

A diabéteszes és iszkémiás vesekárosodás patomechanizmusának vizsgálata és új kezelési lehetőségei

Doktori értekezés

Dr. Bánki Nóra Fanni

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Fekete Andrea, egyetemi tanársegéd, Ph.D.

Programvezető: Dr. Tulassay Tivadar, egyetemi tanár, az MTA tagja

Hivatalos bírálók: Dr. Szabó Tamás, egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Kökény Gábor, egyetemi adjunktus Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Prohászka Zoltán, egyetemi tanár, Ph.D.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Fülöp Norbert, belgyógyász, Ph.D.

Dr. Soós Pál, egyetemi tanársegéd, Ph.D.

Budapest

2013

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	5
1.1 Krónikus veseelégtelenség	6
1.2 Diabétesz mellitusz	7
1.3 Diabéteszes nefropátia	9
1.3.1 A diabéteszes nefropátia patomechanizmusa	10
1.4 A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer	11
1.4.1 Renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer a vesében	12
1.5 Az epiteliális-mezenhimális tranzíció szerepe	14
1.6 A nátrium/kálium ATPáz szerepe	14
1.7 A diabéteszes nefropátia kezelése	15
1.7.1 A vesetranszplantáció	16
1.8 A vese iszkémia/reperfúziós károsodása	18
1.8.1 A Sigma-1 receptor – NOS jelátviteli útvonal	19
2. Célkitűzés	22
3. Módszerek	23
3.1 <i>In vivo</i> kísérletek	23
3.1.1 Diabéteszes állatmodel	23
3.1.2 Iszkémiás állatmodell	24
3.2 <i>In vitro</i> kísérletek	26
3.3 Vérnyomás- és pulzusz mérés	26
3.4 Rutin laboratóriumi vizsgálatok	27
3.5 A vesék szövettani vizsgálata	27
3.6 Multifoton mikroszkópos vizsgálat	28
3.7 Immunfluoreszcens festés és konfokális képalkotás	30
3.8 Western blot	31
3.9 Statisztikai kiértékelés	32
4. Eredmények	33
4.1 Diabéteszes nefropátia	33
4.1.1 Vérnyomás, pulzus	33
4.1.2 Klinikai paraméterek	33
4.1.3 A vesék szövettani kiértékelése	36
4.1.4 A renális α SMA mennyisége	39
4.1.5 A renális NKA mennyisége	39

4.1.6 A NKA renális lokalizációja	40
4.1.7 <i>In vitro</i> eredmények.....	42
4.2 Iszkémia/reperfúzió.....	43
4.2.1 Túlélési eredmények.....	43
4.2.2 Szérumparaméterek változása	44
4.2.3 A vesék hisztológiai analízise	45
4.2.4 A vesék <i>in vivo</i> analízise.....	47
4.2.4.1 Szöveti struktúra	47
4.2.4.2 A veseérátmérő változása	48
4.2.5 A Sigma-1R – Akt – eNOS fehérjék renális expressziója.....	49
4.2.6 A Sigma-1R – Akt – eNOS fehérjék renális lokalizációja.....	51
4.2.7 A renális nNOS fehérje mennyisége	54
4.2.8 Érátmérők változása 30 perccel a kezelést követően	55
4.2.9 A Sigma-1R – NOS rendszer expressziója 30 perccel a kezelést követően.....	56
5. Megbeszélés.....	58
6. Következtetések.....	69
7. Összefoglalás	70
8. Summary.....	71
9. Irodalomjegyzék	72
10. Saját közlemények bibliográfiai adatai.....	87
Köszönetnyilvánítás.....	90

Rövidítések jegyzéke

7-NI	7-nitronidazol
ACE	angiotenzin I konvertáló enzim
Ang	angiotenzin
ARB	angiotenzin II receptor 1 blokkoló
α SMA	alfa smooth muscle actin - alfa simaizom aktin
AT1	angiotenzin II 1-es típusú receptora
AT2	angiotenzin II 2-es típusú receptora
D	diabéteszes csoport
DHEA	dehidroepiandroszteron
DMEM	Dulbeco Modified Eagle Medium
DNP	diabéteszes nefropátia
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA	etilén-glikol-tetraecetsav
EMT	epiteliális mezenhimális tranzíció
eNOS	endoteliális nitrogén-monoxid szintáz
FLU	fluvoxamin
GFR	glomeruláris filtrációs ráta
HCl	hidrogén-klorid
HDL	high density lipoprotein - magas denzitású lipoprotein
Hepes	N-2-hidroxietilpiperazini-N-etánesulfát sav
HK-2	human kidney 2 – humán proximális tubuláris sejtvonal
ip.	intraperitoneális
I/R	iszkémia/reperfúzió
KVE	krónikus veseelégtelenség
LDL	low density lipoprotein - alacsony denzitású lipoprotein

L-NAME	L-NG-nitroarginin metil-észter
L-NIO	N5-(1-iminoetil)-L-ornitin
NKA	nátrium/kálium ATPáz
NOS	nitrogén-monoxid szintáz
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintáz
NTx	vesetranszplantáció
PAS	perjódsav Schiff
PBS	phosphate buffered saline – foszfátpufferes sóoldat
PMSF	fenil-metánszulfonil fluorid
PTDM	poszt-transzplantációs diabétesz mellitusz
RAAS	renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer
SDS	szódium-dodecil szulfát
Sigma-1R	Sigma-1-receptor
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor - szelektív szerotonin visszavételt gátló
STZ-	streptozotocin
TGF β	transforming growth factor beta – transzformáló növekedési faktor
TRIS	tris(hidroximetil)aminometán
VEH	vehikulum

1. Bevezetés

A krónikus veseelégtelenség (KVE) világszerte folyamatosan emelkedő megjelenése jelentős népegészségügyi és gazdasági probléma¹. A növekvő tendencia oka a KVE háttérében álló legjelentősebb kóroki tényező, a diabétesz mellitusz járványszerű előfordulása: a WHO előrejelzései szerint, 2030-ra megduplázódik a cukorbetegek száma². A cukorbetegség hosszútávú szövődményeként kialakuló diabéteszes nefropátia (DNP) a felnőttkori KVE és végstádiumú veseelégtelenség vezető oka¹.

A DNP patomechanizmusának két meghatározó tényezője a direkt glükosztotoxicitás³ és a diabéteszben aktiválódott renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS)⁴. Napjainkban a nemzetközi és hazai terápiás ajánlások az angiotenzin (Ang) II gátló szerek adását javasolják a DNP kezelésére^{5, 6}. Ugyanakkor számos adat bizonyítja, hogy ez a kezelési protokoll nem lassítja a kívánt mértékben a vesekárosodás progresszióját⁷, a betegek jelentős hányadánál továbbra is végstádiumú veseelégtelenség alakul ki.

Munkacsoportunk hosszú ideje tanulmányozza a DNP progressziójában szerepet játszó mechanizmusok molekuláris háttérét. Korábbi vizsgálataink alapján az Ang II fokozza a DNP progresszióját, melynek háttérében a vesefunkció szempontjából nélkülözhetetlen nátrium/kálium ATP-áz (NKA) károsodása központi jelentőségű⁸. Az aktuális irodalmi adatok azonban a DNP progressziójában az Ang II mellett az aldoszteronnak is jelentős kóroki szerepet tulajdonítanak⁹, bár a pontos patomechanizmus továbbra is tisztázatlan.

A végstádiumú veseelégtelenség kezelésének elsődleges módja a vesetranszplantáció (NTx). A NTx hosszú távú kimenetelét számos allogéntől függő és független tényező befolyásolja. Az allogéntől független faktorok közül a vese iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodása a legjelentősebb¹⁰. Korábbi kísérleteinkben igazoltuk, hogy a nőstények jobban ellenállnak a vese I/R károsodásának, aminek háttérében a nőstényekben megfigyelhető alacsonyabb endotelin szint és stabilabb NKA áll^{11, 12}.

Az értekezés tárgyalja a diabéteszes vesekárosodás patomechanizmusát, kiemelve a fokozott RAAS aktivitás következményeit, valamint ismerteti a vesetranszplantátum hosszútávú túlélése szempontjából központi jelentőségű I/R károsodás legfontosabb patofiziológiai folyamatait. Kísérleteink célja a különböző RAAS gátlók monoterápiás

hatékonyságának összehasonlítása a vesekárosodás megelőzése szempontjából, illetve egy új jelátviteli kaszkád, a Sigma-1 receptor (Sigma-1R) – nitrogén-monoxid szintáz (NOS) útvonal hatásának vizsgálata a krónikus vesekárosodás megelőzése szempontjából.

1.1 Krónikus veseelégtelenség

Definíció szerint KVE-ről beszélünk, amennyiben a vese struktúrális vagy funkcionális károsodása legalább 3 hónapja fennáll, illetve, ha a glomeruláris filtrációs ráta (GFR) tartósan 60 ml/perc/1,73 m²-nél alacsonyabb ¹³. A vese funkcionális károsodását az albuminúria mértéke jellemezi, mely kórosnak tekinthető, ha az albumin-kreatinin hányados 30 mg/mmol-t meghaladja (háromból két vizeletmintában) ¹⁴. A vesekárosodás mértéke a GFR értéke alapján 5 stádiumra osztható (1. táblázat).

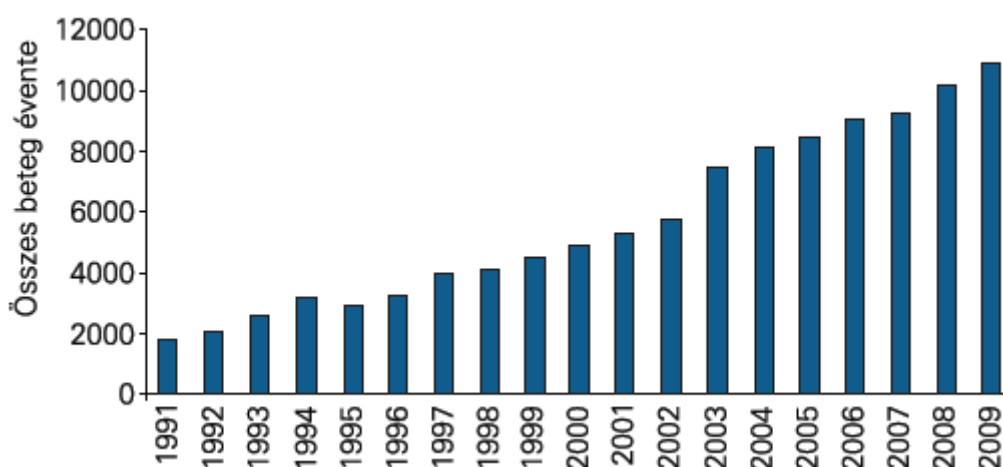
1. táblázat. A vesekárosodás stádiumai a glomeruláris filtrációs ráta (GFR) mértéke alapján (USRDS, 2012) ¹.

1. stádium	vesekárosodás, normál / ↑ GFR	GFR ≥ 90 ml/perc/1,73 m ²
2. stádium	vesekárosodás, enyhén ↓ GFR	GFR 60-89 ml/perc/1,73 m ²
3. stádium	mérsékelten ↓ GFR	GFR 30-59 ml/perc/1,73 m ²
4. stádium	súlyosan ↓ GFR	GFR 15-29 ml/perc/1,73 m ²
5. stádium	végstádiumú vese	GFR < 15 ml/perc/1,73 m ² (vagy dialízis)

A KVE világszerte növekvő egészségügyi probléma ¹, prevalenciája az elmúlt közel 20 év alatt 200%-kal nőtt. Ezzel párhuzamosan az egészségügyi kezelés költségei jelentősen emelkednek. Míg 1993-ban az USA-ban a teljes egészségügyi költségvetés 3,9%-át fordították a veseelégtelen betegek kezelésére, 2010-ben ez már 17%-ra, összesen 41 milliárd dollárra emelkedett¹. A KVE prevalenciája Magyarországon is nő, jelenleg 5-600.000-re becsülik a veseelégtelen betegek számát ¹⁵.

Mindezekkel párhuzamosan a végstádiumú veseelégtelenség miatt kezelt betegek (KVE 5.stádium) száma is közel tízszeresére nőtt az elmúlt húsz évben ¹. Magyarországon évente 6-7%-kal emelkedik a végstádiumú veseelégtelenség

prevalenciája ¹⁵, a dialízissal kezelt veseelégtelenek száma a húsz évvel ezelőtti ötszöröse (1. ábra) ¹⁵.



1. ábra. A dializált betegek számának növekedése Magyarországon 2006 és 2009 között (Kulcsár és mtsai., 2010) ¹⁵.

Ezek az adatok is mutatják, hogy mind világszerte, mind Magyarországon a KVE-ben szenvedők száma évről-évre nő, ami hatalmas anyagi-szociális terhet ró mind az egészségügyre, mind a társadalomra.

A felnőtt populációban a vesekárosodás hátterében az esetek közel felében (44 %) diabétesz, 28%-ban magas vérnyomás, 7 %-ban glomerulonefritisz, 3 %-ban cisztás vesebetegség, 2 %-ban urológiai eltérések állnak, míg a többi 16%-hoz egyéb vagy ismeretlen okok vezetnek ¹. Hasonló arány érvényesül a vesepótló kezelésre szoruló betegek között is, a páciensek többségénél a diabéteszes vesekárosodás vezet a végállapotú veseelégtelenség kialakulásához ¹⁵.

1.2 Diabétesz mellitusz

A cukorbetegség napjaink egyik legjelentősebb népegészségügyi problémája. A Nemzetközi Diabétesz Szövetség szerint jelenleg több, mint 371 millió cukorbeteg él világszerte ¹⁶, de ha az eddigi növekedési tendencia folytatódik, ez a szám 2030-ra meg is duplázódhat ². Magyarországon jelenleg 7,6 % a cukorbetegség prevalenciája, mely 2030-ra várhatóan 8,4 %-ra emelkedik ².

A cukorbetegség a szénhidrát-anyagcsere krónikus zavara, melynek oka az inzulin viszonylagos vagy teljes hiánya (1-típusú diabétesz mellitusz), illetve a szervezet

inzulinnal szembeni érzéketlensége (2-típusú diabétesz mellitusz). A két klasszikus csoport mellett még több kóroki tényező is ismert (gesztációs diabétesz, neonatális diabétesz, stb), melyeket részleteiben itt nem ismertetünk. Valamennyi típusra jellemző azonban, hogy az abszolút vagy relatív inzulinhiány következtében, a sejtek nem képesek a glükóz felvételére, a vércukorszint megemelkedik, és ez okozza a betegség klasszikus tüneteit ⁶.

A diabétesz mellitusz kórisméje általában a klinikai tünetek keltette gyanú alapján, máskor szűrővizsgálat során végzett vércukor-meghatározás eredménye alapján igazolódik. Diabétesz mellitusz állapítható meg, ha klasszikus tünetek figyelhetők meg, és:

- ha az éhomi (az utolsó energiafelvételt követően minimum 10 óra múlva mért) vércukorszint kóros, vagyis értéke vénás plazmában eléri vagy meghaladja a 7,0 mmol/l-t;
- vagy az étkezés utáni random vércukorszint eléri vagy meghaladja a 11,1 mmol/l-t;
- valamint ha a klasszikus tünetek hiányában a két különböző alkalommal mért éhomi vércukorszint értéke eléri, vagy meghaladja a 7,0 mmol/l-t ⁶.

Az amerikai ajánlásokban fentiek mellett a 6,5 % fölötti hemoglobin A1C érték, mint önálló diagnosztikus paraméter is szerepel ⁵, bár ezt önmagában, egyéb cukorbetegsége utaló jel nélkül ritkán mérjük, így elsősorban a vércukor mérése a mérvadó.

A diabétesz szövődményei két fő csoportba oszthatók: makro-, illetve mikroangiopátiás károsodások. A makroangiopátiás csoport a nagyerek ateroszklerotikus károsodása következtében létrejövő kardiovaszkuláris szövődményeket is magában foglalja, míg a mikroangiopátia, a kiserek destruálása révén létrejövő specifikus szervkárosodásokat, elsősorban a nefropátiát, neuropátiát és retinopátiát jelenti.

Az egyes szövődmények kialakulása szorosan összefügg. DNP kialakulása esetén többszörösére nő a kardiovaszkuláris szövődmények kockázata ¹⁷, a szisztémás ateroszklerózis ugyanakkor fokozza a vesekárosodás progresszióját ¹⁸. Míg a cukorbetegség önmagában 3-6-szoros, addig a diabéteszes vesekárosodás 15-20-szoros kardiovaszkuláris kockázattal jár az egészséges populációhoz viszonyítva ¹⁹.

A KVE a diabétesztől független rizikótényezője a szív-érrendszeri megbetegedéseknek ^{20, 21}, így DNP-ban a cukorbetegség és a krónikus vesebetegség okozta kardiovaszkuláris kockázat növekedés összeadódik ²². A cukorbetegség mortalitását legnagyobb mértékben a szív- és érrendszeri szövödmények kialakulása határozza meg, így nem meglepő, hogy a kardiovaszkuláris rizikót közel húszszorosára növelő DNP a diabétesssel összefüggő mortalitás legfőbb oka ²³.

A kezelési lehetőségek fejlődése és a molekuláris ismereteink bővülése ellenére a mai napig a DNP a felnőttkori veseelégtelenség vezető oka, prevalenciája a cukorbetegséggel párhuzamosan világszerte folyamatosan nő ²⁴. Az egyre nagyobb méreteket öltő vesekárosodás fokozza a betegek mortalitását és növeli a dialízisre, illetve NTx-ra szoruló végstádiumú vesebetegek számát, rontva az érintettek életminőségét, valamint jelentős anyagi terhet róva az egészségügyre és a társadalomra. A patomechanizmus jobb megértése segíthet a hatékonyabb kezelési és megelőzési stratégiák kidolgozásában.

1.3 Diabéteszes nefropátia

A DNP 1-es típusú cukorbetegségben a betegek 30-40%-ában ²⁵, a 2-es típusú diabéteszben szenvedők esetében 10-20%-ban lép fel ²⁶, átlagosan 15-20 évvel a cukorbetegség megállapítását követően. 2-es típusú diabéteszben a vesekárosodás már a cukorbetegség diagnosztizálásának pillanatában jelen lehet.

A klinikai kép és a szövettani elváltozások alapján a DNP öt stádiumát írták le ⁶.

A korai szakban renális hiperfiltráció és hipertrófia figyelhető meg; a GFR nő a glomerulusok hipertrófiáznak, de a bazálmembrán és mezangium még ép szerkezetű.

A DNP második stádiumában intermittáló mikroalbuminúria (30-300 mg/nap), szövettanilag a glomerulusok bazálmembránjának megvastagodása és a mezangiális mátrix felszaporodása figyelhető meg.

Tartós mikroalbuminúria a betegség harmadik stádiumára jellemző, ilyenkor a vérnyomás már határérték hipertóniát jelezhet, a GFR csökkenni kezd. A második stádiumban már kialakuló bazálmembrán vastagodás és mezangiális mátrix felhalmozódás további progressiója jellemző.

A negyedik stádiumban már megnövekedett albuminvesztés (> 300 mg/nap, makroalbuminúria), non-szelektív proteinúria jellemző. Szövettanilag glomeruloszklerózis, ateroszklerózis és krónikus tubulo-intersticiális károsodás figyelhető meg, melyek az ép struktúra kiszorítása révén a vesefunkció beszűküléséhez vezetnek. A glomeruláris funkció romlása miatt csökken a vizeletképzés és a kiválasztás, ezáltal emelkedik a szérum kreatinin szint és nő a vérnyomás²⁷.

Az ötödik stádiumban a működő nefronok száma nagymértékben lecsökken, ami végül urémiához, veseelégtelenséghez vezet. A vese károsodása miatt csökkent eritropoetin termelés anémiát okozhat. Zavart szenved a D-vitamin – vesében történő – aktív formává alakulása, ami csökkent intesztinális kalciumfelszívódással és fokozott csontvesztéssel jár. A lipid-szintek (koleszterin, triglicerid) is emelkednek³. A napi vizelet mennyisége egyre kevesebb, jellemző az ödéma, fáradékonyság, kialakul a végstádiumú veseelégtelenség; vesepótló kezelés megkezdése válik szükségessé²⁷.

1.3.1 A diabéteszes nefropátia patomechanizmusa

A DNP kialakulása multifaktoriális, metabolikus és hemodinamikai faktorok kölcsönhatása. A kockázati tényezők között szerepel a diabétesz fennállásának időtartama, a hiperglikémia mértéke, az emelkedett vérnyomás, a diszlipidémia, a dohányzás és a fokozott fehérje-bevitel is¹⁹.

Bár a kórfolyamat elindításában döntő jelentőségű a kórosan magas vércukor²³, a fenntartásában a folyamatos hiperglikémia, az aktiválódott RAAS, a kialakuló ateroszklerózis és az emelkedett szisztémás magas vérnyomás hatásai összeadódnak. Nehéz egyértelmű ok-okozati rendszerben leírni az egyes tényezők szerepét, mivel a hiperglikémia, a RAAS túlaktiválódása, az ateroszklerózis és a hipertónia egy összefüggő rendszert alkotnak, melyben minden faktor hat a másikra.

A hiperglikémia önmagában aktiválja a RAAS-t, illetve fokozza az ateroszklerózis kialakulását, ugyanakkor a RAAS növeli az inzulinrezisztencia mértékét, növelve ezáltal a vércukrot²⁸. A vazokonstrikció következtében romlik a hasnyálmirigy vérellátása, ez beszűkült inzulintermelést eredményez, ami szintén a vércukor további emelkedéséhez vezet. A vazokonstrikció miatt csökken a vese vérátáramlása is, ami még jobban aktiválja a RAAS-t, ez ugyanakkor fokozza az

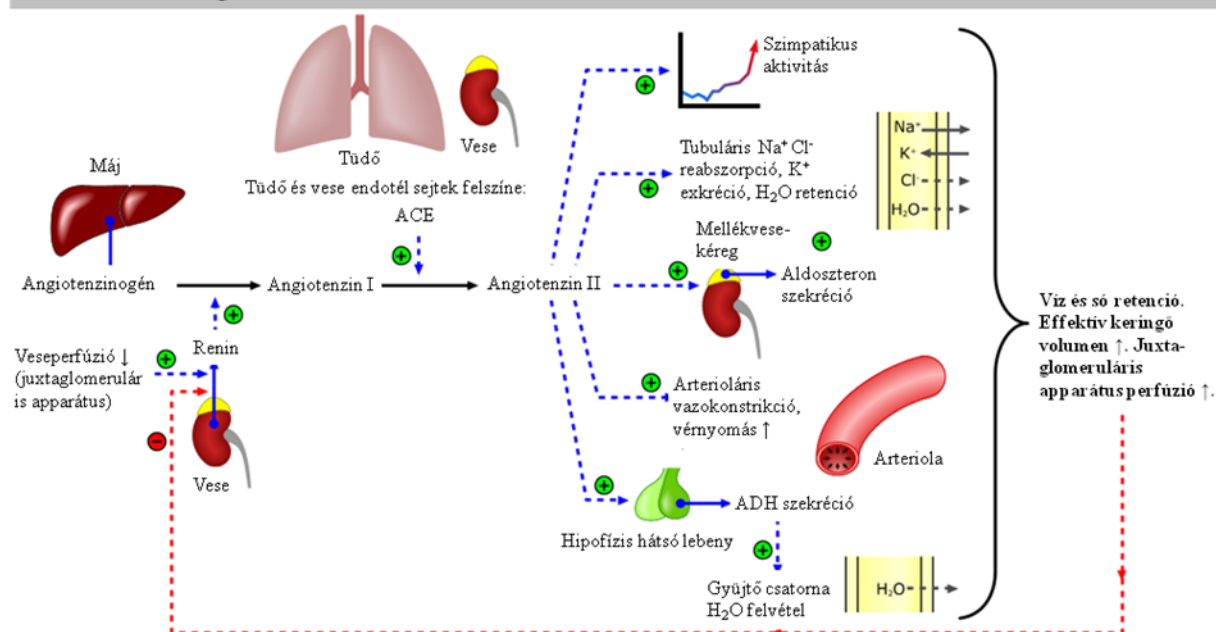
oxidatív gyökök képződését és a hiperlipidémia kialakulását, ami visszahat az erekre és növeli az ateroszklerózis mértékét ²⁹. Az érlelmeszesedés és a hiperaktív RAAS önmagukban emelik a szisztémás vérnyomást, diabéteszben viszont egymással szorosan összefonódva fordul elő a két kóroki tényező, ami még kifejezettebb hemodinamikai zavart eredményez. A magas vérnyomás ugyanakkor rontja az érfal és a vese keringését, ami szintén tovább fokozza az ateroszklerózist és a RAAS aktivációját ⁴.

Így végső soron egy több ponton összekapcsolódó ördögi kör alakul ki a hiperglikémia, a túlaktivált RAAS, az ateroszklerózis és a hipertónia között, melyek külön-külön is károsítják a vesét, együtt viszont súlyos additív nefrotoxikus hatásuk van. A megváltozott hemodinamikai tényezők és anyagcsere-folyamatok hatására különböző intracelluláris jelátviteli útvonalak aktiválódnak, ami végső soron a vese strukturális károsodásához, a glomeruláris szklerózis és a tubulo-intersticiális fibrózis kialakulásához vezet ³⁰.

1.4 A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

A RAAS összefoglaló ábrája az alábbiakban látható (2. *ábra*). A RAAS fő effektora az Ang II, mely több lépésben képződik a májban termelődő angiotenzinogénből ³¹. A juxtaglomeruláris apparátusban termelődő renin az angiotenzinogénből Ang I-et hoz létre, ami Ang II-vé alakul az angiotenzin I konvertáló enzim (ACE) hatására. Az ACE a vazokonstriktor Ang II termelése mellett a vazodilatátor hatású bradikinin lebontása révén is szerepet játszik az erek összehúzódásában ³². Az Ang II a mellékvesekéreg zona glomerulosa rétegében fokozza az aldoszteron termelődését, ami a vesében a nátrium és víz visszavételét serkenti ²³.

Renin-angiotenzin-aldoszeron rendszer



2. ábra. A renin-angiotenzin-aldoszeron rendszer összefoglalása. ADH – antidiuretikus hormon, Na⁺ - nátrium, K⁺ - kálium, Cl⁻ - klorid ion, H₂O – víz (Rad és mtsai. 2006) ³³.

Az Ang II az 1-es (AT1) és 2-es típusú (AT2) receptorain keresztül közvetíti hatásait. Az AT1-receptorok főleg az erekben, a szívben, a vesében, az agyban és a mellékvesekéreg zóna glomeruloza rétegében találhatóak meg ³⁴. Az Ang II legtöbb hatása, így a sejtnövekedés, a proliferáció, a vazokonstrikció, a nátrium-visszaszívás indukálása és a vérnyomás emelése az AT1-receptoron keresztül megy végbe ³⁵.

