot 0,45 µm-es szűrőn átszűrtük, majd vákuumcentrifugában szárazra pároltuk. Vízen történő visszaoldást

követően a kromatográfiás elválasztás LiChroCART 55-2 Purospher STAR RP-18 oszlopon történt izokroatis körülmények között (85% víz, 15% acetonitril). A kreatinin és d3-kreatinin retenciós ideje 0,9 perc. Az MS/MS meghatározást API 4000 QTRAP tömegspektrométerrel végeztük, elektropray ionforrással, pozitív ionizációs módban. Az analitok detektálását MRM (multiple reaction monitoring) módban végeztük. A minták kreatinin mennyiségének meghatározása kalibrációs görbe segítségével történt.

3.4. Hisztológiai analízis

3.4.1. *Perjódsav-Schiff festés*

Az iszkémia/reperfúziós kísérletek hisztológiai vizsgálatához a vesék egy részét 4%-os formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyazást követően perjódsav-Schiff festést alkalmaztunk. A mintákat kódoltuk és kiértékelésük vakon történt. A tubuláris károsodás mértékét szemikvantitatívan írtuk le i) az epitélium károsodás, illetve ii) a tubulusban lévő hialin mennyisége alapján. Az epitélium károsodás fokát 0-4-ig minősítettük a következők szerint: 0 = nincs károsodás, 1 = tubulus sejt duzzadás, vakuolizáció, kefeszegély károsodása, 2 = tubulus sejt nekrozis <1/3 arányban, 3 = tubulus sejt nekrozis 1/3-2/3 arányban, 4 = tubulus sejt nekrozis több mint 2/3 arányban. A tubulusban található hialin mennyiségét 0-2-ig értékeltük: 0 = nincs, 1 = kevés, 2 = sok (Heemann et al. 2000).

3.4.2. *Masson-féle trichrome festés*

A CNI nefrotoxicitást leíró kísérleteink során a paraformaldehiddel fixált, majd paraffinba ágyazott vese metszeteket Masson-féle Trichrome eljárással festettük meg, ami a sejtmagokat feketére, a sejtplazmát és a vörösvértesteket vörösre, míg a kollagén kékre festi. Vesénként átlagosan 12 képet értékeltünk ki, mind a kéregből, mind a velőállományból, elkerülve a glomerulusokat és nagyobb ereket, 20X-os nagyítású képeken. A mintákat kódoltuk, és azonos megvilágítási és polarizációs beállítások mellett fénymikroszkóppal fotózott képeken vizsgáltuk a tubulointersticiális fibrózis mértékét, melyre a kék színben megjelenő kollagén mennyiségéből következtettünk. Az Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated San Jose, CA, USA) program segítségével kijelöltük a kékekkel ábrázolódó fibrotikus szövetet, majd ugyanezen program használatával a kijelölt területet feketére, a fennmaradó részeket fehérre alakítottuk át. Az így kapott fekete-fehér képeken Scion image (Scion Corporation, <http://scion-image.software.informer.com/>) szoftver segítségével elemeztük a fekete területek arányát

a fehér területhez viszonyítva (Degrell et al. 2009). A végeredményként kapott arányszámokat statisztikailag hasonlítottuk össze, mértékegységként az általunk bevezetett Masson pontot használtuk. A kontroll csoport eredményét 1-re normalizáltuk, a többi eredményt pedig arányosan viszonyítottuk hozzá (Banki et al. 2012).

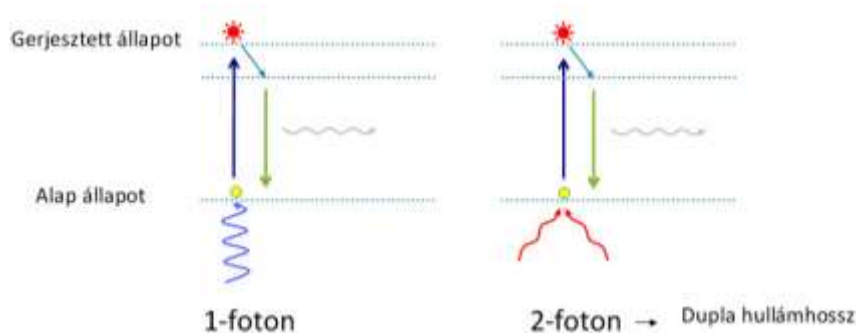
3.5. Áramlási citometria

A megfelelő reperfüziós időt, vagy a három hetes gyógyszeres kezelést követően az állatokat leöltük, veséiket eltávolítottuk. A vesemintákat kollagenáz II-vel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) emésztettük, majd a lecentrifugált sejtpelletet foszfáttal pufferált sóoldattal mostuk. Az intracelluláris jelölés céljából a sejteket ezután 10 percig szobahőmérsékleten fixáltuk/permeabilizáltuk (FACS Permeabilizing Solution 2, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Ezt követően mintáinkat specifikus elsődleges, kecske akvaporin 2 antitesttel, nyúlban termeltetett vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) A specifikus antitesttel (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA), illetve nyúlban termeltetett reninre specifikus antitesttel (AnaSpec Inc., Fremont, CA, USA) inkubáltuk 30 percen keresztül, szobahőmérsékleten (200µg/ml). A nem kötődött antitesteket permeabilizáló pufferrel történő mosással távolítottuk el. Mosás után 30 percig szobahőmérsékleten fénytől elzárva inkubáltuk a sejteket az elsődleges antitestre specifikus, fluoreszcens festékekkel konjugált másodlagos ellenanyagokkal: Alexa 488-konjugált csirke anti-nyúl antitesttel és (2 mg/ml) Alexa 647-konjugált szamár anti-kecske antitesttel (2 mg/ml). A negatív kontrollokat csak másodlagos antitesttel inkubáltuk. A nem kötődött antitesteket permeabilizáló pufferrel történő mosással távolítottuk el, majd foszfáttal pufferált sóoldatban 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.

3.6. Multifoton excitációs, lézerpásztázó mikroszkópia

3.6.1. A multifoton mikroszkóp működésének alapelve

Méréseink során konfokális lézerpásztázó fluoreszcens képalkotó technikát, multifoton mikroszkópot használtunk, mely az élő szövetek mély optikai felbontására alkalmas. A technológia alapja, hogy a gerjesztés során két azonos energiájú foton - amik egyenként fele akkora energiával rendelkeznek, mint ami a fluorofór gerjesztéséhez szükséges - egyszerre éri el a fluorofórt, és emeli magasabb energia szintre azt (6. ábra) (Peti-Peterdi et al. 2004). Ennek megfelelően a multi-foton excitáció 680-1080 nm tartományú infravörös fényvel történik, ellentétben a hagyományos egy-fotonos képalkotással, ahol UV- és látható fényt használnak (193-694nm). Ennek köszönhetően a nagyobb hullámhosszú fotonok kevésbé szóródnak és károsító hatásuk is kisebb, így mélyebb szöveti penetranciát tesznek lehetővé. Mivel a gerjesztés főleg a fokális síkban történik, az emittált fotonok 100%-a detektálható, így nincs szükség pinhole-ra, vagyis a beérkező fotonok retesz szűrésére. Legfőbb előnye a hagyományos konfokális mikroszkópokkal szemben, hogy nagyobb a feloldóképessége és lehetővé teszi az élő szövetben, valós időben történő képalkotást.

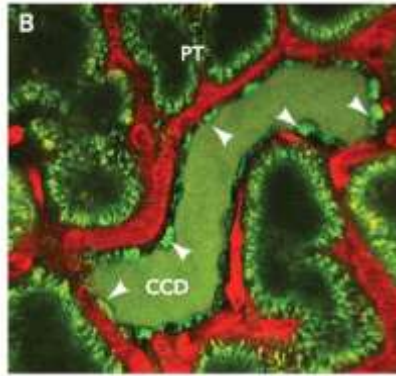


6. ábra: A két-foton excitáció alapelve. A fluorofórt az ábra bal oldalán egy foton, míg jobb oldalán két foton gerjeszti. A két-foton gerjesztés során a fotonok energiája fele akkora, míg hullámhosszuk kétszerese a hagyományos egy-foton gerjesztéshez képest. A gerjesztést követő folyamat már megegyezik. A fluorofór magasabb energia nivóra kerül, majd fotonot emittálva visszatér alap állapotba (Peti-Peterdi et al. 2004).

3.6.2. Multifoton mikroszkópia a vesekutatásban

A multifoton mikroszkópot eredetileg elsősorban az agy vizsgálatára használták. Anatómiai szerkezetéből adódóan nagyságrendileg akár mm-es mélységében is lehetővé tette az agy tanulmányozását. Később a bőr metabolizmusának, tumorok vaszkularizációjának, az embrionális fejlődés lépéseinek leírására alkalmazták (Dunn et al. 2003). Mára a vesekutatásban is elfogadott metodikává vált, igaz a vese vizsgálata egyelőre 100-200 μm -es mélységre korlátozódik a kéregben a nagyfokú vaszkularizáció és következményes fényelnyelődés és –szóródás miatt (Peti-Peterdi et al. 2009). A vesében ezen a területen lehetővé válik a sejtbeli változók (citoszolikus kalcium, pH, sejt-sejt kommunikáció és szignál propagáció) valós idejű képalkotása (Peti-Peterdi et al. 2012; Peti-Peterdi et al. 2009). Megfigyelhető a JGA és a glomerulus szerkezete teljes átmérőjében (kb. 100 μm), valamint fluoreszcens festékek alkalmazásával pl. 10-kDa FITC-dextránnal láthatóvá és mérhetővé tehető a glomeruláris filtráció (Dunn et al. 2003; Peti-Peterdi et al. 2009).

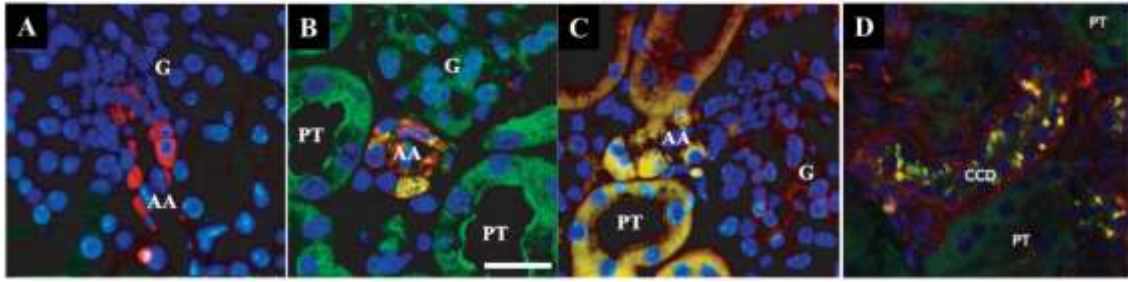
A vese vizsgálata során fontos szem előtt tartani, hogy a magas nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát tartalom következtében a vese jelentős autofluoreszcenciával rendelkezik. Részben ennek köszönhetően a proximális és disztális tubulus szakaszok jól elkülöníthetőek egymástól: i) a visszaszívás döntő részéért felelős, nagy energiaigényű proximális tubulus szakasz sejtjeire jellemző elsősorban az intenzív, valamelyest egyenetlen, zöld színű autofluoreszcencia, míg a disztális szakasz, illetve a gyűjtőcsatorna sejtek kisebb energiafelhasználásuk miatt sötétebben jelennek meg a mikroszkópos képeken; ii) a vesében kiválasztódó festékek a koncentráció és lassult áramlás következtében elsősorban a disztális szakaszok lumenében láthatóak, míg a proximális szakaszok lumene legtöbbször sötétben ábrázolódik; iii) a gyűjtőcsatorna két jellegzetes sejtípusának, a laposabb, interkaláris sejteknek és a lumenbe kifejezetten elődomborodó principális sejteknek köszönhetően jól elkülöníthető ez a tubulus szakasz (7. ábra) (Dunn et al. 2003; Sipos et al. 2007).



7. ábra: Tubulus szakaszok leírása a vesében multifoton mikroszkóp vizsgálata során. A proximális tubulusok (PT) epitél sejtjei a nagy mennyiségű nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát következtében intenzív, zöld autofluoreszcenciával rendelkeznek, lumenük sötét. A disztális szakaszok (CCD) sejtjeinek autofluoreszcenciája kisebb mértékű, lumenükben a festékek felhalmozódhatnak. A nyílhegyek a gyűjtőcsatornára jellemző principális sejtekre mutatnak. CCD: cortical collecting duct, azaz kortikális gyűjtőcsatorna; PT: proximális tubulus. (Peti-Peterdi et al. 2009)

Peti-Peterdi és mtsai (Peti-Peterdi et al. 2004; Peti-Peterdi et al. 2009) leírták, hogy a multifoton mikroszkóp kiválóan használható a vese renin-angiotenzin rendszerének vizsgálatára. Igazolták, hogy az intracelluláris savas granulumokhoz kötődő quinacrin festék alkalmas a renin jelölésre, mind a JGA-ban, mind a gyűjtőcsatornában (Peti-Peterdi et al. 2004; Peti-Peterdi et al. 2009). Mindamellet, fontos megjegyezni, hogy a quinacrin lizoszómákban is felhalmozódhat, így gyenge háttérjelet adhat minden tubulus szegmensben (Kang et al. 2006).

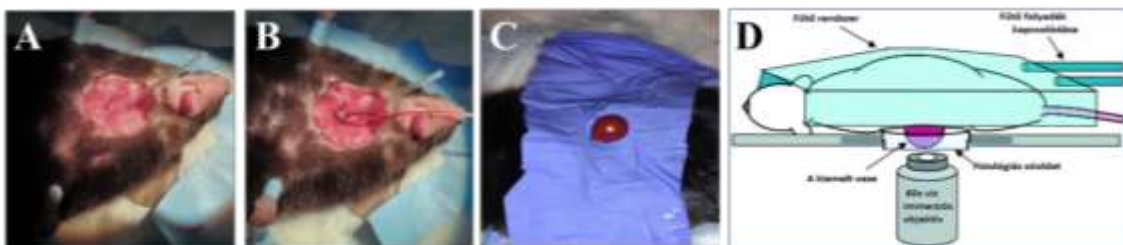
Korábbi, immunhisztokémiai vizsgálatok alapján (Peti-Peterdi et al. 2004; Peti-Peterdi et al. 2009) azonban könnyedén elkülöníthetőek a lényegesen kisebb méretű, diffúzan elhelyezkedő lizoszómák és sejtmagok – melyek kisebb mértékben ugyan, de szintén festődnek a quinacrinnal – a 2-4 μm átmérőjű, renin tartalmú granulumoktól a principális sejtek apikális és bazális membránjának közelében, illetve a JGA-ban (8. ábra).



8. ábra: Quinacrin festék használata renin jelölésére a vesében. A renin (piros) immunhisztokémiai jelölése (A kép), illetve quinacrinnal (zöld) történő párhuzamos festése (B és D kép), az afferens arteriolában (AA) és a gyűjtőcsatornában (CCD). A kolokalizációt a sárga szín jelzi. A kisméretű, diffúzan elhelyezkedő lizoszómákhoz kötődő quinacrin a proximális tubulusokban (PT) is jelen van (B kép). A lizoszóma marker LysoTracker-Red (piros) quinacrin együttes használatakor sárga színnel jelzi a lizoszómák lokalizációját a PT-ben és az AA-ban (C kép). G: glomerulus; kék: sejtmagok. (Peti-Peterdi et al. 2004; Peti-Peterdi et al. 2009)

3.6.3. Multifoton mikroszkópia az iszkémia/reperfúziós és CNI vesekárosodás vizsgálatában

A fentebb részletezett anesztézia után leborotváltuk, majd betadine-nal fertőtlenítettük az állatok nyakát és a hátuk bal oldalát. Hús mm-es metszést ejtettünk a nyaki régió bőrén a trachea és az artéria karotisz kommunisz feltárása céljából. A tracheát preparáltuk és kanüláltuk stabil légzés biztosítására (9. ábra). Ezt követően az artéria karotiszba is kanült helyeztünk az immunfluoreszcens festék bejuttatásához. Végül az állat gerincétől balra, a bőrmetszésen keresztül óvatosan kiemeltük a bal vesét. Az állatot bal oldalára fektettük a mikroszkóp objektíve fölött úgy, hogy a vese a képalkotás alatt folyamatosan 0,9%-os sóoldatban helyezkedjen el (9. ábra).



9. ábra: A műtéti előkészítés multifoton mikroszkópos képalkotáshoz. A kép: A trachea kanülálása; B kép: Kanül behelyezése az artéria karotiszba; C kép: Vese dorzális irányba való kiemelése. D kép: Az állat pozíciója multi-foton mikroszkópia során. Az állat veséje a háti oldalon kiemelve és fiziológiás sóoldatba helyezve a mikroszkóp objektíve fölött. (Dunn et al. 2003).

Immunfluoreszcens festékek közül az érhálózat jelölésére 70 kDa rhodamin dextránt (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), a savas granulomok, így a renin vizualizálására quinacrint (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) használtunk, ahogyan azt már korábban leírták (Peti-Peterdi et al. 2004). A sejtmagok megjelenítésére Hoechst 33342 festéket (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) alkalmaztunk. Az immunfluoreszcens festékeket fiziológiás sóoldatban oldva, bólusban injektáltunk az artéria karotisza.

A fluoreszcens képalkotást Femto 2D inverz mikroszkóp rendszerrel (Femtonics Inc., Budapest, Magyarország) végeztük. A fluoreszcens festék gerjesztéséhez hangolható MaiTai zárt típusú titán-zafír lézert alkalmaztunk (MaiTai Deep Sea Laser, Spectra-Physics Inc., Irvine, CA, USA), 820 nm hullámhosszt használva. Ez alól kivételt képzett a Hoechst festék gerjesztése, ami 720 nm-en történt. A vizsgálathoz két objektívet használtunk (Olympus, Budapest, Magyarország) 10X száraz objektívet átnézeti képek készítéséhez (UPLSAPO 10X, N.A.= 0,4) és 60X glicerin immerziós objektívet a részletesebb képek készítéséhez (UPLSAPO 60X, N.A.= 1,35). A fotonokat külön foton sokszorosítók gyűjtötték be pinhole felhasználása nélkül, 12 bit-es intenzitás skálával, 100 µm-es maximális mélységből.

A peritubuláris kapillárisok diaméter változását 10X nagyítású képeken vizsgáltuk. Az érátmérők mérése során csoportonként (n=3/csoport) több mint 500 kapilláris átmérőjét átlagoltuk, korábbi leírás alapján (Linkermann 2013).

A képek és adatok feldolgozása Matlab szoftver (Femtonics Inc., Budapest, Magyarország) és ImageJ program (ImageJ 1.48v, U.S. National Institute of Health, Bethesda, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>) segítségével történt.

3.7. Vizelet fehérje meghatározás

A vizelet albumin szintjének meghatározását kereskedelmi forgalomban kapható kittel Beckmann Coulter AU480 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) kémiai analizátoron végeztük fotometriás színreakció alapján.

3.8. Vérnyomásmérés

A CNI nefropátia vizsgálata során a 3 hetes CNI kezelést követően a leölés előtt mértük az állatok vérnyomását CODA Standard Tail-cuff (EMKA Technologies, Párizs,

Franciaország) módszerrel. Minden állatnál több alkalommal, legalább 3-szor mértük a szisztolés, a diasztolés vérnyomást, az artériás középnyomást, majd az eredményeket átlagoltuk.