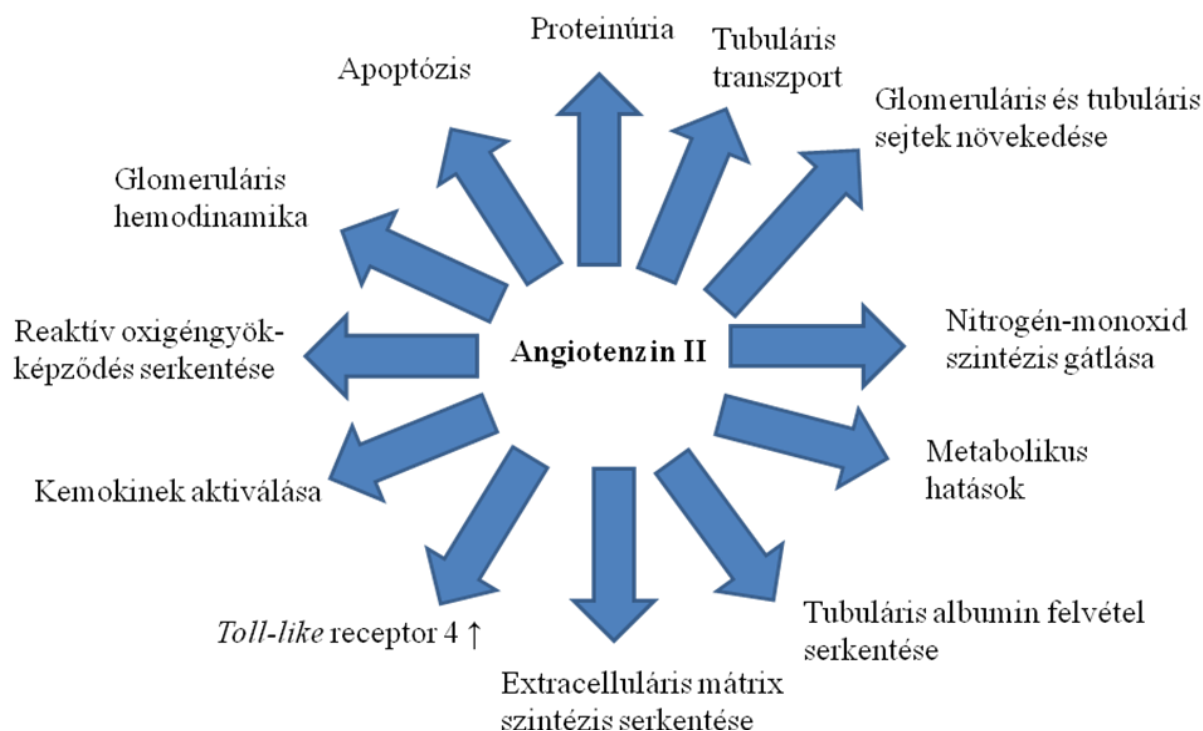
Az AT2-receptor élettani funkciója kevésbé ismert, részben azért, mert felnőtt szövetekben kisebb mértékben fejeződik ki. Az AT2-receptor nagy mennyiségben a magzati szervezetben fordul elő, felnőtt szövetekben patológiás körülmények között, így diabéteszben is változhat az expressziója, elsősorban a vesében ²³.

1.4.1 Renin-angiotenzin-aldoszeron rendszer a vesében

A vesében más szervekhez hasonlóan (méh, placenta, érszövet, szív, agy) a RAAS valamennyi eleme expresszálódik. ³⁵, ugyanakkor a lokális RAAS a szisztémástól függetlenül is szabályozódik ³⁶. A vesében mind a renin, mind az Ang II szintje nagyságrendekkel magasabb a plazmához képest ³⁷, a proximális tubuláris folyadék Ang II koncentrációja több százszorosa a plazmáénak ²³. A DNP korai

fázisában a proximális tubulusban és a glomerulusban is fokozódik a renin expresszió, ami a tubuláris és glomeruláris Ang II szint további emelkedéséhez vezet^{30, 38}. Mindez alátámasztja a lokális RAAS és a vese szorosan kapcsolt szabályozását és a RAAS központi szerepét a DNP kialakulásában.

Az alábbi 3. ábra összefoglalja az Ang II vesére kifejtett közvetlen hatásait, a továbbiakban azonban csak a DNP patomechanizmusa szempontjából fontos folyamatokat tárgyaljuk részleteiben.



3. ábra. Az intrarenális angiotenzin II hatásai (Ruster és mtsai. módosított ábrája)³⁹.

A DNP-ban észlelt proteinúria kialakulásának első lépése az Ang II hatására emelkedett transzformáló növekedési faktor béta (TGF β) expresszió⁴⁰, ami rontja az afferens arteriolák autoregulációját⁴¹. A károsodott autoreguláció miatt nő a glomeruláris transzkapilláris nyomás, fokozva a bazálmembrán fehérje áteresztőképességét. Emellett az Ang II csökkenti a negatív töltésű proteoglikánok szintézisét is⁴², melyek jelentős szerepet játszanak a glomeruláris bazálmembrán barrier tulajdonságának kialakításában. Az Ang II serkenti az albumin tubuláris endocitózisát⁴³, ami ismét aktiválja a renális RAAS-t, ördögi kört kialakítva.

A funkcionális károsodás mellett a vese strukturális degenerációjában is elsődleges az Ang II szerepe. A DNP jellegzetes szövettani elváltozása a glomerulus fibrotikus károsodása, a glomeruloszklerózis, mely már a betegség korai stádiumában

megjelenik ⁴⁴. A nefropátia előrehaladásával fibrotikus anyag tölti ki a tubuláris interstíciumot is, mely a veseműködés beszűküléséhez vezet ⁴⁵. A mezangiális sejtek, glomeruláris endotélsejtek és fibroblasztok proliferációjának ³⁹ és az extracelluláris mátrix expansió indukálása révén ⁴⁰ az Ang II hozzájárul a glomeruloszklerózis és az intersticiális fibrózis kialakulásához. Mindezek mellett apoptózist is indukál ⁴⁶, ami szintén meghatározó a strukturális változások kialakításában. Kiemelendő továbbá az Ang II proinflammatorikus hatása ⁴⁷. Elősegítve a gyulladós sejtek glomeruláris és tubulo-intersticiális infiltrációját központi szerepet játszik a KVE progressziójában ³⁹.

Az AngII mellett a vesében lokálisan aldosteron is képződik, amit a hiperglikémia és az Ang II indukál ⁴⁸. Diabétiszben a normális plazma aldosteron szintek ellenére fokozódik a renális aldosteron képzése, ez lokálisan gyulladást, mezangiális mátrix expansiót, TGF β -n keresztül fibrózist indukál, valamint fokozza az albuminúria mértékét és a DNP progresszióját ⁹. Az aldosteron serkenti az Ang II oxigén-szabadgyök termelő és egyéb szöveti hatásait ⁴⁹, és önmagában is szerepe van az endotélkárosodás, a gyulladás, a proteinúria és a fibrózis folyamataiban ⁵⁰.

1.5 Az epiteliális-mezenhimális tranzíció szerepe

A szövetek fibrotikus degenerációjában kulcsfontosságú az epiteliális-mezenhimális tranzíció (EMT) folyamata, melynek során a renális tubuláris epitélisejtek elvesztik adhéziós képességüket és migráló miofibroblasztokká alakulnak. A sejtek α -simaizom-aktint (α SMA) kezdenek termelni, ezáltal aktin vázuk átrendeződik ^{51, 52}. A mozgásra képes sejtek a feltöredezett bazálmembránon keresztül az interstíciumba vándorolnak ⁴⁴, ahol extracelluláris mátrix összetevők, növekedési faktorok, illetve citokinek termelése révén gyulladást indukálnak. A miofibroblasztok rezisztensek az apoptózissal szemben, összességében a gyulladás fenntartásához, és a fibrotikus folyamat progressziójához járulnak hozzá ⁵³.

1.6 A nátrium/kálium ATPáz szerepe

Az Ang II és az aldosteron a nátrium (Na^+) reabszorpció fokozásával központi szerepet játszik a renális Na^+ és víz homeosztázisban ⁵⁴. A diabétiszben megfigyelhető fokozott só- és vízvisszaszívás különböző transzportfehérjék

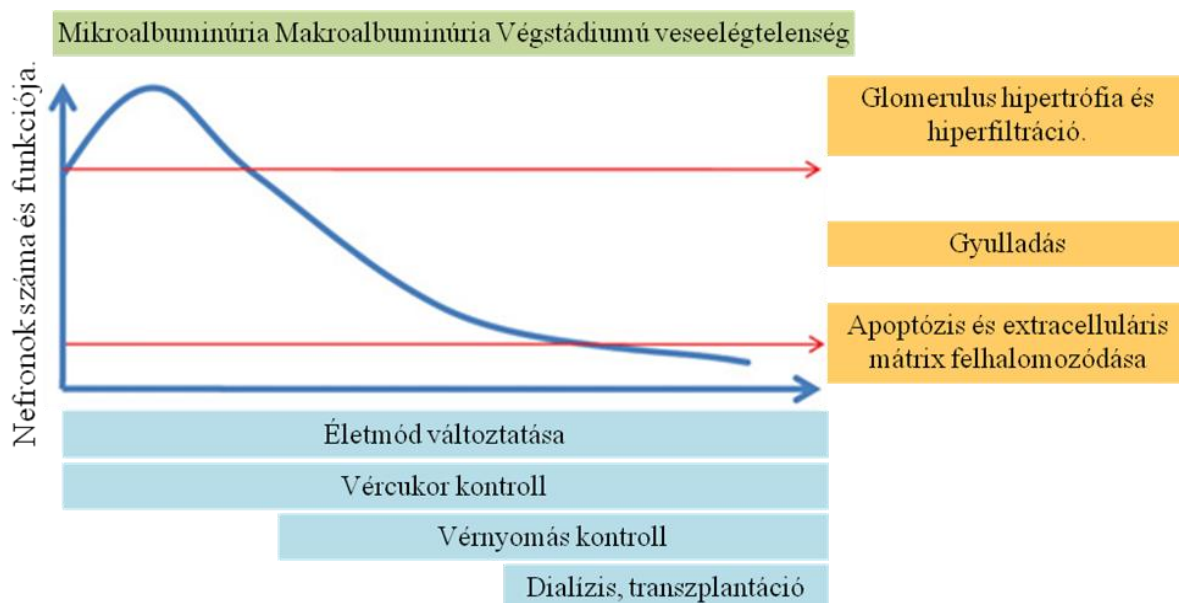
megváltozott működésével mutat összefüggést. A hiperglikémia önmagában is károsítja számos transzporter működését ⁵⁵, de a diabéteszben megnövekedett koncentrációjú Ang II és aldosteron tovább rontja ezen fehérjék funkcióját ⁸.

A nátrium/kálium ATPáz (NKA) fontos eleme a folyadék- és az ionháztartás szabályozásának; a Na⁺-gradiens fenntartásával biztosítja a reabszorpciós folyamatok energetikai hátterét ⁵⁶. Emellett a NKA jelentős szerepet játszik az ozmoreglációban ⁵⁷, így a hiperglikémia ozmolarikus hatása sem elhanyagolható az enzim funkciója szempontjából. Az enzim aktivitását mindazon tényezők befolyásolják, melyek megváltoztatják a plazmamembránban elhelyezkedő NKA lokalizációját, számát és aktivitását. Korábban kimutattuk, hogy streptozotocin (STZ) indukálta 1-es típusú diabétesz patkánymodelljében, bár megemelkedik a renális NKA expressziója, ugyanakkor az enzim a bazálmembránból a citoplazma felé helyeződik át és ezáltal funkcióját veszti. Exogén Ang II infúzió alkalmazása tovább fokozza az enzim diszfunkcióját és a DNP progresszióját ⁸.

1.7 A diabéteszes nefropátia kezelése

A DNP pontos patomechanizmusa részleteiben továbbra is ismeretlen, mely elengedhetetlen lenne egy adekvát kezelési stratégia kidolgozására. A DNP kezelése és megelőzése szempontjából elsőként a vércukor és a vérnyomás normalizálása és stabilizálása a cél. Az Amerikai Diabétesz Társaság 2013. évi ajánlása szerint cukorbetegknél mikroalbuminúria esetén ACE gátlók, illetve Ang II receptor blokkolók (ARB) adása javasolt, míg az aldosteron antagonisták csak adjuváns terápiaként szerepelnek. Az európai ajánlások szintén ACE gátlók és ARB-k használatát javasolják, az aldosteron antagonistákat csak az elsőként választandó szerek mellett is fennálló hipertónia esetén tartják indokoltnak ⁵⁸. A Magyar Diabétesz Társaság szakmai irányelvei szerint: diabéteszben mikro- vagy makroalbuminúria esetén hipertónia hiányában is indokolt ACE-gátlót adni, intolerancia esetén pedig ARB kezelés jön szóba, míg az aldosteron antagonistákat nem is említik ⁶.

Az ajánlásokban a napi fehérjebevitel maximalizálása is szerepel, a DNP korai stádiumaiban 0,8-1 mg/ttkg, míg későbbiekben 0,8 mg/ttkg/nap napi fehérje bevitel javasolt ⁵.



4. ábra. A diabéteszes nefropátia lefolyása, kezelése (Wada és mtsai. 2013) ³.

Bár egyértelmű konszenzus nincs, az egyes ajánlásokban egyelőre elsődlegesen az Ang II gátlókat javasolják, ugyanakkor nagyszámú randomizált vizsgálat alapján úgy tűnik, hogy az aktuális protokollok használata sem lassítja kellő mértékben a DNP progresszióját, a betegek jelentős hányadánál kialakul a végstádiumú veseelégtelenség, vesepótló kezelés, dialízis illetve NTx válik szükségessé. (4. ábra)

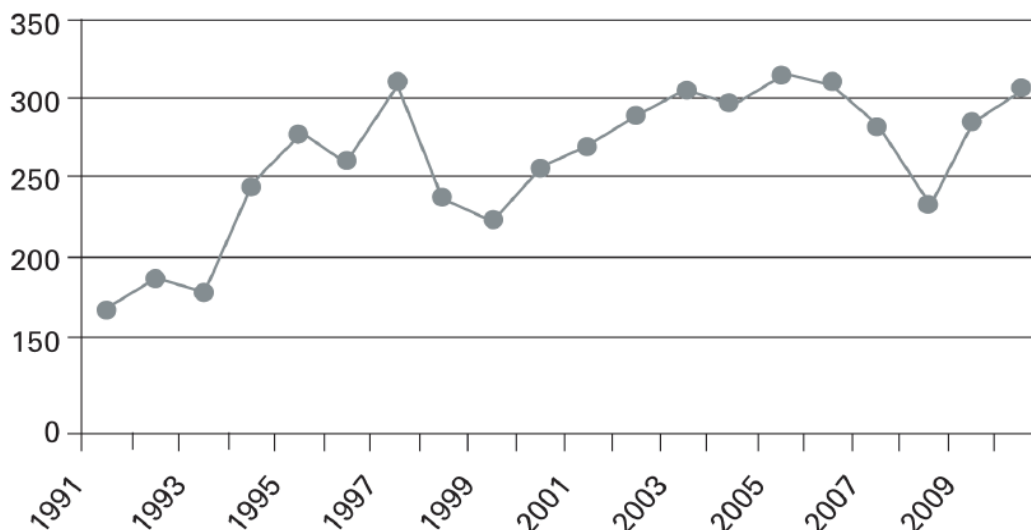
1.7.1 A vesetranszplantáció

A dialízis jelentős életminőség csökkenést jelent a betegek számára, ezért fontos a KVE kialakulásának megelőzése, korai stádiumban történő kiszűrése, illetve a NTx mielőbbi elvégzése. 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 ¹.

Az Egészségügyi Minisztérium szakmai irányelve alapján, ha a KVE során a becsült GFR 25 ml/perc/1,73 m² alá csökken, NTx indokolt. Amennyiben diabétesz mellitusz áll a KVE hátterében, akkor már 30 ml/perc/1,73 m² érték alatt is NTx-ra van szükség ⁵⁹.

Az utóbbi 15 évben közel négyszeresére emelkedett a várólistán lévő betegek száma az Amerikai Egyesült Államokban ¹. Míg a dializált betegek száma folyamatosan emelkedett Magyarországon az utóbbi években ¹⁵, addig a NTx-k száma 1997 óta stagnál (5. ábra) ⁶⁰. A transzplantációk számát elsősorban a donorok száma korlátozza.

Magyarországon a NTx-k körülbelül 10 %-a történik élő donorból, míg Nyugat-Európában körülbelül 20 %, skandináv országokban és az Amerikai Egyesült Államokban körülbelül 40 %⁶⁰. Hazánk 2012-ben csatlakozott az Eurotranszplant hálózathoz, melyben számos program és Szervezet segíti elő a sikeres transzplantációk létrejöttét és remélhetőleg növekedést hoz a NTx-k számában Magyarországon is.



5. ábra. A vesetranszplantációk száma Magyarországon (1991-2010) (Szelestei és mtsai. módosított ábrája)⁶⁰.

A NTx akut technikai szövődményei (artériás, vénás, illetve uréter elzáródás) mellett a nagy dózisu immunszuppresszió következtében kialakuló fertőzések és poszt-transzplantációs diabétesz (PTDM) is jelentősen befolyásolják a hosszú távú kimenetelt. Három évvel a NTx-t követően, az előzőleg nem diabéteszesek 40 %-a lesz cukorbeteg¹. A PTDM oka az esetek 74%-ában az immunszuppresszív terápia, különösképpen a szteroid lökésterápia és a nagy dózisu kalcineurin inhibitorok alkalmazása⁶¹. A PTDM többnyire a transzplantációt követő 3 hónapon belül kialakul és függ az immunszuppresszánsok dózisától⁶². Kevésbé károsító immunszuppresszív terápiával, például mikofenolát-mofetil vagy szirolimusz alkalmazásával megelőzhető, illetve terápiaváltással csökkenthető a PTDM kialakulása⁶³.

A NTx sikerességét alapvetően a hosszútávú graft túlélés határozza meg. Míg az akut kilökődés visszaszorítása eredményes, a késői graft diszfunkció előfordulása még mindig komoly problémát jelent⁶⁴. Nagyban befolyásolja a kimenetelt a graft eredete; élő donorból származó vesénél a korai, és a késői eredmények egyaránt jobbak, a kadáveres NTx-hoz képest⁶⁵. Míg kadáver donor esetén az egyéves grafttúlélés 90%, az

átlagos túlélési idő pedig 8-9 év, addig élő donoros NTx-nál a vesék túlélési aránya az első évben 95%, az átlagos túlélési idő pedig 15-20 év ¹. Mivel az élő donoros NTx tervezett műtét, jelentősen csökkenthető a hideg iszkémiás idő és így mérséklődik az I/R károsodás, mely a NTx során fellépő akut veseelégtelenség és krónikus allograft diszfunkció kialakulásának meghatározó tényezője ¹⁰.

1.8 A vese iszkémia/reperfúziós károsodása

Renális iszkémia a transzplantáción kívül számos esetben kialakulhat, így súlyos hipotenzió (pl. intraoperatív vagy vérzés okozta), volumenhiány (pl. hányás, hasmenés, kiterjedt égési sérülés), szívelégtelenség, veseartéria elzáródás vagy nagy műtétek kapcsán ⁶⁶. A váratlanul vagy hirtelen jelentkező okokkal ellentétben a NTx során fellépő I/R károsodás egy előrelátható folyamat, mely jelentősen rontja a transzplantált betegek túlélését ¹⁰. Az I/R károsodás mérséklésére irányuló különböző törekvések a transzplantáción kívül elektív műtéteknél pl. veseartéria-, szuprarenális aorta- és veseműtéteknél (pl. tumorrezekció) is jelentős haszonnal bírnak.

Az iszkémiás vesekárosodás a szisztémás vagy lokális véráramlás átmeneti csökkenése következtében lép fel, mely a vese perfúziójának romlását okozza. Bár a véráramlás helyreállása nélkülözhetetlen a veseszövet túléléséhez, a reperfúzió mégis további károsodásokat okoz. A károsodás foka függ az iszkémia, valamint az azt követő reperfúzió időtartamától ⁶⁷. Az I/R patomechanizmusával kapcsolatos ismereteink folyamatos bővülése ellenére sem megoldott probléma a NTx során obligátnan létrejövő I/R által okozott károsodások kiküszöbölése, ezáltal jelentősen rontva a NTx hosszú távú eredményeit. Munkacsoportunk egyik fő érdeklődési területe a vese I/R károsodás folyamatának megismerése, különös tekintettel az iszkémiás inzultussal szemben tapasztalt nemi különbség hátterének felderítésére.

A női nem számos vesebetegségben védő faktornak számít, mely protektív hatása a menopauzát követően megszűnik ⁶⁸. A kor előrehaladtával egészségesegekben is megfigyelhető vesefunkció beszűkülés kisebb mértékű nőkben a férfiakhoz képest ⁶⁹, de már a kongenitális urológiai malformációk előfordulása is gyakoribb fiúkban, mint lányokban ⁷⁰. Számos KVE-hez vezető kórállapot, így membranózus glomerulonefritisz, fokális-szegmentális glomeruloszklerózis, szisztémás lupusz illetve 1-es típusú diabétesz veseszövődménye kapcsán írtak le lassabb progressziót nőkben a férfiakhoz viszonyítva ⁷¹. A NTx kapcsán is érvényesül a nemi különbség, női recipiensek jobb

hosszú távú graft túlélést mutattak a férfiakhoz képest, melynek hátterében immunológiai folyamatokat feltételeznek ⁷². Munkacsoportunk is a krónikus allograft rejekció ritkább előfordulását figyelte meg nők NTx-ja esetén ⁷³.

Állatkísérletek kapcsán is régóta ismert a női nem, illetve az ösztrogén protektív szerepe. Hím patkányokban a nőtényekkel ellentétben spontán időskori proteinúria és glomeruloszklerózis alakul ki ⁷⁴, míg az ösztrogén kezelés illetve a kasztrálás a vesebetegségek lassabb progresszióját eredményezi ⁷⁵. A tesztoszteron kezelés ugyanakkor fokozza, míg az ösztradiol kezelés csökkenti a krónikus allograft rejekció kialakulását ⁷⁶.

Saját vizsgálatainkban a nőtény állatoknál jobb posztisztkémiás túlélését tapasztaltuk vese I/R kapcsán, melynek hátterében a hím állatokban megfigyelhető fokozott endotelin-1 fehérje expresszió vazokonstriktor hatása valószínűsíthető ¹¹. További kísérleteink során stabilabbnak bizonyult nőtény patkányokban a már korábbiakban is említett, vese aktív transzport folyamataiban kulcsszerepet betöltő NKA ¹². Ennek hátterében az enzimet és funkcióját helyreállító hősokk-fehérje 72 nőtényeknél megfigyelt magasabb expressziója állhat ¹⁰. Kimutattuk továbbá, hogy az indukálható NOS expressziója kisebb hím állatokban vese I/R-t követően, ami a vesekeringést javító nitrogén-monoxid alacsonyabb szintjét eredményezi ⁷⁷. A nemi hormon prekursor DHEA renoprotektívnek bizonyult előző vizsgálatainkban I/R kapcsán ⁷⁸, melynek hátterében ugyanakkor nem igazolódott a DHEA ösztrogén/tesztoszteron arányt módosító hatása. Hormonális tulajdonságán túl a DHEA antioxidáns is, amit egy nemrégiben leírt jelátviteli úton keresztül valósít meg, melynek aktiválásával protektív szív iszkémiában ⁷⁹, illetve hipertóniás vesekárosodásban ⁸⁰.

1.8.1 A Sigma-1-receptor - NOS jelátviteli útvonal

A DHEA kapcsán újonnan leírt szignál transzdukciós útvonal első, kulcsfontosságú eleme a Sigma-1R. Ez egy 29-kDa molekulásúlyú transzmembrán polipeptid, mely a plazmamembránban és szubcelluláris membránokban, főként az endoplazmatikus retikulumban helyezkedik el. Elsősorban a központi idegrendszerben fordul elő, de a szívben, a gyomorban, a májban és a vesében is expresszálódik ^{81, 82}. A vesében pontos lokalizációja és funkciója még nem ismert.

Számos struktúrájában eltérő anyag tartozik a Sigma-1R agonistái (benzomorfanok, fluvoxamin (FLU), DHEA) és antagonistái (haloperidol, NE100)

közé. A ligandok farmakológiai hatása elsősorban a szignál transzdukció modulálásában nyilvánul meg⁸³. Az irodalmi adatok ellentmondásosak az agonisták hatásmechanizmusát illetően. Egyes vizsgálatok alapján fokozódik a Sigma-1R mRNS expressziója⁸⁴, míg mások szerint az endoplazmatikus retikulumhoz kötött receptor kihelyeződik a plazmamembránba az agonista hatására, miáltal további ligandok számára könnyebben elérhetővé válik és aktiválódik⁸⁵. Valószínűsíthető, hogy a Sigma-1R aktivációja különböző fehérjék Ca^{2+} dependens foszforilációja révén az intracelluláris jelátvitelt is befolyásolja⁸⁶. A Sigma-1R agonistáinak jótékony hatásait agyi hipoxia kapcsán tanulmányozták először⁸⁷. Emellett a közelmúltban bizonyították védő szerepüket a máj, szív és a retina iszkémiás károsodásának kapcsán is⁸⁸⁻⁹⁰.

A Sigma-1R agonista DHEA és FLU kapcsán kimutatták, hogy az Akt foszforilációs aktiválását indukálják⁹¹. Az Akt alapvető szereppel bír a sejtek homeosztázisában, számos jelátviteli útvonal központi molekulája⁹². Az Akt az endotélsejtekben is megtalálható, ahol fiziológiaszubsztátja az endoteliális NOS (eNOS), melyet foszforiláció révén aktivál⁹³. A NOS enzimnek három izoformája ismert, a konstitutív endoteliális és neuronális, valamint az indukálható (eNOS, nNOS, iNOS)⁹⁴. A vesében mindhárom NOS izoforma expresszálódik, eltérő mennyiségben és lokalizációban. Az eNOS a glomeruláris endotél sejtekben, a proximális tubulusokban, a gyűjtőcsatornáknak, valamint a Henle-kacs felszálló vastag szegmentumában található. A nNOS elsősorban a makula denzában és az idegsejtekben expresszálódik, az iNOS pedig a mezangiális és proximális tubulus sejtekben, illetve a medulláris felszálló vastag szegmensben fejeződik ki⁹⁵.

A NOS hatására termelődő NO növeli a renális perfúziót, a renin elválasztás gátlásán keresztül csökkenti a vérnyomást, valamint nátriurézist és diurézist okoz⁹⁶. A trombocita aggregáció, a leukocita adhézió és az ér simaizomsejt proliferációjának szabályozása révén jelentős szerepet játszik a vesekeringés stabilizálásában⁹⁷. A renális iszkémiás károsodást kivédő kezelések hátterében jelentős szerepet tulajdonítanak a fokozott eNOS expresszióknak⁹⁸, a prekondicionálás protektív mechanizmusának kialakításában is kulcsfontosságú a NO jelenléte⁹⁹. Összességében a NO jótékony hatása feltételezhető vese I/R-ban.

A Sigma-1R agonistái is az Akt és végső soron a NOS aktiválása, vagyis a NO szintézis fokozása révén lehetnek protektívek iszkémiában. A közelmúltban mutatták ki a szelektív szerotonin visszavételt gátló (SSRI) antidepresszánsokról, hogy eredeti szerotonin szintet növelő tulajdonságuk mellett a Sigma-1R agonistái is, legnagyobb

affinitást a FLU mutatott. A FLU Sigma-1R-on keresztül kifejtett hatásait elsősorban az idegrendszer kapcsán vizsgálták: neuronális növekedési faktorok aktiválásával serkenti az idegsejtek proliferációját ¹⁰⁰, gátolja a fenilciklidin kognitív funkciókat károsító hatását ¹⁰¹, valamint csökkenti az agy hipoxiás károsodásának mértékét ¹⁰². Mindemellett a Sigma-1R-Akt-NOS jelátviteli útvonal aktiválásán keresztül protektívnek bizonyult a FLU a torakális aorta endotél károsodásával szemben az abdominális aorta lekötésnél ⁹³.

2. Célkitűzések

Kísérleteinkben a DNP progresszióját befolyásoló folyamatokat és az I/R patomechanizmusában szerepet játszó molekulákat, valamint mindkét kórállapot új terápiás lehetőségeit vizsgáltunk. A következő kérdésekre kerestük a választ.

1. DNP:

- a. Az egyes RAAS gátlók monoterápiában alkalmazva hogyan befolyásolják a diabétesz indukálta szöveti és funkcionális vesekárosodást?
- b. Hogyan módosítják diabéteszben a RAAS gátlók az EMT folyamatát és a NKA működését?
- c. Befolyásolja-e a hiperglikémia - ozmotikus hatásától függetlenül - a fenti folyamatokat?