3.9. Calcineurin inhibitor vérszintek meghatározása

A CNI vérszinteket teljes vérből határoztuk meg, nagyhatékonyságú folyadék kromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométer segítségével. A mintákat az utolsó kezelést követő 12. órában gyűjtöttük, ami a CNI-k mélyszintjének felel meg. A fehérjék eltávolítása/kicsapása érdekében 100 µl vérhez 300 µl acetonitrilt adtunk. Vortexelést és centrifugálást követően, 50 µl felülúszót 200 µl-es mintatartókba pipettáztunk, majd ezt követően történt meg a folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométer mérés. A mérésekhez egy Perkin Elmer Series 200 micro LC folyadékkromatográfiás rendszert használtunk (Perkin Elmer, Massachusetts, USA). A tömegspektrométer egy AB Sciex 6500 QTrap készülék volt, TurboIon-Spray forrással szerelve (AB Sciex, CA, USA). A kalibrációs tartomány 10-250 ng/ml volt a CyA esetében és 0,1-5 ng/ml a Tac esetében. A detektálás alsó határa (Limit Of Detection, LOD) a CyA esetében 5 ng/ml, míg a Tac esetében 0,05 ng/ml volt.

3.10. Reverz transzkripciót követő valós idejű polimeráz láncreakció

A vér- és vizeletminta gyűjtése után kiemeltük az állatok szerveit. A vese egészének kollagén I- és glicerilaldehid-3-foszfát dehidrogenáz mRNS expresszióját RT-PCR-rel mértük. Első lépésben a szövetminták teljes RNS tartalmát Total RNA Mini Kittel izoláltuk a gyártó protokollja alapján (Geneaid Biotech, Bade City, Taiwan). Az izolált RNS-ből ezt követően reverz transzkripcióval cDNS-t hoztunk létre Maxime First Standard cDNA Synthesis Kittel (Thermo Scientific, Waltham MA, USA). A kollagén I és a glicerilaldehid-3-foszfát dehidrogenáz mRNS expresszióját Light Cycler 480 rendszerrel (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) mértük. Az RT-PCR vizsgálatok 20 µl-es végtérfogatban történtek. A reakcióhoz a sokszorozni kívánt részt tartalmazó cDNS templátot és specifikus primereket alkalmaztunk, amelyek az általunk vizsgálni kívánt szekvencia elejével és végével komplementerek (2. táblázat). A reakcióelegy az előbbieken kívül tartalmazta a Luminaris Color HiGreen Fluorescens

qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) keveréket a gyártó utasításai szerint. A PCR beállításai a következők voltak:

95°C	10 perc	- denaturáció	
95°C	15 másodperc	} 35 ciklus – anelláció/extenzió	
60°C	30 másodperc		
72°C	30 másodperc		

Az eredmények számszerűsítése során minden mintát ugyanazon küszöbérték mellett vizsgáltunk. Abból, hogy az egyes minták mikor érik el a küszöbértéket, következtetni tudunk a kiindulási templát mennyiségének különbségére. Minden minta kollagén I mRNS expresszióját ugyanazon minta glicerilaldehid-3-foszfát dehidrogenáz mRNS expressziójához, mint belső kontrollhoz viszonyítottuk, így minden minta esetében egy mértékegység nélküli arányszámot kaptunk, az eredményeket pedig statisztikailag hasonlítottuk össze. A kontroll csoport eredményét 1-re normalizáltuk, a többi eredményt pedig arányosan viszonyítottuk. Az eredményeket a Light-Cycler szoftver 1.5.0.39 verziójával (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) elemeztük.

2. táblázat: A felhasznált primerek szekvenciái.

Gén	Primer szekvencia	Termék hossza
Kollagén I	forward: 5'-CTG CCC CGG CGC CGA AGT C-3' reverse: 5'-CCC TCG ACG CCG GTG GTT TCT TG-3'	96 bp
GAPDH	forward: 5'-ATC TGA CGT GCC GCC TGG AGA AAC-3' reverse: 5'-CCC GGC ATC GAA GGT GGA AGA GT-3'	164 bp

3.11. Plazma renin aktivitás mérése

A három hetes CNI kezelést követően, a mintagyűjtés során minden CNI-vel kezelt csoportban vért vettünk etilén-diamin-tetraecetsavval kezelt csőbe. Közvetlenül a centrifugálást követően -20°C -ra fagyasztottuk a plazmát a renin aktivitás meghatározásáig. A plazma renin aktivitást kereskedelmi forgalomban kapható Angiotenzin I Radioimmunoassay Kit (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) segítségével

határoztuk meg Riamat 280 analizátoron (DiaSorin, Stillwater, MN, USA), a gyártó utasításai szerint. A kapott értékeket ng Ang1/mL/h mértékegységben fejeztük ki.

3.12. Statisztikai analízis

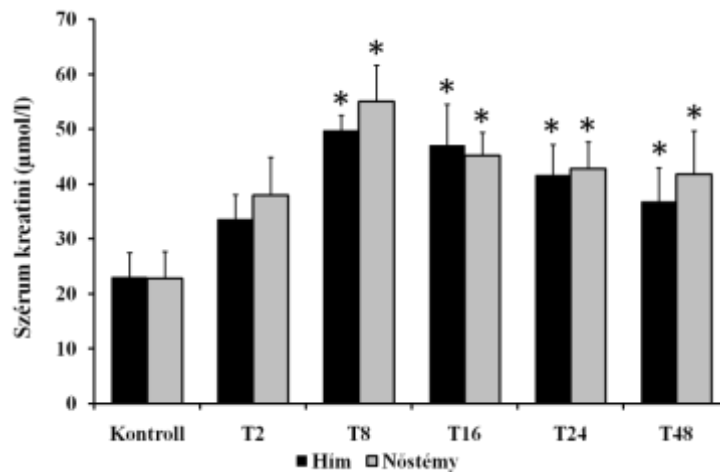
Az adatok kiértékelése STATISTICA.8 software-rel (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA) történt. A normál eloszlást Kolmogorov-Smirnov teszttel ellenőriztük. Az összehasonlításokat a normál eloszlású adatok esetében ANOVA és Fisher féle poszt-hoc teszttel, illetve a nem normál eloszlású adatok esetében Kruskal-Wallis teszt használatával végeztük. A p értéket 0,05 alatt tekintettük szignifikánsnak. Az adatokat átlag \pm átlag szórása (SEM) ábráztuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Iszkémia/reperfúziós vesekárosodás

4.1.1. Vesefunkció

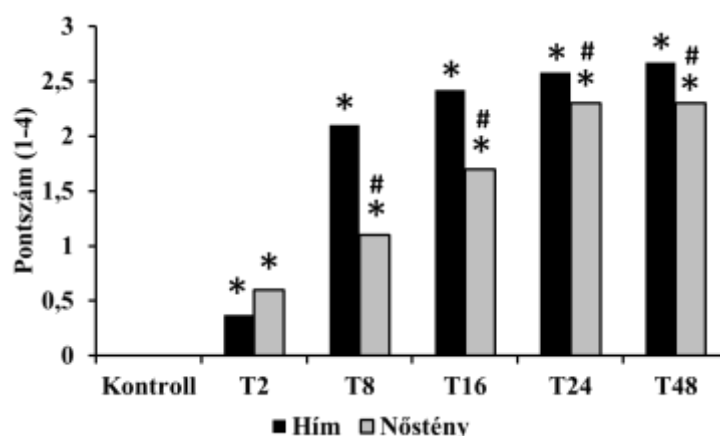
A vese működésének megítéléséhez szérumban kreatinin szintet határoztunk meg az iszkémiát követő reperfúzió különböző időpontjaiban (10. ábra). A vese iszkémia/reperfúziós károsodása szignifikáns szérumban kreatinin szint emelkedést okozott a reperfúzió 8. órájára hímekben (Kontroll: $23,0 \pm 4,5 \mu\text{mol/l}$ vs. T8: $49,7 \pm 2,8 \mu\text{mol/l}$; $p \leq 0,05$) és nőstényekben (Kontroll: $22,8 \pm 4,9 \mu\text{mol/l}$ vs. T8: $55,0 \pm 6,7 \mu\text{mol/l}$; $p \leq 0,05$) egyaránt. Ezek az értékek jelentős vesefunkció romlásra utaltak, egyben alátámasztották modellünk alkalmasságát az iszkémia/reperfúzió okozta akut vesekárosodás vizsgálatára. A kreatinin értékek emelkedése minden további időpontban szignifikáns maradt, mindkét nemből (hímekben T16: $47,0 \pm 7,5 \mu\text{mol/l}$; T24: $41,6 \pm 5,5 \mu\text{mol/l}$; T48: $36,8 \pm 6,2 \mu\text{mol/l}$; $p \leq 0,05$ és nőstényekben T16: $45,2 \pm 4,2 \mu\text{mol/l}$; T24: $42,8 \pm 4,8 \mu\text{mol/l}$; T48: $41,8 \pm 8,0 \mu\text{mol/l}$; $p \leq 0,05$).



10. ábra: Iszkémia/reperfúziós vesekárosodást követő szérumban kreatinin szint változása hímekben és nőstényekben. Iszkémia/reperfúziós vesekárosodást követően a szérumban kreatinin szint szignifikánsan megemelkedett a reperfúzió 8. órájára és a különbség a vizsgálat további időpontjaiban is szignifikáns maradt mindkét nemből. *: $p \leq 0,05$ vs. kontroll. Az adatokat átlag \pm SEM ábrázoltuk. T2, T8, T16, T24 és T48: a reperfúzió óta eltelt órák.

4.1.2. Szöveti károsodás – Perjódsav-Schiff festés

Az állat modellünk validálása, az iszkémia/reperfúziós károsodás progressziója, illetve a nemi különbségek leírása céljából perjódsav-Schiff festést alkalmaztunk. Már T2 időpontban jelentős tubulus károsodás alakult ki mindkét nemből a kontroll csoporthoz képest (hímek: 0,4; nőtények: 0,6; $p \leq 0,05$). Hímekben a veseszövet igen súlyosan sérült T8 időpontra, míg nőtényekben ez a folyamat lassabban következett be, és a maximumát csak T24-re érte el. (T8: 2,1; T16: 2,4; T24: 2,6; T48: 2,7 hímekben vs. T8: 1,1; T16:1,7; T24: 2,3; T48: 2,3 nőtényekben; $p \leq 0,05$). Szignifikánsan rosszabb szövettani képet látunk hímekben a nőtényekhez képest T8 időpontban, mely különbség minden későbbi vizsgált időpontban fennállt (11. ábra).

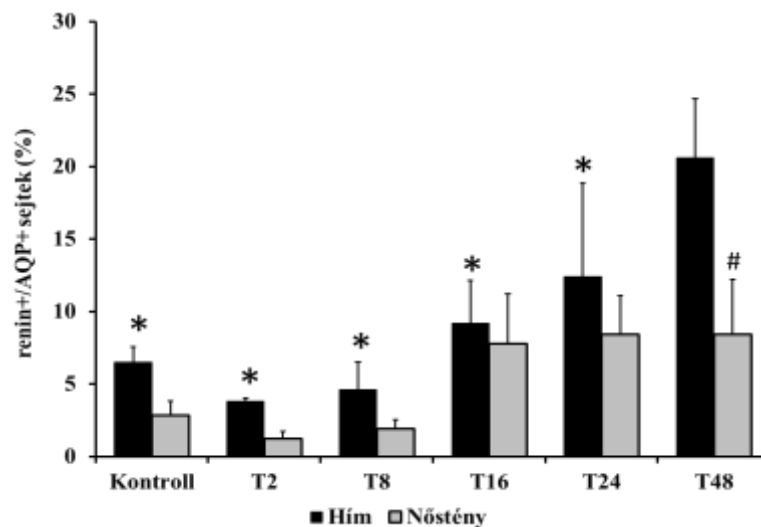


11. ábra: Iszkémia/reperfúziós vesekárosodást követő szöveti károsodás hímekben és nőtényekben. Már T2 időpontban számottevő károsodás alakult ki mindkét nemből. Hímekben igen súlyos károsodás alakult ki a vesében T8 időpontra, ami szignifikánsan rosszabb eredményt jelent a nőtényekhez képest, akikben a szöveti károsodás csak hosszabb idő alatt alakult ki, és a maximumát T24-re érte el. A nemek közötti szignifikáns különbség T8 időponttól a vizsgálat végéig megfigyelhető. *: $p \leq 0,05$ vs. kontroll; #: $p \leq 0,05$ vs. hím. T2, T8, T16, T24 és T48: a reperfúzió óta eltelt órák.

4.1.3. Renin tartalom változása a reperfúzió különböző időpontjaiban – áramlási citometria

Áramlási citometriát alkalmazva vizsgáltuk a renin pozitív sejtek arányát az akvaporin 2 pozitív principális sejt populációban (12. ábra). Az akvaporin 2 pozitív sejtek aránya a teljes veseszövethez képest nem változott a mérés során (adatokat nem ábrázoltam). A

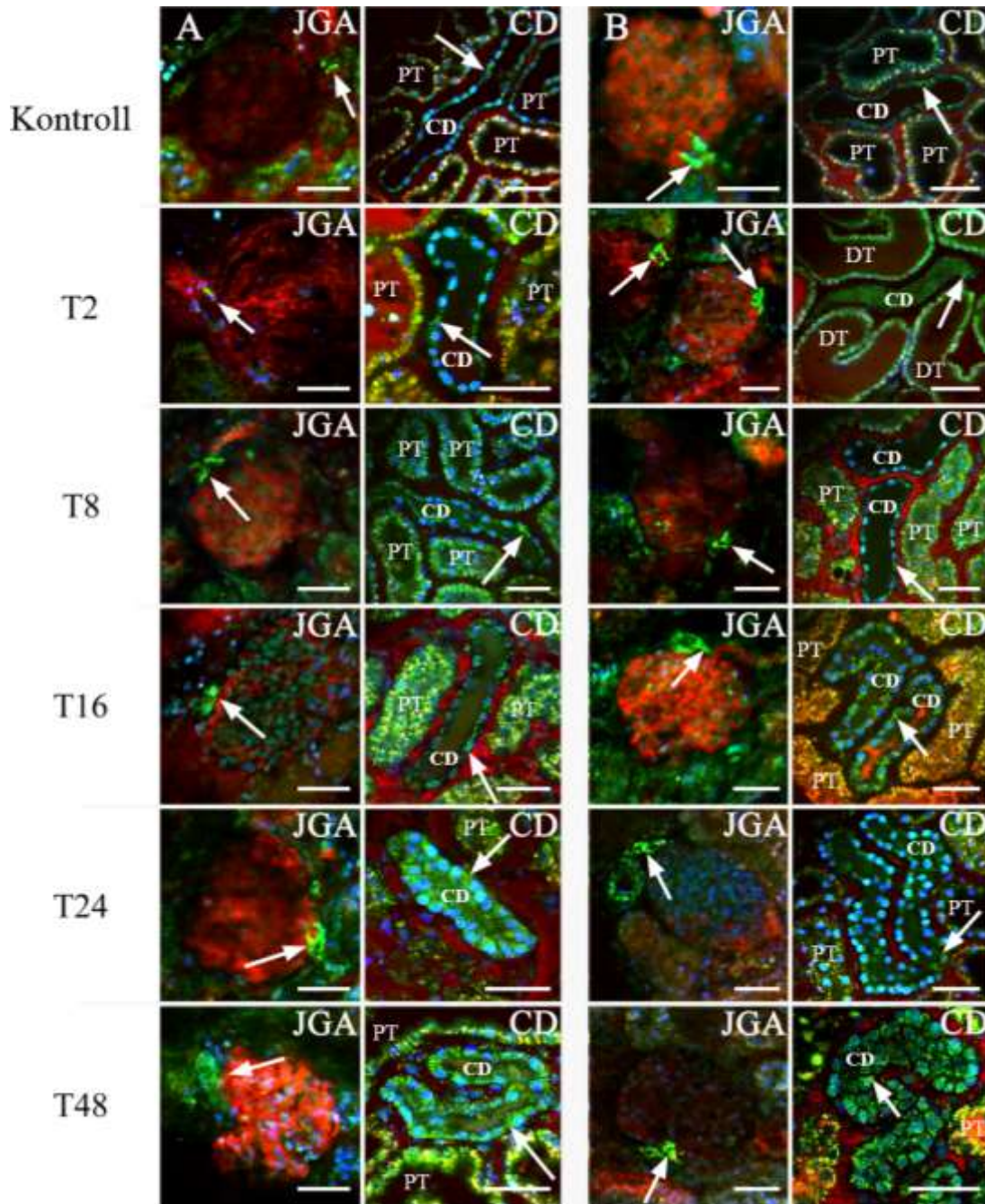
kontroll állatok principális sejtjeinek csupán $6,5 \pm 1,1\%$ -a tartalmazott renint hímekben és $2,8 \pm 1,0\%$ -a nőstényekben [p= nem szignifikáns (NS)]. A reperfúzió első 8 órájában a renin termelő sejtek aránya a gyűjtőcsatornában mindkét nemben csökkenő tendenciát mutatott a kontrollokhoz képest (hímekben T2: $3,8 \pm 0,2\%$; T8: $4,6 \pm 1,9\%$, p=NS; nőstényekben T2: $1,2 \pm 0,5\%$; T8: $1,9 \pm 0,6\%$; p=NS). A renin pozitív principális sejtek aránya mindkét nemben emelkedett T16 időpontra (T16: $9,2 \pm 2,9\%$ hímekben és T16: $7,8 \pm 3,4\%$ nőstényekben; p=NS). Ebben az időpontban a nőstények esetében háromszoros növekedés volt megfigyelhető, azonban további változás már nem történt (T24: $8,4 \pm 2,7\%$; T48: $8,4 \pm 3,8\%$; p=NS). Hímekben viszont T16 időpontra csak másfélszeres növekedés történt a kontroll csoporthoz képest, míg a legmagasabb értéket T48 időpontban mértük (T48: $20,6 \pm 4,0\%$; $p \leq 0,05$). A nemi különbségek tendenciáját tekintve, minden időpontban a renin pozitív sejtek nagyobb arányát láttuk hímekben, mely különbség T48 időpontra vált szignifikánssá ($20,6 \pm 4,0\%$ vs. $8,4 \pm 3,8\%$; hím vs. nőstény, $p \leq 0,05$).



12. ábra: Gyűjtőcsatorna principális sejtjeinek renin tartalma iszkémia/reperfúziós károsodást követően. Áramlási citometriás vizsgálatokat végeztünk a gyűjtőcsatorna principális sejtjeinek renin tartalma leírására. A kontroll hím állatokban, jelentősebb mennyiségben, míg nőstényekben kisebb arányban voltak jelen a renin termelő principális sejtek. Mennyiségük T2 és T8 időpontra csökkent, míg T16-tól kezdve fokozatosan megnőtt, mely emelkedés kifejezettebb volt hímekben. *: $p \leq 0,05$ vs. T48, #: $p \leq 0,05$ vs. T48 hím. Az adatokat átlag \pm SEM ábrázoltuk. T2, T8, T16, T24 és T48: a reperfúzió óta eltelt órák. AQP2+: akvaporin 2 pozitív.