2. I/R:

- a. A Sigma-1R agonista FLU javítja-e a túlélést renális I/R-t követően?
- b. Mérsékli-e a FLU a posztisztkémiás strukturális és funkcionális vesekárosodást?
- c. Hogyan befolyásolja a FLU a renális Sigma- 1R – NOS rendszert?
- d. A FLU renális I/R kapcsán kifejtett hatásai Sigma-1R specifikusak-e?

3. Módszerek

3.1 *In vivo* kísérletek

Kísérleteinket 175-200 gramm súlyú, ivarérett, hím, Wistar patkányokon (Toxicoop Kft, Budapest, Magyarország) végeztük. A patkányokat állandó (21°C) hőmérsékleten, 75% páratartalom és 12 óránként váltakozó megvilágítás mellett tartottuk. Az állatoknak állandóan elérhető standard rágcsálótápot és csapvizet biztosítottunk.

Munkánkat a Magyar Köztársaság állatvédelmi és állatkísérletekkel kapcsolatos törvényeinek (1998/XXVIII.) betartásával, a Semmelweis Egyetem állatkísérletekre vonatkozó irányelvei alapján végeztük.

3.1.1 Diabéteszes állatmodell

A diabéteszt egyszeri, nagy dózisu, citrátban (0,1 M; pH=4,5) oldott streptozotocinnal (STZ, Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) (65 mg/ttkg, intraperitonealis (*ip.*)) indukáltuk. Az STZ injekciót követően 72 órával vénás vérben ellenőriztük az állatok vércukorértékét tesztcsíkos Dcont Trend vércukormérő készülékkel (77 Elektronika Kft, Budapest, Magyarország). A cukorbetegség alsó határaként a 15 mmol/l vércukorértéket fogadtuk el, ennél alacsonyabb vércukor érték esetén kizártuk az állatot a vizsgálatból.

Vizsgálati csoportok

A diabétesz 5 hetes fennállását követően 2 hétig kezeltük az állatokat *per os* izotóniás sóoldatban oldott:

1. ACE inhibitor *enalaprilal* (40 mg/ttkg/nap);
2. ARB *lozartánnal* (20 mg/ttkg/nap);
3. non-szelektív aldosteron antagonistá *spironolaktonnal* (50 mg/ttkg/nap);
4. szelektív aldosteron antagonistá *eplerenonnal* (50 mg/ttkg/nap);
5. illetve izotóniás sóoldattal, mint vehikulummal.

Az eplerenon struktúrája egy 9,11-epoxid csoportban különbözik a spironolaktonétól, mely növeli szelektivitását az aldosteron receptor iránt és csökkenti

affinitását a progeszteron és az androgén receptorokhoz ¹⁰³, így jóval kevesebb anti-androgén mellékhatással bír.

. Kontrollként korban és testtömegben megfelelő patkányokat használtunk. (n=8/csoport). A hatóanyagok (Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) dózisát korábbi vizsgálatok kapcsán választottuk aszerint, hogy hatékonyan gátolják az ACE-t ¹⁰⁴, az AT1-t ¹⁰⁵ és az aldoszteront ¹⁰⁶ anélkül, hogy befolyásolnák a vérnyomást.

A 2 hetes RAAS gátló kezelést követően az állatokat *ip.* ketamin-xylazin (8:2 arányú) anesztéziában, hólyagpunkciós vizeletminta vételét követően kivéztettük. A vér egy részét vérvizsgálatra etilén-diamin-tetraecetsavas (EDTA) vércsőben 4°C-ra raktuk, másik részéből szérumot izoláltunk és a vizelettel együtt -80 °C-on tároltuk a további vizsgálatokig. Az eltávolított veséket egyenlő darabokra osztottuk és 4% pufferolt formalinban (pH=7,4) szobahőn vagy szárazjégen történő gyorsfagyasztást követően -80 °C-on tároltuk.

3.1.2 Iszkémiás állatmodell

A műtéti beavatkozást *ip.* ketamin-xylazin (8:2 arányú keverék) anesztéziában végeztük. A műtét, illetve az 50 perces iszkémiás idő alatt az állatok testhőmérsékletét egy hőmérséklet-szabályozott operációs pad segítségével tartottuk állandó szinten.

Az anesztéziát követően a hasfal leborotválása és betadinos fertőtlenítése után, medián laparotómiát végeztünk. A bal veseartériát és -vénát kipreparáltuk, majd atraumatikus, mikrovaskuláris klip segítségével 50 percre leszorítottuk. Az iszkémiás idő alatt az állatok hasfalát ideiglenes varratokkal zártuk. Közvetlenül az iszkémiás idő lejártá előtt az ellenoldali jobb vesét eltávolítottuk. Az 50 perces iszkémiás periódus lejártakor a klippet felengedtük, a hasfalat rétegesen zártuk.

Az állatok 30 perccel az iszkémia megkezdése előtt a következő *ip.* kezeléseket részesültek:

1. Vehikulum (izotóniás sóoldat; *VEH*).
2. 20 mg/ttkg FLU (Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) (*FLU*).
3. 20 mg/ttkg FLU és 1 mg/ttkg Sigma-1R antagonistá NE100 (Merck Kft, Budapest, Magyarország) (*FLU+NE100*).

Kontrollként korban és súlyban egyeztetett áloperált állatok szolgáltak (n=8-10/csoport).

A FLU hatásos dózisát előkísérletekben határoztuk meg, ahol a 2 mg/ttkg és a 40 mg/ttkg-os dózis nem bizonyult olyan hatásosnak, mint 20mg/ttkg-os adag.

Vizsgálati csoportok

Kísérleteink első részében az állatok túlélését követtük az iszkémiás beavatkozást követő egy hétig. Korábbi kísérleteink alapján a jelen modellben az első hét után életben maradt állatok között további elhullás nem várható. (n=12/csoport)

A vér és veseszövet molekulárbiológiai analizéséhez kísérleteinket megismételtük, majd 24 órás reperfúziót követően az állatokat újra elaltattuk, végül kivéztettük. A vér egy részét vérvizsgálatra EDTA-s vércsőben 4°C-ra raktuk, másik részéből szérumot izoláltunk és további vizsgálatokig -80 °C-on tároltuk. Az eltávolított vesét egyenlő darabokra osztottuk és 4% pufferolt formalinban (pH=7,4) szobahőn vagy szárazjégen történő gyorsfagyasztást követően -80 °C-on tároltuk.

Egy harmadik kísérletsorozat kapcsán multifoton mikroszkópos képalkotás segítségével *in vivo* vizsgáltuk a vesék strukturális és funkcionális károsodását, valamint az intrarenális érátmérő változását az iszkémiát követő 24 órás reperfúzió időpontjában. Az érátmérők elemzésénél további 3 kezelési csoportot vontunk be vizsgálatainkba:

1. 20 mg/ttkg FLU és 10 mg/ttkg nem-szelektív NOS gátló L-NG-Nitroarginin metil észter (L-NAME) (Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) (*FLU+L-NAME*)
2. 20 mg/ttkg FLU és 20 mg/ttkg szelektív eNOS gátló N⁵-(1-iminoetil)-L-ornitin (L-NIO) (Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) (*FLU+L-NIO*)
3. 20 mg/ttkg FLU és 25 mg/ttkg szelektív nNOS gátló 7-nitrondazol (7-NI) (Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) (*FLU+7-NI*)

Az intrarenális érátmérő és a vesék molekuláris biológiai változását külön vizsgálat során a kezeléseket követően 30 perccel, iszkémiás inzultus nélkül is mértük.

Az NE100-at és a NOS gátlókat irodalmi adatok alapján választott dózisokban ⁹³,
¹⁰⁷ a FLU-nal egy időben, azzal ellentétes oldalra adtuk be *ip*.

Az I/R-s kísérletek felépítését az alábbi folyamatábra összegzi (6. ábra)



6. ábra. Az iszkémia/reperfúziós (I/R) kísérletek folyamatábrája. Az állatokat 50 perces iszkémia előtt 30 perccel kezeltük. I/R nélkül, illetve 24 órás reperfúziót követően mértük az intrarenális kapillárisok átmérőjét, valamint vizsgáltuk a renális Sigma-1R – NOS jelátvitelt. 24 órás I/R után elemeztük a vese strukturális és funkcionális károsodását is. Különálló kísérlet kapcsán egy hétig követtük az állatok túlélését.

3.2 *In vitro* kísérletek

Kísérletünkben immortalizált HK-2 (human kidney-2) (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) vese proximális tubulussejteket használtunk. Ezek a sejtek a RAAS összes elemét expresszálják: detektáltak HK-2 sejtekben renin, angiotenzinogén, ACE, ACE 2, AT1-receptor mRNS-t és fehérje expressziót is²³.

A sejteket magas glükóz tartalmú (35mM/L) Dulbecco's Modified Eagle Médiumban (DMEM) tenyésztettük, melyhez 1% glutamint, 1% gentamycint és 10% FCS-t (foetal calf serum) adtunk. Kontrollként normál (5 mM/L) glükózon tartott és magas mannóz tartalmú oldattal kezelt (5 mM/L glükóz + 30 mM/L mannóz) sejteket használtunk. A magas glükózon tartott sejteket 72 órán át kezeltünk ACE-gátló *enalaprillal* (1 uM), ARB *lozartánnal* (10uM), aldosteron antagonistá *spironolaktonnal* (200 nM) és *eplerenonnal* (10uM) (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország).

3.3 Vérnyomás- és pulzusmérés

Diabéteszes vizsgálataink során a 2 hetes RAAS gátló kezelés és a leölés előtt mértük az állatok vérnyomását és pulzusát CODA Standard Tail-cuff (EMKA Technologies, Párizs, Franciaország) módszerrel. Az állatokat egy melegítőpárnán lévő hengerben legalább 37 °C-os testhőmérsékleten tartottuk, majd miután megnyugodtak, a

vérnyomás és pulzusmérésre alkalmas mandzsettákkal mértük a szisztolés, a diasztolés vérnyomást, az artériás középnyomást, valamint a pulzust. Minden állatnál több alkalommal, legalább 3 mérést végeztünk. A módszer pontossága 95%-ban egyezik a gold standardként használt telemetriás eljárással¹⁰⁸. Mivel nem-invazív módszer, jóval kisebb terhelést jelent az állatoknak, ami fontos szempont, mivel a kísérlet utolsó szakaszában az állatok már rossz, urémiás általános állapotban vannak.

3.4 Rutin laboratóriumi vizsgálatok

Minden vizsgálati csoportból az aorta abdominalisból vett vérből vérképvizsgálatot végeztünk, valamint Hitachi-712 automatizált spektrofotométeren fotometriás módszerrel határoztuk meg a szérum karbamid, kreatinin, nátrium, kálium, klorid, albumin, össz. fehérje, glükóz, triglicerid, össz koleszterin és magas denzitású lipoprotein (HDL) koleszterin értékeket. Az alacson denzitású lipoprotein (LDL)-koleszterin számítására a Friedewald képletet használtuk: $LDL\text{-koleszterin} = \text{összkoleszterin} - (\text{HDL-koleszterin} + \text{triglicerid}/2,2)$. A gyűjtött vizeletből kreatinin, fehérje és glükóz mennyiségi meghatározását végeztük el.

3.5 A vesék szövettani vizsgálata

A hagyományos hisztológiai vizsgálatokhoz a vesék egy részét formalinban fixáltuk, majd paraffinbaágyazást követően perjódsav Schiff (PAS) és hematoxilín-eoszinnal festettük. A diabéteszes kísérletsorozatban a fibrózis megítélésére Masson festést alkalmaztunk. A metszetek kiértékelését számmal kódolva, két vizsgáló, egymástól függetlenül végezte fénymikroszkóp (Nikon Eclipse E200-LED. Budapest, Magyarország) segítségével.

A diabéteszes kísérletek kapcsán a mezangális mátrix, az arterioláris hialinizáció és a tubulo-intersticiális fibrózis mértékét, valamint az Armani-Ebstein tubulus-atrófia előfordulását elemeztük. A mezangiális mátrix a glomeruluson belül található, erősen PAS pozitív régió, melynek a glomerulus teljes területéhez viszonyított mennyiségét *Adobe Photoshop* és *Scion image* szoftverek segítségével vizsgáltuk¹⁰⁹. Ilyen módon metszetenként 40 x-es nagyításban 10-15 glomerulus mezangiális mátrix tartalmát mértük le, melyekből átlagot vontunk. Az arterioláris hialinizáció értéke erenként 0-4 között változhat: 0 – nincs az ér lumenébe bedomborodó, PAS pozitív hialin; 1 – az ér

lumenét 4 negyedre osztva, csak az egyik negyedben látható a lument szűkítő PAS pozitív hialin; 2 – az ér 2 negyedét is hialin szűkíti; 3 – az ér 3 negyedében látható hialin; 4 – az érlumen hialinnal kitöltött. 20 x-os nagyítással minden metszetet végignéztünk, és az összes eret megvizsgáltuk. Az Armani-Ebstein lézió vakuoláris tubulusatrófia, melynél a tubulus epitelsejteket a kicsapódó glikogén károsítja, és a PAS pozitív habos glikogén látható az ép szerkezetű epitelsejtek helyett. A Masson festés során kézzel ábrázolódó fibrotikus szövet teljes területhez viszonyított arányát 20 x-os nagyítású képeken elemeztük *Adobe Photoshop* és *Scion image* szoftverek segítségével.

Az I/R-s minták hisztológiai kiértékelése egy pontskála alapján történt, mellyel a glomeruláris és tubuláris károsodás mértékét értékeltük PAS festett metszeteken. A glomeruláris károsodást a hipercellularitás és a kollapszus mértéke alapján határoztuk meg 0-3-ig terjedő skálán, ahol 0-nincs, 1 - enyhe (a sejtek <30%-ában), 2 - közepes (a sejtek 30-60%-ában), 3 - súlyos (a sejtek több mint 60%-ában) hipercellularitás/kacsolumen kollapszus látható. A tubuláris károsodás mértékét az epitélium károsodás, a hámban és a tubulusban lévő hialin mennyisége alapján írtuk le. Az epitélium károsodás fokát 0-4-ig minősítettük a következők szerint: 0-nincs károsodás, 1 - tubulus sejt duzzadás, vakuolizáció, kefeszegély eltűnés, 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 hámban és a tubulusban található hialin mennyisége: 0 - nincs, 1 - kevés, 2 - sok.

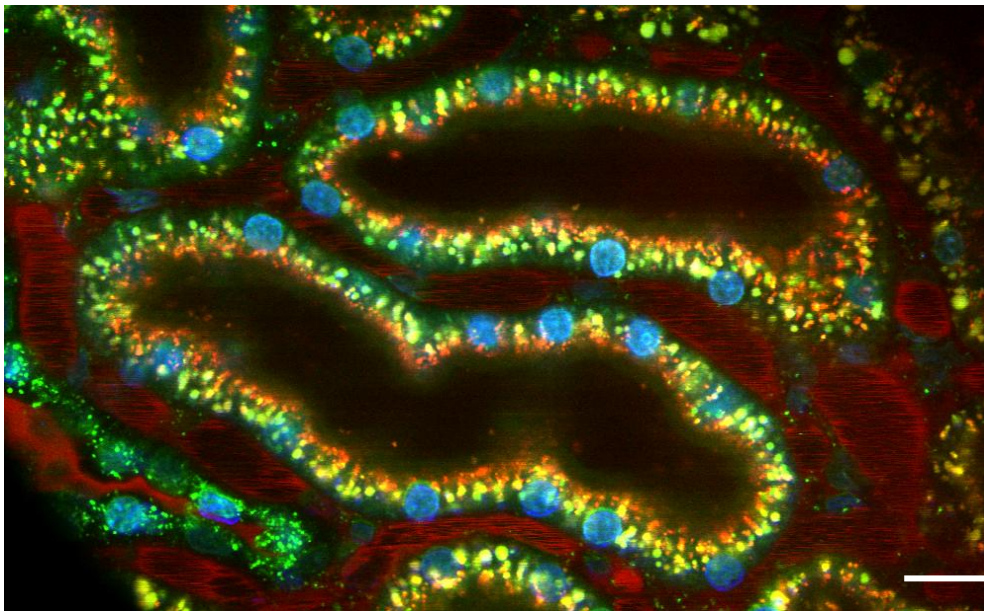
3.6 Multifoton mikroszkópos vizsgálat

A multi-foton mikroszkópia egy konfokális, lézerpásztázó fluoreszcens képalkotó technika, mely alkalmas az élő szövetek mélyebb struktúráinak nagy felbontású vizsgálatára. Az állatokat elaltattuk, a trachea kanülálásával szabadon átjárható légutakat biztosítottunk, majd az artéria karotiszba kanült vezettünk, a fluoroforok bejuttatására. A bal vesét az állat hátára kiemeltük, így helyeztük az objektív fölé.

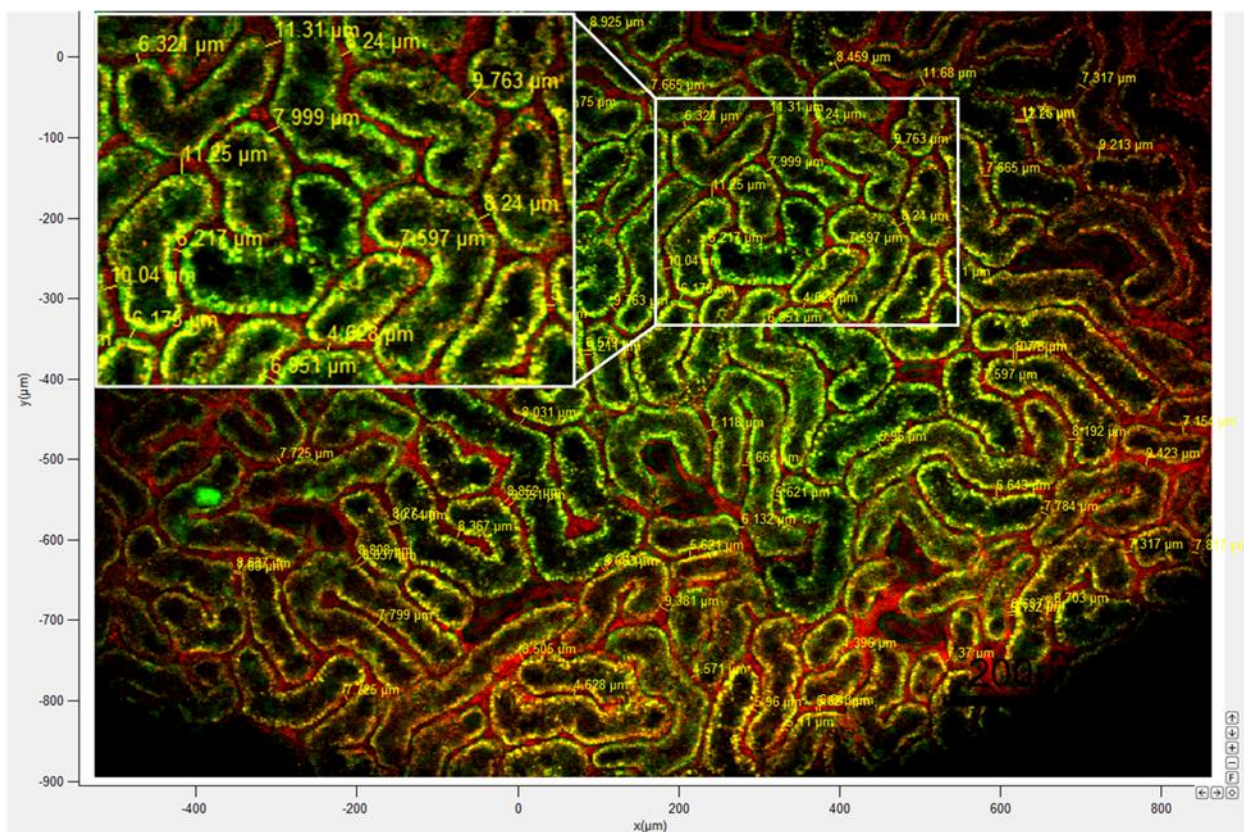
A vesék szöveti struktúrájának megítéléséhez a következő fluoroforokat adtuk be a karotisz kanülön: a Texas Red narancssárga fluorofort, mely az ép kefeszegélyt jelöli, 70kDa dextrán-rodamin konjugátummal pirosan ábrázolódnak az erek, Hoechst 33342-vel kéken világítanak a sejtmagok. A tubulusok autofluoreszcenciájukból adódóan zöld színűek (7. ábra). A képalkotás (Leica TCS SP5 konfokális lézermikroszkóp, Leica-Microsystems, Wetzlar, Németország) során az intakt kefeszegély jelenlétét néztük,

elemztük a sejtmagok integritását, valamint a tubulusok lumenében felhalmozódó nekrotikus szövettörmelék előfordulását.

Az intrarenális érátmérő méréséhez 70kDa dextrán-rodamin konjugátumot jutattunk a patkány arteria karotiszába, így kirajzolódott a vese kapilláris hálózata. Ezt követően *Femto 2D IX* szoftver segítségével mértük meg az erek átmérőjét. Mérésenként 80-100 kapilláris átmérőjét átlagoltuk. A 30 percig tartó folyamatos mérés során percenként készítettünk képet ugyanarról a látótérrel, majd ugyanazokat az ereket mértük le (8. ábra)



7. ábra. A vesestruktúra vizsgálata multifon mikroszkóppal. Kék – Hoechst 33342, sejtmag; Narancssárga – Texas red, kefeszegély; Piros – 70 kDA dextrán-rodamin konjugátum, kapilláris lumen; Zöld – tubulus epitelsejt autofluoreszcencia; 63x nagyítás; lépték 100 μm .



8. ábra. Intrarenális kapillárisok átmérőjének mérése *in vivo* multifoton mikroszkóppal. A 10x nagyítású képen a tubulusokat autofluoreszcenciájuk (zöld, sárga) rajzolja ki, az ereket a 70kDa dextrán-rodamin konjugátum (piros) tölti ki. Az erek átmérőjét egy szoftver segítségével jelöltük be, mértük le (kinagyított ábrarészlet).

3.7 Immunfluoreszcens festés és konfokális képalkotás

A -80°C -on tárolt, $0,5\ \mu\text{m}$ vastag fagyasztott vesemetszeteket kiolvastottuk, majd nedves kamrában 60 percig inkubáltuk foszfát pufferolt sóoldatban (PBS) hígított primer ellenanyagokkal (*mouse* anti-NKA 1:100 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA), *rabbit* anti-Sigma-1R 1:200 (Invitrogen, Life Technologies, Budapest, Magyarország), *goat* anti-Akt 1:500 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA) és *mouse* anti-eNOS 1:500 (BD-Bioscience Transduction Laboratories, Soft Flow Hungary Kft., Budapest, Magyarország) hígításban). Ezt 10 perc PBS-es mosás, majd 30 percig PBS-ben hígított szekunder, fluoroforral konjugált ellenanyaggal (Alexa 488 anti-*mouse*, Alexa 543 anti-*rabbit* illetve Alexa 633 anti-*goat* IgG 1:100 hígításban (Invitrogen, Life Technologies, Budapest, Magyarország)) való inkubálás követte. 10 perces desztillált vízben történő mosás után a sejtmagok megfestéséhez desztillált

vízben hígított Hoechst 33342-t (1:1000 hígításban (Invitrogen, Life Technologies, Budapest, Magyarország)) használtunk. A metszeteket száradás után Vectashield Mounting Mediummal (Vector Labs., Biomarker Kft., Budapest, Hungary) fixáltuk, fedőlemezrel lefedtük, majd a fehérjék renális lokalizációját konfokális képalkotással határoztuk meg.

A jelölt metszeteket Carl Zeiss LSM 510 Meta konfokális lézermikroszkóppal (Carl Zeiss GmbH., Jena, Németország) elemeztük 20x-os és 63x-os nagyítással.

3.8 Western Blot

Az *in vivo* állatmodelljeink kapcsán 100 mg veseszövetet hűtött (4°C) lizáló pufferben [10 mM tris(hidroximetil)aminometán (TRIS) hidrogénklorid (HCl) (1 M) pH=8,0; 60 mM N-2-hidroxi-etilpiperazini-N-etánesulfát sav (Hepes); 100 mM nátriumklorid (NaCl); 0,75 mg/l leupeptin; 1 mM EDTA; 1mM/1 etiléneglikol-tetraecetsav (EGTA) (0,5 M); 0,5 mM fenilmetánszulfonil fluorid (PMSF); 0,1 mM ditiotritol] (Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) Fastprep RP120 homogenizátorral homogenizáltuk. A minták összfehérje koncentrációját spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg. A minták fehérje koncentrációját 1 µg/µl-re állítottuk be. Az *in vitro* kísérletek során ugyanezt az eljárást alkalmaztuk mintánként 5 x 10⁶ sejten.

A fehérjeizolátumot 4x minta pufferben (12,5 mM TRIS-HCl pH=6,7; 4,0 % szódium dodecil szulfát (SDS); 1mM EDTA; 15 % glicerol; 0,01 % bromfenolkék) szolubilizáltuk, majd 10 %-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk meg hűtött rendszerben. Koncentráló gélként 4 %-os SDS-poliakrilamidot használtunk. Mintáink mellett párhuzamosan molekulásúly markert (Precision Plus Protein Standard Dual Color, Bio-Rad Kft, Budapest, Magyarország) futtattunk.

A blottolás során az SDS-poliakrilamid gélről a fehérjéket nitrocellulóz membránra (Bio-Rad Kft, Budapest, Magyarország) elektroblottoltuk, TRIS-HCl, glicin és metanol tartalmú standard transzfer pufferben, hűtött rendszerben. A fehérjetranszfer sikerességét 1 % Ponceau S (Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország), 25 % ecetsav (Reanal Kft, Budapest, Magyarország) tartalmú festékkeverékkel ellenőriztük. Ezután a blottmembránt szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül blokkoló oldatban (5 % zsírintes tejpor, 10 % PBS puffer) inkubáltuk.

Blokkolás után a membránt mosó oldatban (1 % zsírmentes tejpor, 0,1 % TweenTM20 detergens, 10 % PBS puffer) egy órán keresztül inkubáltuk az elsődleges specifikus ellenanyaggal *mouse* NKA 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA), *mouse* α SMA 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA), *rabbit* anti-Sigma-1R 1:200 (Invitrogen, Life Technologies, Budapest, Magyarország), *rabbit* anti-Akt 1:1000 (Cell signaling, Kvalitex Scientific, Budapest, Magyarország), *mouse* anti-eNOS 1:1000 (BD-Bioscience Transduction Laboratories, Soft Flow Hungary Kft., Budapest, Magyarország) és *mouse* anti-nNOS 1:200 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA) hígításban.

4 x 15 perc mosást követően a második, torma-peroxidázzal jelölt ellenanyaggal (*goat anti-rabbit* 1:2000 (Cell signaling, Kvalitex Scientific, Budapest, Magyarország), *goat anti-mouse* 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA)) a membránokat 30 percig inkubáltuk, majd további mosásokkal (4 x 15 perc) távolítottuk el a feleslegben kötött ellenanyagot.

Az ellenanyagot megkötött helyek kemilumineszcens szignálját *ECL plus* reagenssel (GE Healthcare Hungary, Budapest, Magyarország), Diagnosztikai Röntgenfilmen (Medinstall Kft, Budapest, Magyarország) detektáltuk, majd *Quantity One* szoftverrel denzitometráltuk.

3.9 Statisztikai kiértékelés

A statisztikai elemzést *GraphPad* statisztikai programmal végeztük, az eredményeket átlag \pm SD adtuk meg. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

Az állatok túlélését Kaplan-Mayer analízissel (Log-rank test) értékeltük. A hisztológiai eredményeket Kruskal-Wallis és Dunn féle *post hoc* teszttel hasonlítottuk össze. A különböző csoportok laboratóriumi értékeit, vérnyomás és pulzusadatait, intrarenális érátmérőit és a különböző fehérjék mennyiségét ANOVA teszttel hasonlítottuk össze Newman-Keuls post-hoc teszttel kiegészítve.