4.1.4. Renin tartalom változása a reperfúzió különböző időpontjaiban – multifoton mikroszkóp

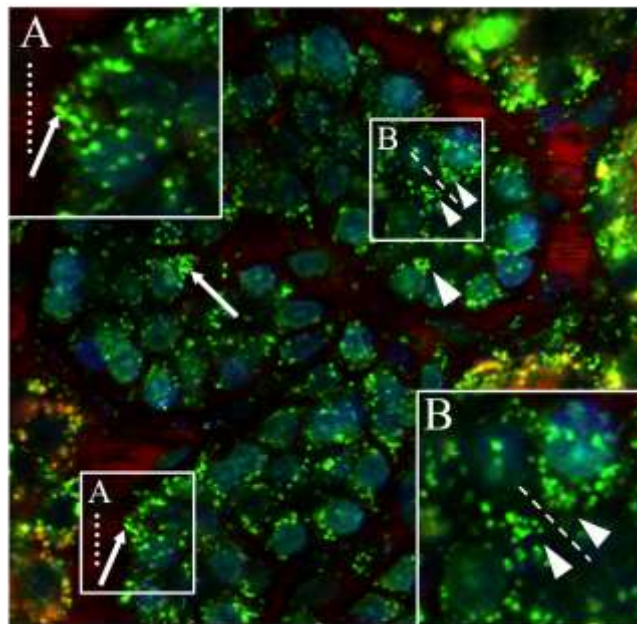
A multifoton mikroszkóppal való vizsgálatunk során a renin jelenlétét a savas granulumokat festő, az ábrán világoszöld színben megjelenő quinacrinnal igazoltuk (13. ábra). Ezzel kirajzolódott, hogy kontroll állatokban a JGA tartalmazott renint termelő sejteket, de az áramlási citometriával mért eredményeknek megfelelően a gyűjtőcsatorna sejtei csak igen kis mértékben festődtek. A renin granuláció T2 időpontra mindkét lokalizációban minimálisra csökkent és a hormontermelés még T8 időpontban is alacsony maradt. Először T16 időpontban tapasztaltunk jelentős renin granulációt, mind a JGA-ban, mind a gyűjtőcsatornában. A reperfúzió 24. órájában a renin termelés egyre kifejezettebb volt, és egészen a 48. óráig fokozódott. Az áramlási citometria során tapasztalt nemi különbség is látható volt, hím állatokban lényegesen több renin termelődött (*A kép*) mind a JGA-ban, mind a gyűjtőcsatornában a nőstény állatokhoz képest, minden időpontban (*B kép*).



13. ábra: Renin tartalom vizsgálata a juxtaglomeruláris apparátusban (JGA) és a gyűjtőcsatornában (CD) multifoton mikroszkóppal hím (A) és nőstény (B) állatokban. A JGA-ban és a gyűjtőcsatornában a kontroll csoport nyomokban tartalmazott renin granulumokat, mely mennyiség tovább csökkent T2 és T8 időpontokra. A renin granuláció T16 időpontra mindkét lokalizációban növekedett, majd T24 időpontra tovább fokozódott és T48 időpontra vált igazán kifejezetté. Ekkora a nemek közötti különbség is szembetűnővé vált, hímeiben jelentősebb renin termelést láttunk, mint nőstényekben. Lépték: 50 μ m. Piros: 70kDa rhodamin dextran (erek); világos zöld: quinacrin (renin granulumok), autofluoreszcencia; kék: Hoechst 33342 (sejtmag); nyíl: renin granulumok; T2, T8, T16, T24 és T48: reperfüzió óta eltelt órák. DT: disztális tubulus; PT: proximális tubulus.

4.1.5. Renin termelés a gyűjtőcsatornában – multifoton mikroszkóp

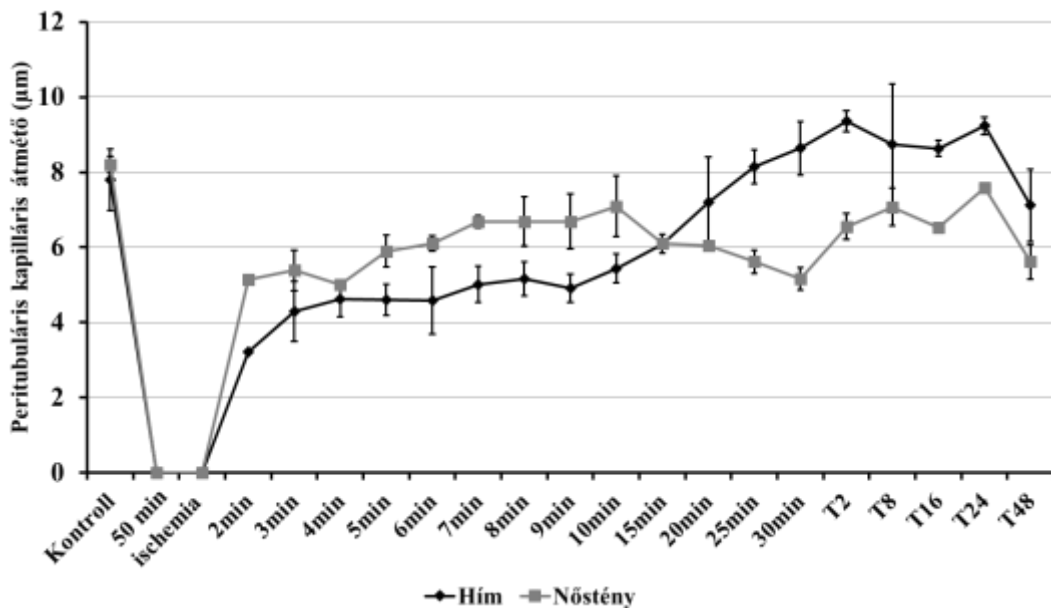
Megfigyelésünk szerint az iszkémia/reperfúziós károsodást követő 48. órában a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben termelődő renin két irányba is kiválasztódott (14. ábra): az A képen látható granulomok, melyek méretükben megfelelnek a renin tartalmú granulomoknak, a kapillárisok közelében feltételezhetően renin tartalmukat a keringésbe szecernálták. A B képen két principális sejt látható egymással szemben, melyek az apikális membrán közelében tartalmaztak nagy mennyiségű renint és tartalmukat a tubulus lumene felé ürítették.



14. ábra: Renin termelés a gyűjtőcsatornában a szisztémás keringés és a tubulus lumen felé. Az iszkémia/reperfúziós károsodást követően a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben termelődő renin két irányba választódott ki: a szisztémás keringésbe (A kép) és a tubulus lumenbe (B kép). Világoszöld: quinacrin (renin granulomok), autofluoreszcencia; piros: 70kDa rhodamin dextran (erek); kék: Hoechst 33342 (sejtmag); nyíl: renin granulomok kiválasztása a szisztémás keringésbe; nyílhegy: renin granulomok kiválasztása a tubulus lumenbe; pontozott vonal: kapilláris; szaggatott vonal: tubulus lumen.

4.1.6. Peritubuláris érátmérők változása – multifoton mikroszkóp

Az érátmérők vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy kontroll állatokban a kéregben található peritubuláris kapillárisok érátmérőiben a két nem között nem volt különbség (hímek: 7,2 μm vs. nőstények: 8,2 μm) (15. ábra). A klip felengedését követően (2 min) azonban kifejezett különbség mutatkozott az érátmérők alakulásában a két nem között. Nőstényekben a reperfúzió első perceiben jelentősen gyorsabban teltek fel a kapillárisok, ami a 10. percig minden időpontban (2 min, 5 min, 6 min, 7 min, 8 min, 9 min, 10 min) nagyobb érátmérőt jelentett a hímekhez képest (hímek: 3,2 μm ; 4,6 μm ; 4,6 μm ; 5,0 μm ; 5,2 μm ; 4,9 μm ; 5,4 μm vs. nőstények: 5,2 μm ; 5,9 μm ; 6,1 μm ; 6,7 μm ; 6,7 μm ; 6,7 μm ; 7,1 μm). Ezt követően az erek további tágulását nőstényekben már nem tapasztaltuk. Ennek megfelelően nőstényekben a kapilláris érátmérő nem haladta meg a kontrollban mért értéket, hímekben azonban ez a klip felengedését követő 25. percben bekövetkezett (25 min: 8,1 μm vs. kontroll: 7,8 μm). A 15. perctől a nemi különbség aránya megfordult, az ezt követő időpontokban a hímekben mértünk nagyobb érátmérőt (hímek: 8,1 μm , 8,6 μm vs. nőstények: 5,6 μm , 5,2 μm ; sorrendben).



15. ábra: Peritubuláris érátmérők iszkémia/reperfúziós károsodást követően hímekben és nőstényekben. A kontroll állatok érátmérői nem mutattak különbséget a két nem között. Ugyanakkor nőstényekben 2 min időponttól nagyobb érátmérőket mértünk, mint a hímeknél, de a 15. perctől az arány megfordult és hímekben mértünk nagyobb érátmérőket. Az adatokat átlag \pm SEM ábrázoltuk. 2-30 min: reperfúzió óta eltelt percek. T2-T48-ig: a reperfúzió óta eltelt órák.

4.2. Calcineurin inhibitor nefropátia

4.2.1. Vesefunkció, testsúly, vérnyomás

A vese funkcionális állapotának leírására szérumban kreatinin szintet mértünk a három hetes kezelést követően (3. táblázat). A kontroll állatok szérumban kreatinin szintje a fiziológiai tartományon belül maradt, azonban CNI kezelés hatására ez az érték több mint másfélszeresére nőtt, ami szignifikáns romlást jelentett az állatok vese-funkciójában. Aliskiren együttes adása CNI-kal szignifikánsan csökkentette a szérumban kreatinin szintet.

Az állatok testtömege a különböző csoportokban nem mutatott szignifikáns különbséget, így ez nem befolyásolta a kreatinin mérést (3. táblázat).

Méréseink során glomerulopátiát egyik csoportban sem figyeltünk meg. A vizelet fehérje tartalma minden csoportban a mikroalbuminuria határain belül maradt, azaz számottevő glomeruláris károsodással nem kellett számolnunk (3. táblázat).

Ahogy a 3. táblázatban látható, nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll és a kezelt csoportok vérnyomás értékei között, így ez a szisztémás hatás sem befolyásolta a nefropátia mértékét.

4.2.2. Calcineurin inhibitor vérszint

A gyógyszeres kezelés eredményességének ellenőrzése érdekében CyA és Tac vérszintet mértünk (3. táblázat). A kontroll csoporthoz viszonyítva, a humán céltartományt megközelítő vérszint értékeket kaptunk mindkét kezelés esetén.

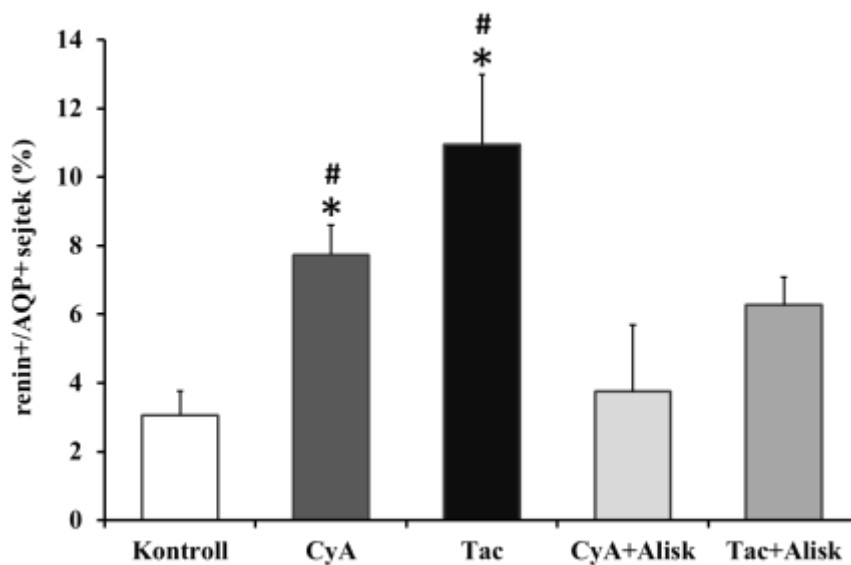
3. táblázat: Leíró jellegű paraméterek. Az állatok testtömege nem különbözött szignifikánsan a kontroll és a kezelt csoportokban. A CNI-k vérszintje a humán terápiás tartománynak megfelelő volt. A szérumban a kreatinin értékek alapján 3 hét CNI kezelést követően szignifikáns romlás következett be a vesefunkcióban, ami csökkenthető volt az Aliskiren együttes adásával. A vizelet fehérje tartalom minden csoportban a mikroalbuminuria határán belül maradt. A farok mandzsettás vérnyomásmérés nem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll és a kezelt csoportok vérnyomása (szisztolés, diasztolés és MAP) között. *: $p \leq 0,05$ vs. kontroll. Alisk: Aliskiren, CNI: calcineurin inhibitor, CyA: Cyclosporin A, MAP: artériás középnyomás (mean arterial pressure), Tac: Tacrolimus.

	Kontroll	CyA	Tac	CyA+Alisk	Tac+Alisk
Testsúly (g)	19,2±0,5	19,6±0,7	19,2±0,5	18,6±0,3	18,4±0,3
CNI vérszintek					
CyA (ng/ml)	-	42,52±1,2	-	20,43±1,1	-
Tac (ng/ml)	-	-	2,14±0,2	-	1,73±0,2
Szérumban a kreatinin (μmol/l)	19,5±2,6	31,7±3,6*	33,6±5,4*	26±1,3	23,4±1,7
Vizelet fehérje (g/l)	0,30±0,1	0,35±0,1	0,25±0,1	0,30±0,0	0,30±0,0
Vérnyomás					
Szisztolés (Hgmm)	104,6 ± 2,8	109,4 ± 3,7	107,5 ± 3,3	108,1 ± 3,5	102,0 ± 4,1
Diasztolés (Hgmm)	84,3 ± 2,6	85,9 ± 4,3	83,5 ± 3,4	85,6 ± 3,2	80,6 ± 2,6
MAP (Hgmm)	91,0 ± 2,6	93,7 ± 4,3	89,2 ± 2,5	93,1 ± 3,3	85,0 ± 4,3

*: $p \leq 0,05$ vs. kontroll

4.2.3. Renin tartalom a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben – áramlási citometria

Áramlási citometria során jelöltük az akvaporin 2 pozitív principális sejteket, és e sejtpopuláción belül vizsgáltuk a renin pozitív sejtek arányát (16. ábra). Az akvaporin 2 pozitív sejtek aránya a teljes veseszövethez képest nem változott a mérés során (adatokat nem ábrázoltam). A fizioiógias sóoldattal kezelt kontroll csoportban $3,1 \pm 0,7\%$ volt a renin pozitív sejtek aránya a principális sejtek között, ami a CyA kezelt csoportban több mint kétszeresére, a Tac kezelt csoportban majdnem háromszorosára emelkedett (Kontroll: $3,1 \pm 0,7\%$ vs. CyA: $7,7 \pm 0,9\%$; Tac: $11,0 \pm 2,0\%$; $p \leq 0,05$). Ha a CNI-okat renin gátlóval kombinációban adtuk, a kontroll csoporthoz hasonló eredményt kaptunk (Kontroll: $3,1 \pm 0,7\%$ vs. CyA+Alisk: $3,8 \pm 0,8\%$; Tac+Alisk: $6,3 \pm 0,8\%$; $p = \text{NS}$).

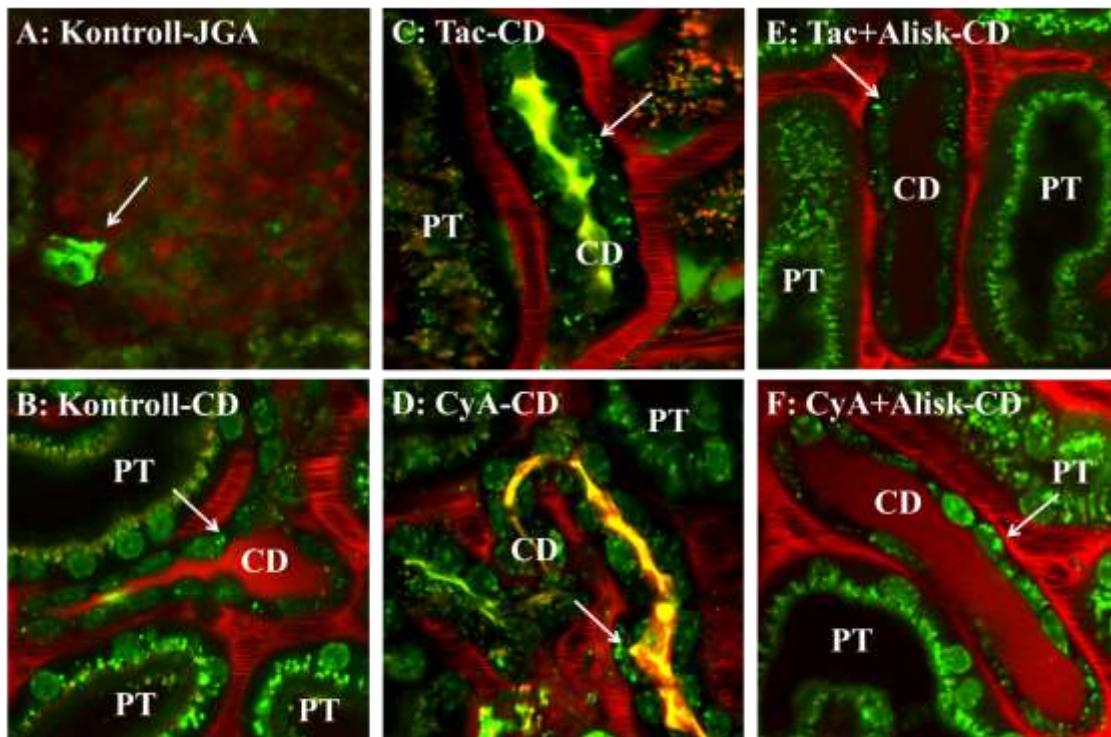


16. ábra: Áramlási citometria: renin pozitív sejtek aránya a principális sejtek között. A kontroll állatok principális sejtjeinek körülbelül 3%-a tartalmazott renint. Három hetes calcineurin inhibitor kezelés szignifikáns emelkedést eredményezett a renin pozitív sejtek arányában, mely szignifikancia eltűnt a kombinált kezelést kapott állatoknál. *: $p \leq 0,05$ vs. kontroll; #: $p \leq 0,05$ vs. Alisk. Az adatokat átlag \pm SEM ábrázoltuk. Alisk: Aliskiren; AQP2: akvaporin 2; CyA: Cyclosporin A; Tac: Tacrolimus.