4. Eredmények

4.1 Diabéteszes nefropátia

4.1.1 Vérnyomás, pulzus

A hét hetes cukorbeteg állatok arteriális középnyomása megegyezett a kontrollokéval és a RAAS gátló kezelések sem befolyásolták a diabéteszes patkányok vérnyomását.

A diabéteszes állatoknál alacsonyabb pulzusértékeket mértünk ($p < 0,05$ vs. Kontroll), melyeket a RAAS gátló kezelések közül csak az aldoszteron antagonisták ($p < 0,05$ vs. Diabétesz) emeltek, közel a kontrollok szintjére. (2. táblázat)

2. táblázat. A kontroll, diabéteszes (D), illetve enalaprillal, lozartánnal, spironolaktonnal, eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok arteriális középnyomása és pulzusa a 2 hetes renin-angiotenzin-aldoszteron rendszert gátló kezelés előtt és után. * $p < 0,05$ vs. Kontroll; § $p < 0,05$ vs. Diabétesz; (n=8/csoport).

		Kontroll	Diabétesz (D)	D+ Enalapril	D+ Lozartán	D+ Spironolakton	D+ Eplerenon
Artériás középnyomás (Hgmm)	Kezelés előtt	105 + 17	117 ± 20	103 ± 33	110 ± 18	118 ± 22	118 ± 25
	Kezelés után	100 + 15	103 ± 21	116 ± 29	109 ± 17	108 ± 19	125 ± 11
Pulzus (/perc)	Kezelés előtt	443 ± 48	366 ± 47*	346 ± 41*	334 ± 39*	349 ± 32*	366 ± 42*
	Kezelés után	422 ± 70	350 ± 49*	356 ± 26*	362 ± 43	400 ± 20 [§]	389 ± 35 [§]

4.1.2 Klinikai paraméterek

A vizsgálataink során mért klinikai paramétereket a 3. táblázat foglalja össze. A cukorbeteg patkányok testtömege kisebb volt a kontroll állatokénál ($p < 0,001$ vs. Kontroll). Valamennyi mért metabolikus szérumparaméter emelkedett a diabéteszes csoportban a kontrollokhoz képest: glükóz ($p < 0,001$ vs. Kontroll), össz koleszterin ($p < 0,05$ vs. Kontroll), LDL-koleszterin ($p < 0,05$ vs. Kontroll), triglicerid ($p < 0,05$ vs. Kontroll). A lozartán és az enalapril kezelés csak a glükóz szintjeit csökkentette a diabéteszes állatokhoz viszonyítva ($p < 0,01$ vs. Diabétesz), míg a spironolakton valamennyi vizsgált értéken javított ($p < 0,01$ vs. Diabétesz), az eplerenon pedig a

testtömeg kivételével szintén jótékonyan hatott az összes paraméterre ($p < 0,05$ vs. Diabétesz).

A cukorbeteg állatok a DNP-ra jellemző renális laboreltéréseket mutatták: magasabb volt a vese-testtömeg indexük ($p < 0,001$ vs. Kontroll), ami vesehipertrófiára utal; magasabb volt a szérumban a karbamid ($p < 0,01$ vs. Kontroll), kreatinin ($p < 0,05$ vs. Kontroll) és kálium ($p < 0,01$ vs. Kontroll) szintjük és alacsonyabb a szérumban a nátrium értékük ($p < 0,001$ vs. Kontroll) a kontrollokhoz képest. Az enalapril kizárólag a vese/testtömeg indexet csökkentette ($p < 0,01$ vs. Diabétesz), a losartán emellett a kreatinin ($p < 0,01$ vs. Diabétesz) és kálium ($p < 0,05$ vs. Diabétesz) értékeit is mérsékelte, míg a spironolakton ($p < 0,05$ vs. Diabétesz) valamennyi, az eplerenon pedig a kreatinin kivételével szintén valamennyi paraméteren javított ($p < 0,05$ vs. Diabétesz).

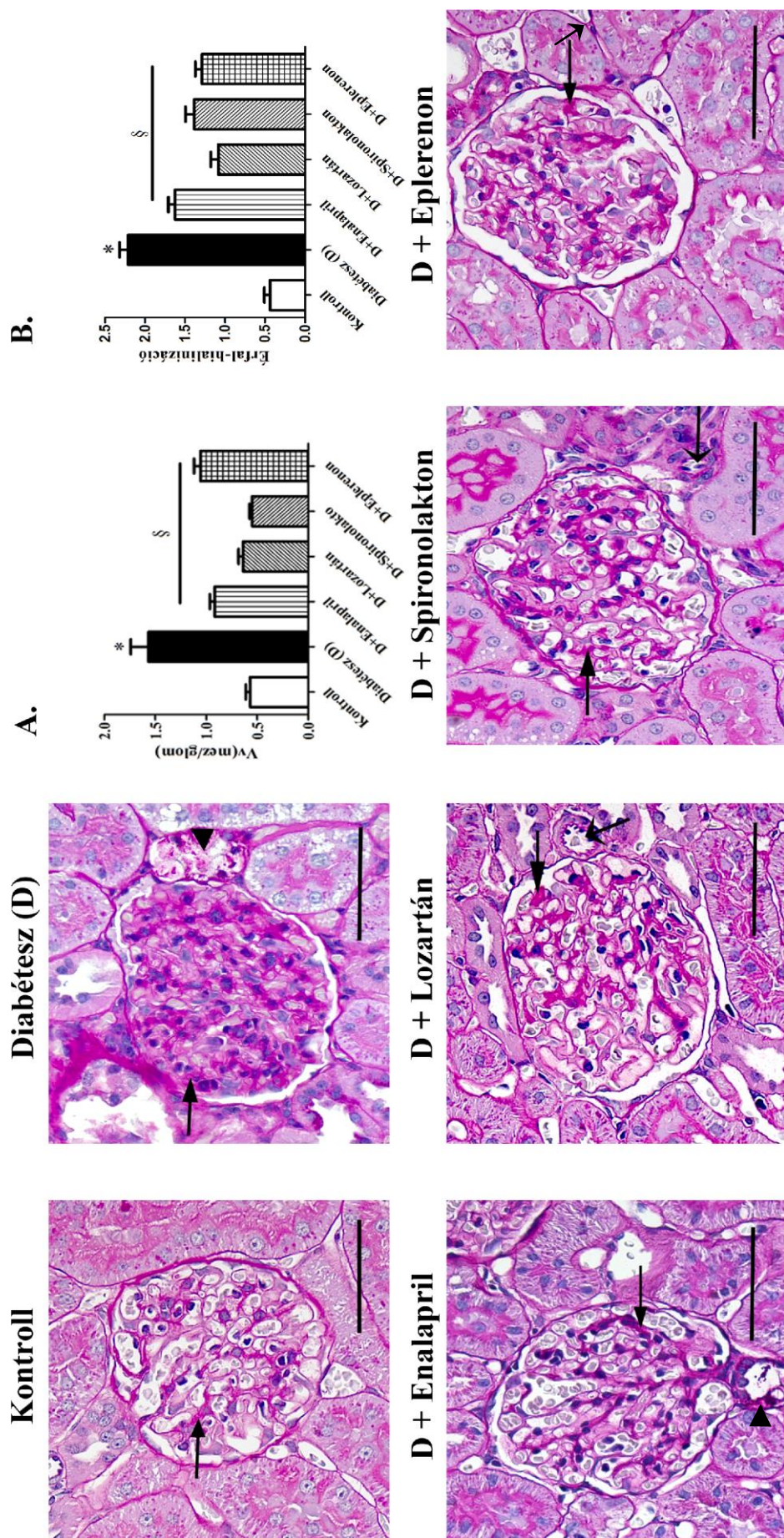
3. táblázat. A kontroll, diabéteszes (D), illetve enalaprillal, lozartánnal, spironolaktonal, eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok testtömege és laboradatai. LDL – alacsony denzitású lipoprotein; ND – nem detektálható. * $p < 0,05$ vs. Kontroll; ** $p < 0,01$ vs. Kontroll; *** $p < 0,001$ vs. Kontroll; § $p < 0,05$ vs. Diabétesz; §§ $p < 0,001$ vs. Diabétesz; §§§ $p < 0,001$ vs. Diabétesz; (n=8/csoport)

Paraméter	Kontroll	Diabétesz (D)	D+Enalapril	D+Lozartán	D+Spironolakton	D+Eplerenon
Testtömeg (g)	342 ± 2	260 ± 5***	256 ± 7	250 ± 11	349 ± 5§§§	273 ± 9
Szérum Glükóz (mmol/l)	11.6 ± 1.1	43.6 ± 3.2***	35.6 ± 5.2§§	36.1 ± 5.9§§	33.2 ± 2.4§§§	38.5 ± 4§§
Szérum koleszterin (mmol/l)	1.72 ± 0.43	4.1 ± 2.3*	3.13 ± 1.64	2.72 ± 0.91	1.64 ± 0.32§§	2.28 ± 0.44§
LDL-koleszterin (mmol/l)	ND	1.63 ± 1.95*	0.65 ± 1	0.48 ± 0.54	ND§	ND§
Szérum triglicerid (mmol/L)	1.32 ± 0.17	4.94 ± 3.7*	4.54 ± 5.17	2.45 ± 1.51	0.79 ± 0.29§§	2.16 ± 1.17§
Vese/testtömeg x 100	0.42 ± 0.01	0.67 ± 0.01***	0.53 ± 0.02§§	0.54 ± 0.01§§	0.56 ± 0.01§§	0.58 ± 0.01§§
Szérum kreatinin (µmol/l)	55.6 ± 0.9	64.6 ± 1.1*	57.8 ± 1.6	54.8 ± 1.2§§	56.7 ± 0.7§§	69.3 ± 1.2
Szérum karbamid (mmol/l)	7.12 ± 0.05	15 ± 0.5**	11.9 ± 0.4	11.93 ± 0.2	8.61 ± 0.2§§	11.4 ± 0.4§
Szérum Kálium (mmol/l)	5.78 ± 0.07	7.26 ± 0.14**	7.24 ± 0.2	6 ± 0.08§	5.34 ± 0.2§§	6.12 ± 0.01§§
Szérum Nátrium (mmol/l)	154 ± 1	135 ± 0.5***	137 ± 0.5	138 ± 0.2	141 ± 0.3§	140 ± 0.3§

4.1.3 A vesék szövettani kiértékelése

A kontroll állatok PAS festett vesemetszetén tág kapilláris lumen ábrázolódott a glomerulusokon belül, az arteriolákban minimális volt a hialinlerakódás mértéke, a tubulusok ép kefeszegély és epitél struktúrát mutattak. A Massonnal jelölt metszeteken a kontrollokban a késsel festődő intersticiális fibrózis mértéke elhanyagolható volt (8., 9. *ábra*). A 8. ábrán látható, hogy cukorbeteg állatokban (D) kialakult a DNP-ra jellemző hisztológiai elváltozás: emelkedett a glomeruluson belül erősen PAS pozitív, kapillárisok lumenét összenyomó mezangiális mátrix mennyisége ($p < 0,05$ vs. Kontroll), az erek lumenét beszűkítő, szintén PAS pozitív arteriális hialinizáció mértéke ($p < 0,05$ vs. Kontroll), valamint megjelent az Armanni-Ebstein vakuoláris tubulusatrófia. A Masson festés kimutatta, hogy a diabéteszes állatokban fokozódott a vese szövetét destruáló intersticiális fibrózis kialakulása ($p < 0,05$ vs. Kontroll). (9. *ábra*)

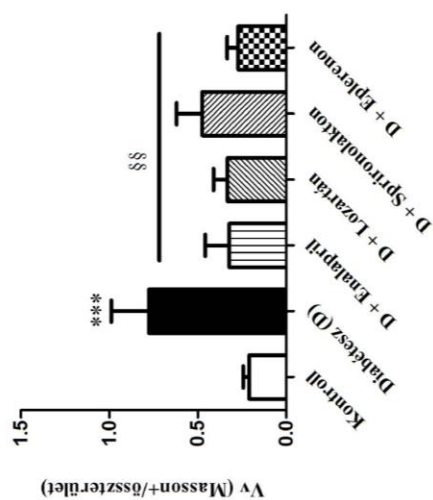
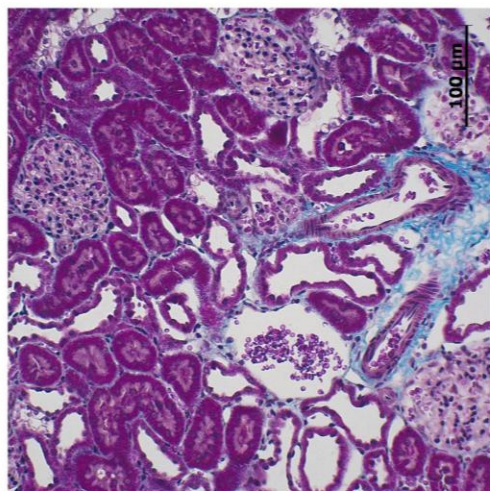
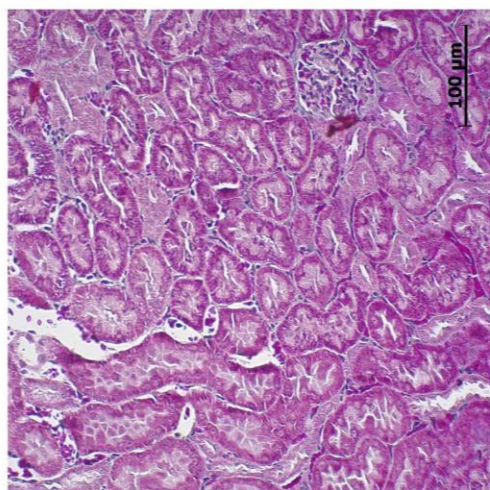
Valamennyi RAAS gátló kezelés mérsékelte a diabétesz indukálta szöveti károsodást: egyaránt csökkent a mezangiális mátrix expansió ($p < 0,05$ vs. Diabétesz), az arterioláris hialinizáció ($p < 0,05$ vs. Diabétesz) és az intersticiális fibrózis ($p < 0,05$ vs. Diabétesz) mértéke (9., 10. *ábra*).



9. ábra Reprezentatív képek Perjódsvav-Schiff festett vesemetszetekből kontroll, diabéteszes, (D) illetve enalaprillal, lozartánnal, spironolaktonnal, eplerenonnal kezelt diabéteszes állatokból. mezangiális mátrix (nyíl) ; arterioláris hialinizáció (nyílt végű nyíl), Armanni-Ebstein lézió (nyílvég); lépték: 50μm. A mezangiális mátrix expansió (A) és erfal-hialinizáció (B) kvantifikált értékeit mutatja a két diagram. *p <0,05 vs. Kontroll; §p <0,05 vs. Diabétesz. (n=8/csoport)

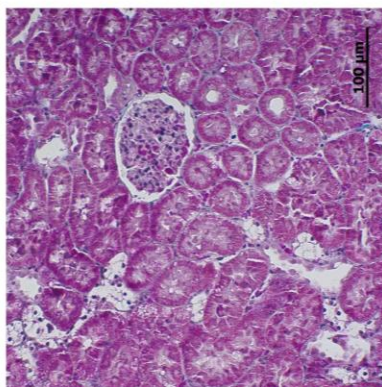
Tubulo-intersticiális fibrózis

Diabétesz (D)

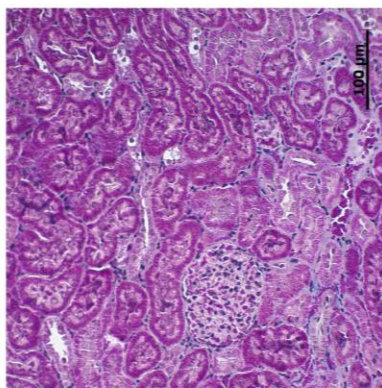


Kontroll

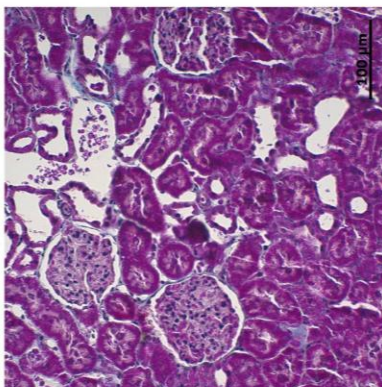
D + Enalapril



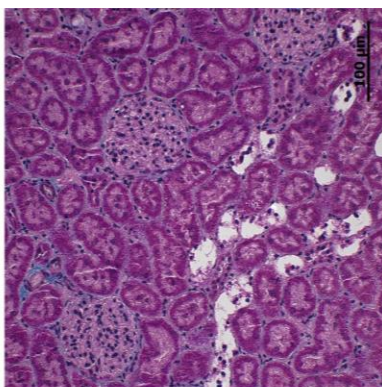
D + Lozartán



D + Spironolakton



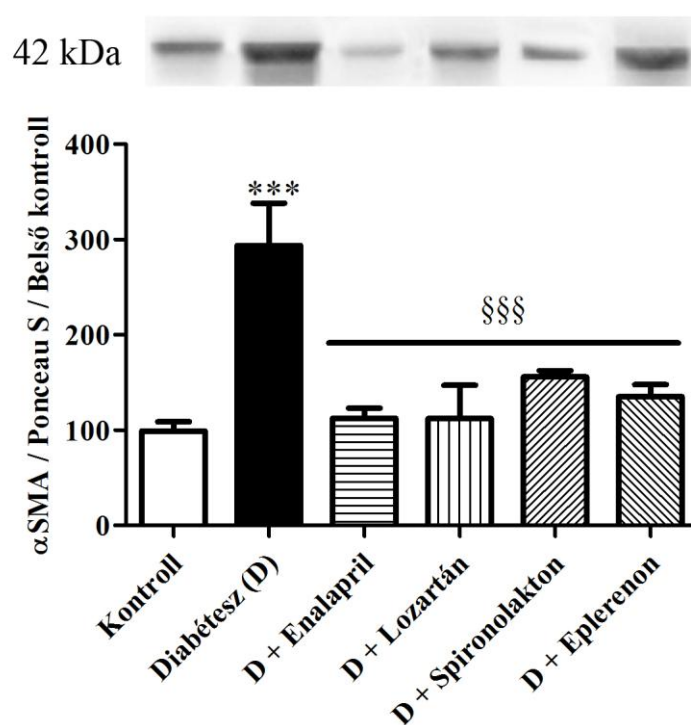
D + Eplerenon



9. ábra. Reprezentatív képek Masson festett vesemetszetekből kontroll, diabéteszes, (D) illetve enalaprillal, lozartánnal, spironolaktonnal, eplerenonnal kezelt diabéteszes állatokból. kék – fibrotikus szövet. A tubulo-intersticiális fibrózis kvantifikált értékeit mutatja a diagram. Lépték: 100 µm. *p < 0,001 vs. Kontroll; §§p < 0,01 vs. Diabétesz. (n=8/csoport)**

4.1.4 A renális α SMA fehérje mennyisége

A DNP patomechanizmusában és a RAAS gátlók hatékonyságának háttérében a fibrózis egyik első lépéseként tekinthető EMT szerepe is feltételezhető, melynek fő markere az α SMA. Az STZ-diabéteszes állatokban megemelkedett a teljes vesehomogenizátum α SMA fehérje mennyisége a kontrollokhoz képest ($p < 0,001$ vs. Kontroll), melyet valamennyi RAAS gátló kezelés csökkentett ($p < 0,001$ vs. Diabétesz). (11. ábra)



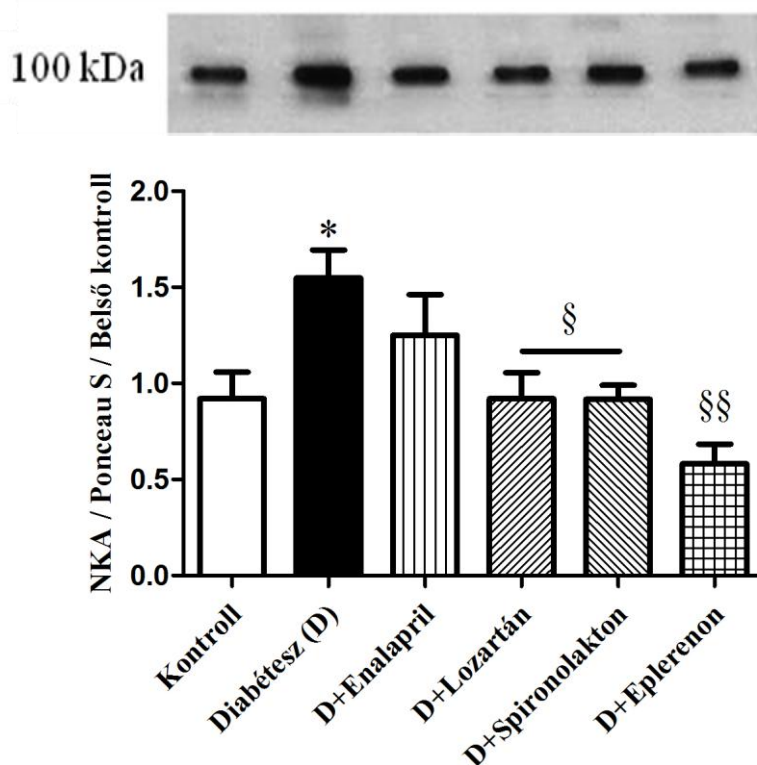
10. ábra. Kontroll, diabéteszes, (D) illetve enalaprillal, lozartánnal, spironolaktonnal, eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok renális α -simaizom-aktin (α SMA) fehérje mennyisége. *** $p < 0,001$ vs. Kontroll; §§§ $p < 0,001$ vs. Diabétesz. (n=8/csoport)

4.1.5 A renális NKA fehérje mennyisége

Korábban már kimutattuk, hogy DNP-ban nő a renális NKA szintje, amit az Ang II tovább fokoz. Jelen vizsgálatainkban különböző RAAS gátlókkal kezelt csoportokban mértük a renális NKA fehérje mennyiségét.

A diabéteszes csoportban megemelkedett a NKA fehérje mennyisége ($p < 0,05$ vs. Kontroll), melyet az enalapril kivételével valamennyi RAAS gátló; ($p < 0,05$ vs.

Diabétesz), legnagyobb mértékben az eplerenon ($p < 0,01$ vs. Diabétesz) csökkentett. (12. ábra)

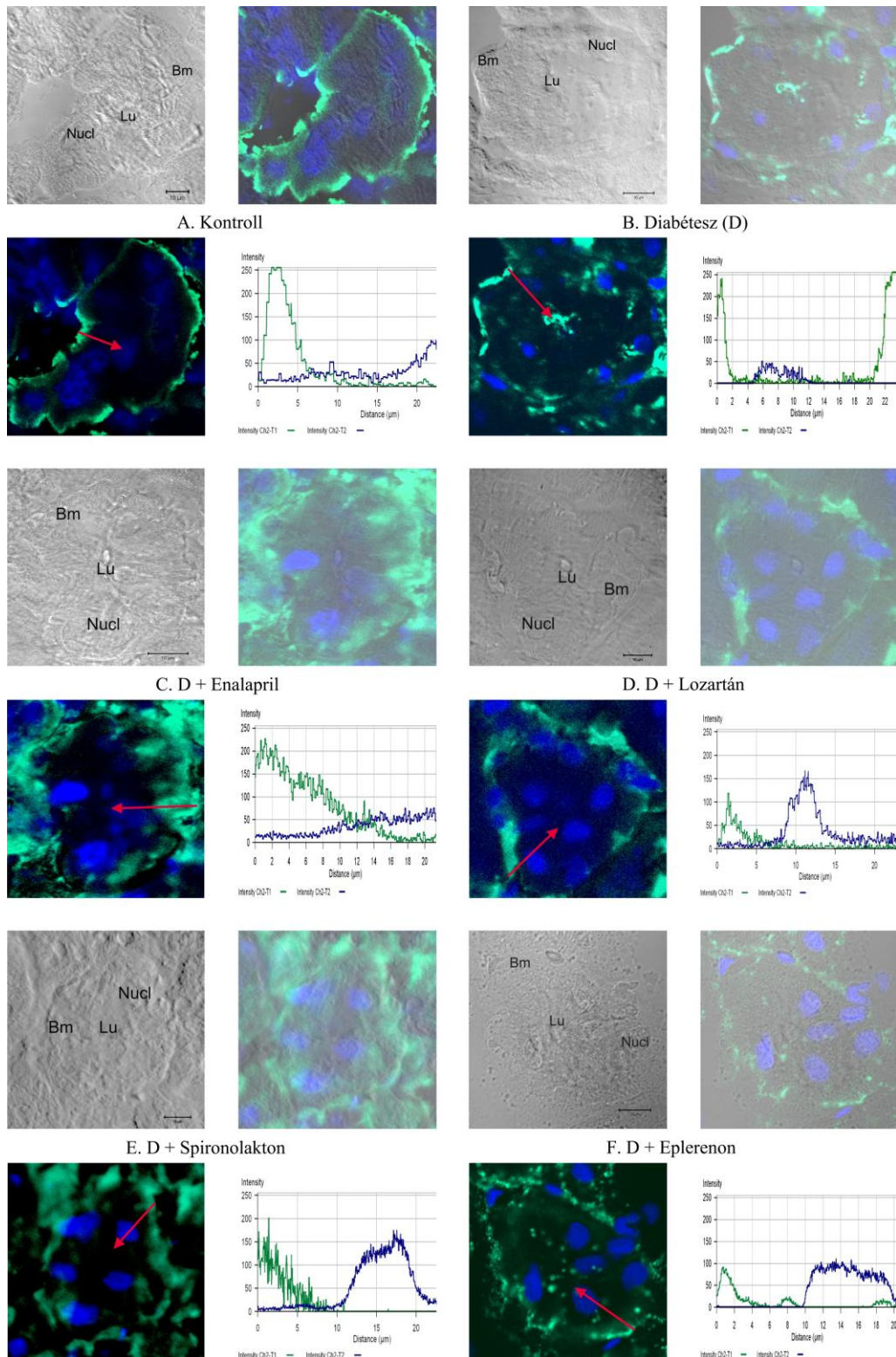


11. ábra. A nátrium/kálim ATPáz (NKA) fehérje mennyisége a kontroll, diabéteszes és enalaprillal, lozartánnal, spironolaktonnal, eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok veséjében. * $p < 0,05$ vs. Kontroll; § $p < 0,05$ vs. Diabétesz; §§ $p < 0,01$ vs. Diabétesz. $n = 8$ /csoport

4.1.6 A NKA renális lokalizációja

Korábbi vizsgálataink alapján a DNP-ban megemelkedett NKA jelentős része nem a fiziológias helyén, a bazál membránhoz kötötten fordul elő, hanem áthelyeződik a citoplazmába, és ezáltal funkcióját veszti. Elképzelhető, hogy a RAAS gátlók megakadályozzák ezt a diszlokációt, és részben így járulnak hozzá a stabilabb vesefunkció kialakításához.