4.2.4. Renin tartalom a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben – multifoton mikroszkóp

A három hetes gyógyszeres kezelést követően multifoton mikroszkópos mérést végeztünk, hogy megfigyelhessük a renin tartalmában és lokalizációjában bekövetkezett változásokat. A 2-4 μm -es renin granulumok kimutatására használt, savas granulumokhoz

kötődő quinacrin festék felhalmozódása volt megfigyelhető a JGA területén (17. ábra – A kép). A kontroll állatok gyűjtőcsatornájában alig mutatkozott néhány, a JGA-ban látottakhoz hasonló renin szemcse (17. ábra – B kép). A CNI kezelésben részesült állatok gyűjtőcsatornájában azonban eltérő képet láttunk. A Tac és CyA kezelt állatok gyűjtőcsatornáiban a principális sejtek bazális és apikális membránhoz közel eső területeit sűrűn kitöltötték a renin granulumok (17. ábra – C és D kép). A kombinált kezelésben részesült csoportokban azonban a renin szemcsék száma látványosan lecsökkent, a kontroll csoportéhoz hasonló szintre (17. ábra – E és F kép).

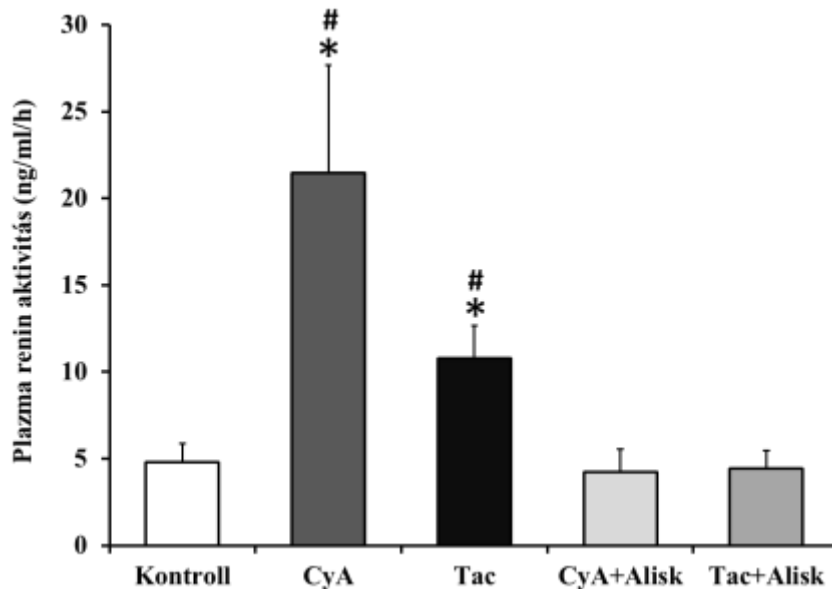


17. ábra: Renin tartalom vizsgálata multifoton mikroszkóppal. A: Kontroll állatokban a világoszöld quinacrin a JGA renin granulumaihoz kötődött. B: A kontroll állatok gyűjtőcsatornáiban néhány renin szemcse volt megfigyelhető a principális sejtek apikális felszínéhez közel. C-D: A Tac vagy CyA (sorrendben) kezelt csoportokban lényegesen több renin szemcse volt látható a principális sejtekben. E-F: Renin gátló kezelés mellett kevesebb renin granulum jelent meg a principális sejtekben. A fehér nyilak renin granulumokra mutatnak. Alisk: Aliskiren; CD: gyűjtőcsatorna; CyA: Cyclosporin A; JGA: juxtaglomeruláris apparátus; PT: proximális tubulus; Tac: Tacrolimus. Világoszöld: quinacrin (renin granulumok), autofluoreszcencia; piros: 70kDa rhodamin dextran (erek).

4.2.5. Plazma renin aktivitás

Meghatároztuk a plazma renin aktivitást annak érdekében, hogy megállapítsuk, vajon a CNI kezelés hatására csupán lokálisan vagy akár szisztémásan is megemelkedik a renin mennyisége (18. ábra). A kontroll csoportban 4,8 ng/ml/h volt a renin aktivitás, ami CyA kezelés hatására az ötszörösére, Tac kezelés hatására a kétszeresére emelkedett (Kontroll: $4,8 \pm 1,1$ ng/ml/h vs. CyA: $21,5 \pm 6,2$ ng/ml/h; Tac: $10,8 \pm 1,9$ ng/ml/h; $p \leq 0,05$).

Az ismert hatásmechanizmusnak megfelelően a szérumban a renin aktivitás emelkedést megakadályozta a CNI-kal kombinációban adott Aliskiren (Kontroll: $4,8 \pm 1,1$ ng/ml/h vs. CyA+Alisk: $4,2 \pm 1,4$; Tac+Alisk: $4,4 \pm 1,2$; $p = \text{NS}$).

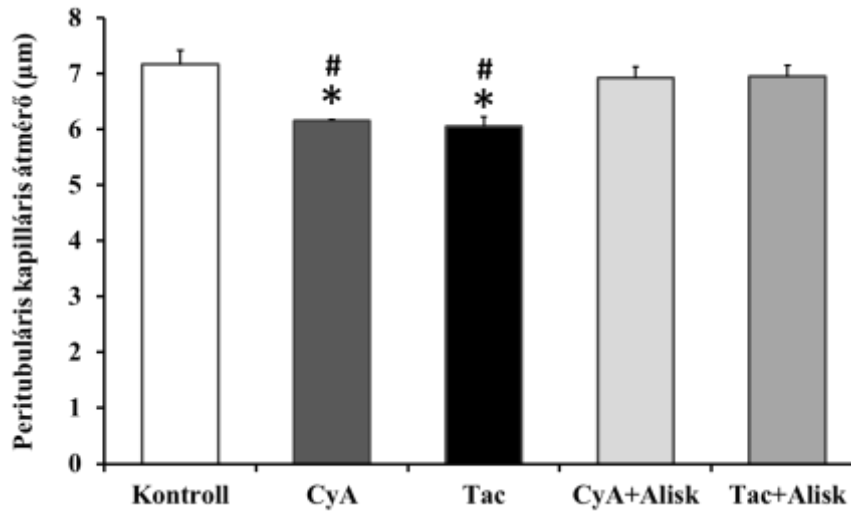


18. ábra: Plazma renin aktivitás meghatározása. Három hét CNI kezelést követően szignifikánsan megemelkedett a plazma renin aktivitás, mely renin gátló kezelés hatására a kontroll csoporthoz hasonló értékre csökkent. *: $p \leq 0,05$ vs.kontroll, #: $p \leq 0,05$ vs. Aliskiren. Alisk: Aliskiren; CyA: Cyclosporin A; Tac: Tacrolimus.

4.2.6. Peritubuláris kapilláris átmérők – multifoton mikroszkóp

Multifoton mikroszkóppal *iv vivo* mértük a peritubuláris kapillárisok átmérőit (19. ábra). A kontroll állatokban ez átlagosan $7,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ volt. Tacrolimus és CyA kezelés szignifikáns csökkenést okozott a tubulus menti kapillárisok átmérőiben (Kontroll: $7,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ vs. CyA: $6,2 \pm 0,0 \mu\text{m}$; Tac: $6,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$; $p \leq 0,05$). Aliskiren kezelés

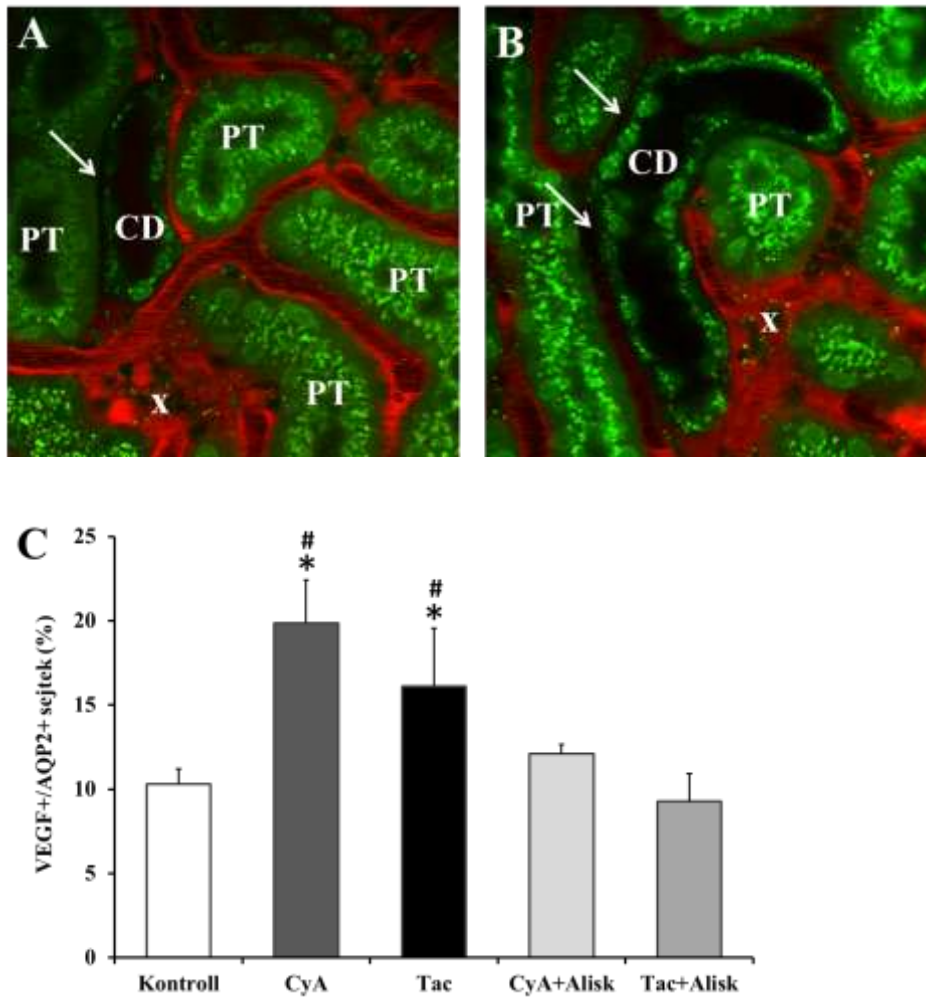
ellensúlyozta a CNI-ok hatására kialakuló érátmérő csökkenést (CyA: $6,2 \pm 0,0 \mu\text{m}$, Tac: $6,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$ vs. CyA+Alisk: $6,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$; Tac+Alisk: $7,0 \pm 0,2 \mu\text{m}$; $p \leq 0,05$).



19. ábra: Peritubuláris kapilláris átmérők. A CyA-val és Tac-szal kezelt csoportokban szignifikáns érátmérő csökkenést mértünk a kontroll és CyA+Alisk és Tac+Alisk csoportokhoz képest. *: $p \leq 0,05$ vs. kontroll, #: $p \leq 0,05$ vs. Alisk. Az adatokat átlag \pm SEM ábrázoltuk. Alisk: Aliskiren; CyA: Cyclosporin A; Tac: Tacrolimus

4.2.7. Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor pozitív sejtek aránya a principális sejtek között – multifoton mikroszkóp, áramlási citometria

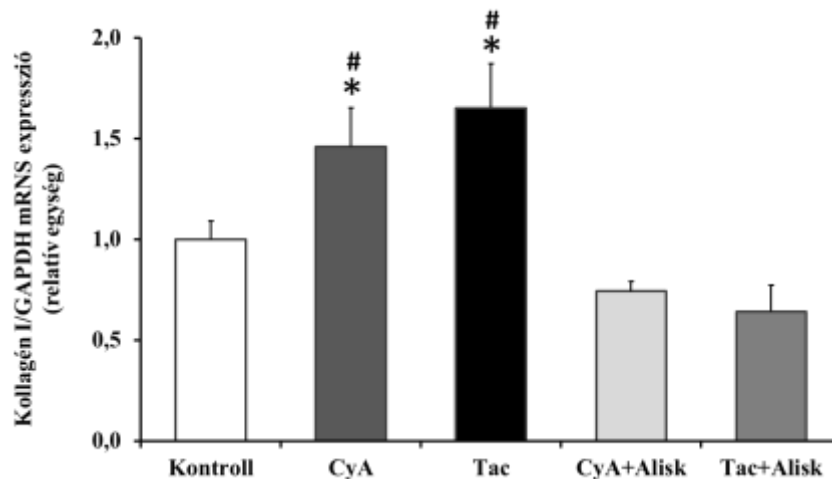
Az érátmérők vizsgálata során érmalformációkra lettünk figyelmesek a gyűjtőcsatornák közvetlen közelében. Néhol jelentősen beszűkült, máshol tág ereket figyeltünk meg turbulens áramlással (20. ábra A és B kép). Hogy a patomechanizmus esetleges újabb lépcsőjét felderítsük, vizsgáltuk a VEGF pozitív sejtek arányát a gyűjtőcsatornák principális sejtjei között áramlási citometriával (20. ábra, C kép). A principális sejtek aránya a teljes veseszövethez képest nem változott a mérés során (adatokat nem ábrázoltam). Kontroll állatokban a principális sejtek 10%-a tartalmazott VEGF-et. Ez az arány szignifikánsan emelkedett a CNI kezelt csoportban (Kontroll: $10,3 \pm 0,9\%$ vs. CyA: $19,9 \pm 2,6\%$; Tac: $16,1 \pm 3,4\%$; $p \leq 0,05$). A CNI mellett renin gátló kezelést is kapott csoportokban ez az emelkedés elmaradt (Kontroll: $10,3 \pm 0,9\%$ vs. CyA+Alisk: $12,1 \pm 0,6\%$; Tac+Alisk: $9,3 \pm 1,7\%$; $p = \text{NS}$).



20. ábra: Kóros VEGF termelés a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben és aránytalan érhálózat kialakulása a gyűjtőcsatornák környezetében. A és B kép: A multifoton mikroszkóppal készült képeken a nyilak vazokonstriktóra, az x turbulens áramlásra mutat. Világoszöld: quinacrin (renin granulomok), autofluoreszcencia; piros: 70kDa rhodamin dextran (erek). CD: gyűjtőcsatorna; PT: proximális tubulus. C kép: CyA és Tac kezelést követően szignifikáns emelkedés következett be a VEGF pozitív sejtek arányában a principális sejtek között a kontroll és CyA+Alisk és Tac+Alisk csoportokhoz képest is. *: $p \leq 0,05$ vs. kontroll, #: $p \leq 0,05$ vs. Alisk. Az adatokat átlag \pm SEM ábrázoltuk. Alisk: Aliskiren; AQP2: akvaporin 2; CyA: Cyclosporin A; Tac: Tacrolimus; VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor.

4.2.8. Kollagén I mRNSexpresszió – RT-PCR

Az intersticiális fibrózis a CNI nefrotoxicitás egyik jellegzetes szövettani elváltozása (Randhawa 1993, Morozumi 2004), melynek egyik markerét, a kollagén mennyiségét vizsgáltuk. Ezért kollagén I mRNS szintet mértünk a veseszövetben (21. ábra). A CyA és Tac kezelt csoportokban szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a kollagén I mRNS expresszióban a kontroll csoporthoz képest (Kontroll: 1,0; CyA: 1,5; Tac: 1,7; $p \leq 0,05$). A direkt renin inhibitor Aliskirennel együtt kezelt csoportokban a kontrollokhoz hasonló mértékű kollagén I mRNS expressziót mértünk (CyA: 1,5, Tac:1,7 vs. CyA+Alisk: 0,7; Tac+Alisk: 0,6; $p \leq 0,05$).

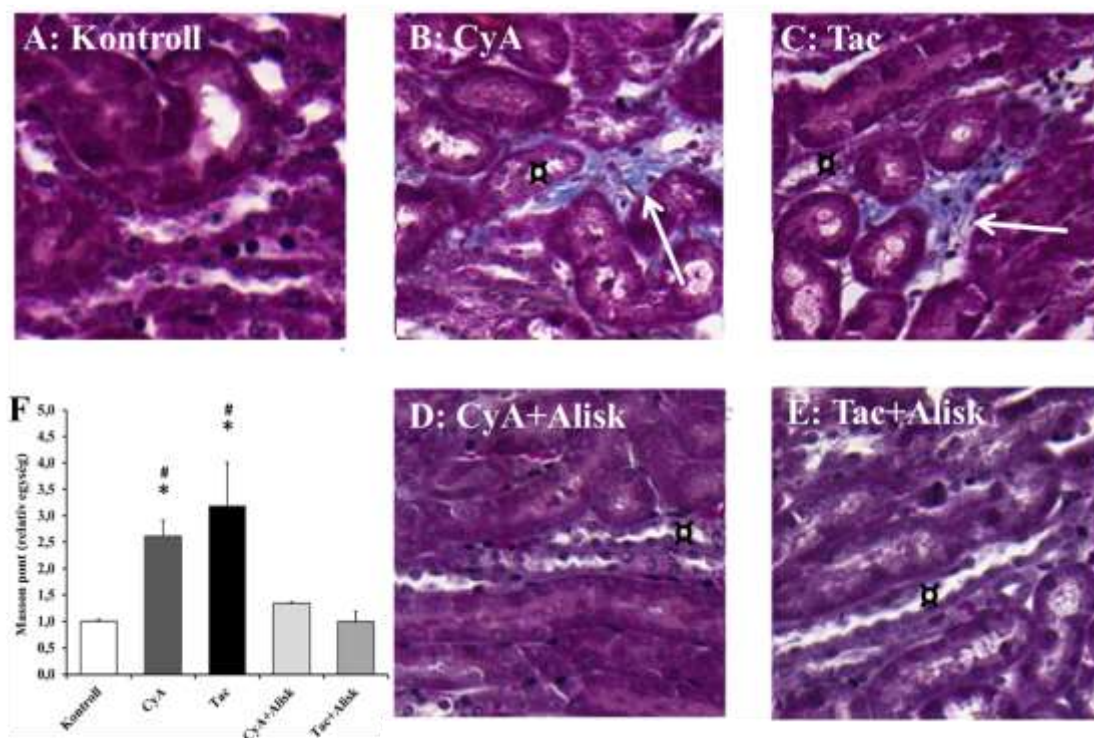


21. ábra: Kollagén I mRNS expresszió mérése. CyA és Tac kezelt csoportokban szignifikáns emelkedés történt a kollagén I mRNS expresszióban a kontroll és az Aliskirennel kombinációban kezelt csoportokhoz képest is. *: $p \leq 0,05$ vs. kontroll; #: $p \leq 0,05$ vs. Alisk. Az adatokat átlag \pm SEM ábrázoltuk. Alisk: Aliskiren; CyA: Cyclosporin A; GAPDH: glicerilaldehid-3-foszfát dehidrogenáz; Tac: Tacrolimus.

4.2.9. Kollagén kimutatás – Masson festés

A kollagén kimutatására alkalmas Masson festéssel a vese egészét érintő szerkezeti változásokat figyeltük meg. A CNI-ok nefrotoxikus hatásának és az Aliskiren kezelés CNI nefropátiában jelentkező, védő szerepének vizsgálatára a kollagén kiterjedését és pontos lokalizációját vizsgáltuk (22. ábra). A kontroll állatok veséiből készült szövettani metszeteken az arteriolák körül figyeltünk meg kollagén festődést, azonban intersticiális fibrózis nyomait nem találtuk. Három hetes CNI kezelést követően szignifikáns

emelkedést láttunk a kollagén mennyiségében a CyA és Tac csoportban is (Kontroll: $1,0 \pm 0,1$ Masson pont vs. CyA: $2,6 \pm 0,5$ Masson pont; Tac: $3,2 \pm 1,5$ Masson pont; $p \leq 0,05$). Vizsgálataink során feltűnt, hogy a szigetszerű fibrotikus plakkok többnyire a gyűjtőcsatornák környezetében helyezkedtek el. Azon csoportokban, ahol Aliskiren kezelést is alkalmaztunk, a kollagén felhalmozódása kisebb mértékű volt (Kontroll: $1,0 \pm 0,1$ Masson pont vs. CyA+Alisk: $1,3 \pm 0,1$ Masson pont; Tac+Alisk: $1,0 \pm 0,3$ Masson pont; $p = \text{NS}$).