Az immunhisztológiai vizsgálat során kontrollokban a NKA a tubuláris bazálmembrán mentén helyezkedett el. A diabéteszes csoportban megjelent a fehérje az apikális membránon is. Az enzim áthelyeződését az apikális membránra az összes RAAS gátló kezelés kivédte, a citoplazmatikus festődés kiszélesedését az enalapril kivételével valamennyi RAAS gátló kezelés, legnagyobb mértékben a spironolakton mérsékelte. (13. ábra)



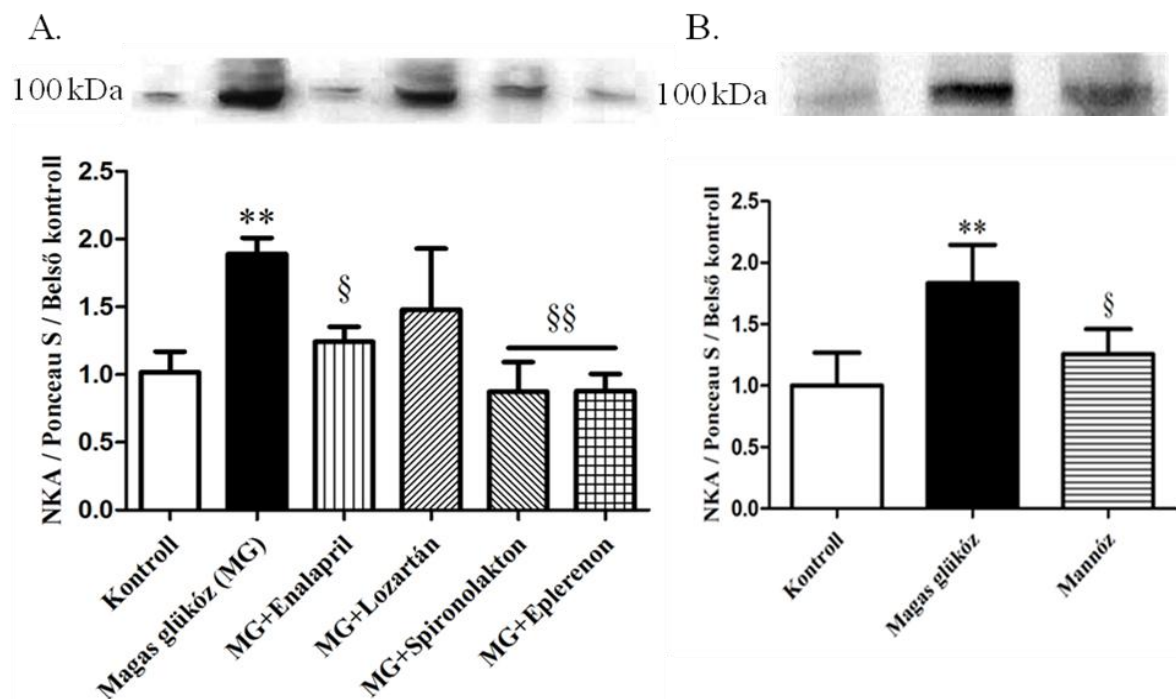
12. ábra. Kontroll, diabéteszes és enalaprillal, lozartánnal, spironolaktonnal, eplerenonnal kezelt diabéteszes állatok reprezentatív immunhisztokémiai képe. Az egyes csoportokban a felső bal kép a fénymikroszkóppal készült kép, a bal alsó az immunfestéssel készült kép, a jobb alsó diagram a jelintenzitás változását mutatja a bal alsó képen lévő piros nyíl mentén, a jobb felső kép összegzi a fény- és konfokális mikroszkópos képeket. Zöld – nátrium/kálium ATPáz, kék – sejtmag. Nucl – sejtmag, Lu – lumen, Bm – bazálmembrán. 63x nagyítás, lépték: 10 μm .

4.1.7 *In vitro* eredmények

A tubulusok NKA-ára kifejtett direkt glükotoxicitás és a glükóz ozmotikus tulajdonságától független hatásának elkülönítésére, valamint a RAAS gátlók effektivitásának elemzésére végeztük el sejt kultúrák kísérleteinket, melynek eredményeit a 14. ábra foglalja össze.

A magas cukortartalmú médiumban tartott HK-2 proximális tubulussejtekben megnőtt a NKA fehérje mennyisége ($p < 0,01$ vs. Kontroll), melyet a lozartán kivételével valamennyi RAAS gátló ($p < 0,05$ vs. Magas glükóz), legnagyobb mértékben az aldosteron antagonisták ($p < 0,01$ vs. Magas glükóz) csökkentették.

A glükóz helyett azonos ozmolaritású mannózos médiumban tenyésztett sejtekben is emelkedett a NKA fehérje mennyisége a kontrollokhöz képest ($p < 0,05$ vs. Kontroll), de nem olyan mértékben, mint a magas glükózon tartott sejtekben ($p < 0,05$ vs. Magas glükóz).



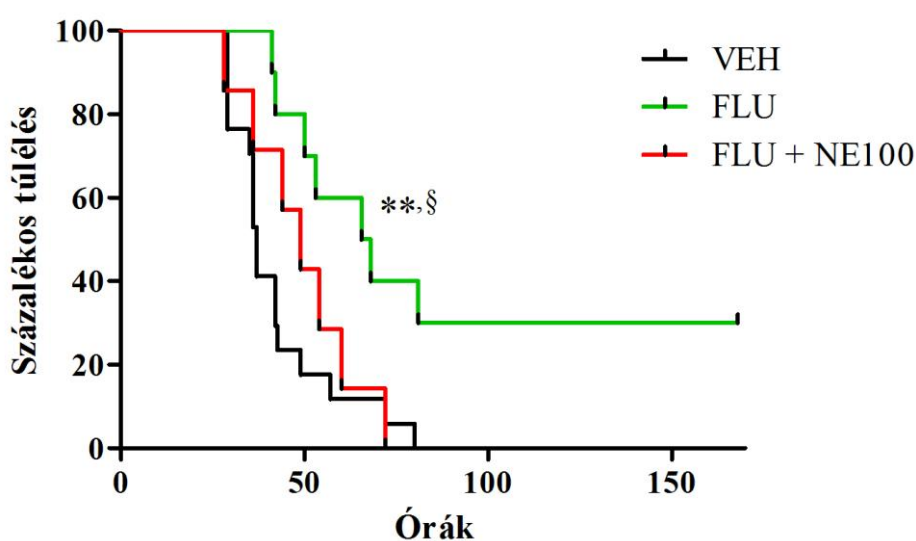
13. ábra. *In vitro* kísérleteinkben mért nátrium/kálium ATPáz (NKA) fehérje mennyiségbeli változása. A. Kontroll, magas glükóztartalmú, magas glükóztartalmú + enalaprillal, lozartánnal, spironolaktonnal vagy eplerenonnal kezelt médiumban tartott HK-2 proximális tubulussejtek NKA fehérje mennyisége. B. Kontroll, magas glükóz- és magas mannóztartalmú médiumban tartott HK-2 sejtek NKA fehérje mennyisége. ** $p < 0,01$ vs. Kontroll; § $p < 0,05$ vs. Magas glükóz; §§ $p < 0,01$ vs. Magas glükóz; $n = 6 \times 10^5$ /csoport

4.2 Iszkémia/reperfúzió

4.2.1 Túlélési eredmények

Az 50 perces renális iszkémiát követően 168 órán keresztül óránként regisztráltuk minden csoportban az állatok túlélését.

A FLU kezelés növelte a posztiszkémiás túlélést a VEH-hoz képest ($p < 0,001$ vs. VEH). A VEH csoportban 36 (29-72) a FLU csoportban 67 (41-168), a FLU+NE100 csoportban pedig 49 óra (28-72) volt az állatok medián túlélése. A FLU csoportban 50 óra elteltével az állatok 70%-a még életben volt, míg a VEH csoportban erre az időpontra a patkányok 90%-a elhullott. A FLU+NE100 csoportban a FLU mellett alkalmazott Sigma-1R gátló kezelés a túlélést közel a VEH csoport szintjére csökkentette ($p < 0,01$ FLU vs. FLU+NE100). A FLU kezelt állatok 30%-a a vizsgált periódus alatt végig túlélte, ezzel szemben a VEH csoportban 70 óra elteltével egy állat sem maradt életben (15. ábra).



14. ábra. Az állatok 50 perces iszkémiát követő túlélése vehikulum (VEH), fluvoxamin (FLU), valamint fluvoxamin + NE100 (FLU+NE100) előkezelés után. ** $p < 0,01$ vs. VEH; § $p < 0,05$ vs. FLU+NE100 (n=12/csoport)

4.2.2 Szérumparaméterek változása

A vesefunkció az iszkémiát 24 órával követően minden kezelési csoportban romlott a kontrollokhoz képest (4. táblázat), így a kreatinin, valamint a karbamid értékekben egyaránt jelentős emelkedést tapasztaltunk ($p < 0,001$ vs. Kontroll). A FLU kezelés csökkentette mind a kreatinin ($p < 0,05$ FLU vs. VEH), mind a karbamid ($p < 0,05$ FLU vs. VEH) értéket a VEH-hoz képest. A FLU+NE100 csoportban a vesefunkciós paraméterek értéke ismét a VEH szintjére emelkedett ($p < 0,05$ FLU vs. FLU+NE100).

4. táblázat. A szérum kreatinin és karbamid értékek változása kontroll, valamint iszkemizált vehikulummal (VEH), fluvoxaminnal (FLU), és fluvoxamin + NE100-zal (FLU+NE100) kezelt állatokban 24 órás reperfúzió után. +++ $p < 0,001$ vs. Kontroll; * $p < 0,05$ vs. VEH; ** $p < 0,01$ vs. VEH; \$\$ $p < 0,01$ vs. FLU; \$\$\$ $p < 0,001$ vs. FLU. n=8/csoport.

	Szérum karbamid (mmol/l)	Szérum kreatinin (μ mol/l)
Kontroll	6,43 \pm 0,5	31,14 \pm 3,39
VEH	45,83 \pm 2,09 ⁺⁺⁺	349,14 \pm 42,56 ⁺⁺⁺
FLU	39,98 \pm 3,01 ^{**,+}	317,92 \pm 11,89 ^{*,+}
FLU + NE100	56,72 \pm 4,48 ^{\$\$\$,+}	353 \pm 19,81 ^{\$\$,+}

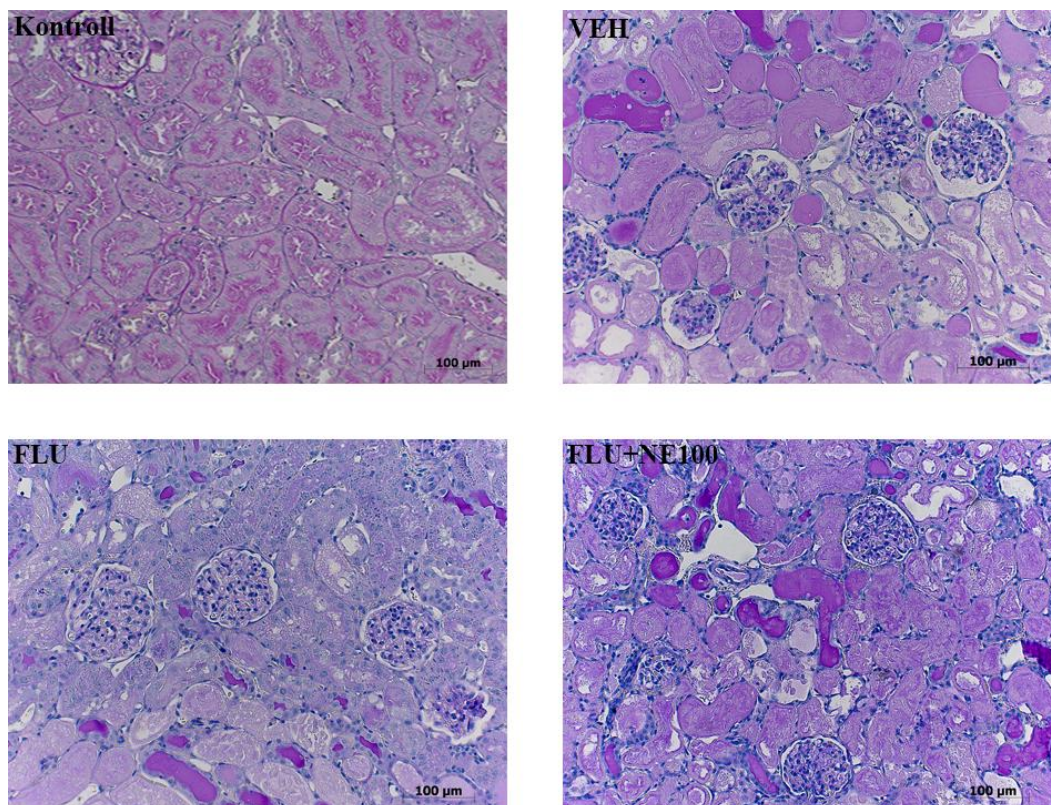
I/R követően a hemoglobin ($p < 0,001$ vs. Kontroll) és hematokrit ($p < 0,01$ vs. Kontroll) értéke csökkent, a fehérvérsejtszám emelkedett ($p < 0,01$ vs. Kontroll) a kontroll csoporthoz képest. FLU kezelés hatására a hemoglobin ($p < 0,001$ vs. VEH) és hematokrit ($p < 0,001$ vs. VEH) szint normalizálódott, a fehérvérsejtszám pedig csökkent ($p < 0,05$ vs. VEH). Az NE100 hatására a VEH csoporthoz hasonló értékeket mértünk ($p < 0,05$ vs. FLU). (5. táblázat)

5. táblázat. A fehérvérsejt szám, a hemoglobin és a hematokrit értékek változása kontroll, illetve iszkemizált, vehikulummal (VEH), fluvoxaminnal (FLU), és fluvoxamin + NE100-zal (FLU+NE100) előkezelt állatokban 24 órás reperfüzió után. +p< 0,05 vs. Kontroll; ++ p< 0,01 vs. Kontroll; +++ p< 0,001 vs. Kontroll; *p<0,05 vs. VEH; ***p<0,001 vs. VEH; \$p<0,05 vs. FLU; \$\$p<0,01 vs. FLU; \$\$\$p<0,001 vs. FLU. n=8/csoport.

	Kontroll	VEH	FLU	FLU+NE100
Fehérvérsejtszám (x10⁹/l)	3,33±0,89	6,24 ± 2,15 ⁺⁺	4,71 ± 1,89 ^{*,+}	6,22 ± 0,58 ^{\$\$,+++}
Hemoglobin (g/l)	135±11	126 ± 10 ⁺⁺⁺	131 ± 5 ^{***,+}	126 ± 6 ^{\$\$,++}
Hematokrit (l/l)	0,42±0,04	0,36 ± 0,03 ⁺⁺	0,4 ± 0,01 ^{***}	0,38 ± 0,01 ^{\$\$\$,+}

4.2.3 A vesék hisztológiai analízise

A kontroll állatok veséje normális struktúrát mutatott, melyet ép sejtmagok és ép kefeszegély jellemez. Ehhez viszonyítva a VEH-mal kezelt, iszkemizált állatok veséjében számottevő glomeruláris és tubuláris károsodást láttunk, mely a glomerulusok hipercellularitásában, a kacsolumenek mérsékelt kollapszusában, valamint a tubulusok epitélsejtjeinek vakuolizációjában és nekrozisában nyilvánult meg. A hámban és a tubulus lumenében hialin lerakódás látszott. A FLU kezelt állatokban a szöveti szerkezet károsodása kisebb mértékű volt, mind a glomeruláris (p<0,01 vs. VEH), mind a tubuláris (p<0,05 vs. VEH) szerkezetekben. A FLU+NE100 csoportban a VEH csoporthoz hasonló mértékű glomeruláris (p<0,01 vs. FLU) és tubuláris (p<0,05 vs. FLU) léziót tapasztaltunk (16. ábra, 6. táblázat).



15. ábra. A vese szövettani szerkezete Perjódsvav-Schiff festett metszetek reprezentatív képén kontroll, iszkemizált vehikulummal (VEH), fluvoxamminal (FLU), valamint fluvoxamin + NE100-zal (FLU+NE100) kezelt állatokban 24 órás reperfúzió után. 20x nagyítás, lépték: 100 µm.

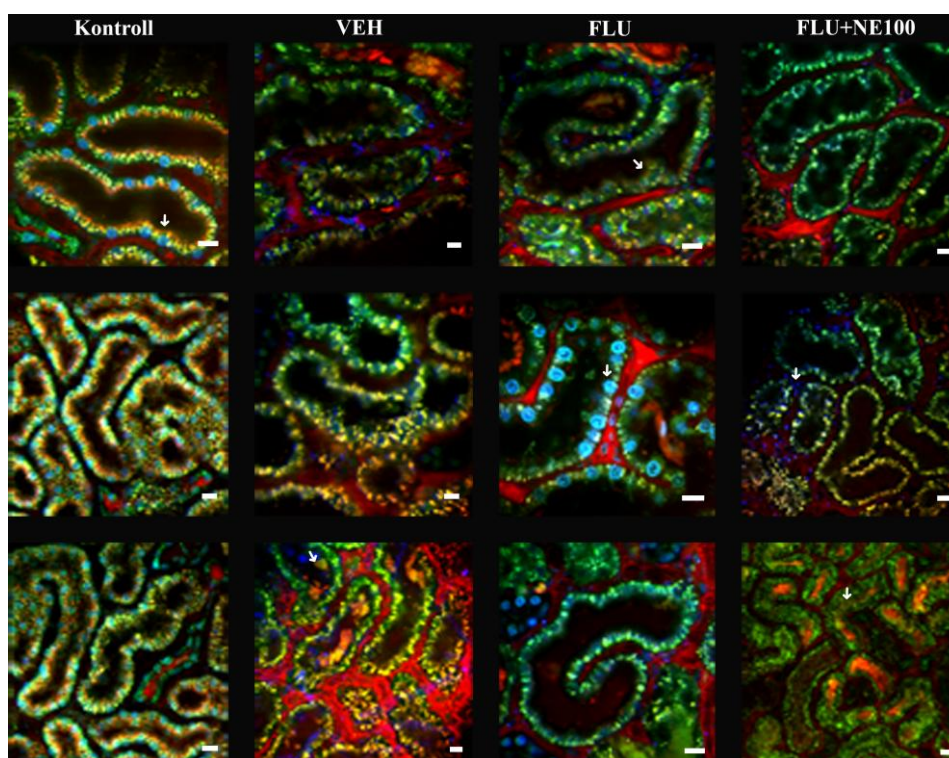
6. táblázat. A glomeruláris és tubuláris károsodás mértéke kontroll és iszkemizált, vehikulummal (VEH), fluvoxamminal (FLU), valamint fluvoxamin + NE100-zal (FLU+NE100) kezelt állatokban 24 órás reperfúzió után. +p<0,05 vs. Kontroll; +++p<0,01 vs. Kontroll; *p<0,05 vs. VEH; **p<0,01 vs. VEH; \$p<0,05 vs. FLU; \$\$p<0,01 vs. FLU. (n=8/csoport).

	Glomerulus hipercellularitás	Glomerulus kollapszus	Glomerulus károsodás	Tubulus károsodás
Kontroll	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,8	0,4 ± 0,2
VEH	1,2 ± 0,84 ⁺⁺⁺	1,6 ± 1,14 ⁺⁺⁺	2,8 ± 1,79 ⁺⁺⁺	8 ± 0 ⁺⁺⁺
FLU	0,4 ± 0,53*	0,7 ± 0,5 ^{**,+}	1,1 ± 0,93 ^{**,+}	7,1 ± 0,86 ^{*,+++}
FLU+NE100	1,5 ± 0,15 ^{\$\$,+++}	1,17 ± 0,15 ^{\$\$,+++}	2,67 ± 0,21 ^{\$\$,+++}	7,67 ± 0,52 ^{\$,+++}

4.2.4 A vesék *in vivo* analízise

4.2.4.1 Szöveti struktúra

A vesék funkcionális és strukturális károsodásának élő állatban történő meghatározására multifoton mikroszkópos képalkotást végeztünk, mellyel a hagyományos fénymikroszkópos analízis során tapasztalt elváltozások alátámasztása mellett további strukturális tényezők vizsgálatára nyílt lehetőség. A kontrollokban funkcionálisan ép kefeszegély ábrázolódott és az epitelsejtek, sejtmagok struktúrája megtartott volt, a tubulusok lumenét nem foglalta el nekrotikus szövettörmelék. I/R hatására eltűnt a tubulusok felszínéről a kefeszegély, a sejtmagok feltöredezték, struktúrájukat veszítették és a tubulusok lumenében jelentős mennyiségű szövettörmelék halmozódott fel. A FLU-nal kezelt állatok veséjében kisebb mértékű volt a károsodás: maradt funkcionális kefeszegély, a sejtmagok integritása jobban megtartott volt és kevesebb volt az elhalt szövettörmelék a lumenben. Az NE100 felfüggesztette a FLU hatását, ismét a VEH csoporthoz hasonló képet láttunk. (17. ábra)

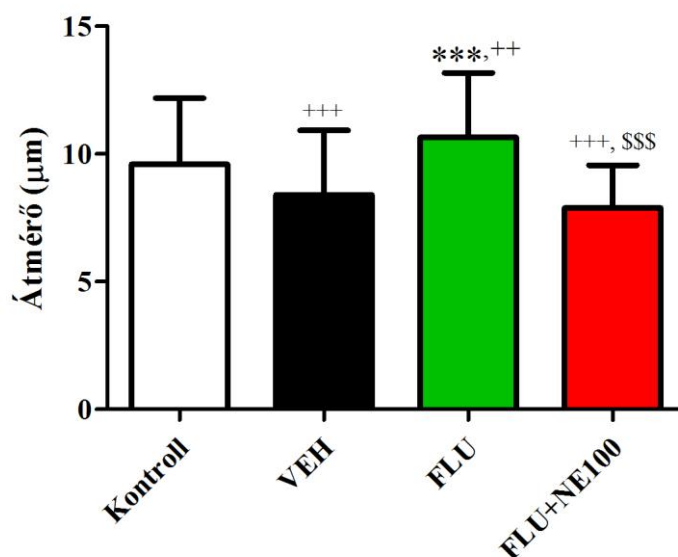


16. ábra. Kontroll, illetve iszkemizált, vehikulummal (VEH), fluvoxaminnal (FLU) és fluvoxamin + NE100-zal (FLU+NE100) előkezelt állatok veséjének multifoton mikroszkópos képe. A felső sor a kefeszegély (nyíl), a középső sor a sejtmag (nyíl) integritást, az alsó pedig a szövettörmelék (nyíl) felhalmozódását mutatja. piros – erek, narancssárga – kefeszegély, kék – sejtmag, lépték: 20 μm .

4.2.4.2 A veseérátmérő változása

Mivel a FLU javította a túlélést és csökkentette a szisztémás gyulladás valamint a vesekárosodás mértékét, és a Sigma-1R agonistájaként befolyással lehet a NOS rendszerre, azt feltételeztük, hogy értágulatot, jobb vesekeringést biztosít, és így fejt ki renoprotektív hatását. Ennek bizonyítására multifoton mikroszkóppal elő állatokban megmértük az intrarenális kapillárisok átmérőjét.

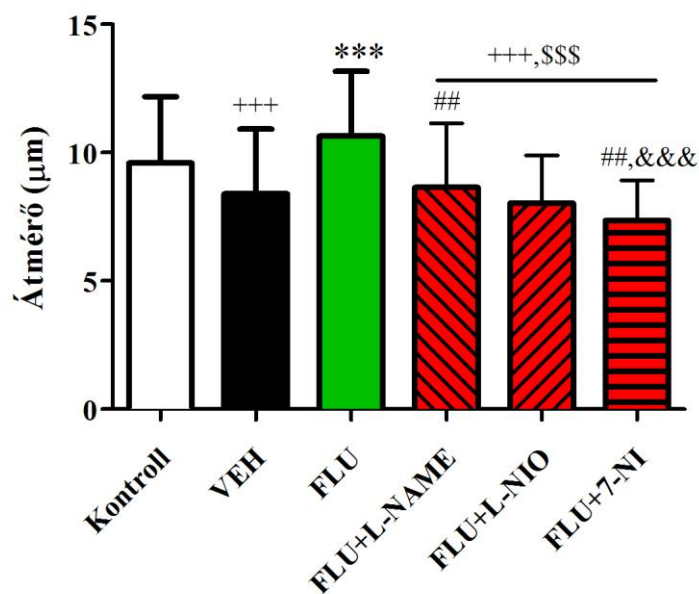
Méréseink alapján 24 órás I/R hatására a veseerek átmérője csökkent ($p < 0,001$ vs. Kontroll), vazokonstrikció alakult ki, míg FLU kezelés hatására megnövekedett érátmérőt tapasztaltunk ($p < 0,001$ vs. VEH; $p < 0,01$ vs. Kontroll). NE100 adását követően ismét kisebb érátmérőt mértünk a FLU kezelt csoporthoz képest ($p < 0,01$ vs. FLU) (18. ábra).



17. ábra: Renális érátmérő a kontroll, valamint iszkemizált vehikulummal (VEH), fluvoxaminnal (FLU), és fluvoxamin + NE100-zal (FLU+NE100) kezelt, állatokban. ++ $p < 0,01$ vs. Kontroll; +++ $p < 0,001$ vs. Kontroll; *** $p < 0,001$ vs. VEH; \$\$\$ $p < 0,01$ vs. FLU. $n = 80-100$ ér/ csoport.

Mivel feltételezzük a NOS rendszer szerepét a FLU értágító hatásában, NOS gátlókat adtunk a FLU-nal egy időben, 30 perccel az iszkémiás inzultus előtt. Mind a három alkalmazott NOS inhibitor felfüggesztette a FLU értágító hatását ($p < 0,001$ vs. FLU), de nem azonos mértékben. A legerősebb hatása az nNOS gátló 7-NI-nek volt, ez nagyobb mértékű érszűkületet váltott ki, mint a nem szelektív NOS gátló L-NAME ($p < 0,05$ FLU+7-NI vs. FLU+L-NAME), illetve az eNOS gátló L-NIO ($p < 0,05$ FLU+7-

NI vs. FLU+L-NIO), melyek közel azonos mértékben függesztették fel a FLU hatását. (19. ábra)

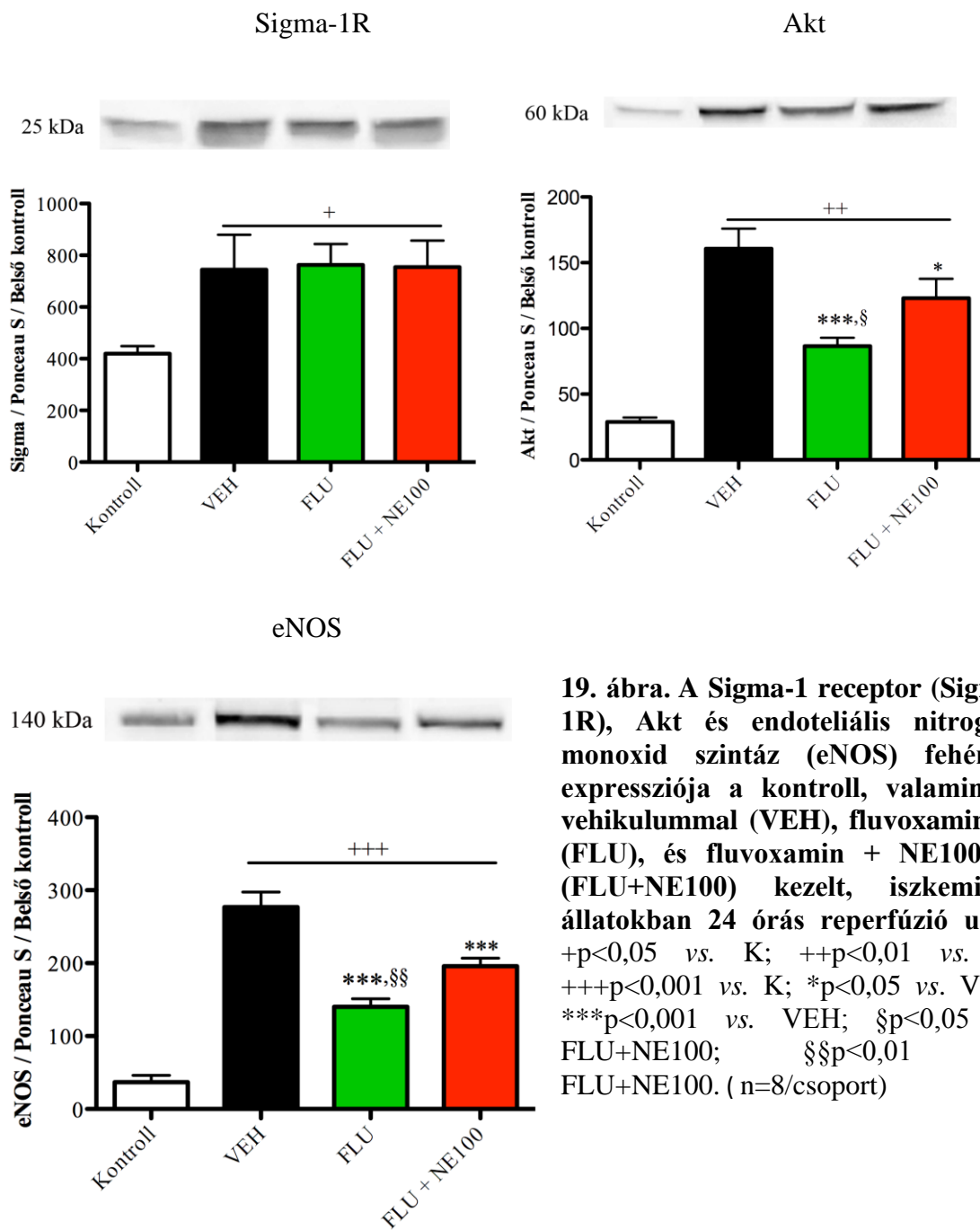


18. ábra. Renális érátmérő a kontroll, valamint iszkemizált vehikulummal (VEH), fluvoxammal (FLU), fluvoxamin + L-NAME-val (FLU+L-NAME), fluvoxamin + L-NIO-val (FLU+L-NIO) és fluvoxamin + 7-NI-vel (FLU+7-NI) kezelt állatokban. +++p<0,001 vs. Kontroll, ***p<0,001 vs. VEH; \$\$\$p<0,001 vs. FLU; ##p<0,05 vs. FLU+L-NIO; &&&p<0,001 vs. FLU+L-NAME. n=80-100 ér/ csoport.