22. ábra: Kollagén kimutatása Masson festéssel. A: A kontroll csoportban nem volt jele intersticiális fibrózisnak. B-C: Tac és CyA kezelt csoportokban kollagén szigetek jelentek meg a gyűjtőcsatornák környezetében. D-E: Tac+Alisk vagy CyA+Alisk kombinált kezelés a kontroll csoporthoz hasonló szöveti képet eredményezett, kollagén felszaporodás nem volt látható. F: A diagramon a fibrózis szemikvantitatív analízisének eredménye látható. *: $p \leq 0,05$ vs. kontroll, #: $p \leq 0,05$ vs. Alisk. Az adatokat átlag \pm SEM ábrázoltuk. Alisk: Aliskiren; CyA: Cyclosporin A; Tac: Tacrolimus. Fekete: sejtmagok; vörös-lila: sejtplazma, vörösvértestek; kék: kollagén. Fehér nyilak: kollagén szaporulat; \blacksquare : gyűjtőcsatorna.

5. MEGBESZÉLÉS

A krónikus vesebetegség világszerte milliókat érintő kórkép, Magyarországon több mint fél millió ember szenved krónikus vesebetegségben. A betegség végső stádiumában vesepótló kezelésre van szükség, melyek közül a vesetranszplantáció hosszú távú megoldást és a dialízisnél jobb életminőséget jelenthet. A beültetett vese optimális esetben évekig fiziológiásan működik, azonban az évek múltával egyre nagyobb a kockázata az allograft diszfunkció kialakulásának, melynek hátterében alloantigén-függő és -független folyamatok állhatnak. Jelen tanulmányunkban a vesetranszplantációval minden esetben velejáró iszkémia/reperfúzió által okozott változásokat, illetve a transzplantáció után nagyon gyakran alkalmazott CNI kezelés nefrotoxikus hatását vizsgáltuk, amiket a transzplantált vese diszfunkciójának kialakulásában szerepet játszó alloantigén-független kóroki tényezők között tart számon a szakirodalom. A két hatás gyakran együttesen éri az átültetett vesét.

Az elmúlt évtizedben került leírásra, hogy bizonyos kórállapotokban, mint diabétesz mellitusz vagy magas vérnyomás betegség, illetve magas sótartalmú diéta során, a gyűjtőcsatorna bizonyos sejtjei képesek visszanyerni az embrionális korra jellemző renin termelő kapacitásukat (Csohány et al. 2013; Kang et al. 2008; Prieto-Carrasquero et al. 2008; Prieto-Carrasquero et al. 2004; Prieto-Carrasquero et al. 2005; Rohrwasser et al. 1999). Lényeges különbség azonban, hogy ez a tubulus szegmens, mivel nagyobb renin termelő sejt populációval rendelkezik a JGA-hoz képest, jelentősebb mennyiségű lokális renin szecernálására képes. Ennek következtében a gyűjtőcsatornában termelődő renin a renális renin-angiotenzin rendszer fokozott aktiválásán keresztül fontos szereplőjévé válhat a krónikus allograft diszfunkció kialakulásának (Kang et al. 2008). Elképzelhető lenne, hogy a JGA-ban kiválasztott és a glomerulusban átfiltrálódott renin, a tubuluson végig haladva a gyűjtőcsatorna sejtjeiben kerül felvételre. Ismert azonban, hogy a proximális tubulus sejtjeiben a renin visszavételre kerül, illetve korábban bizonyítást nyert az a tény, hogy a gyűjtőcsatorna principális sejtjei képesek renin termelésre, amit a kéreg és velőállomány gyűjtőcsatornájában expresszálódó renin mRNS jelenléte is tanúsít (Prieto-Carrasquero et al. 2005; Rohrwasser et al. 1999). Mindezek alapján munkám első részében céлом volt a vese iszkémia/reperfúziós károsodás akut modelljén vizsgálni a renin termelést a

gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben, különös tekintettel a nemi különbségekre. A PhD munkám második felében pedig CNI nefropátia kialakulása során vizsgáltam a renin termelődésének nemrégiben leírt új lokalizációjának jelentőségét, illetve lokálisan kifejtett hatását.

Eredményeim alapján elmondható, hogy mind a vese akut iszkémia/reperfúziós károsodása során, nemtől függetlenül, mind CNI nefropátiában a gyűjtőcsatorna principális sejtjeinek renin termelése kórosan emelkedett. Ezen megfigyelések felhívhatják a figyelmet a renin kulcsszerepére a krónikus allograft diszfunkció kialakulásában.

5.1. A renin feltételezett szerepe renális allograft diszfunkció kialakulásában

Felmerül a kérdés, hogy mi lehet az a közös kórfolyamat, ami a gyűjtőcsatorna fokozott renin termeléséhez vezet, illetve mi az a renin által indukált patomechanizmus, amely mindkét modellben a renális allograft diszfunkció kifejlődésében szerepet játszhat. A leglemibb faktor, ami jelen volt mindkét vizsgálati felállásban az iszkémia/hipoxia. Míg a vese iszkémia/reperfúziós károsodása során a nyilvánvaló iszkémiás időszak, addig CNI nefropátiában a CNI-k hatására kialakuló vérátáramlás csökkenés és az azt eredményező lokális hipoxia lehet a renin termelésének egyik indirekt ingere a gyűjtőcsatornában. Irodalmi adatok alapján a renin termelés jelentős emelkedésére magyarázatul szolgálhat az a tény, hogy oxigén hiányában a mitokondriumban zajló citrát ciklus zavart szenved, így szukcinát halmozódik fel először a mitokondriumban, majd a citoszolban, végül kilép a keringésbe is (Hebert 2004; Peti-Peterdi 2010). A szukcinát, nemrégiben leírt receptorán keresztül képes számos mestergénnek, így a reninnek az átírását, majd elválasztását serkenteni (Hebert 2004; Peti-Peterdi et al. 2013). Peti-Peterdi és munkatársai a vese iszkémiájával járó diabétesz mellitusz állatmodellben írták le, hogy a szukcinát receptora a G protein–kapcsolt receptor-91, a JGA granuláris sejtjei mellett, a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben is kifejeződik és ezen keresztül a hipoxia következtében megnövekedett mennyiségű szukcinát jelentősen fokozza a renin elválasztását, mindkét lokalizációban (Kang et al. 2008; Peti-Peterdi et al. 2013; Toma et al. 2008). Ez a fokozott renin termelés a nemrégiben leírt (pro)renin receptoron keresztül (Nguyen et al. 2002) az iszkémiás károsodást elszenvedett sejtekben rövid távon túlélési szignálokat képes beindítani, úgy mint extracelluláris szignál-regulált kináz-1 és -2 és p38

útvonalakat (Sakoda et al. 2007). Amennyiben a károsodás súlyosabb mértéket ölt vagy hosszabb ideig tart, ugyanezen a receptoron keresztül profibrotikus útvonalak aktiválása történik, leginkább a transzformáló növekedési faktor 1 β szignálkaszkádján keresztül (Rüster and Wolf 2011; Wynn 2008), mely így a vese hosszú távú károsodásához vezet.

Vajon, mi lehet a magyarázata a vese fokozott renin termelésének különböző stressz helyzetekben? Lehetséges magyarázatként szolgálhat, hogy a legősibb válaszreakció elevenedik fel újra e körülmények között, azaz az embrionális korban az egészséges vese fejlődéséhez kulcsfontosságú fokozott renin termelés, az érett vesét érő különböző károsodások helyreállításában is a túlélés záloga lehet. A kóros mértékű renin termelésnek, illetve a feltételezhetően annak következményeként is kialakuló fibrózisnak akár protektív szerepe is elképzelhető, melynek eredeti feladata a vesét érő káros ingerek hatására kialakuló védelmi rendszer lenne (Kaissling et al. 2013). Amennyiben a stressz tartósan áll fenn, e védő funkciók tartós válaszukkal a vese szövet nagyobb mértékű fibrotikus átalakulásához, így a vese diszfunkciójához vezethetnek.

5.2. Iszkémia/reperfúziós graft károsodás

Az irodalomban számos bizonyíték áll rendelkezésre, miszerint a renin-angiotenzin rendszer aktivációjának meghatározó szerepe van az iszkémia/reperfúziós károsodás talaján létrejövő krónikus allograft nefropátia progressziójában (Efrati et al. 2012; Fouad et al. 2010; Lutz et al. 2006). A JGA renin termelése és elválasztása jelentősen fokozódik krónikus iszkémiát elszenvedő vesében, azonban közvetlenül gátolva a megnövekedett mennyiségű renint, hatékonyan csökkenthető a fibrózis, illetve a sejtek apoptózisa (Hammad et al. 2013; Sun et al. 2012; Wang et al. 2013). Ugyan több tanulmány is foglalkozik a vese iszkémiáját követő hosszú távú renin termeléssel (Siddiqi et al. 2009; Sun et al. 2012; Tokuyama et al. 2002), azonban az iszkémiát közvetlenül követő időszakról nem áll rendelkezésünkre adat, ezen felül az akut iszkémiás vesekárosodás során alig ismert a renin szerepe, az erre vonatkozó nemi különbségekről pedig kiváltképpen hiányos a tudásunk. Mivel mára ismertté vált, hogy a gyűjtőcsatorna principális sejtjei is képesek a renin szecernálására (Kang et al. 2008; Prieto-Carrasquero et al. 2004), célunk volt a vese iszkémia/reperfúziós károsodás akut modelljén vizsgálni

a renin elválasztását a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben, különös tekintettel a nemi különbségekre.

Vizsgálatainkból kiderül, hogy 50 perces, egy oldali iszkémiát követően jelentős, akut változás történik nem csak a már jól ismert JGA-ban (Weber et al. 1975), de a gyűjtőcsatornában is, mely lokalizációt a korábbi iszkémia/reperfúziós károsodásról szóló tanulmányok nem vizsgálták.

5.2.1. Renin termelés időbeli változása iszkémia/reperfúziós vese károsodás esetén

Mind az áramlási citometriai mérések során, mind multifoton mikroszkóppal látott eredményeink azt mutatják, hogy a reperfúzió első óráiban a hormontermelés jelentősen csökken a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben. A reperfúzió második és nyolcadik órájában tapasztalt renin szint csökkenés háttérében feltételezésünk szerint az állhat, hogy a hiperakut fázisban a renin granulomok hirtelen kiürülnek, majd ezt követően, mivel a károsodás hatására a sejt energiaraktárai jelentősen csökkennek és a fehérjeszintézis átmenetileg korlátozott, nincs megfelelő hormontermelés, ami a hiányt pótolná (Mackins et al. 2006). Feltételezzük, hogy T16 időpontra a sejt energiaháztartása regenerálódik, és lehetőség van a túlélésért felelős útvonalak beindítására. Az ezt követő jelentős mennyiségű renin termelés háttérében a már korábban említett összefüggés állhat, miszerint a hipoxia hatására fokozottan termelődő szukcinát, saját receptorán keresztül serkenti a renin képződését a gyűjtőcsatornában (Hebert 2004; Peti-Peterdi 2010). Korábban már leírták, hogy a szervek korlátozott vérellátása, vagyis lokális iszkémiája a szukcinát felszaporodásához és azt követő emelkedett renin elválasztáshoz vezet (He et al. 2004). A megnövekedett mennyiségű renin pedig szintén saját receptorán keresztül a fibrózis irányába ható jelátviteli útvonalakat aktivál (ld. Bevezetés).

5.2.2. Nemi különbségek a renin termelésében

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy jelentős nemi különbség áll fenn a renin-angiotenzin rendszer működésében és szabályozásában (Komukai et al. 2010). Hímekben sokkal hangsúlyosabb a renin-angiotenzin rendszer aktivitása a vesében nőstényekhez képest, amit alátámaszt az a megállapítás miszerint az androgén hormonok emelik a plazma renin aktivitást, illetve a renin mRNS expresszióját a vesében, míg az ösztrogének csökkentik azokat (Chen et al. 1992). Emellett a tesztoszteronról ismert, hogy növeli az

angiotenzin konvertáló enzim aktivitását, míg az ösztrögének gátolják az angiotenzin konvertáló enzim működését, csökkentik az angiotenzin 1-es típusú receptorának denzitását és az aldoszteron termelést, ezzel egy időben pedig emelik az angiotenzin 1-7 szintjét. Ezen felül a progeszteron verseng az aldoszteronnal a mineralokortikoid receptorért (Komukai et al. 2010). E megállapításokkal egybehangzó eredményt tapasztaltunk mi is vizsgálataink során. Már a kontroll csoportban látható volt, hogy hímekben a fiziológiás renin termelés fokozottabb, mint nőstényekben. Jóllehet T16 időpontban mindkét nemből figyelemre méltó emelkedést láttunk a renin tartalomban az előző időpontokhoz képest, a változás dinamikája különbözött a két nemből. Nőstényekben a növekedés hamarabb következett be, azonban a reperfüzió második napjáig már nem történt változás. Ehhez képest hímekben a változás lassabb és elhúzódóbb volt, a renin termelés csak a második napra (T48) érte el maximumát. Hímekben a kontroll csoporthoz képest arányaiban hasonlóan alakult a renin termelés nőstényekhez képest, abszolút értékben azonban szignifikánsan több renin termelődött a gyűjtőcsatornában (12. ábra). Tehát a hímek nem csak fiziológiás állapotban rendelkeznek nagyobb renin tartalékkal a nőstényekhez képest, de az iszkémia/reperfüziós károsodás hatására nagyobb mennyiség termelődik. Ezek alapján feltételezzük, hogy míg hímekben központi szereplő lehet, nőstényekben nem a renin-angiotenzin rendszer útvonal elsősorban az, ami a vese iszkémia/reperfüziós károsodásra adott válaszában alapvető szerepet játszik.

5.2.3. Nemi különbségek a peritubuláris érátmérők változásában

Jól ismert tény, hogy a nem az iszkémiát követő vesefunkciót is igen nagymértékben befolyásolja (Müller et al. 2002). Laboratóriumunkban korábban kimutatták, hogy az artéria renalis nagyfokú vazokonstriktója figyelhető meg iszkémiát követően hím, Wistar patkányokban (Müller et al. 2002). Nőstényekben az artéria renalis átmérője korábban visszanyerte eredeti méretét és a vérátáramlás is hamarabb rendeződött a hímekhez képest (Müller et al. 2002). Munkánk során hasonló eredményt láttunk, azonban a korábbi vizsgálatokkal ellentétben nem az artéria renalis átmérőjét és vérátáramlását mértük, hanem *in vivo* körülmények között a vese kéreg peritubuláris kapillárisait, aminek köszönhetően lényegesen pontosabb képet kaptunk a vese vérellátásáról. Kontroll állatokban nem találtunk különbséget a nemek között a

kapillárisok érátmérőiben. Az iszkémiát követő reperfúzió első két percében azonban a peritubuláris kapillárisok nagyobb mértékben telődtek vissza nőstényekben, vagyis ennyivel is rövidebb az iszkémia időtartalma a hímekhez képest, ugyanakkor a nőstények érátmérői a megfigyelés későbbi időpontjaiban sem lépték át a kiindulási értékeket. Ezzel szemben, hímeknél a kapillárisok visszatelődése sokkal lassabban történt meg. Az eredeti diaméter elérése csak a 25. percben következett be és a nőstényeknél tapasztaltakkal ellentétben az értékek a vizsgálat folyamán mindvégig emelkedő tendenciát követettek egészen a T24 időpontig. Fontos megjegyezni, hogy az ereknek ez a túlzott tágulata súlyosabb reperfúziós károsodásért lehet felelős, ahogyan azt a szövettani kiértékelés során is láttuk. Úgy tűnik, a nőstények egyfajta relatív védelemben részesülnek a vese iszkémia/reperfúziós károsodása során: nem csak a kapillárisok iszkémiát követő gyorsabb újratelődésnek, de a túlzott vazodilatáció kivédésének is köszönhetően, a reperfúziós károsodás is nagyobb mértékben megelőzhető. Összességében tehát nőstényekben lényegesen kiegyensúlyozottabb értónus szabályozás jellemző, hímekhez képest (15. ábra). Eredményeink összecsengenek az irodalmi adatokkal, az intrarenális renin-angiotenzin rendszer fokozottabb aktivitása hímekben, míg a renin-angiotenzin rendszer szereplőinek kisebb mértékű jelenléte nőstényekben, részben magyarázatul szolgálhat a vese iszkémia/reperfúziós károsodására adott nemi különbségekre (Maric-Bilkan and Manigrasso 2012).