4.2.5 A Sigma-1R-Akt-eNOS fehérjék renális expressziója

Mivel a FLU vazodilatatív hatása mögött a Sigma-1R–Akt–eNOS jelátviteli útvonal szerepe feltételezhető, ezért az egyes kezelési csoportokban mértük mindhárom fehérje mennyiségi változásait.

A renális Sigma-1R, Akt és eNOS fehérjék szintje iszkémiás károsodás hatására 24 órás reperfúziót követően megemelkedett (p<0,05 vs. Kontroll). A FLU kezelés az Akt és az eNOS fehérjék expresszióját a kontrollok szintjére csökkentette (p<0,05 vs. VEH), míg a FLU+NE100 csoportban a Sigma-1R antagonistá hatására ismét emelkedett a proteinek mennyisége (p<0,05 vs. FLU). A Sigma-1R expressziója nem változott az egyes kezelések hatására (20. ábra).



19. ábra. A Sigma-1 receptor (Sigma-1R), Akt és endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) fehérjék expressziója a kontroll, valamint a vehikulummal (VEH), fluvoxaminnal (FLU), és fluvoxamin + NE100-zal (FLU+NE100) kezelt, iszkemizált állatokban 24 órás reperfüzió után. + $p < 0,05$ vs. K; ++ $p < 0,01$ vs. K; +++ $p < 0,001$ vs. K; * $p < 0,05$ vs. VEH; *** $p < 0,001$ vs. VEH; § $p < 0,05$ vs. FLU+NE100; §§ $p < 0,01$ vs. FLU+NE100. (n=8/csoport)

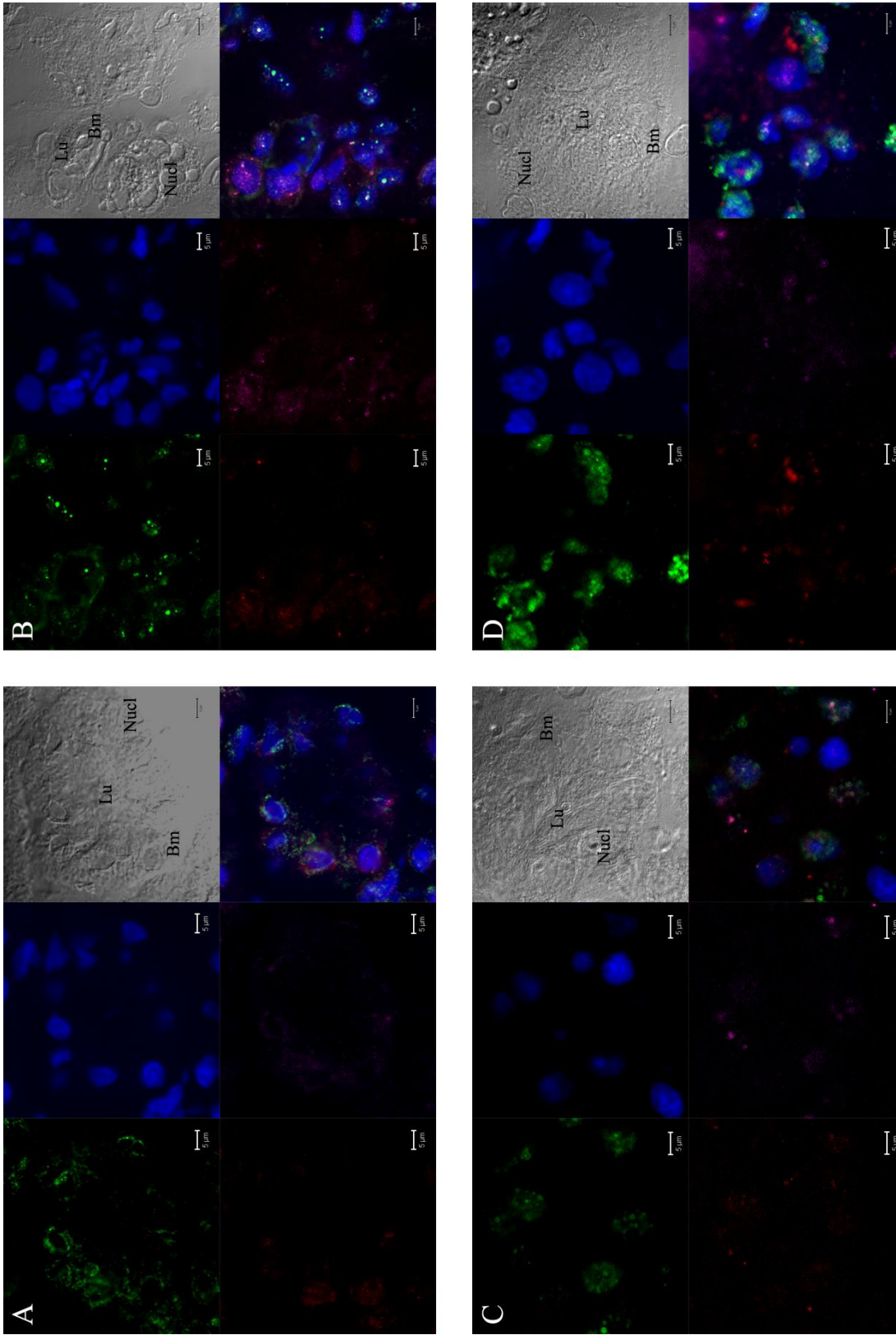
4.2.6 A Sigma-1R-Akt-eNOS fehérjék renális lokalizációja

A Sigma-1R aktiválása kapcsán felmerül a fehérje áthelyeződése a sejten belül, melynek vizsgálatára immunfluoreszcens jelölést alkalmaztunk. A fagyasztott vesemetszeteken konfokális képalkotással a Sigma-1R-Akt-eNOS útvonal fehérjéinek lokalizációját figyeltük meg. Külön elemeztük a tubulusokról és a glomerulusokról készült felvételeket. A képeken az átmeneti fényel készült metszeteken láthatók a vese szerkezeti egységei – a bazálmembrán, a tubulus lumene, a glomerulus és a sejtmagok. Az egyes színek a különböző fehérjéket jelölik, így a zöld az eNOS-t, a piros a Sigma-1R-t, a lila az Akt-ot, kék színnel pedig a sejtmagok ábrázolódnak.

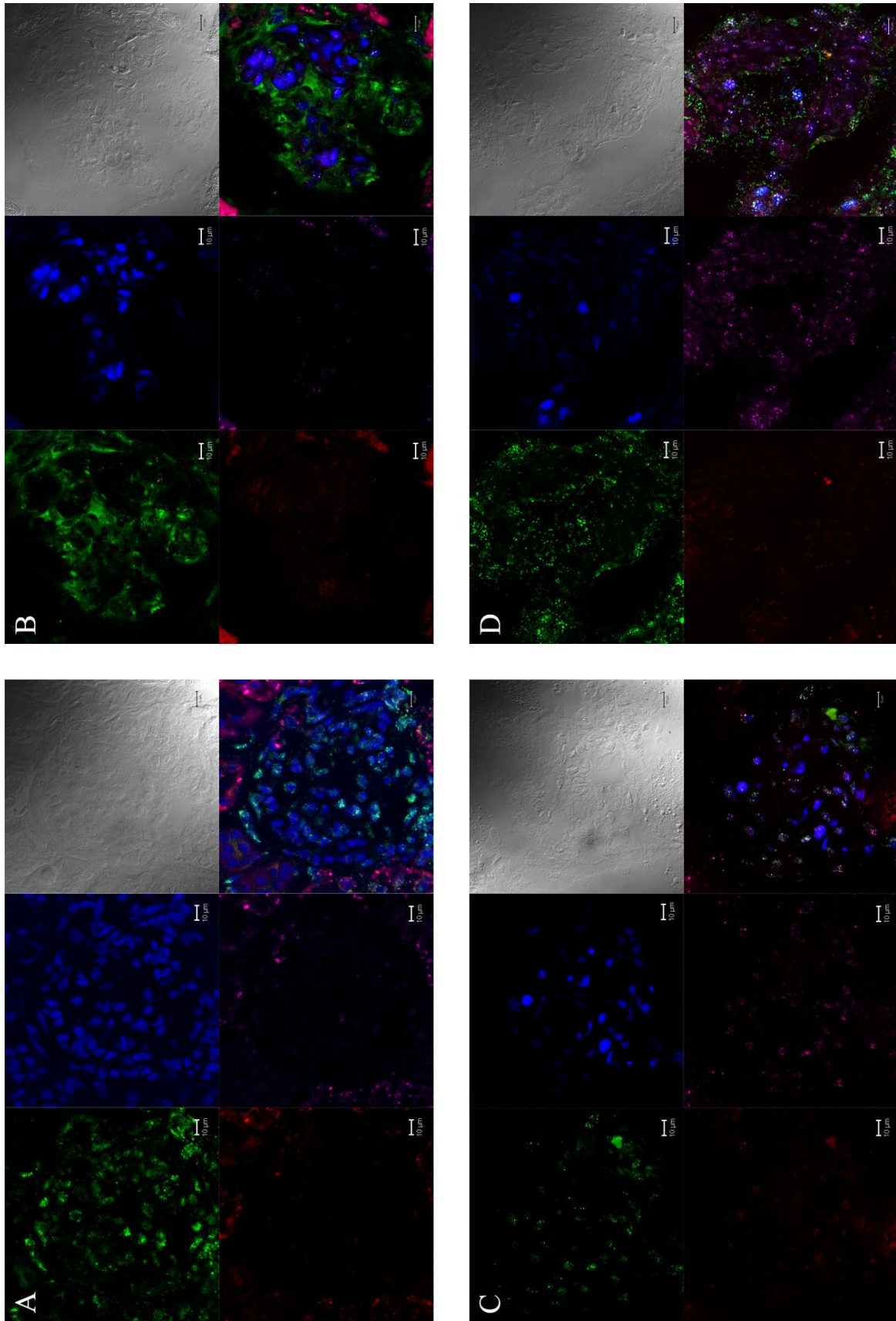
A kontroll állatok, illetve a FLU kezelt veséiben a tubulusok esetén mindhárom fehérje a maghoz lokalizáltan helyezkedett el, míg a VEH és a FLU+NE100 csoportokban a vizsgált proteinek a citoplazmában is kifejeződtek. Az összevetülő képeken a Sigma-1R, Akt és eNOS fehérjék kolokalizációja ábrázolódnak (21. ábra).

A glomerulusok esetén a kontroll csoportban az eNOS kizárólag a maghoz lokalizáltan volt jelen, míg a Sigma-1R és az Akt alig expresszálódott. I/R hatására a VEH csoportban megjelentek a Sigma-1R és Akt fehérjék a glomerulusban, az eNOS pedig áthelyeződött a citoplazmába.

A FLU kezelés csökkentette a Sigma-1R, valamint az Akt glomeruláris expresszióját, az eNOS itt is kizárólag a maghoz asszociáltan volt jelen. A Sigma-1R antagonistá NE100-zal történt kezelést követően a VEH csoporthoz hasonlóan emelkedett volt a Sigma-1R és az Akt mennyisége a glomerulusban, míg az eNOS ismét a citoplazmába helyeződött. A három fehérje a glomerulusokban a tubulusokhoz hasonlóan szintén kolokalizációt mutatott (22. ábra).



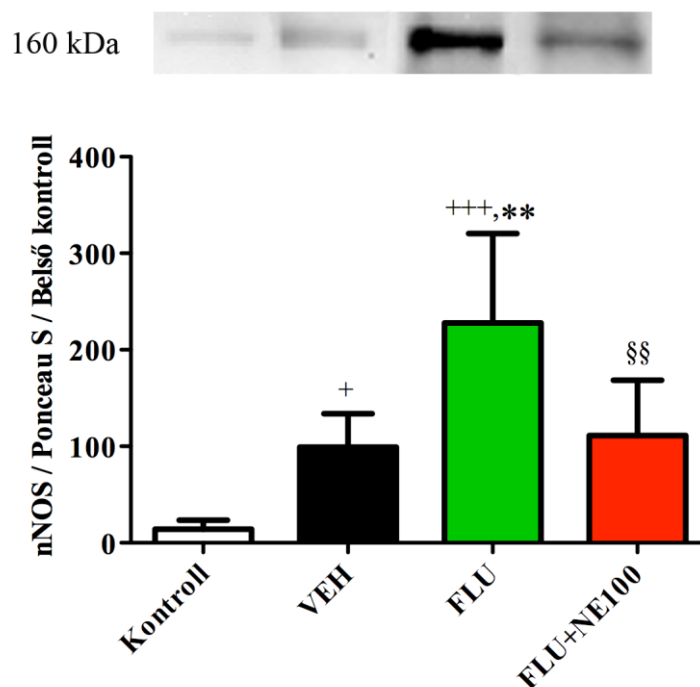
20. ábra. A Sigma-1 receptor (R) – Akt – endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) fehérjék lokalizációja a tubulusokban kontroll (A), valamint iszkemizált, vehikulámmal (B), fluvoxaminnal (C), és fluvoxamin + NE100-zal (D) előkezelt állatokban 24 órás reperfüzió után. Zöld – eNOS, piros – Sigma-1R, lila – Akt, kék – sejtmag; Lu – lumen, Nucl – sejtumag, Bm – bazál membrán, 63x nagyítás, lépték: 5 μm.



21. ábra. A Sigma-1 receptor (R) – Akt – endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) fehérjék lokalizációja a glomerulusokban kontroll (A), valamint iszkemizált, vehikulámmal (B), és fluvoxammal (C), és fluvoxammal + NE100-zal (D) előkezelt állatokban 24 órás reperfüzió után. Zöld – eNOS, piros – Sigma-1R, lila – Akt, kék – sejtmag, 63x nagyítás, lépték: 10 μm.

4.2.7 A renális nNOS fehérje mennyisége

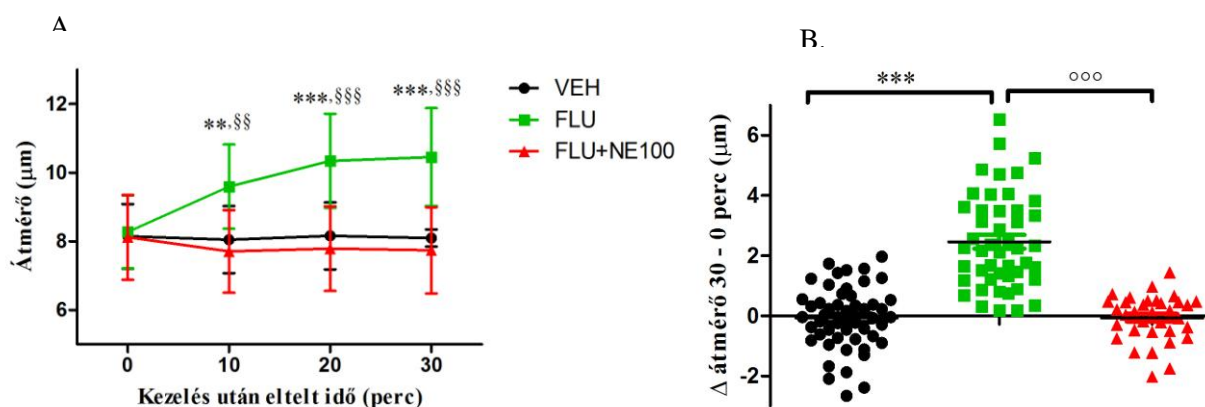
Mivel 24 órás I/R-t követően FLU kezelés hatására a vazodilatátor eNOS szintje csökkent, ugyanakkor a FLU növelte az intrarenális erek átmérőjét, úgy gondoltuk, hogy esetleg egy másik NOS, a nNOS tehető felelőssé ezekért a hatásokért. Ezért lemértük a vesék nNOS fehérje mennyiségét, és azt találtuk, hogy I/R hatására ugyan nőtt a fehérje expressziója ($p < 0,05$ vs. Kontroll), de a FLU kezelt csoportban még több volt a fehérje mennyisége ($p < 0,01$ vs. VEH), és a Sigma-1R antagonistá NE100 hatására ismét a VEH szintjére csökkent ($p < 0,01$ FLU+NE100 vs. FLU). (23. ábra)



22. ábra. A neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) fehérje expressziója a kontroll, valamint az iszkemizált vehikulummal (VEH), fluvoxaminnal (FLU), és fluvoxamin + NE100-zal (FLU+NE100) kezelt állatokban 24 órás reperfúzió után. + $p < 0,05$ vs. K; +++ $p < 0,001$ vs. K; ** $p < 0,01$ vs. VEH; §§ $p < 0,01$ vs. FLU. $n=8$ /csoport

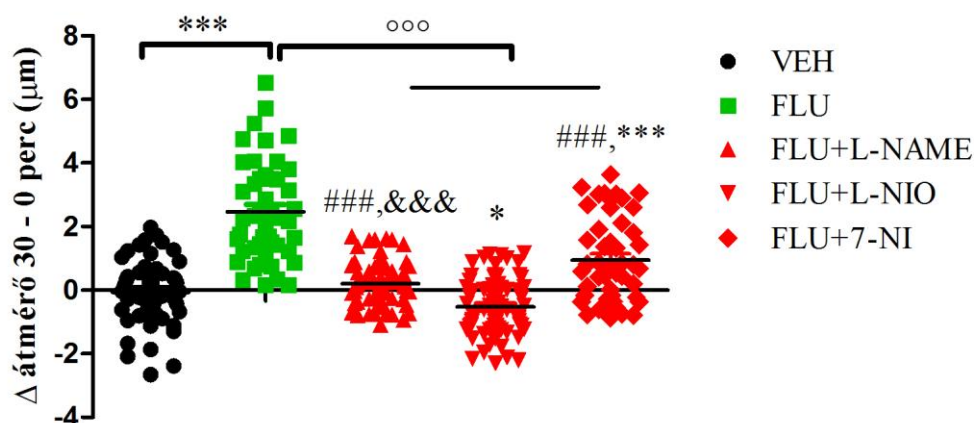
4.2.8 Érátmérők változása 30 perccel a kezelést követően

Mivel 24 órás I/R-t követően a Sigma-1R – Akt – eNOS jelátvitel fehérjei csökkentek, ugyanakkor vazodilatációt tapasztaltunk a FLU kezelt csoportban, ezért azt feltételeztük, hogy 30 perccel a FLU beadása után, tehát az iszkémia kezdetekor már vazodilatáció áll fenn a FLU-nal kezelt csoportban, mely 24 órával később is fennáll. Ezért mértük meg az állatok intrarenális érátmérőjét 30 perccel a FLU ill. a FLU+NE100 beadását követően iszkémia nélkül (24. ábra). A FLU már 10 perccel a beadását követően jelentős értágulatot idézett elő ($p < 0,01$ vs. VEH), 30 perccel a kezelés után átlagosan $2 \mu\text{m}$ -rel nött a kapillárisok átmérője ($p < 0,001$ vs. VEH). Ezt a vazodilatációt a Sigma-1R antagonistá NE100 teljesen felfüggesztette ($p < 0,001$ vs. FLU).



23. ábra. Renális érátmérő változása kontroll állatokban vehikulum (VEH), fluvoxamin (FLU) vagy fluvoxamin+NE100 (FLU+NE100) beadása után 30 perccel keresztül (A), illetve a változás mértéke a 30. percre (B). ** $p < 0,01$ vs. VEH; *** $p < 0,001$ vs. VEH; §§ $p < 0,01$ vs. FLU+NE100; §§§ $p < 0,001$ vs. FLU+NE100; °°° $p < 0,001$ vs. FLU. $n = 80-100$ ér/ csoport.

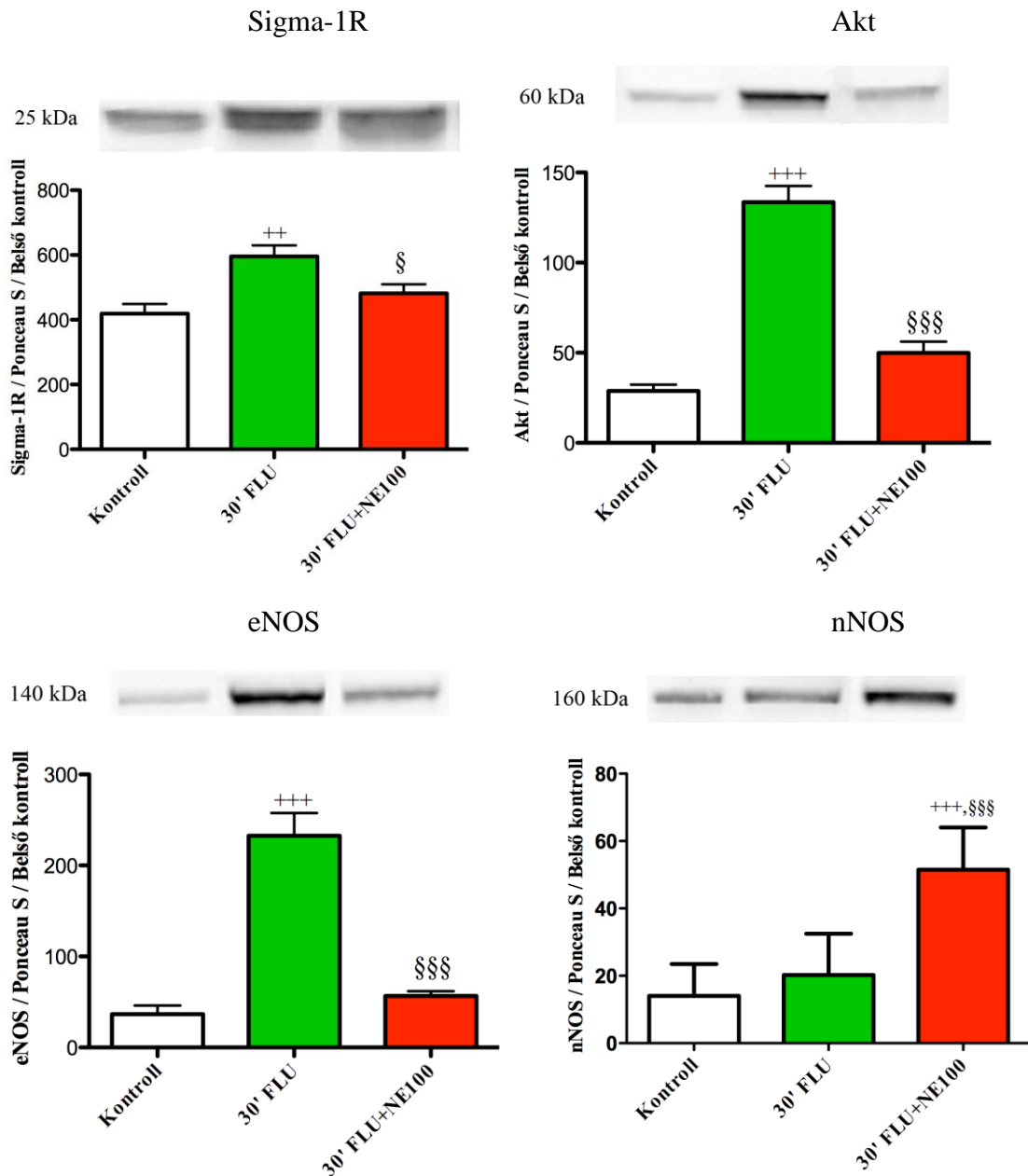
NOS gátlókat adva a FLU mellé azt tapasztaltuk, hogy iszkémiás inzultus nélkül, 30 perccel a hatóanyagok beadását követően a szelektív eNOS gátló L-NIO semlegesítette legnagyobb mértékben a FLU értágító hatását ($p < 0,001$ L-NAME, L-NIO, 7-NI vs. FLU; $p < 0,001$ L-NAME, 7-NI vs. L-NIO), míg a szelektív nNOS gátló bizonyult a leggyengébbnek ($p < 0,001$ vs. L-NAME). (25. ábra)



24. ábra. Az intrarenális érátmérő 30 perccel a vehikulum (VEH), fluvoxamin (FLU), fluvoxamin + L-NAME (FLU+L-NAME), fluvoxamin + L-NIO (FLU+L-NIO) vagy fluvoxamin + 7-NI (FLU+7-NI) beadását követően. * $p < 0,05$ vs. VEH; *** $p < 0,001$ vs. VEH; °°° $p < 0,001$ vs. FLU; ### $p < 0,001$ vs. FLU+L-NIO; &&& $p < 0,001$ vs. 7-NI. $n = 80-100$ ér/ csoport.

4.2.9 A Sigma-1R - NOS rendszer expressziója 30 perccel a kezelést követően

Mivel 30 perccel a FLU beadását követően jelentős intrarenális értágulatot tapasztaltunk, lemértük a vazodilatatív Sigma-1R - NOS rendszerfehérjék expresszióját is. 30 perccel a FLU beadását követően nőtt a Sigma-1R – Akt – eNOS fehérjék expressziója ($p < 0,01$ vs. Kontroll), míg a nNOS nem változott a kontrollokhoz képest. A Sigma-1R antagonistá NE-100 hatására ismét a kontrollok szintjére csökkent a Sigma-1R – Akt – eNOS fehérjék renális mennyisége ($p < 0,05$ vs. 30' FLU), míg a nNOS expressziója megnőtt ($p < 0,001$ vs. Kontroll; 30' FLU) (26. ábra).



25. ábra. A Sigma-1 receptor (Sigma-1R), Akt, endoteliális és neuronális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS, nNOS) fehérjék expressziója a kontroll, valamint 30 perccel a fluvoxamin (30' FLU), vagy fluvoxamin + NE100 (30' FLU+NE100) kezelést követően. $++p < 0,01$ vs. K; $+++p < 0,001$ vs. K; $§p < 0,05$ vs. FLU+NE100; $§§§p < 0,001$ vs. FLU+NE100. (n=8/csoport)

5. Megbeszélés

A diabétesz mellitusz miatt vesekárosodásban szenvedő betegek száma világszerte, így hazánkban is folyamatosan növekszik ²⁴, jelenleg a DNP a felnőttkori veseelégtelenség vezető oka. A DNP talaján kialakuló végstádiumú veseelégtelenséggel kezelt betegek száma is jelentősen emelkedett az utóbbi években ¹, így egyre többen kerülnek transzplantációs listára és várnak veseátültetésre. A NTx hosszú távú kimenetelét számos tényező közül az I/R-s károsodás befolyásolja legnagyobb mértékben ¹⁰. Az I/R pontos patomechanizmusának feltárása új terápiás támpontok kidolgozását segítheti elő, mellyel jelentősen javítható a betegek életminősége és várható élettartama.