5.2.4. Renin gátlás feltételezett szerepe iszkémia/reperfúziós vesekárosodásban

Irodalmi, illetve saját eredményeink is alátámasztják a renin-angiotenzin rendszer jelentős szerepét iszkémia/reperfúziós vesekárosodás kialakulásában (Altunoluk et al. 2006; Efrati et al. 2012; Fouad et al. 2010; Lutz et al. 2006). Számos vizsgálat foglalkozott a renin-angiotenzin rendszer gátlók alkalmazásának következményeivel iszkémia/reperfúziós vesekárosodásban. E vizsgálatok kimutatták, hogy angiotenzin konvertáló enzim gátlók és angiotenzin receptor blokkolók csökkentik számos mediátor (interleukin-1, interleukin-6, tumor nekrozis faktor α , transzformáló növekedési faktor β) szintjét, javítják a vese funkciót és mérséklék az iszkémia/reperfúziós vesekárosodás következtében kialakuló gyulladást és fibrózist (Barrilli et al. 2004; Efrati et al. 2012; Fouad et al. 2010; Habibey et al. 2008; Lukitsch et al. 2012; Molinas et al. 2009). Igaz, hatékonyságuk korlátozott, ugyanis az angiotenzin konvertáló enzim gátlók és

angiotenzin receptor blokkolók alkalmazásakor a renin szint kompenzatórikusan megemelkedik, ez viszont csökkenti az alkalmazott gyógyszerek védőhatását (Hollenberg 2010). Egyes tanulmányok kimutatták, hogy a direkt renin gátló enalkiren kifejezettebb vazodilatációt okoz vesében, az angiotenzin konvertáló enzim gátló captoprilhez képest (Cordero et al. 1991; Fisher et al. 1994). Emellett ismert a direkt renin gátlás protektív szerepe az agy és szívizom iszkémia/reperfúziós modelljében (Schmerbach et al. 2010; Shi et al. 2011). A vese krónikus iszkémia/reperfúziós modelljében is bebizonyosodott a direkt renin gátló Aliskiren védő hatása (Sun et al. 2012). Jelen tanulmányunk bizonyítja, hogy a renin az akut iszkémia/reperfúziós vesekárosodás során is felhalmozódik, nem csak a JGA-ban, hanem a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben is. Mindezek alapján feltételezzük, hogy a renin direkt gátlásával hatékonyan csökkenthető lenne az akut iszkémia/reperfúziós vesekárosodás. Ezen feltételezésünket alátámasztja az irodalomban a közelmúltban megjelent két vizsgálat, melyek bizonyították akut iszkémia/reperfúziós patkánymodellben az Aliskiren protektív szerepét (Hammad et al. 2013; Wang et al. 2013). Az első vizsgálat az iszkémia/reperfúziós károsodás szövettani következményeit írta le és arról számolt be, hogy Aliskiren hatására csökkent a leukocita infiltráció és az apoptotikus sejtek száma. Ezzel együtt az oxidatív stressz okozta szuperoxid-dizmutáz és glutation szint csökkenését is kivédte a renin direkt gátlása. Ennek megfelelően pedig a vese funkcióban (vér karbamid-nitrogén, szérum kreatinin) is javulás mutatkozott Aliskiren kezelést követően (Wang et al. 2013). A másik vizsgálat a vese hemodinamikája és tubuláris funkciója mellett két fehérjét kódoló gén expresszióját is vizsgálta. Az egyik fehérje a neutrofil zselatináz-kapcsolt lipocalin, mely az akut vesekárosodás egyik fontos markere, a másik a fibrogenetikus tulajdonságokkal rendelkező plazminogén aktivátor gátló-1, melynek szintje szintén megemelkedik iszkémia/reperfúziós károsodásban. A direkt renin gátlás javította a vese vérátáramlását és tubuláris működését és csökkentette e két gén expresszióját is (Hammad et al. 2013). Arra azonban egyik tanulmány sem tért ki, hogy időben és lokalizációban hogyan változik a renin termelés a vesében iszkémia/reperfúziós károsodás során, vagy arra, hogyan alakul renin gátlás (Aliskiren kezelés) hatására. Összességében azonban ezen eredmények is alátámasztják a renin meghatározó szerepét iszkémia/reperfúziós károsodásban.

Összefoglalásként elmondható, hogy munkánk során leírtuk a vese iszkémia/reperfúziós károsodásának akut modelljében a renin válasz meglétét a JGA

mellett a gyűjtőcsatornában is. Ez a válasz kifejezettebb hímekben, mint nőstényekben. A renin-angiotenzin rendszer eltérő szabályozása a két nemből iszkémia/reperfúziós vesekárosodás során, magyarázatul szolgálhat a hímekre jellemzőbb ingadozó értónus szabályozásra. Ezzel szemben a nőstények igen kiegyensúlyozott renin-angiotenzin rendszer regulációval és stabilabb érátmérőkkel rendelkeznek a vese kéregben. Eredményeinkre támaszkodva feltételezzük, hogy a renin közvetlenül is szerepet játszhat az iszkémia/reperfúziós vesekárosodás rövidebb és hosszabb távú következményeinek kialakulásában. Ennek hátterében a megnövekedett renin elválasztás állhat, amely mind az angiotenzin II-t, mind saját (pro)renin receptorát aktiválva a folyamat központi szereplője lehet. A renin gátlása terápiás lehetőségként merülhet fel az iszkémia/reperfúziós vesekárosodás mind akut, mind krónikus következményeinek csökkentésében.

5.3. Calcineurin inhibitor nefropátia

A veseátültetést követő terápia elengedhetetlen része az immunszuppresszív szerek használata, melyek közül a CNI-k gyakran alkalmazott gyógyszerek. A CNI-k az egy éves grafttúlélést jelentősen javítják, ám hosszú távon nefrotoxikus mellékhatásuk miatt jelentősen hozzájárulnak a krónikus allograft diszfunkció kialakulásához. A CNI nefrotoxicitás hátterében meghúzódó patomechanizmus nem teljesen ismert. A CNI-k okozta nefrotoxicitás kialakulásában számos komponens vesz részt (ld. Bevezetés 1.2.1.3.), melyek közül mi a renin-angiotenzin rendszer működésének jelentőségét vizsgáltuk.

Vizsgálataink során leírtuk, hogy a direkt renin gátló Aliskiren jótékony hatású CNI nefrotoxicitásban. Ismert, hogy a renin csökkenti a vese vérátáramlását, a megnövekedett renin-angiotenzin rendszer aktivitás, illetve fokozott angiotenzin II képződésén keresztül, azonban termelődését CNI nefrotoxicitásban mindeddig csak a JGA-ban vizsgálták. Eredményeink azt mutatják, hogy CNI kezelést követően a gyűjtőcsatornában is fokozódik a renin termelés és ezzel párhuzamosan csökken a peritubuláris kapillárisok érátmérője. Eredményeink felvetik, hogy a következményesen csökkent vérátáramlásra és hipoxiára a principális sejtek kóros VEGF expresszióval válaszolhatnak. Ennek következményeként a gyűjtőcsatornák környezetében aránytalan érnövekedést és

intersticiális fibrózis megjelenését tapasztaltuk. A direkt renin gátló Aliskirennel történő kezelés csökkentette a káros hatásokkal járó VEGF termelődést, illetve a káros érújdonképződést és fibrózist.

Kísérleteink során, az állatokon ugyan nem végeztünk szerv transzplantációt, azonban a veseátültetést követő immunszuppresszív gyógyszerek dózisának megfelelő kezelésben részesültek. Tehát nem modelleztünk teljes mértékben transzplantációs helyzetet, viszont így el tudtuk kerülni, hogy a vesét más – a transzplantáció során előforduló – károsodás érje és ennek köszönhetően más befolyásoló tényező nélkül tudtuk vizsgálni a CNI-k nefrotoxikus hatását.

5.3.1. Renin termelés a gyűjtőcsatornában CNI nefropátia kialakulása során

Az irodalomból jól ismert, hogy a CNI-k fokozzák a JGA renin termelését és elválasztását (Bennett et al. 1996; Remuzzi et al. 2008; Wolf 2006). A granuláris sejtekben kifejeződő különböző calcineurin izoformák, magyarázatul szolgálhatnak arra, hogy miért reagálnak ilyen érzékenyen CNI kezelésre a juxtaglomeruláris sejtek. Cyclosporin A kezelést követően szignifikánsan emelkedett renin elválasztás mutatható ki a JGA-ban *in vitro* kísérletekben (Ryffel et al. 1994). Hasonló eredményeket írtak le széles körben végzett állatkísérletek során, *in vivo* körülmények között is: CNI kezelést követően a renin termelő granuláris sejtek hipertófiája és emelkedett plazma renin aktivitás figyelhető meg patkányokban (Andoh and Bennett 1998; Lee 1997; Ryffel et al. 1994; Young et al. 1995). Továbbá, CNI terápiában részesülő betegekben vese érintettség nélkül is (szív és máj transzplantáltak) emelkedett plazma renin aktivitásról számoltak be (Julien et al. 1993). Fontos azonban megjegyezni, hogy minden eddigi tanulmány a CNI-k JGA renin termelő sejtjeire kifejtett hatására fókuszált és egyik sem vizsgálta a szérumban renin aktivitás növekedésének más potenciális forrását. Jóllehet, a CNI-k hatása a gyűjtőcsatorna szegmensre jól ismert (Gooch et al. 2006; Rinschen et al. 2011).

Méréseink során az intrarenális renin pontos lokalizációjának és mennyiségének meghatározására egy *in vivo* képalkotó módszert kombináltunk áramlási citometriával. Ezen technikák segítségével a JGA-n kívül egy másik intrarenális lokalizációban, a gyűjtőcsatornában is sikerült kimutatnunk jelentős mennyiségű renint CNI nefropátia kialakulása során. Vizsgálataink során már három hét CNI kezelés után három-négyszeres emelkedést mértünk a renin pozitív principális sejtek arányában. Mivel nem

tapasztaltunk glomerulopátiát egyik csoportban sem, valószínűtlennek tartjuk, hogy kóros mennyiségű renin filtrálódott volna át a glomeruluson, mely a gyűjtőcsatorna sejteibe került volna felvételre. Kimutattuk továbbá, hogy a renin granulomok a principális sejtekben mind az apikális, mind a bazális membrán közelében megtalálhatóak, ami alátámasztja, hogy a gyűjtőcsatorna renin termelése lokális és szisztémás hatásokért is felelős lehet. A gyűjtőcsatornában található (P)RR, epiteliális Na⁺ csatorna (Peti-Peterdi et al. 2002) és az angiotenzin II 1-es típusú receptorának (Prieto-Carrasquero et al. 2009) aktivációján keresztül a renin lokálisan a tubulusban, míg a keringésbe kerülve szisztémásan fejt ki hatását (Kurtz 2011). Ez utóbbit a mi eredményeink is alátámasztják, hiszen összhangban az irodalmi adatokkal, a CNI-vel kezelt csoportokban mi is emelkedett plazma renin aktivitást mértünk. Ugyanakkor a CNI-k az általunk használt dózisban 3 hét kezelés után sem befolyásolták az állatok vérnyomását.

5.3.2. Lokális hipoxia kialakulása CNI nefropátiában

A CNI-ok csökkentik a vese vérátáramlását, ami tovább fokozza a renin elválasztást, ezzel rontva a CNI nefropátia progresszióját. A hemodinamikai egyensúly felborulásához azonban számos más faktor is hozzájárul a CNI nefropátia kialakulása során, ahogy a Bevezetésben is említettük (ld. Bevezetés 1.2.1.3.). Az említett parakrin faktorok és jelátviteli útvonalak vizsgálatán túl csak egy tanulmány ismert, mely egy mikropunkciós technika segítségével kifejezetten az afferens és efferens arteriolák változásait írta le, közvetlenül CyA infúziót követően (Barros et al. 1987). Igaz, a mikropunkciós technika invazív mivolta aggályokat vethet fel a glomeruláris hemodinamika épségét illetően. Ezért mi egy minimálisan invazív *in vivo* képalkotó módszert alkalmaztunk, aminek köszönhetően intakt vesében tudtuk megjeleníteni az intrarenális renin tartalmat és a peritubuláris érhálózat változásait CNI nefropátiában. A peritubuláris kapillárisok érátmérői szignifikáns csökkenést mutattak három hetes CNI kezelést követően. A Hagen-Poiseuille törvényt alkalmazva kiszámolható, hogy az általunk mért érátmérő csökkenés az áramlás sebességét 50%-kal csökkenti a kapillárisokban (amennyiben minden csoportban egyforma artériás középnyomást és centrális vénás nyomást feltételezünk). A szűkült kapillárisok mellett azonban helyenként jelentősen tágult érszakaszokat is megfigyeltünk, mely szakaszokon az áramlás

turbulenssé vált. Ezen aránytalan érhálózat kialakulásában a VEGF kulcsszerepét feltételeztük. Ennek megfelelően áramlási citometriával szignifikáns emelkedést mértünk a VEGF pozitív principális sejtek arányában, a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben három hét CNI kezelést követően.

5.3.3. Kóros VEGF termelés CNI nefropátiában

A VEGF egy jelátviteli fehérje, mely a trombocita eredetű növekedési faktorok családjába tartozik. Epitél sejtek, miociták és makrofágok, a vesében elsősorban a glomeruláris epitél sejtek és a gyűjtőcsatorna principális sejtjei termelik. Feladata az embrionális vaszkulogenezis mellett a sérülések utáni érújdonképzés, érelzáródások utáni kollaterális képzés vagy a fejlődő izmok angiogenezise. Specifikus receptorain, a VEGF receptor 1-en és VEGF receptor 2-n kötődik az endotél sejtekhez (Ferrara et al. 1991). Receptoraihoz kötődve az endotél fenesztráltságát és az érpermeabilitást növeli, valamint fiziológias érújdonképződésben vesz részt (Folkman and Shing 1992). A tumor növekedés és hipoxia során fellépő patológiás érképződés is összefüggésbe hozható a VEGF-ral (Folkman 1995). A VEGF termelés és a CNI nefrotoxicitás illetve krónikus allograft nefropátia kapcsolatáról ellentmondásos az irodalom. Humán vese tumoros sejtvonalakon CyA kezelés növelte a VEGF mRNS expressziót és a tumor sejtek növekedését (Basu et al. 2008). Egy másik munkacsoport kimutatta, hogy a VEGF és a VEGF receptor 1 expresszió emelkedik krónikus allograft nefropátia során, patkány modellen (Malmström et al. 2008). Ugyanakkor léteznek vizsgálatok, melyek patkány modellen CyA és Tac kezelés hatására sem mértek változást a VEGF mRNS expresszióban (Lloberas et al. 2008). Mások CyA kezelésben részesülő vesetranszplantáltak biopsziás mintáin vizsgálták a tubuláris és intersticiális VEGF szintet, melyet emelkedettnek találtak. Vizsgálataikból azt a következtetést vonták le, hogy rövid távon a VEGF protektív a graftra nézve, de hosszú távon, korai intersticiális fibrózis indukciója miatt, rontja a grafttúlélést (Ozdemir et al. 2005). Kísérleteink során három hét CNI kezelést követően szignifikáns emelkedést mértünk a VEGF pozitív principális sejtek arányában a kontroll csoporthoz képest is. Kapcsolatot feltételezünk a CNI kezelést követően a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben tapasztalt, fokozódott renin és VEGF termelés között. Vélhetően a principális sejtekből a gyűjtőcsatorna lumenébe kiválasztódó renin hatására fokozódik a lokális angiotenzin II képződés, ami 1-es típusú

receptorán keresztül serkenti a principális sejtek VEGF termelését (Madsen et al. 2010), ezt támasztja alá az az eredményünk is, miszerint a renin inhibitor kezelés kivédte a VEGF fokozott termelődését.

5.3.4. Lokális hipoxia hatására kialakuló fibrózis

Lehetségesnek tartjuk, hogy a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben kóros mennyiségben túltermelő VEGF hozzájárul a gyűjtőcsatorna környezetében kialakuló patológiás érhalózathoz, ami tovább ronthatja a már egyébként is csökkent lokális vérátáramlást, tovább súlyosbítva a lokális hipoxiát. Feltételezzük, hogy ebben az oxigénszegény környezetben megemelkedik a hipoxia indukált faktor 1 α szintje és aktiválódik a transzformáló növekedési faktor β jelátviteli út, melyek hozzájárulhatnak a fibrózis kialakulásához (Basu et al. 2011; Lee et al. 2008). Vizsgálataink során szignifikánsan emelkedett kollagén I mRNS expressziót találtunk a Tac és CyA kezelt csoportokban a kontroll csoporthoz képest. Masson festett metszeteinken pedig fokozott kollagén festődést láttunk a CNI kezelt csoportokban. Vizsgálataink során arra lettünk figyelmesek, hogy az immunszuppresszánsok hatására megjelenő fibrotikus szigetek főként a gyűjtőcsatornák környezetében jelentkeztek. Ez a jelenség alátámasztja a lokálisan megemelkedett VEGF – lokális hipoxia – fibrózis tengely mechanizmusának jelentőségét.

A lokális hipoxia és fibrózis közötti kapcsolatban ezzel párhuzamosan maga a renin közvetlenül is szerepet játszhat. A CNI-k hatására csökken a vese vérátáramlása, azaz lokális hipoxia alakul ki, ahogy az a Bevezetőben is részletezésre került, fokozza a szukcinát termelést, mely saját receptorán keresztül serkenti a renin termelést a gyűjtőcsatornában. A megemelkedett mennyiségű renin pedig a gyűjtőcsatornában található (pro)renin receptoron keresztül fibrózis kialakulásához vezető jelátviteli útvonalakat aktivál. A renin-angiotenzin rendszer túlműködés közvetlen profibrotikus szerepére utalhat, hogy a kollagén I mRNS expressziójának fokozódását, illetve a szövettani metszeteiken látott kollagén felhalmozódást is mérsékelte az Aliskiren kezelés.

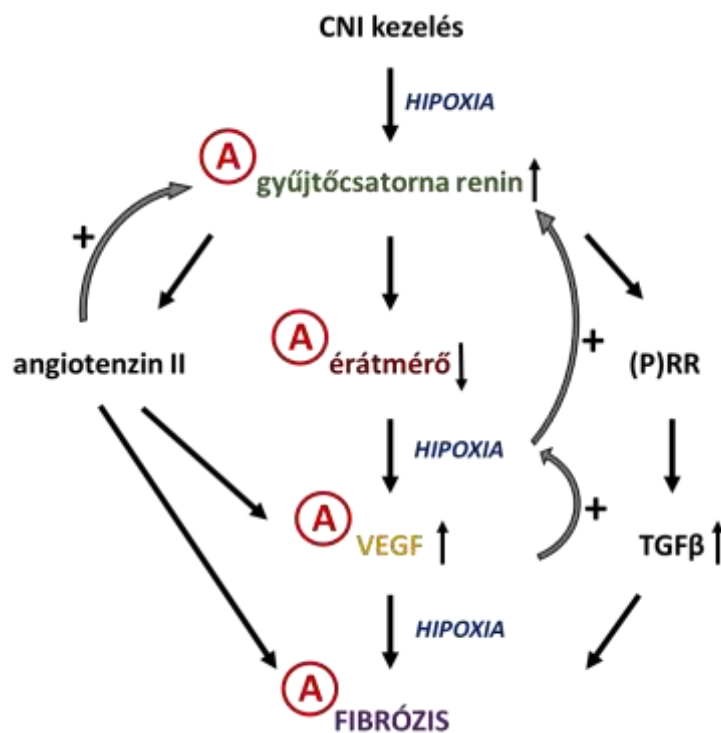
5.3.5. Direkt renin inhibitor jótékony hatása CNI nefropátiában

Korábbi vizsgálatokból már ismert, hogy az angiotenzin II ellentétesen szabályozza a renin termelést a gyűjtőcsatornában a JGA-hoz képest. Míg a negatív

visszacsatolásnak köszönhetően az angiotenzin II hatására a JGA-ban csökken a renin termelés (Schnermann and Briggs 2008), addig a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben fokozódik (Prieto-Carrasquero et al. 2004). Egy másik munkacsoport angiotenzin 1-es típusú receptorának gátlását követően csökkent renin termelődést írt le a gyűjtőcsatornában (Kang et al. 2008). A mi eredményeink is alátámasztják, hogy a gyűjtőcsatornában történő renin-angiotenzin rendszer gátlás jótékony hatású. A direkt renin gátló Aliskiren csökkentette a renin tartalmat a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben. Korábban leírták, hogy izotóppal jelzett Aliskiren a disztális tubulusokban és a gyűjtőcsatornában dúsul, illetve felvételre kerül a tubulus sejtekbe (Feldman et al. 2013), ezért lokálisan is képes lehet gátolni a renin termelődését a gyűjtőcsatornában. Így a renin enzimikus gátlása nem csak szisztémásan csökkenti az angiotenzin II szintjét, de a tubulusok lumenében is alacsonyabb angiotenzin II szintet eredményez, és így csökken a renin lokális szintézise a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben, mivel elmarad az angiotenzin II serkentő hatása a renin termelésre (Kang et al. 2008). Igen szegényes az irodalom az Aliskiren CNI nefropátiában betöltött jótékony hatását illetően. Az egyik idevonatkozó tanulmányban CyA-val kezelt hipertenzív egerek vér (tumor nekrozis faktor-alpha és interleukin-6) és vizelet vizsgálatát (vér karbamid-nitrogén, szérum kreatinin, karbamid és karbamidsav) végezték el (Saraswat et al. 2014), míg egy másikban Tac-szal indukált nefropátiában egész vese mintákon vizsgálták az Aliskiren jótékony hatását az oxidatív stresszre vonatkozóan (Al-Harbi et al. 2014). Egyik munkacsoport sem vizsgálta azonban a renin eredetét vagy adott magyarázatot a kialakuló vaszkuláris elváltozásokra. Munkánk során leírtuk, hogy a CNI nefropátia is azon kórképek közé tartozik, melyekben a gyűjtőcsatorna sejtek visszanyerik renin termelő képességüket, illetve tapasztalataink szerint az Aliskiren csökkentette a renin pozitív principális sejtek arányát a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben. Emellett azt is láttuk, hogy a CNI-k hatására megemelkedett szérum renin aktivitást csökkentette, illetve a csökkent vérátáramlást szintén javította az Aliskiren. Továbbá kimutattuk, hogy a CNI kezelés mellé adott Aliskiren csökkentette az előzőleg megemelkedett VEGF tartalmú principális sejtek arányát, és fiziológiásabb kapilláris hálózat kialakulását eredményezte. Mivel ismert, hogy az angiotenzin II 1-es típusú receptorán keresztül növeli a VEGF termelést, különös hangsúllyal a gyűjtőcsatornában (Gruden et al. 1999; Madsen et al. 2010),

feltételezzük, hogy a mi modellünkben az Aliskiren elsősorban ezt a jelátviteli útvonalat gátolhatja.