A DNP kialakulásában és progressziójában a RAAS túlaktiválódása kulcsfontosságú, kezelésében is a RAAS gátlása az elsődleges ¹¹⁰. Ennek megfelelően mikroalbuminúria esetén a klinikai gyakorlatban az elsőként választandó szerek az ACE gátlók és az ARB-k ⁵, melyek azonban nem lassítják kellő mértékben a DNP progresszióját ¹¹¹. Ezt támasztja alá a közelmúltban megjelent tanulmány, amelyben a lozartán illetve az enalapril kezelés nem védte ki az 1-es típusú diabéteszes, normotenzív, nem albuminúriás betegeknél a proteinúria kialakulását ⁷.

Az aldosteron önmagában is fontos szereppel bír DNP-ban ¹¹², az ún. „aldosteron-szökés” - melynek lényege, hogy az ACE gátlók, illetve ARB-k nem csökkentik kellő mértékben a diabéteszben megemelkedett aldosteron szintet - jelentős mértékben hozzájárul a proteinúria és a vesekárosodás progressziójához ¹¹³. Mindezek ellenére az aldosteron gátlása egyelőre csak kombinációban jön szóba: a spironolaktont jelenleg csak adjuvánsként alkalmazzák DNP-ban, míg az eplerenont, ezidáig csak szívbetegségekben használták ¹¹⁴. Bár jóval specifikusabb és kevesebb antiandrogén mellékhatással rendelkezik, mint a spironolakton, DNP-ban egyelőre törzskönyveztve sincs.

Vizsgálatainkban a különböző RAAS gátlók monoterápiás hatékonyságát hasonlítottuk össze diabéteszes állatmodellben. Eredményeink alapján az aldosteron antagonisták legalább olyan hatékonyak a DNP progressziójának lassításában, mint a rutinszerűen alkalmazott ACE inhibitorok és ARB-k ¹¹⁵.

A RAAS gátlók hemodinamikai hatásától független renoprotektív tulajdonsága az elmúlt években az érdeklődés középpontjában áll. Az ARB olmezartánról kimutatták, hogy a vérnyomás csökkentése mellett antioxidáns tulajdonságú, mely jelentősen növeli

vesevédő szerepét DNP-ban ¹¹⁶. Kísérleteinkben a RAAS gátlók antihipertenzív tulajdonságától független hatását vizsgáltuk, ezért irodalmi adatok alapján olyan dózisokat választottunk, melyek nem csökkentik a vérnyomást, ugyanakkor bizonyítottan gátolják az ACE-t ¹⁰⁴, az AT1-t ¹⁰⁵ és az aldosteront ¹⁰⁶. Eredményeink alapján sem a STZ indukálta diabétesz, sem a RAAS gátlók nem befolyásolták a vérnyomást, ami igazolja a kísérleteink során alkalmazott RAAS gátló dózisok *non-depresszor* mivoltát.

A klinikai gyakorlatban jól ismert jelenség a cukorbetegéknél megfigyelhető nyugalmi tahikardia ¹¹⁷, ugyanakkor a diabéteszes állatokra a nyugalmi bradikardia jellemző ^{118, 119}. Míg embereknél elsősorban a paraszimpatikus beidegzés károsodik, addig a cukorbeteg állatoknál nagyjából ugyanolyan mértékben romlik a szív szimpatikus és paraszimpatikus beidegzése ¹¹³, ami paraszimpatikus túlsúlyt eredményez és így bradikardiához vezet. A diabéteszes állatokra jellemző nyugalmi bradikardia vizsgálatainkban is igazolódott, melyet egyedül az aldosteron antagonisták állítottak vissza a kontrollhoz hasonló pulzusértékekre. Az aldosteron a karotisz szinuszban növeli a NKA szintézisét és aktivitását, ezáltal gátolja a baroreceptorokat és elnyomja a baroreflexet ¹²⁰. Elképzelhető, hogy a diabéteszben megemelkedett aldosteron fokozott baroreflex gátló hatását védi ki a spironolakton és az eplerenon, normalizálva ezáltal a cukorbeteg állatok pulzusát.

Korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan ^{8, 121}, mi is közel 25 %-os elmaradást tapasztaltunk a testtömeg növekedésében a diabéteszes patkányoknál, amit csak a spironolakton kezelés védett ki. Az eplerenon szerkezete egy 9,11-epoxid csoportban különbözik a spironolaktonétól, mely növeli az eplerenon affinitását az aldosteron receptorhoz, ugyanakkor csökkenti kötődését a progeszteron és androgén receptorokhoz ¹⁰³. Ezáltal az eplerenon specifikusabb az aldosteron receptorra nézve, és kisebb mértékben vannak anti-androgén hatásai a spironolaktonhoz képest. Ismert, hogy a STZ indukálta diabéteszben a hím patkányok testtömege kifejezetten csökken, míg a nőstényekre ez nem jellemző ^{122, 123}. Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy kísérletünkben a spironolakton anti-androgén hatása tehető felelőssé a testsúlycsökkenés kivédéséért, és az eplerenon azért nem hat, mert kevésbé kötődik a progeszteron és az androgén receptorokhoz. Végző soron a spironolakton anti-androgén mellékhatása ilyen körülmények között akár előnyös is lehet.

Kísérleteink során valamennyi RAAS gátló csökkentette a diabéteszes állatok emelkedett vércukorértékeit, melynek hátterében a RAAS túlaktiválódása és az

inzulinrezisztencia közötti szoros kapcsolat állhat. Számos vizsgálat igazolja az Ang II^{124, 125} és az aldoszteron^{121, 126} aktív szerepét az inzulinrezisztencia patogenezisében. A RAAS által aktivált NADP-oxidáz komplex fokozott oxidatív stresszt okoz, ami központi szerepet játszik az inzulin szignálkaskád károsodásában^{28, 124}. Bár a STZ a béta sejtek elpusztítása révén hosszútávon teljes inzulinhiányhoz vezet, ismert, hogy hat héttel a STZ beadása után is marad reziduális inzulinaktivitás az állatok szervezetében¹²³. Így feltételezhető, hogy az általunk mért alacsonyabb vércukorértékek a RAAS gátlók inzulinrezisztenciát mérséklő hatásának is tulajdoníthatók.

A cukorbeteg megváltozott zsír és koleszterin anyagcsereje¹²⁷, emelkedett triglicerid szintje¹²⁸ gyorsítja az érlemezésedés folyamatát és jelentősen növeli a szív- és érrendszeri megbetegedések kockázatát¹²⁹. Korábbi állatkísérletekhez hasonlóan¹³⁰ mi is jelentősen emelkedett össz-, LDL-koleszterin és triglicerid értékeket mértünk a diabéteszes csoportban a kontrollokhoz képest. Az aldoszteron antagonisták kifejezetten csökkentették valamennyi lipidparamétert, míg az ACE inhibitor és az ARB hatása jóval kisebb mértékű volt. A spironolakton kapcsán már ismert, hogy diabéteszben javítja a megváltozott lipidanyagcserét¹²¹, de az eplerenon esetében elsőként sikerült bizonyítanunk a gyógyszer lipidcsökkentő hatását. Az aldoszteron antagonisták csökkentik a májsejtek inzulinrezisztenciáját és károsodását diabéteszben¹³¹, ezáltal stabilizálják a lipoproteinek homeosztázisát és javítják a zsíryananyagcserét. Emellett mérséklik a zsírszövet destruálódását, amit a fehér zsírsejtekben diabétesz hatására aktivált gyulladásos kaskád és citokintermelés gátlása révén érhetnek el¹³². Kimutatták továbbá, hogy a spironolakton befolyásolja az adiponektin termelését, ami jelentős szereppel bír a zsírsavak metabolizmusában¹³³. Összességében feltételezhető tehát, hogy az aldoszteron inhibitorok több ponton járulnak hozzá a kedvezőbb zsíryananyagcseréhez.

A cukorbeteg állatok veseműködése beszűkült, melyet emelkedett szérum kreatinin, karbamid, kálium és csökkent nátrium szint, továbbá a vesehipertrófiára utaló emelkedett vese/testtömeg index igazolt. Valamennyi RAAS gátló csökkentette a vese/testtömeg indexet. Ez összefüggésben állhat a RAAS gátlók vércukorszintet csökkentő hatásával, mivel a hiperfiltráció, mely a kompenzatórikusan kialakuló vesehipertrófiához vezet, elsősorban a megnövekedett vércukor fokozott kiválasztásával és ennek ozmotikus vízajtó hatásával magyarázható¹³⁴. A lozartán a vesehipertrófia kivédése mellett csökkentette az emelkedett szérum kreatinin és kálium szinteket.

Az ARB nagyobb hatékonyságát magyarázhatja, hogy ACE-től függetlenül is képződhet Ang II a vesében ¹³⁵, így az AT1 gátlása az alternatívan képződő Ang II hatását is kivédi. A spironolakton valamennyi vesefunkciós értéken javított, az eplerenon pedig a kreatinin kivételével szintén helyreállította az összes paramétert. Feltételezzük, hogy az aldosteron inhibitorok nagyobb effektivitása az „aldosteron-szökés” jelenségével ¹¹³ és az aldosteron DNP-ban kifejtett központi szerepével ¹¹² magyarázható.

Vizsgálataink kapcsán a vesék strukturális károsodására utal a diabéteszes patkányoknál megfigyelhető mezangiális mátrix expanszió, arterioláris hialinizáció, tubulo-intersticiális fibrózis fokozódása és az Armani-Ebstein lézió megjelenése. Az Armani-Ebstein lézió lényegében a tubulusokra ható direkt glükotoxicitás eredménye. A megnövekedett tubuláris glükózfelvétel miatt kicsapódik a glikogén, ami a tubulusok vakuoláris atrófiáját eredményezi ¹³⁶. Mivel kísérleteink során valamennyi RAAS gátló csökkentette a vércukorszintet, valamint a proximális tubulusok glükózfelvétele a vércukorszinttel arányos ¹³⁷, valószínűsíthető, hogy a RAAS gátlók a direkt glükotoxicitás mérséklésével csökkentették a tubulusok károsodását.

A mezangiális mátrix expanszió, az arterioláris hialinizáció és a tubulo-intersticiális fibrózis közös eleme az extracelluláris mátrix felszaporodása, lerakódása és a funkcionális szövet kiszorítása, a kapilláris, arterioláris és tubuláris lumenek beszűkítése, melyek mind a vesefunkció romlását eredményezik. Az Ang II-ről és az aldosteronról is kimutatták, hogy pro-fibrotikus citokinek és növekedési faktorokon keresztül serkentik az extracelluláris mátrix szintézisét a vesében ¹³⁸. A RAAS és a vesefibrózis kapcsolatát alátámasztja a kísérleteinkben tapasztalt, valamint korábbi vizsgálatokban is leírt jelenség, miszerint ACE inhibitorok, ARB-k ¹³⁹ és aldosteron antagonisták ^{140, 141} alkalmazása csökkenti a vesefibrózis mértékét.

A szövetek kötőszöveti degenerációjában kulcsfontosságú folyamat az EMT, mely a fibrózis egyik első lépéseként tekinthető. Az EMT folyamata során az epitélsejtek mezenhimális, mobilis sejtekké alakulnak át, csökken az adhézions fehérjék expressziója és nő a mozgást lehetővé tevő α SMA fehérje mennyisége a sejtekben ¹⁴². Diabéteszben az α SMA pozitív sejtek termelik a felhalmozódó extracelluláris mátrix komponenseket, melyek végül tubulo-intersticiális fibrózis kialakulásához vezetnek ¹⁴³. Vizsgálatainkban megnőtt a diabéteszes állatok veséjében az α SMA fehérje mennyisége, mely az EMT fokozódására utal. Az is valószínűsíthető, hogy a RAAS gátlók DNP-ra kifejtett jótékony hatásában kulcsfontosságú az EMT folyamata, mivel

méréseink során valamennyi RAAS gátló a kontroll szintjére csökkentette az α SMA fehérje expresszióját és így mérsékelte a vese szöveti károsodását.

Az Ang II-ről és aldosteronról is köztudott, hogy fokozzák a TGF β expresszióját, mely az EMT egyik legerősebb induktora¹⁴⁴. Korábbi vizsgálatokban kimutatták, hogy a TGF β jelátviteli útvonalának gátlása kivédi az EMT és a fibrózis kialakulását¹⁴⁵. Emellett kimutatták, hogy az Ang II és az aldosteron TGF β -tól függetlenül is képes az EMT folyamatának beindítására^{146, 147}. Feltételezhető tehát, hogy a RAAS inhibitorai a TGF β gátlásán keresztül és attól függetlenül is mérsékelik az EMT és ezáltal a fibrózis folyamatát. Mindezek mellett a diabéteszben megnövekedett tubuláris glükózfelvétel direkt indukálja a tubulusok EMT-ját¹⁴⁸, amit a RAAS gátlók a szérumban glükóz és így a glükózkínálat csökkentése révén is kivédhetnek.

A glükóz tubuláris transzportja megfelelő Na⁺ grádienssel feltételez, melyet a bazolaterálisan elhelyezkedő NKA biztosít¹³⁷. A NKA-nak jelentős szerepe van a diabéteszben károsodott Na⁺ és glükóz metabolizmus kialakulásában. Ismert, hogy az Ang II inhibitorok befolyásolják a NKA működését¹⁴⁹, de diabétesz kapcsán mindezt csak a retinában mutatták ki az ACE gátlók ilyen irányú védő hatását¹⁵⁰.

Korábbiakban munkacsoportunk igazolta, hogy STZ indukálta diabéteszes patkánymodellben megemelkedett a renális NKA expressziója, ugyanakkor az enzim a bazalmembránról a citoplazma felé áthelyeződött, és ezáltal funkcióját veszítette⁸. Galuska és mtsai. humán proximális tubulussejteken is azt tapasztalták, hogy hiperglikémia hatására NKA a bazolaterális membránról a citoplazmába transzlokálódik¹⁵¹. Korábbi kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy 24 órás nagydózisú Ang II infúzió alkalmazása tovább fokozta a DNP progresszióját és a NKA károsodását⁸.

Jelen vizsgálatunkban a RAAS gátlók - legnagyobb mértékben az aldosteron antagonisták - csökkentették a megemelkedett NKA fehérje mennyiségét és kivédtek az enzim kóros áthelyeződését a tubulusok bazolaterális membránja felől a citoplazmába. Humán proximális tubulus sejt kultúrán kimutattuk, hogy a hiperglikémia önmagában, ozmoláris hatásától függetlenül fokozza a NKA expresszióját, amit az egyes RAAS gátlók kivédnek. A glükóz az angiotenzinogén kódoló gén promotéréhez kapcsolódva direkt fokozza a renális RAAS aktivitását³⁰, melyről igazolták, hogy jelentősen befolyásolja a NKA kifejeződését és lokalizációját¹⁵². Irodalmi adatok alapján ismert, hogy az Ang II gátolja az Akt-indukálta NKA bazolaterális lokalizációt¹⁵³. Elképzelhető tehát, hogy a RAAS inhibitorok a hiperglikémia által kiváltott RAAS aktiváció kivédésével gátolják a NKA expresszió fokozódását és az enzim kóros

áthelyeződését. Összességében azt tapasztaltuk, hogy a RAAS és a direkt glükotoxicitás hatása szorosan összefügg DNP-ban, illetve, hogy a RAAS gátlók mind a glükotoxicitás, mind az AngII és az aldosteron káros hatásait képesek kivédeni.

Eredményeink alapján elmondható tehát, hogy aldosteron antagonisták monoterápiában alkalmazva legalább olyan hatékonyak, ha nem hatékonyabbak a rutinszerűen alkalmazott ACE inhibitorok és ARB-k mellett a STZ indukálta DNP progressziójának kivédésében. Emellett felmerül az EMT és a NKA kórélettani szerepe a DNP kialakulásában és új terápiás támpontként szolgálhat a RAAS gátlók alkalmazása során. Ugyanakkor számos klinikai vizsgálat szükséges eredményeink alátámasztásához, illetve az aldosteron antagonisták monoterápiás alkalmazásának bevezetéséhez a DNP kezelésében.

A jelenlegi terápiás protokollok nem lassítják kellő mértékben a DNP progresszióját ¹¹¹, így a betegek jelentős hányada továbbra is a DNP utolsó fázisába, végstádiumú veseelégtelenségbe kerül. A végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegek számára az ideális terápia a NTx, mely a dialízissel szemben jobb életminőséget, illetve hosszabb túlélést biztosít ¹⁵⁴. A modern immunszuppresszív kezelések révén az akut rejekciók száma jelentősen csökkent, azonban a NTx során elkerülhetetlenül fellépő I/R károsodás, mely a krónikus allograft diszfunkció vezető oka, továbbra is megoldatlan problémát jelent. A renális I/R felelős ezen kívül a késői graftfunkció csökkenés, illetve az akut veseelégtelenség többségéért, ezért számos kutatás irányul az iszkémiás sérülés csökkentésére ¹⁰.

A közelmúlt kutatásainak középpontjába került Sigma-1R elsősorban az agyban és a szívben található, de a vesében is expresszálódik ⁸³, ahol azonban pontos lokalizációja és funkciója nem ismert. Nemrégiben igazolták, hogy a Sigma-1R agonistái protektívek az agy, a retina és a máj iszkémiás károsodásával szemben ^{88, 90, 155}, renális I/R kapcsán szerepét ezidáig nem vizsgálták. A Sigma-1R agonistái közül az antidepresszáns hatású FLU-ról kimutatták, hogy kardiális iszkémiában, valamint nyomástúlterhelés okozta szívkárosodásban protektív, mely mechanizmus hátterében a Sigma-1R által mediált Akt-eNOS jelátviteli útvonal játszik szerepet ¹⁵⁶. Munkánk során elsőként tanulmányoztuk a FLU előkezelés hatását renális I/R-ban a vesekárosodásra, valamint a Sigma-1R – NOS rendszerre. Eredményeink alapján a FLU renoprotektív lehet vese I/R-ban, és ezt a hatását feltételezhetően a Sigma-1R – NOS rendszeren keresztül kiváltott vazodilatációval éri el.

Vizsgálataink során az iszkémiás inzultust megelőzően *ip.* adott Sigma-1R agonista FLU növelte az állatok posztiszkémiás túlélését. A SSRI-ok, köztük a FLU korábbi kutatások szerint csökkentik a szívinfarktust követő morbiditást és mortalitást, melynek hátterében a Sigma-1R-szerepét feltételezik¹⁵⁷. Megállapítottuk, hogy a Sigma-1R antagonistá NE100 FLU-nal együtt adva az állatok túlélését közel a VEH-mal kezelt I/R csoport szintjére csökkentette, tehát a FLU túlélésre gyakorolt jótékony hatása kutatásaink alapján is a Sigma-1R-on keresztül érvényesül.

Kísérleteink során a FLU-nal kezelt csoportban csökkent az I/R-t követően megnövekedett fehérvérsejtszám, mely a szisztémás gyulladási válasz mérséklődésére utal. Az SSRI-okról már korábban bebizonyosodott, hogy a T-sejtek proliferációjának gátlásával, immunmodulációval, valamint a proinflammatorikus citokinek szintjének csökkentése révén gyulladásgátló hatásúak^{158, 159}. Endotoxin okozta gyulladás *in vitro* és *in vivo* modelljében megállapították, hogy a Sigma-1R agonista, SR 31747 a proinflammatorikus citokinek szintjét csökkenti, míg a gyulladásgátlókat növeli¹⁶⁰. Vizsgálták továbbá a Sigma-1R agonisták agyi iszkémiában kifejtett hatását, mivel egyre több bizonyíték van arra, hogy az iszkémia okozta károsodásokban gyulladási mechanizmusok is szerepet játszanak. Szelektív Sigma-1R agonista hatására csökkent az agyi iszkémiás károsodás, mely valószínűleg részben a proinflammatorikus citokinszint csökkenésének és a gyulladásgátló citokin expresszió fokozódásának köszönhető¹⁶¹.

A Sigma-1R agonisták gyulladáscsökkentő hatása minden bizonnyal szisztémásan érvényesül, javítja a keringést, és ezáltal a vese perfúzióját is. Kísérleteinkben tehát a hosszabb túlélés valószínűleg nem csupán a FLU közvetlen renális hatásával van összefüggésben, hanem részben a szisztémás antioxidáns, és keringésjavító tulajdonságának az eredménye. A Sigma-1R antagonistá NE100 a FLU-nak nemcsak a túlélésre, hanem a fehérvérsejtszámra gyakorolt jótékony hatását is kivédte. Ebből arra következtetünk, hogy a FLU a Sigma-1R közvetítésével gyulladásgátló, mely hozzájárul a vesekárosodás csökkentéséhez és a hosszabb posztiszkémiás túléléshez.

Kísérleteink igazolták, hogy a FLU előkezelés mérsékli az I/R inzultus szöveti károsító hatását. A vesében a FLU csökkentette mind a tubuláris, mind a glomeruláris szöveti struktúra sérülését. Multifoton mikroszkópos vizsgálataink alapján I/R-t követően a tubulusok funkcionálisan és strukturálisan is sérültek, eltűnt a felszínükről a kefeszegély, a sejtmagok széttöredeztek és nekrotikus szövettörmelék töltötte ki a tubulusok lumenét. Mindezen elváltozások jelentősen csekélyebbek voltak a FLU

előkezelt csoportban. Egerekben agyi iszkémiában bizonyos SSRI-k növelik a hipoxia-indukált-faktor-1 α szintjét, mely szükséges a sejtek oxigénhiányhoz való adaptációjához, így mérsékelik a hipoxia okozta szöveti léziót¹⁶². A Sigma-1R-ról a közelmúltban kimutatták, hogy aktivációja oxidatív stresszben antiapoptotikus faktorok transzkripcióját növeli, ezáltal csökken a sejtpusztulás¹⁶³. Ez az apoptózist gátló hatás közrejátszhat a Sigma-1R agonista FLU kezelés kapcsán a vese strukturális károsodásának kivédésében. Ehhez társul a Sigma-1R antioxidáns és gyulladáscsökkentő tulajdonsága, mely minden bizonnyal hozzájárul a szöveti károsodás megelőzéséhez. A Sigma-1R antagonistá NE100 a FLU szöveti protektivitását teljes mértékben gátolta, ez bizonyítja, hogy a FLU antiapoptotikus és gyulladásgátló hatása a Sigma-1R-on keresztül megy végbe.

Vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a FLU kezelés mérsékelte a vesefunkció romlását is, melyet a szérum kreatinin, illetve karbamid paraméterek kisebb emelkedése bizonyított. Emellett az I/R hatására bekövetkezett vesekárosodás következtében fellépő, feltételezhetően dilúciós anémia is rendeződött FLU adagolás után, melyet a hemoglobin és hematokrit szint normalizálódása is alátámasztott. A FLU vesefunkcióra gyakorolt jótékony hatását a FLU+NE100 csoportban az NE100 felfüggesztette, mely Sigma-1R mediált hatásra utal.

Multifoton mikroszkópia segítségével *in vivo* mérve az intrarenális kapillárisok lumenét megállapítottuk, hogy I/R-ban a renális erek átmérője csökkent, vazokonstriktió alakult ki, a FLU kezelés pedig növelte a renális erek posztisztkémiás átmérőjét, vazodilatációt eredményezve. A Sigma-1R antagonistá NE100 kezelést követően ismét a I/R-ra jellemző vazokonstriktiót észleltük, vagyis a FLU értágító hatása is Sigma-1R mediált folyamatnak látszik.

Korábbi vizsgálatok szerint az eNOS aktiváció - a vazodilatációt okozó NO termelés fokozása révén - protektív renális I/R károsodást követően⁹⁵. A FLU irodalmi adatok alapján a Sigma-1R – Akt- eNOS kaskád aktiválása révén növeli a NO termelést, így azt feltételeztük, hogy saját kísérleti modellünkben is ez a jelátviteli útvonal érvényesül.

Kimutattuk, hogy bár a Sigma-1R iszkémiában fokozódó expresszióját nem befolyásolta a FLU kezelés, az I/R következtében megemelkedett Akt és eNOS fehérjék szintje FLU kezelés hatására 24 órával az iszkémiát követően a kontrollcsoport szintjére csökkent. Ezek az alacsonyabb eNOS szintek az intrarenális érátmérők mérésekor tapasztalt vazodilatáció mellett látszólag ellentmondásnak tűnnek. Egyik lehetséges

magyarázat, hogy a FLU egy másik NO-ot termelő enzim, a nNOS expressziójára hat. Erre utalnak Western-blotos méréseink is.

A nNOS szerepe az iszkémiás károsodás folyamatában vitatott. Barua és mtsai. a szív iszkémiás károsodása kapcsán írták le, hogy a nNOS bizonyos anyagok kardioprotektivitását fokozza, ugyanakkor gátlása mérsékeli a szív iszkémiás károsodását¹⁶⁴. Nemrégiben mutatták ki, hogy nNOS knock-out egerekben súlyosabb a belek iszkémiás károsodása a kontrollokhöz képest¹⁶⁵, ami szintén a nNOS protektív szerepét feltételezi. A nNOS a vesében a makula denzában fejeződik ki legnagyobb mértékben, és elsősorban az afferens arteriola érátmérőjét szabályozza. Több adat utal arra, hogy a renális nNOS alapvetően védőfunkcióval bír a vesebetegségek szempontjából, mivel fokozott expressziója mérsékli a magas vérnyomás, a diabétesz illetve a hiperlipidémia vesekárosító hatását¹⁶⁶. A nNOS és a Sigma-1R kapcsolatát elsősorban az idegrendszerben vizsgálták eddig, ahol egymást serkentő kölcsönhatásukat feltételezik¹⁶⁷.

Vizsgálatainkban a nNOS fehérje mennyisége ugyan nőtt 24 órás I/R-t követően, de a FLU kezelés hatására sokkal jelentősebb emelkedés volt megfigyelhető a VEH-hoz képest. A Sigma-1R antagonistá felfüggesztette a FLU nNOS emelő hatását, tehát Sigma-1R mediált folyamatról van szó, mely úgy tűnik, hogy protektív a vese I/R károsodása szempontjából.

További magyarázat lehet a 24 órás I/R-t követő western-blotos és érátmérőre vonatkozó eredményeink diszkrépanciájára, hogy a FLU¹⁶⁸ és a NO igen rövid féléletideje miatt már korábban kialakul a vazodilatáció, mely előre felkészíti a vesét az iszkémiás inzultus ellen. Ezért az állatok renális érátmérőjét 30 perccel a FLU beadását követően is mértük. Azt tapasztaltuk, hogy már 10 perccel a FLU kezelés után jelentős vazodilatáció alakult ki a vesében, mely 30 perc után - vagyis a többi kísérletben az iszkémia kezdetekor - átlagos 30%-os érátmérő-növekedést eredményezett. Így azt feltételezzük, hogy a FLU-nal kezelt állatok veséjét jobb oxigénellátottság mellett érte az iszkémiás inzultus a VEH-mal kezeltékhez képest. A Sigma-1R antagonistá NE100 mind a 24 órás I/R utáni, mind a 30 perccel a FLU beadását követően tapasztalt értágulat kialakulását megakadályozta, bizonyítva, hogy a FLU értágító hatása összefügg a Sigma-1R-ral.