Az Aliskirennel kezelt állatokban kimutatható lényegesen jobb vesefunkció és csökkent kollagén I expresszió tovább erősíti a renin – angiotenzin II – VEGF tengely jelentőségét CNI nefropátia kialakulásában. Emellett feltételezzük, hogy mivel az Aliskiren kezelésnek köszönhetően csökken a renin tartalom a gyűjtőcsatornában, elmarad a (pro)renin receptor és ezen keresztül a profibrotikus útvonalak aktiválása, mely jótékony hatást a fibrózis kialakulására irányuló vizsgálataink is alátámasztanak (23. ábra).



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

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy igazoltuk a direkt renin inhibitor jótékony hatását CNI nefropátiában. Továbbá leírtuk a gyűjtőcsatornában termelődő renin kulcsfontosságú szerepét ebben a betegség modellben. Feltételezésünk szerint a nagy mennyiségben termelődő renin hozzájárulhat a vese vérátáramlásának csökkenéséhez. A gyűjtőcsatorna erre jelentős VEGF termeléssel reagál, következményes kóros érhálózat kialakulásával, ami tovább rontja a lokális hipoxiát és így fokozza a gyűjtőcsatornák körüli fibrózis kialakulását. Az Aliskiren csökkenteni tudta ezen hatásokat, ami egy új terápiás célpont lehetőségét veti fel a CNI nefropátia megelőzésében.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

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

1. leírtuk a vese iszkémia/reperfúziós károsodásának akut modelljében a renin válasz meglétét a JGA mellett a gyűjtőcsatornában is;
2. a hímek nem csak fiziológiás állapotban rendelkeznek nagyobb renin tartalékkal a gyűjtőcsatornában a nőstényekhez képest, de az iszkémia/reperfúziós károsodás hatására hímekben több renin termelődik a gyűjtőcsatornában;
3. hímekhez képest a nőstények lényegesen kiegyensúlyozottabb peritubuláris érátmérőkkel rendelkeznek a vese kéregben, mely a veseszövet egyenletesebb vérellátását biztosíthatja;
4. az eddig ismert patofiziológiás állapotokon túl, CNI kezelés hatására is fokozódik a renin termelés a gyűjtőcsatornában;
5. a CNI-ok vesekárosító hatása összefüggésbe hozható a gyűjtőcsatornában termelődő reninnel, amit alátámaszt a direkt renin inhibitor jótékony hatása CNI nefropátia állatmodellünkben: feltételezhetően a krónikus allograft nefropátia irányába ható folyamatokat gátolja az Aliskiren;
6. a gyűjtőcsatorna fokozott renin termelése és ezzel párhuzamosan csökkent peritubuláris kapilláris érátmérők következtében feltételezhetően csökken a vese vérátáramlásra és lokális hipoxia alakul ki, melyre a principális sejtek kóros VEGF expresszióval válaszolhatnak, ez aránytalan érnövekedéshez vezethet, mely tovább fokozza az intersticiális fibrózis kialakulását.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A transzplantált vese diszfunkciójához számos folyamat vezet, melyek közül PhD munkám során a transzplantációval mindig együtt járó iszkémia/reperfúziós károsodást, illetve a gyakran alkalmazott calcineurin inhibitorok (CNI) okozta nefrotoxicitást vizsgáltuk. Mivel a közelmúltban bizonyos vesekárosodással járó állapotokban igazolódott a gyűjtőcsatorna renin termelésének patofiziológiás szerepe, ezért célunk volt a vese iszkémia/reperfúziós károsodás akut modelljén vizsgálni a renin termelést a gyűjtőcsatorna principális sejtjeiben, különös tekintettel a nemi különbségekre. Emellett CNI nefropátia kialakulása során is vizsgáltuk a renin termelést a gyűjtőcsatornában, illetve azt, hogy milyen mechanizmusok aktiválásával vehet részt a lokálisan termelődő renin a graft károsodás kialakulásában.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a vese iszkémia/reperfúziós károsodásának akut modelljében megfigyelhető renin termelés a gyűjtőcsatornában. Hímekben a renin termelés nem csak fiziológiás állapotban, de az iszkémia/reperfúziós károsodást követően is kifejezettebb, mint nőstényekben. A renin-angiotenzin rendszer eltérő aktivitása a két nemből, magyarázhatja a hímekre jellemzőbb ingadozó értónust, ezzel szemben a nőstények stabilabb érátmérőkkel rendelkeznek a vese kéregben. E különbség jelentőségét alátámasztja a szövettani kiértékelés során látott súlyosabb reperfúziós károsodás hímekben. Ezek alapján a renin gátlása terápiás lehetőségként merülhet fel az iszkémia/reperfúziós vesekárosodás mind akut, mind krónikus következményeinek csökkentésében.

Tanulmányunk során leírtuk, hogy a CNI vesekárosító hatása összefüggésbe hozható a gyűjtőcsatornában termelődő reninnel, mely lokalizáció ez idáig nem volt ismert CNI nefrotoxicitás kapcsán. A gyűjtőcsatornabeli fokozott renin termeléssel párhuzamosan csökkentek a peritubuláris kapillárisok érátmérői és a vérátáramlás, így következményes hipoxia és VEGF termelés jött létre, mely hatások eredőjeként aránytalan érnövekedést és intersticiális fibrózist tapasztaltunk. Direkt renin gátlás csökkentette a káros hatásokkal járó VEGF termelődést, illetve a következményes kóros érújdonképződést és fibrózist.

8. SUMMARY

Several causes can lead to the dysfunction of the transplanted kidney. In my PhD thesis I investigated the ischemia/reperfusion injury, which is always associated with transplantation, and the nephrotoxicity caused by the commonly used calcineurin inhibitors (CNI). In certain states of kidney damage, the pathophysiological role of renin synthesis in the collecting duct was recently described, therefore our aim was to study the renin content in the principal cells of collecting duct regarding to gender differences in the acute model of ischemia/reperfusion kidney injury. We also investigated the renin synthesis in the collecting duct in the development of CNI nephropathy, furthermore we studied how the locally produced renin could contribute to graft damage by the activation of pathophysiological mechanisms.

We observed renin synthesis in the acute model of renal ischemia/reperfusion injury in the collecting duct. Furthermore, we demonstrated that the renin response is more pronounced in males, not only in physiological states, but also during renal ischemia/reperfusion injury. The different activation of renin-angiotensin system during ischemia/reperfusion injury can result in a vasoregulation with larger amplitudes in males. While females show more stable capillary diameters in the kidney cortex. This results in a more severe reperfusion injury, as we demonstrated with the histological analysis. We assume, that the inhibition of renin might serve as a therapeutic target for the mitigation of not only chronic but also acute renal ischemia/reperfusion injury.

We also demonstrated that treatment with CNIs induce renin production in the collecting duct, which may contribute to the development of CNI nephropathy. This additional localization of renin production was until now not described in this disease model. Parallel with the increased renin production in the collecting duct, the diameter of peritubular capillaries and renal blood flow decreased. Due to reduced blood supply, collecting ducts respond with significant VEGF production resulting in disproportional vessel growth, further worsening the local hypoxia, and striped fibrosis. Aliskiren was able to prevent this pathophysiological remodelling, suggesting that, as a new therapeutic strategy, it may be used for the prevention of CNI nephropathy.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Advani A, Kelly DJ, Cox AJ, White KE, Advani SL, Thai K, Connelly KA, Yuen D, Trogadis J, Herzenberg AM, Kuliszewski MA, Leong-Poi H, Gilbert RE (2009) The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H⁺-ATPase in the kidney. *Hypertension* 54:261-269

Al-Harbi NO, Imam F, Al-Harbi MM, Iqbal M, Nadeem A, Al-Shahrah OA, Korashy HM, Al-Hosaini KA, Ahmed M, Bahashwar S (2014) Treatment with aliskiren ameliorates tacrolimus-induced nephrotoxicity in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*

Altunoluk B, Soylemez H, Oguz F, Turkmen E, Fadillioglu E (2006) An Angiotensin-converting enzyme inhibitor, zofenopril, prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Ann Clin Lab Sci* 36:326-332

Andoh TF, Bennett WM (1998) Chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7:265-270

Armenti VT, Ahlswede KM, Ahlswede BA, Jarrell BE, Moritz MJ, Burke JF (1994) National transplantation Pregnancy Registry--outcomes of 154 pregnancies in cyclosporine-treated female kidney transplant recipients. *Transplantation* 57:502-506

Banki NF, Ver A, Wagner LJ, Vannay A, Degrell P, Prokai A, Gellai R, Lenart L, Szakal DN, Kenesei E, Rosta K, Reusz G, Szabo AJ, Tulassay T, Baylis C, Fekete A (2012) Aldosterone antagonists in monotherapy are protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *PLoS One* 7:e39938

Barrilli A, Molinas S, Petrini G, Menacho M, Elias MM (2004) Losartan reverses fibrotic changes in cortical renal tissue induced by ischemia or ischemia-reperfusion without changes in renal function. *Mol Cell Biochem* 260:161-170

Barros EJ, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N (1987) Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 32:19-25

Basu A, Contreras AG, Datta D, Flynn E, Zeng L, Cohen HT, Briscoe DM, Pal S (2008) Overexpression of vascular endothelial growth factor and the development of post-transplantation cancer. *Cancer Res* 68:5689-5698

- Basu RK, Hubchak S, Hayashida T, Runyan CE, Schumacker PT, Schnaper HW (2011) Interdependence of HIF-1 α and TGF- β /Smad3 signaling in normoxic and hypoxic renal epithelial cell collagen expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 300:F898-905
- Bell JR, Bernasochi GB, Varma U, Raaijmakers AJ, Delbridge LM (2013) Sex and sex hormones in cardiac stress--mechanistic insights. *J Steroid Biochem Mol Biol* 137:124-135
- Bennett WM, DeMattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM (1996) Chronic cyclosporine nephropathy in renal transplantation. *Transplant Proc* 28:2100-2103
- Bernat JL, D'Alessandro AM, Port FK, Bleck TP, Heard SO, Medina J, Rosenbaum SH, Devita MA, Gaston RS, Merion RM, Barr ML, Marks WH, Nathan H, O'connor K, Rudow DL, Leichtman AB, Schwab P, Ascher NL, Metzger RA, Mc Bride V, Graham W, Wagner D, Warren J, Delmonico FL (2006) Report of a National Conference on Donation after cardiac death. *Am J Transplant* 6:281-291
- Borel JF (2002) History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development. *Wien Klin Wochenschr* 114:433-437
- Cecka JM, Terasaki PI (1995) The UNOS scientific renal transplant registry. United Network for Organ Sharing. *Clin Transpl*:1-18
- Chang CT, Hung CC, Tian YC, Yang CW, Wu MS (2007) Cyclosporin reduces paracellin-1 expression and magnesium transport in thick ascending limb cells. *Nephrol Dial Transplant* 22:1033-1040
- Chapman JR, O'Connell PJ, Nankivell BJ (2005) Chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 16:3015-3026
- Chen YF, Naftilan AJ, Oparil S (1992) Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. *Hypertension* 19:456-463
- Collins AJ, Foley RN, Chavers B, Gilbertson D, Herzog C, Johansen K, Kasiske B, Kutner N, Liu J, St Peter W, Guo H, Gustafson S, Heubner B, Lamb K, Li S, Peng Y, Qiu Y, Roberts T, Skeans M, Snyder J, Solid C, Thompson B, Wang C, Weinhandl E, Zaun D, Arko C, Chen SC, Daniels F, Ebben J, Frazier E, Hanzlik C, Johnson R, Sheets D, Wang X, Forrest B, Constantini E, Everson S, Eggers P, Agodoa L (2012) 'United States Renal Data System 2011 Annual Data Report: Atlas of chronic kidney disease & end-stage renal disease in the United States. *Am J Kidney Dis* 59:A7, e1-420

- Cordero P, Fisher ND, Moore TJ, Gleason R, Williams GH, Hollenberg NK (1991) Renal and endocrine responses to a renin inhibitor, enalkiren, in normal humans. *Hypertension* 17:510-516
- Csohány R, Prókai A, Kosik A, Szabó JA (2013) [The cortical collecting duct plays a pivotal role in the kidney's local renin-angiotensin system]. *Orv Hetil* 154:643-649
- Degrell P, Cseh J, Mohás M, Molnár GA, Pajor L, Chatham JC, Fülöp N, Wittmann I (2009) Evidence of O-linked N-acetylglucosamine in diabetic nephropathy. *Life Sci* 84:389-393
- Denton MD, Magee CC, Sayegh MH (1999) Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 353:1083-1091
- Deppe CE, Heering PJ, Tinel H, Kinne-Saffran E, Grabensee B, Kinne RK (1997) Effect of cyclosporine A on Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter, and H⁺/K⁺-ATPase in MDCK cells and two subtypes, C7 and C11. *Exp Nephrol* 5:471-480
- Dunn KW, Sandoval RM, Molitoris BA (2003) Intravital imaging of the kidney using multiparameter multiphoton microscopy. *Nephron Exp Nephrol* 94:e7-11
- Efrati S, Berman S, Hamad RA, Siman-Tov Y, Ilgiyaev E, Maslyakov I, Weissgarten J (2012) Effect of captopril treatment on recuperation from ischemia/reperfusion-induced acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 27:136-145
- Eidelman BH, Abu-Elmagd K, Wilson J, Fung JJ, Alessiani M, Jain A, Takaya S, Todo SN, Tzakis A, Van Thiel D (1991) Neurologic complications of FK 506. *Transplant Proc* 23:3175-3178
- 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 Physiol Renal Physiol* 291:F806-811
- 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. *J Physiol* 555:471-480
- Feldman DL, Jin L, Xuan H, Persohn E, Zhou W, Schuetz H, Park JK, Muller DN, Luft FC (2013) The direct renin inhibitor aliskiren localizes and persists in rat kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* 305:F1593-1602
- Fellström BC, Larsson E (1993) Pathogenesis and treatment perspectives of chronic graft rejection (CVR). *Immunol Rev* 134:83-98

- Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW (1991) The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem* 47:211-218
- Fisher ND, Allan D, Kifor I, Gaboury CL, Williams GH, Moore TJ, Hollenberg NK (1994) Responses to converting enzyme and renin inhibition. Role of angiotensin II in humans. *Hypertension* 23:44-51
- Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1:27-31
- Folkman J, Shing Y (1992) Angiogenesis. *J Biol Chem* 267:10931-10934
- Fouad AA, Qureshi HA, Al-Sultan AI, Yacoubi MT, Al-Melhim WN (2010) Nephroprotective effect of telmisartan in rats with ischemia/reperfusion renal injury. *Pharmacology* 85:158-167
- Geibel J, Giebisch G, Boron WF (1990) Angiotensin II stimulates both Na(+)-H+ exchange and Na+/HCO3- cotransport in the rabbit proximal tubule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7917-7920
- Gomez RA, Pupilli C, Everett AD (1991) Molecular and cellular aspects of renin during kidney ontogeny. *Pediatr Nephrol* 5:80-87
- Gooch JL, Guler RL, Barnes JL, Toro JJ (2006) Loss of calcineurin Aalpha results in altered trafficking of AQP2 and in nephrogenic diabetes insipidus. *J Cell Sci* 119:2468-2476
- Gruden G, Thomas S, Burt D, Zhou W, Chusney G, Gnudi L, Viberti G (1999) Interaction of angiotensin II and mechanical stretch on vascular endothelial growth factor production by human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 10:730-737
- Gumber MR, Jain SH, Kute VB, Shah PR, Patel HV, Vanikar AV, Modi PR, Trivedi HR (2013) Outcome of second kidney transplant: a single center experience. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 24:696-701
- Habibey R, Ajami M, Hesami A, Pazoki-Toroudi H (2008) The mechanism of preventive effect of captopril on renal ischemia reperfusion injury is independent of ATP dependent potassium channels. *Iran Biomed J* 12:241-245
- Hammad FT, Al-Salam S, Lubbad L (2013) Does aliskiren protect the kidney following ischemia reperfusion injury? *Physiol Res* 62:681-690

- 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
- Hebert SC (2004) Physiology: orphan detectors of metabolism. *Nature* 429:143-145
- Heemann U, Szabo A, Hamar P, Müller V, Witzke O, Lutz J, Philipp T (2000) Lipopolysaccharide pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury : possible connection to an interleukin-6-dependent pathway. *Am J Pathol* 156:287-293
- Heering P, Grabensee B (1991) Influence of ciclosporin A on renal tubular function after kidney transplantation. *Nephron* 59:66-70
- Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M (1999) Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 397:530-534
- Hollenberg NK (2010) Direct renin inhibition and the kidney. *Nat Rev Nephrol* 6:49-55
- Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Fürstenberg A, Yang CL, Roeschel T, Paliege A, Howie AJ, Conley J, Bachmann S, Unwin RJ, Ellison DH (2011) The calcineurin inhibitor tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension. *Nat Med* 17:1304-1309
- 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. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38:215-221
- Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, Nishiyama A, Itoh H (2008) Involvement of receptor-bound prorenin in development of nephropathy in diabetic db/db mice. *J Am Soc Hypertens* 2:332-340
- Jensen CE, Sørensen P, Petersen KD (2014) In Denmark kidney transplantation is more cost-effective than dialysis. *Dan Med J* 61:A4796
- Julien J, Farge D, Kreft-Jais C, Guyene TT, Plouin PF, Houssin D, Carpentier A, Corvol P (1993) Cyclosporine-induced stimulation of the renin-angiotensin system after liver and heart transplantation. *Transplantation* 56:885-891
- Kainz A, Harabacz I, Cowlrick IS, Gadgil SD, Hagiwara D (2000) Review of the course and outcome of 100 pregnancies in 84 women treated with tacrolimus. *Transplantation* 70:1718-1721

- Kaissling B, Lehir M, Kriz W (2013) Renal epithelial injury and fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 1832:931-939
- Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ (2012) Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 298:229-317
- Kaneshiro Y, Ichihara A, Sakoda M, Takemitsu T, Nabi AH, Uddin MN, Nakagawa T, Nishiyama A, Suzuki F, Inagami T, Itoh H (2007) Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats. *J Am Soc Nephrol* 18:1789-1795
- Kang JJ, Toma I, Sipos A, McCulloch F, Peti-Peterdi J (2006) Quantitative imaging of basic functions in renal (patho)physiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F495-502
- 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. *Hypertension* 51:1597-1604
- Kershner RP, Fitzsimmons WE (1996) Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation. *Transplantation* 62:920-926
- Kher A, Meldrum KK, Wang M, Tsai BM, Pitcher JM, Meldrum DR (2005) Cellular and molecular mechanisms of sex differences in renal ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 67:594-603
- Kim SJ, Schaubel DE, Jeffery JR, Fenton SS (2004) Centre-specific variation in renal transplant outcomes in Canada. *Nephrol Dial Transplant* 19:1856-1861
- Komukai K, Mochizuki S, Yoshimura M (2010) Gender and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Fundam Clin Pharmacol* 24:687-698
- Kosieradzki M, Rowiński W (2008) Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc* 40:3279-3288
- Kreis HA, Ponticelli C (2001) Causes of late renal allograft loss: chronic allograft dysfunction, death, and other factors. *Transplantation* 71:SS5-9
- Kurtz A (2011) Renin release: sites, mechanisms, and control. *Annu Rev Physiol* 73:377-399
- Laskow DA, Vincenti F, Neylan JF, Mendez R, Matas AJ (1996) An open-label, concentration-ranging trial of FK506 in primary kidney transplantation: a report of the United States Multicenter FK506 Kidney Transplant Group. *Transplantation* 62:900-905

- Lee AP, Abramowicz D (2015) Is the Kidney Donor Risk Index a step forward in the assessment of deceased donor kidney quality? *Nephrol Dial Transplant* 30:1285-1290
- Lee DB (1997) Cyclosporine and the renin-angiotensin axis. *Kidney Int* 52:248-260
- Lee S, Kim DJ, Park MG, Park SK, Kim JS, Hyun SJ, Oh JE, Nam ES, Joo SH (2008) Expression of transforming growth factor-beta1 and hypoxia-inducible factor-1alpha in renal transplantation. *Transplant Proc* 40:2147-2148
- Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt KU, Nahas ME, Jaber BL, Jadoul M, Levin A, Powe NR, Rossert J, Wheeler DC, Lameire N, Eknoyan G (2007) Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int* 72:247-259
- Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G, Foundation NK (2003) National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 139:137-147
- Liptak P, Ivanyi B (2006) Primer: Histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts. *Nat Clin Pract Nephrol* 2:398-404; quiz following 404
- Lloberas N, Torras J, Alperovich G, Cruzado JM, Giménez-Bonafé P, Herrero-Fresneda I, Franquesa M, Rama I, Grinyó JM (2008) Different renal toxicity profiles in the association of cyclosporine and tacrolimus with sirolimus in rats. *Nephrol Dial Transplant* 23:3111-3119
- Lukitsch I, Kehr J, Chaykovska L, Wallukat G, Nieminen-Kelhä M, Batuman V, Dragun D, Gollasch M (2012) Renal ischemia and transplantation predispose to vascular constriction mediated by angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies. *Transplantation* 94:8-13
- Lutz J, Risch K, Liu S, Antus B, Schmaderer C, Roos M, Ouyang N, Lehmann M, Heemann U (2006) Angiotensin type 1 and type 2 receptor blockade in chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 70:1080-1088
- Mackins CJ, Kano S, Seyedi N, Schäfer U, Reid AC, Machida T, Silver RB, Levi R (2006) Cardiac mast cell-derived renin promotes local angiotensin formation, norepinephrine release, and arrhythmias in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 116:1063-1070

- 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
- Malmström NK, Kallio EA, Rintala JM, Nykänen AI, Räisänen-Sokolowski AK, Paavonen T, Lemström KB, Koskinen PK (2008) Vascular endothelial growth factor in chronic rat allograft nephropathy. *Transpl Immunol* 19:136-144
- Maric-Bilkan C, Manigrasso MB (2012) Sex differences in hypertension: contribution of the renin-angiotensin system. *Gend Med* 9:287-291
- Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Leavey SF, Hanson JA, Leichtman AB, Magee JC, Cibrik DM, Kaplan B (2001) Gender differences in the risk for chronic renal allograft failure. *Transplantation* 71:429-432
- Molinas SM, Cortés-González C, González-Bobadilla Y, Monasterolo LA, Cruz C, Elías MM, Bobadilla NA, Trumper L (2009) Effects of losartan pretreatment in an experimental model of ischemic acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol* 112:e10-19
- Molitoris BA (2004) Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 66:871-883
- Morozumi K, Takeda A, Uchida K, Mihatsch MJ (2004) Cyclosporine nephrotoxicity: how does it affect renal allograft function and transplant morphology? *Transplant Proc* 36:251S-256S
- 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
- Müller V, Szabó A, Viklicky O, Gaul I, Pörtl S, Philipp T, Heemann UW (1999) Sex hormones and gender-related differences: their influence on chronic renal allograft rejection. *Kidney Int* 55:2011-2020
- Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perlroth M (1984) Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med* 311:699-705
- Naderi GH, Mehraban D, Kazemeyni SM, Darvishi M, Latif AH (2009) Living or deceased donor kidney transplantation: a comparison of results and survival rates among Iranian patients. *Transplant Proc* 41:2772-2774
- Neugarten J, Kasiske B, Silbiger SR, Nyengaard JR (2002) Effects of sex on renal structure. *Nephron* 90:139-144

- Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzhir L, Giller T, Sraer JD (2002) Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 109:1417-1427
- 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. *J Am Soc Nephrol* 7:331-337
- Ozdemir BH, Ozdemir FN, Haberal N, Emiroglu R, Demirhan B, Haberal M (2005) Vascular endothelial growth factor expression and cyclosporine toxicity in renal allograft rejection. *Am J Transplant* 5:766-774
- Paul LC (1999) Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney Int* 56:783-793
- Peng TI, Jou MJ (2010) Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann N Y Acad Sci* 1201:183-188
- Perner F, Petrányi G (2013) Szervátültetés. Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt.
- Peti-Peterdi J (2010) High glucose and renin release: the role of succinate and GPR91. *Kidney Int* 78:1214-1217
- Peti-Peterdi J, Burford JL, Hackl MJ (2012) The first decade of using multiphoton microscopy for high-power kidney imaging. *Am J Physiol Renal Physiol* 302:F227-233
- Peti-Peterdi J, Fintha A, Fuson AL, Tousson A, Chow RH (2004) Real-time imaging of renin release in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F329-335
- Peti-Peterdi J, Gevorgyan H, Lam L, Riquier-Brisson A (2013) Metabolic control of renin secretion. *Pflugers Arch* 465:53-58
- Peti-Peterdi J, Toma I, Sipos A, Vargas SL (2009) Multiphoton imaging of renal regulatory mechanisms. *Physiology (Bethesda)* 24:88-96
- Peti-Peterdi J, Warnock DG, Bell PD (2002) Angiotensin II directly stimulates ENaC activity in the cortical collecting duct via AT(1) receptors. *J Am Soc Nephrol* 13:1131-1135
- Ponticelli C, Villa M, Cesana B, Montagnino G, Tarantino A (2002) Risk factors for late kidney allograft failure. *Kidney Int* 62:1848-1854
- Pratt RE, Carleton JE, Richie JP, Heusser C, Dzau VJ (1987) Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7837-7840
- Prieto-Carrasquero MC, Botros FT, Kobori H, Navar LG (2009) Collecting Duct Renin: A major player in Angiotensin II-dependent Hypertension. *J Am Soc Hypertens* 3:96-104

- Prieto-Carrasquero MC, Botros FT, Pagan J, Kobori H, Seth DM, Casarini DE, Navar LG (2008) Collecting duct renin is upregulated in both kidneys of 2-kidney, 1-clip goldblatt hypertensive rats. *Hypertension* 51:1590-1596
- 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. *Hypertension* 44:223-229
- 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 Physiol Renal Physiol* 289:F632-637
- Pritchard DI (2005) Sourcing a chemical succession for cyclosporin from parasites and human pathogens. *Drug Discov Today* 10:688-691
- Prókai A, Fekete A, Bánki NF, Müller V, Vér A, Degrell P, Rusai K, Wagner L, Vannay A, Rosta M, Heemann U, Langer RM, Tulassay T, Reusz G, Szabó AJ (2011) Renoprotective effect of erythropoietin in rats subjected to ischemia/reperfusion injury: gender differences. *Surgery* 150:39-47
- Prommer E (2012) Calcineurin-inhibitor pain syndrome. *Clin J Pain* 28:556-559
- Quiroga I, McShane P, Koo DD, Gray D, Friend PJ, Fuggle S, Darby C (2006) Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 21:1689-1696
- Rabbat CG, Thorpe KE, Russell JD, Churchill DN (2000) Comparison of mortality risk for dialysis patients and cadaveric first renal transplant recipients in Ontario, Canada. *J Am Soc Nephrol* 11:917-922
- Rahuel J, Rasetti V, Maibaum J, Rüeger H, Göschke R, Cohen NC, Stutz S, Cumin F, Fuhrer W, Wood JM, Grütter MG (2000) Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin. *Chem Biol* 7:493-504
- Randhawa PS, Shapiro R, Jordan ML, Starzl TE, Demetris AJ (1993) The histopathological changes associated with allograft rejection and drug toxicity in renal transplant recipients maintained on FK506. Clinical significance and comparison with cyclosporine. *Am J Surg Pathol* 17:60-68
- Reddi V, Zaglul A, Pentz ES, Gomez RA (1998) Renin-expressing cells are associated with branching of the developing kidney vasculature. *J Am Soc Nephrol* 9:63-71

- Reid IA, Morris BJ, Ganong WF (1978) The renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* 40:377-410
- Remuzzi G, Cattaneo D, Perico N (2008) The aggravating mechanisms of aldosterone on kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 19:1459-1462
- Rinschen MM, Klokkers J, Pavenstädt H, Neugebauer U, Schlatter E, Edemir B (2011) Different effects of CsA and FK506 on aquaporin-2 abundance in rat primary cultured collecting duct cells. *Pflugers Arch* 462:611-622
- 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. *Hypertension* 34:1265-1274
- Rosano GM, Panina G (1999) Oestrogens and the heart. *Therapie* 54:381-385
- 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 Pharmacol* 79:1173-1181
- Rüster C, Wolf G (2011) Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 22:1189-1199
- Ryffel B, Weber E, Mihatsch MJ (1994) Nephrotoxicity of immunosuppressants in rats: comparison of macrolides with cyclosporin. *Exp Nephrol* 2:324-333
- Sakoda M, Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Nakazato Y, Nabi AH, Nakagawa T, Suzuki F, Inagami T, Itoh H (2007) (Pro)renin receptor-mediated activation of mitogen-activated protein kinases in human vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 30:1139-1146
- Saran R, Li Y, Robinson B, Ayanian J, Balkrishnan R, Bragg-Gresham J, Chen JT, Cope E, Gipson D, He K, Herman W, Heung M, Hirth RA, Jacobsen SS, Kalantar-Zadeh K, Kovesdy CP, Leichtman AB, Lu Y, Molnar MZ, Morgenstern H, Nallamothu B, O'Hare AM, Pisoni R, Plattner B, Port FK, Rao P, Rhee CM, Schaubel DE, Selewski DT, Shahinian V, Sim JJ, Song P, Streja E, Kurella Tamura M, Tentori F, Eggers PW, Agodoa LY, Abbott KC (2015) US Renal Data System 2014 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis* 66:Svii, S1-305

- Saraswat MS, Addepalli V, Jain M, Pawar VD, Patel RB (2014) Renoprotective activity of aliskiren, a renin inhibitor in cyclosporine A induced hypertensive nephropathy in dTG mice. *Pharmacol Rep* 66:62-67
- Schieppati A, Remuzzi G (2005) Chronic renal diseases as a public health problem: epidemiology, social, and economic implications. *Kidney Int Suppl*:S7-S10
- Schmerbach K, Pfab T, Zhao Y, Culman J, Mueller S, Villringer A, Muller DN, Hocher B, Unger T, Thoene-Reineke C (2010) Effects of aliskiren on stroke in rats expressing human renin and angiotensinogen genes. *PLoS One* 5:e15052
- Schnermann J, Briggs JP (2008) *The Kidney Physiology and Pathophysiology*. Burlington-San Diego-London, Elsevier Academic Press
- Schreiber SL, Crabtree GR (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 13:136-142
- Schwartz RB, Bravo SM, Klufas RA, Hsu L, Barnes PD, Robson CD, Antin JH (1995) Cyclosporine neurotoxicity and its relationship to hypertensive encephalopathy: CT and MR findings in 16 cases. *AJR Am J Roentgenol* 165:627-631
- Serur D, Saal S, Wang J, Sullivan J, Bologna R, Hartono C, Dadhania D, Lee J, Gerber LM, Goldstein M, Kapur S, Stubenbord W, Belenkaya R, Marin M, Seshan S, Ni Q, Levine D, Parker T, Stenzel K, Smith B, Riggio R, Cheigh J (2011) Deceased-donor kidney transplantation: improvement in long-term survival. *Nephrol Dial Transplant* 26:317-324
- Shi X, Yan C, Nadtochiy SM, Abe J, Brookes PS, Berk BC (2011) p90 ribosomal S6 kinase regulates activity of the renin-angiotensin system: a pathogenic mechanism for ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 51:272-275
- Siddiqi L, Joles JA, Grassi G, Blankestijn PJ (2009) Is kidney ischemia the central mechanism in parallel activation of the renin and sympathetic system? *J Hypertens* 27:1341-1349
- Siedlecki A, Irish W, Brennan DC (2011) Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant* 11:2279-2296
- Sipos A, Toma I, Kang JJ, Rosivall L, Peti-Peterdi J (2007) Advances in renal (patho)physiology using multiphoton microscopy. *Kidney Int* 72:1188-1191
- Stepkowski SM (2000) Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Rev Mol Med* 2:1-23

- Sullivan JC (2008) Sex and the renin-angiotensin system: inequality between the sexes in response to RAS stimulation and inhibition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R1220-1226
- Sun CY, Cherng WJ, Jian HZ, Hsu HH, Wu IW, Hsu HJ, Wu MS (2012) Aliskiren reduced renal fibrosis in mice with chronic ischemic kidney injury--beyond the direct renin inhibition. *Hypertens Res* 35:304-311
- Szabo A, Heemann U (1998) Ischemia reperfusion injury and chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 30:4281-4284
- Szabó A, Müller V (2002) [Causes of late renal transplant dysfunction]. *Orv Hetil* 143:2811-2819
- Szelestei T, Rempert Á, Gergely L (2011) A vesetranszplantáció aktuális kérdései. *Hypertonia és Nephrologia* 15:31-34
- Terasaki PI, Ozawa M (2004) Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 4:438-443
- Thomas DW, Newcombe RG, Osborne GR (2000) Risk factors in the development of cyclosporine-induced gingival overgrowth. *Transplantation* 69:522-526
- Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR (1996) Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression. *Nature* 383:837-840
- Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Takamatsu I, Tatematsu S, Ozawa Y, Wakino S, Saruta T (2002) Differential regulation of elevated renal angiotensin II in chronic renal ischemia. *Hypertension* 40:34-40
- 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. *J Clin Invest* 118:2526-2534
- Tricot L, Lebbé C, Pillebout E, Martinez F, Legendre C, Thervet E (2005) Tacrolimus-induced alopecia in female kidney-pancreas transplant recipients. *Transplantation* 80:1546-1549
- Vats AN, Donaldson L, Fine RN, Chavers BM (2000) Pretransplant dialysis status and outcome of renal transplantation in North American children: a NAPRTCS Study. North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Transplantation* 69:1414-1419

- Wang Z, Liu Y, Han Y, Guan W, Kou X, Fu J, Yang D, Ren H, He D, Zhou L, Zeng C (2013) Protective effects of aliskiren on ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. *Eur J Pharmacol* 718:160-166
- Weber P, Held E, Uhlich E, Eigler JO (1975) Reaction constants of renin in juxtaglomerular apparatus and plasma renin activity after renal ischemia and hemorrhage. *Kidney Int* 7:331-341
- Weight SC, Furness PN, Nicholson ML (1999) Biphasic role for nitric oxide in experimental renal warm ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 86:1039-1046
- Weir MR, Fink JC (1999) Risk for posttransplant Diabetes mellitus with current immunosuppressive medications. *Am J Kidney Dis* 34:1-13
- Westermann D, Riad A, Lettau O, Roks A, Savvatis K, Becher PM, Escher F, Jan Danser AH, Schultheiss HP, Tschöpe C (2008) Renin inhibition improves cardiac function and remodeling after myocardial infarction independent of blood pressure. *Hypertension* 52:1068-1075
- Wolf G (2006) Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int* 70:1914-1919
- Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK (1999) Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 341:1725-1730
- Wong W, Venetz JP, Tolckoff-Rubin N, Pascual M (2005) 2005 immunosuppressive strategies in kidney transplantation: which role for the calcineurin inhibitors? *Transplantation* 80:289-296
- Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214:199-210
- Yang CW, Faulkner GR, Wahba IM, Christianson TA, Bagby GC, Jin DC, Abboud HE, Andoh TF, Bennett WM (2002) Expression of apoptosis-related genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity in mice. *Am J Transplant* 2:391-399
- Yosypiv IV (2011) Renin-angiotensin system in ureteric bud branching morphogenesis: insights into the mechanisms. *Pediatr Nephrol* 26:1499-1512
- Yosypiv IV (2009) Renin-angiotensin system-growth factor cross-talk: a novel mechanism for ureteric bud morphogenesis. *Pediatr Nephrol* 24:1113-1120

Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Andoh T, Bennett WM, Couser WG, Alpers CE (1995) Cyclosporine A induced arteriolopathy in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 48:431-438

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

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

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

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

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

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

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

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

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

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

11. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Dr. Szabó J. Attila Prof.

Dr. Tulassay Tivadar Prof.

Dr. Prókai Ágnes

Dr. Pócsai Károly

Dr. Tory Kálmán

Dr. Vannay Ádám

Pap Domonkos

Dr. Sziksz Erna

Boros Szilvia

Dr. Kosik Anna

Dr. Kerti Andrea

Dr. Szabó Dolóresz

Dr. Dégi Arianna

Dr. Balogh Eszter

Sugár Dániel

Dr. Balicza-Himer Leonóra

Veres-Székely Apor

Hosszú Ádám

Kőszegi Sándor

Bernát Mária

Dr. Kellermayer Miklós Prof.

Dr. Kis-Petik Katalin

Köszönettel tartozom továbbá kedves családomnak, szüleimnek.