Mivel a FLU értágító hatása mögött a NOS rendszer szerepe valószínűsíthető, ezért NOS gátlókat is alkalmaztunk. A nem-szelektív NOS inhibitor mind a 24 órás I/R-t követő, mind a 30 perccel a FLU beadása után kialakuló vazodilatációt felfüggesztette,

igazolva a NOS szerepét a FLU értágító hatása mögött. Az eNOS specifikus inhibitor nagyobb mértékben gátolta a 30 perccel a FLU beadását követő értágulat kialakulását, míg az I/R utáni vazokonstriktiót csak kisebb mértékben függesztette föl. A nNOS specifikus inhibitor éppen ellenkezőleg hatott, vagyis inkább a hosszú távú, 24 órás I/R után kialakuló vazodilatációt függesztette fel, míg a 30 perccel a FLU beadását követően nem volt hatékony. Ebből arra következtetünk, hogy a FLU kezelés után 30 perccel kialakuló, rövid távú értágulat kialakításában inkább az eNOS-nak, míg a 24 órás I/R-t követő, hosszú távú vazodilatációban a nNOS-nak van kulcsfontosságú szerepe. Ezt támasztják alá Western-blotos eredményeink is: 30 perccel a FLU kezelést követően nőtt a Sigma-1R - Akt - eNOS fehérjék mennyisége, míg a nNOS expressziója nem változott. A kísérleteink során tapasztalt regenerálódott renális keringés tehát valószínűleg a FLU által kiváltott NOS aktivációval lehet összefüggésben, ami vazodilatációt eredményezett. Mivel a FLU+NE100 csoportban a Sigma-1R antagonistá NE100 megakadályozta a FLU NOS expressziót változtató és érátmérőt fokozó hatását, feltételezzük, hogy a NOS aktiváció a Sigma-1R közvetítésével valósul meg.

A Sigma-1R aktiválódásáról kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Egyes források szerint bizonyos agonisták hatására fokozódik a Sigma-1R mRNS expressziója⁸⁴, míg más kutatások alapján a Sigma-1R transzlokációja vezet aktiválódásához¹⁶⁹. Hayashi és mtsai. azt találták, hogy az endoplazmás retikulumot érő stresszhatás a Sigma-1R-ok *upregulációját*, a transzkripció aktivitás fokozódását, valamint a receptorok transzlokációját okozza. Rövid ideig tartó károsító hatás esetén a Sigma-1R *upreguláció* elhúzódott, azonban hosszabb távon fennálló *noxa* esetén mRNS expressziója ismét csökkent¹⁶⁹. Korábban leírták azt is, hogy a Sigma-1R inaktív állapotban az ER-ban helyezkedik el, ahonnan aktiváló inger hatására a plazmamembránhoz transzlokálódik⁸⁵.

Méréseink során a Sigma-1R-Akt-eNOS fehérjék I/R-t követő lokalizációja FLU hatására megváltozott. A kontroll állatokban a tubulusokban maghoz lokalizált fehérjék I/R károsodás következtében a citoplazmába is átkerültek, mennyiségük emelkedett. A glomerulusok esetén kontrollokban az eNOS a maghoz lokalizáltan helyezkedett el, Sigma-1R és Akt jóformán nem volt detektálható, míg iszkémiát követően az utóbbi két fehérje szintje megnőtt, az eNOS pedig a citoplazmában is kifejeződött. Ebből arra következtethetünk, hogy az I/R indukálja a Sigma-1R-Akt-eNOS útvonal aktivációját, melynek hatására megváltozik a fehérjék lokalizációja. FLU kezelt állatokban mind a tubulusokban, mind a glomerulusokban a kontrollesoporthoz hasonló képet mutatott a fehérjék lokalizációja, tehát mindhárom fehérje ismét a mag közelében volt. Sigma-1R

antagonista NE100 hatására a fehérjékre ugyanaz a lokalizáció volt jellemző, mint kezeletlen iszkémiát követően, tehát meggátolta a FLU hatását.

Konfokális képalkotásunk során tehát bebizonyosodott, hogy a fehérjék áthelyeződése feltételezhetően szerepet játszik a Sigma-1R aktiválásában.

Eredményeink alapján a krónikusan, jelentős mellékhatások nélkül a klinikumban már alkalmazott FLU védő funkcióval bír renális I/R károsodás során. Renoprotektivitása háttérben pedig a FLU vazodilatatív hatását és a Sigma-1R - NOS rendszer szerepét feltételezzük.

6. Következtetések

PhD munkám során célunk a krónikus vesekárosodáshoz vezető DNP, illetve a renális I/R károsodás patomechanizmusának leírása, illetve a terápiában használható új célmolekulák feltérképezése volt. Eredményeink alapján elmondható, hogy a DNP kezelésében az aldosteron antagonistáknak is helye lehet a rutinszerűen alkalmazott ACE inhibitorok és ARB-k mellett, illetve hogy a RAAS gátlók renoprotektív hatásukat részben az EMT folyamatának gátlásával, részben a NKA stabilizálásával fejthetik ki. A DNP progressziójának lassításával mérsékelhető a diabétesz talaján kialakuló végstádiumú veseelégtelenség előfordulása, mely a NTx szükségét csökkenti.

Ugyanakkor a NTx hosszú távú kimenetelét legnagyobb mértékben befolyásoló I/R károsodást a krónikusan, jelentős mellékhatások nélkül már alkalmazott antidepresszáns FLU hatékonyan csökkenti. Ennek a renoprotektivitásnak a hátterében a Sigma-1R hatására létrejövő, NOS mediált vazodilatáció állhat. A FLU kezelés rövidtávon a Sigma-1R – eNOS tengely mentén, míg I/R során a Sigma-1R – nNOS útvonalon fejtheti ki értágító, ezáltal stabilabb vesekeringést biztosító hatását.

Abban bízunk, hogy eredményeink az ismeretlen utak felderítése mellett új terápiás területeket nyithatnak már törzskönyvezett gyógyszerek számára, bővítve ezzel a krónikus vesekárosodás kezelésében használható készítmények kelléktárát.

1. 7. Összefoglalás

A diabéteszes nefropátia (DNP) jelentős népegészségügyi probléma, patomechanizmusa nem tisztázott, terápiája nem megoldott. A DNP szövettani elváltozásai közül kiemelendő az epiteliális-mezenhimális tranzíció (EMT) folyamata, melynek során az epiteliális sejtek kötőszövetes tulajdonságokat vesznek fel és alfa-simaizom aktint (α SMA) termelnek.

Az EMT kialakulásának egyik meghatározó tényezője a diabéteszben aktiválódott renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS). Korábbiakban állatkísérletes modellen kimutattuk, hogy a vese diabéteszben létrejövő strukturális károsodását az angiotenzin (Ang) II adása tovább rontja. Igazoltuk, hogy a folyamat során a veseműködésben központi jelentőségű renális nátrium/kálium ATPáz (NKA) működése is károsodik.

Jelen kísérleteink egyik célja a klinikumban használt különböző RAAS gátlók hatásának összehasonlítása, különös tekintettel az EMT folyamatára és a NKA változására. Eredményeink alapján az aldoszteron antagonisták legalább olyan hatékonyak a DNP progressziójának kivédésében, mint az angiotenzin I konvertáló enzim (ACE) gátlók és Ang II receptor blokkolók (ARB-k). Hatékonyságuk hátterében szerepet játszhat a NKA stabilizálása és az EMT gátlása. Mindezek alapján feltételezzük, hogy az aldoszteron antagonistának is helye lehet a rutinszerűen alkalmazott ACE gátlók és ARB-k mellett a DNP kezelésében.

A DNP talaján kialakuló végstádiumú veseelégtelenség előfordulása nő, kezelésében a vesetranszplantáció (NTx) a választandó eljárás. A NTx hosszú távú kimenetelét leginkább a vese iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodása rontja, melynek pontos kórélettani háttere részleteiben nem ismert. Szív és agy I/R károsodása kapcsán új jelátviteli út jelentősége igazolódott: a Sigma-1 receptor (Sigma-1R) – nitrogén-monoxid szintáz (NOS) rendszer. Kimutatták, hogy a Sigma-1R agonistái, köztük az antidepresszáns fluvoxamin, protektív a szív posztisztkémiás károsodával szemben.

Mindezek alapján kísérleteink másik fő célja a Sigma-1R – NOS útvonal szerepének tisztázása a renális I/R károsodás folyamatában. Igazoltuk, hogy a Sigma-1R agonista fluvoxamin, melyet krónikusan, jelentős mellékhatások nélkül már alkalmaznak, renoprotektív hatású I/R-ban, amit részben a Sigma-1R-NOS rendszeren keresztül előidézett vazodilatációval vált ki. Reményeink szerint a fluvoxamin csökkentheti a NTx során elkerülhetetlen I/R károsodást, hozzájárulhat a beültetett graft hosszabb távú működéséhez és így a transzplantált betegek kedvezőbb túléléséhez, életminőségéhez.

8. Summary

Diabetic nephropathy (DNP) is an increasing problem, its exact pathomechanism is unknown and an adequate therapy is still lacking. A main hallmark of the histological changes in DNP is the epithelial-mesenchymal transition (EMT), during which epithelial cells start to express alpha-smooth muscle actin (α SMA). A crucial element inducing EMT in diabetes is the activated renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). In experimental studies previously we found that angiotensin (Ang) II administration worsened the histological damage in DNP. Furthermore we showed that the function of the sodium/potassium ATPase (NKA), which plays a pivotal role in renal function, is also significantly impaired in DNP.

Here we compared the monotherapeutic efficacy of different RAAS inhibitors in the treatment of DNP, especially concerning EMT and NKA. According to our results aldosterone inhibitors were as or even more effective than angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors or Ang II receptor blockers (ARB) in preventing DNP. They might exert this renoprotective effect through blocking the development of EMT and by stabilizing renal NKA. Therefore we postulate that aldosterone antagonist could be useful in the treatment of DNP besides the routinely used ACE inhibitors or ARBs. Furthermore EMT and NKA could represent novel targets in the therapy for DNP.

Diabetes leads to end stage renal disease requiring renal transplantation (NTx). The long-term outcome of NTx is mainly influenced by the renal ischemia/reperfusion (I/R) injury, whose exact pathomechanism is yet unknown. Recently a new molecular pathway has been described in the heart and brain which seems to be protective against I/R injury, the Sigma-1 receptor (Sigma-1R) – nitric-oxide synthase (NOS) pathway. The agonists of this receptor such as the antidepressant fluvoxamin (FLU) seem to ameliorate I/R injury.

Hence our other aim was to analyze the effect of FLU on renal I/R injury and the Sigma-1R – NOS system. We confirmed that FLU, which is a chronically used antidepressant without any notable side effect, is protective against renal I/R. The renoprotection might be mediated through the Sigma-1R – NOS pathway leading to intrarenal vasodilatation. Therefore we hope that FLU might be beneficial during NTx providing a better long term survival and quality of life both by decreasing renal I/R injury and by improving depressive symptoms in chronic kidney disease patients and renal transplant recipients.

9. Irodalomjegyzék

1. U.S. Renal Data System, USRDS 2012 Annual Data Report (2012) Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD.
2. Whiting, DR, Guariguata, L, Weil, C, Shaw, J (2011) IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*, 94: 311-321.
3. Wada, J, Makino, H (2013) Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)*, 124: 139-152.
4. Ribeiro-Oliveira, A, Nogueira, AI, Pereira, RM, Boas, WW, Dos Santos, RA, Simões e Silva, AC (2008) The renin-angiotensin system and diabetes: an update. *Vasc Health Risk Manag*, 4: 787-803.
5. Association, AD (2013) Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes Care*, 36 Suppl 1: S11-66.
6. Jermendy, G, Gaál, Z, Gerő, L, Hidvégi, T, Kempler, P, Winkler, G (2011) A diabetes mellitus kórismézése, a cukorbetegség kezelése és gondozása a felnőttkorban. A Magyar Diabétesz Társaság szakmai irányelve. *Diabetologia Hungarica*, pp5-72.
7. Mauer, M, Zinman, B, Gardiner, R, Suissa, S, Sinaiko, A, Strand, T, Drummond, K, Donnelly, S, Goodyer, P, Gubler, MC, Klein, R (2009) Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes. *N Engl J Med*, 361: 40-51.
8. Fekete, A, Rosta, K, Wagner, L, Prokai, A, Degrell, P, Ruzicska, E, Vegh, E, Toth, M, Ronai, K, Rusai, K, Somogyi, A, Tulassay, T, Szabo, AJ, Ver, A (2008) Na⁺,K⁺-ATPase is modulated by angiotensin II in diabetic rat kidney--another reason for diabetic nephropathy? *J Physiol*, 586: 5337-5348.
9. Siragy, HM, Xue, C (2008) Local renal aldosterone production induces inflammation and matrix formation in kidneys of diabetic rats. *Exp Physiol*, 93: 817-824.
10. 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.
11. 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.

12. 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.
13. Levey, AS, Eckardt, KU, Tsukamoto, Y, Levin, A, Coresh, J, Rossert, J, De Zeeuw, D, Hostetter, TH, Lameire, N, Eknoyan, G (2005) Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*, 67: 2089-2100.
14. Mátyus, J, V. Oláh, A, Nagy, J, Wittmann, I (2012) Ajánlás az albuminuria, proteinuria, haematuria szűrésére és vizsgálatára a háziorvosi és belgyógyászati mindennapi gyakorlatban.. In: MANET (szerk) Útmutató. Klinikai Irányelvek Kézikönyve, Nefrológiai. Medition Kiadó, Budapest, p1-4.
15. Kulcsár, I, Szegedi, J, Ladányi, E, Török, M, Túri, S, Kiss, I (2010) Dialíziskezelés Magyarországon: 2003-2009. *Hypertonia és Nephrologia*, 14: 247-253.
16. Guariguata, L (2012) By the numbers: New estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012. *Diabetes Res Clin Pract*, 98: 524-525.
17. Foley, RN, Murray, AM, Li, S, Herzog, CA, McBean, AM, Eggers, PW, Collins, AJ (2005) Chronic kidney disease and the risk for cardiovascular disease, renal replacement, and death in the United States Medicare population, 1998 to 1999. *J Am Soc Nephrol*, 16: 489-495.
18. Belgyógyászati Szakmai Kollégium, Magyar Diabetes Társaság (2011) A diabetes mellitus kórismézéséről, a cukorbetegség kezeléséről és gondozásáról a felnőttkorban. *Diabetologia Hungarica* 19:Suppl 1.
19. Belgyógyászati Szakmai Kollégium, Magyar Nefrológiai Társaság (2008) A diabéteszes nephropathia vizsgálata és kezelése. In: MINISZTERIUM, E. (Szerk.). Az Egészségügyi Minisztérium Szakmai Protokollja p1-10.
20. 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.
21. Weiner, DE, Tighiouart, H, Stark, PC, Amin, MG, MacLeod, B, Griffith, JL, Salem, DN, Levey, AS, Sarnak, MJ (2004) Kidney disease as a risk factor for recurrent cardiovascular disease and mortality. *Am J Kidney Dis*, 44: 198-206.
22. Magri, CJ, Fava, S (2012) Diabetic Nephropathy: A Cardiovascular Risk Factor. In: MANISHA, S (Szerk) Diseases of renal parenchyma. InTech, Rijeka, pp 271-304

23. Shalamanova, L, Wilkinson, MC, McArdle, F, Jackson, MJ, Rustom, R (2012) Characterisation of the expression of the Renin-Angiotensin system in primary and immortalised human renal proximal tubular cells. *Nephron Exp Nephrol*, 116: e53-61.
24. Ritz, E, Rychlík, I, Locatelli, F, Halimi, S (1999) End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis*, 34: 795-808.
25. Andersen, AR, Christiansen, JS, Andersen, JK, Kreiner, S, Deckert, T (1983) Diabetic nephropathy in Type 1 (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study. *Diabetologia*, 25: 496-501.
26. Nagy, J, Degrell, P, Wittmann, I (2003) A vesebiopszi indikációja cukorbetegségben. (*LAM*) *Lege Artis Medicinae*, 13: 613-619.
27. Gerő, L (2010) A diabéteszes nefropátia kezelési lehetőségei. *Diabetes*: 8-10.
28. Lastra-Lastra, G, Sowers, JR, Restrepo-Erazo, K, Manrique-Acevedo, C, Lastra-González, G (2009) Role of aldosterone and angiotensin II in insulin resistance: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 71: 1-6.
29. Kumar, Vinay (2007) Diabetic nephropathy. In: Robbins, L., S, (szerk) Robbins basic pathology. Philadelphia, Saunders, Elsevier Inc., pp 353-392.
30. Burns, KD (2000) Angiotensin II and its receptors in the diabetic kidney. *Am J Kidney Dis*, 36: 449-467.
31. Zaman, MA, Oparil, S, Calhoun, DA (2002) Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov*, 1: 621-636.
32. Carey, RM, Siragy, HM (2003) Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*, 24: 261-271.
33. Rad, A: The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). (2006) http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Renin-angiotensin-aldosterone_system.png.
34. Kecskeméti, V: Antihipertenzív szerek. In: GYIRES, K., FÜRST, Z., (szerk) Farmakológia. Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt., 2007, pp 184-191.
35. Ali, Q, Sabuhi, R, Hussain, T (2010) High glucose up-regulates angiotensin II subtype 2 receptors via interferon regulatory factor-1 in proximal tubule epithelial cells. *Mol Cell Biochem*, 344: 65-71.
36. Donoghue, M, Hsieh, F, Baronas, E, Godbout, K, Gosselin, M, Stagliano, N, Donovan, M, Woolf, B, Robison, K, Jeyaseelan, R, Breitbart, RE, Acton, S (2000) A

novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 87: E1-9.

37. Leehey, DJ, Singh, AK, Alavi, N, Singh, R (2000) Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*, 77: S93-98.

38. Zimpelmann, J, Kumar, D, Levine, DZ, Wehbi, G, Imig, JD, Navar, LG, Burns, KD (2000) Early diabetes mellitus stimulates proximal tubule renin mRNA expression in the rat. *Kidney Int*, 58: 2320-2330.

39. Ruster, C, Wolf, G (2006) Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 17: 2985-2991.

40. Wolf, G (1998) Link between angiotensin II and TGF-beta in the kidney. *Miner Electrolyte Metab*, 24: 174-180.

41. Sharma, K, Cook, A, Smith, M, Valancius, C, Inscho, EW (2005) TGF-beta impairs renal autoregulation via generation of ROS. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288: F1069-1077.

42. Brinkkoetter, PT, Holtgreffe, S, van der Woude, FJ, Yard, BA (2004) Angiotensin II type 1-receptor mediated changes in heparan sulfate proteoglycans in human SV40 transformed podocytes. *J Am Soc Nephrol*, 15: 33-40.

43. Caruso-Neves, C, Kwon, SH, Guggino, WB (2005) Albumin endocytosis in proximal tubule cells is modulated by angiotensin II through an AT2 receptor-mediated protein kinase B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 17513-17518.

44. Rastaldi, MP, Ferrario, F, Giardino, L, Dell'Antonio, G, Grillo, C, Grillo, P, Strutz, F, Müller, GA, Colasanti, G, D'Amico, G (2002) Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int*, 62: 137-146.

45. Hills, CE, Squires, PE (2010) TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic intervention in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*, 31: 68-74.

46. Wolf, G, Wenzel, UO (2004) Angiotensin II and cell cycle regulation. *Hypertension*, 43: 693-698.

47. Ruiz-Ortega, M, Esteban, V, Rupérez, M, Sánchez-López, E, Rodríguez-Vita, J, Carvajal, G, Egido, J (2006) Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 15: 159-166.

48. Xue, C, Siragy, HM (2005) Local renal aldosterone system and its regulation by salt, diabetes, and angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension*, 46: 584-590.

49. Mazak, I, Fiebeler, A, Muller, DN, Park, JK, Shagdarsuren, E, Lindschau, C, Dechend, R, Viedt, C, Pilz, B, Haller, H, Luft, FC (2004) Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 109: 2792-2800.
50. Nishiyama, A, Abe, Y (2006) Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: renoprotective effects of aldosterone blockade. *J Pharmacol Sci*, 100: 9-16.
51. Zeisberg, M, Neilson, EG (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*, 119: 1429-1437.
52. Iwano, M, Plieth, D, Danoff, TM, Xue, C, Okada, H, Neilson, EG (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*, 110: 341-350.
53. Zeisberg, EM, Potenta, SE, Sugimoto, H, Zeisberg, M, Kalluri, R (2008) Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol*, 19: 2282-2287.
54. Burns, KD, Homma, T, Harris, RC (1993) The intrarenal renin-angiotensin system. *Semin Nephrol*, 13: 13-30.
55. Ziyadeh, FN, Cohen, MP (1993) Effects of glycated albumin on mesangial cells: evidence for a role in diabetic nephropathy. *Mol Cell Biochem*, 125: 19-25.
56. Ligeti, E (2008) A vese kiválasztó működésének alapjai. In: Fonyó, A, (szerk) Az Orvosi Élettan Tankönyve. Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt. pp: 112-134.
57. Ohtaka, A, Muto, S, Nemoto, J, Kawakami, K, Nagano, K, Asano, Y (1996) Hyperosmolality stimulates Na-K-ATPase gene expression in inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol*, 270: F728-738.
58. National Collaborating Centre for Chronic Conditions (2008) Type 2 diabetes: national clinical guideline for management in primary and secondary care (update). In Mant J (szerk) NICE Guideline 66, Royal College of Physicians, London pp1-154.
59. MANET, MTT (2008) Az Egészségügyi Minisztérium szakmai irányelve vese-transzplantációra való alkalmasság megállapításának szakmai szabályairól. *Egészségügyi Közlöny*. 3: 14-18,
60. Szelestei, T, Rempert, Á, Gergely, L (2011) A vesetranszplantáció aktuális kérdései. *Hypertonia és Nephrologia*, 15: 31-34.

61. Montori, VM, Basu, A, Erwin, PJ, Velosa, JA, Gabriel, SE, Kudva, YC (2002) Posttransplantation diabetes: a systematic review of the literature. *Diabetes Care*, 25: 583-592.
62. Prokai, A, Fekete, A, Pasti, K, Rusai, K, Banki, NF, Reusz, G, Szabo, AJ (2012) The importance of different immunosuppressive regimens in the development of posttransplant diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*, 13: 81-91.
63. Veroux, M, Corona, D, Giuffrida, G, Gagliano, M, Sorbello, M, Virgilio, C, Tallarita, T, Zerbo, D, Giaquinta, A, Fiamingo, P, Macarone, M, Li Volti, G, Caglia, P, Veroux, P (2008) New-onset diabetes mellitus after kidney transplantation: the role of immunosuppression. *Transplant Proc*, 40: 1885-1887.
64. 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.
65. Koo, DD, Welsh, KI, McLaren, AJ, Roake, JA, Morris, PJ, Fuggle, SV (1999) Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney Int*, 56: 1551-1559.
66. Kárpáti, I: Veseelégtelenség. In: TULASSAY, Z. (Ed.) A belgyógyászat alapjai. Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt., 2007 pp 1143-1144.
67. Blaisdell, FW (1989) The reperfusion syndrome. *Microcirc Endothelium Lymphatics*, 5: 127-141.
68. Grzegorzczak, K, Krajewska, M, Weyde, W, Jakuszko, K, Gniewek, A, Klinger, M (2011) Gender and kidney diseases: the clinical importance and mechanisms of modifying effects. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 65: 849-857.
69. Berg, UB (2006) Differences in decline in GFR with age between males and females. Reference data on clearances of inulin and PAH in potential kidney donors. *Nephrol Dial Transplant*, 21: 2577-2582.
70. Broyer, M, Chantler, C, Donckerwolcke, R, Ehrich, JH, Rizzoni, G, Schärer, K (1993) The paediatric registry of the European Dialysis and Transplant Association: 20 years' experience. *Pediatr Nephrol*, 7: 758-768.
71. Kummer, S, von Gersdorff, G, Kemper, MJ, Oh, J (2012) The influence of gender and sexual hormones on incidence and outcome of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*, 27: 1213-1219.

72. Reed, E, Cohen, DJ, Barr, ML, Ho, E, Reemtsma, K, Rose, EA, Hardy, M, Suciufoca, N (1992) Effect of recipient gender and race on heart and kidney allograft survival. *Transplant Proc*, 24: 2670-2671.
73. Müller, V, Szabó, A, Viklicky, O, Gaul, I, Pörtl, S, Philipp, T, Heemann, UW (1992) Sex hormones and gender-related differences: their influence on chronic renal allograft rejection. *Kidney Int*, 55: 2011-2020.
74. Elema, JD, Arends, A (1975) Focal and segmental glomerular hyalinosis and sclerosis in the rat. *Lab Invest*, 33: 554-561.
75. Hajdu, A, Rona, G (1971) The protective effect of estrogens against spontaneous pancreatic islet and renal changes in aging male rats. *Experientia*, 27: 956-957.
76. Antus, B, Yao, Y, Song, E, Liu, S, Lutz, J, Heemann, U (2002) Opposite effects of testosterone and estrogens on chronic allograft nephropathy. *Transpl Int*, 15: 494-501.
77. Rusai, K, Prókai, A, Szebeni, B, Mészáros, K, Fekete, A, Szalay, B, Vannay, Á, Degrell, P, Müller, V, Tulassay, T, Szabó, AJ (2011) Gender differences in serum and glucocorticoid regulated kinase-1 (SGK-1) expression during renal ischemia/reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem*, 27: 727-738.
78. Vannay, A, Fekete, A, Langer, R, Tóth, T, Sziksz, E, Vásárhelyi, B, Szabó, AJ, Losonczy, G, Adori, C, Gál, A, Tulassay, T, Szabó, A (2009) Dehydroepiandrosterone pretreatment alters the ischaemia/reperfusion-induced VEGF, IL-1 and IL-6 gene expression in acute renal failure. *Kidney Blood Press Res*, 32: 175-184.
79. Bhuiyan, MS, Tagashira, H, Fukunaga, K (2010) Dehydroepiandrosterone-Mediated Stimulation of Sigma-1 Receptor Activates Akt-eNOS Signaling in the Thoracic Aorta of Ovariectomized Rats with Abdominal Aortic Banding. *Cardiovasc Ther*. 29: 219-230.
80. Bhuiyan, S, Fukunaga, K (2010) Stimulation of Sigma-1 receptor by dehydroepiandrosterone ameliorates hypertension-induced kidney hypertrophy in ovariectomized rats. *Exp Biol Med (Maywood)*, 235: 356-364.
81. Hellewell, SB, Bruce, A, Feinstein, G, Orringer, J, Williams, W, Bowen, WD (1994) Rat liver and kidney contain high densities of sigma 1 and sigma 2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling. *Eur J Pharmacol*, 268: 9-18.
82. Pontén, F, Gry, M, Fagerberg, L, Lundberg, E, Asplund, A, Berglund, L, Oksvold, P, Björling, E, Hober, S, Kampf, C, Navani, S, Nilsson, P, Ottosson, J, Persson, A,

Wernérus, H, Wester, K, Uhlén, M (2009) A global view of protein expression in human cells, tissues, and organs. *Mol Syst Biol*, 5: 337.

83. Hayashi, T, Su, TP (2004) Sigma-1 receptor ligands: potential in the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Drugs*, 18: 269-284.

84. Zamanillo, D, Andreu, F, Ovalle, S, Pérez, MP, Romero, G, Farré, AJ, Guitart, X (2000) Up-regulation of sigma(1) receptor mRNA in rat brain by a putative atypical antipsychotic and sigma receptor ligand. *Neurosci Lett*, 282: 169-172.

85. Monnet, FP (2005) Sigma-1 receptor as regulator of neuronal intracellular Ca²⁺: clinical and therapeutic relevance. *Biol Cell*, 97: 873-883.

86. Maurice, T, Grégoire, C, Espallergues, J (2006) Neuro(active)steroids actions at the neuromodulatory sigma1 (sigma1) receptor: biochemical and physiological evidences, consequences in neuroprotection. *Pharmacol Biochem Behav*, 84: 581-597.

87. Vagnerova, K, Hurn, PD, Bhardwaj, A, Kirsch, JR (2006) Sigma 1 receptor agonists act as neuroprotective drugs through inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Anesth Analg*, 103: 430-434.

88. Bucolo, C, Drago, F (2004) Effects of neurosteroids on ischemia-reperfusion injury in the rat retina: role of sigma1 recognition sites. *Eur J Pharmacol*, 498: 111-114.

89. Maslov, LN, Lishmanov, IB, Bogomaz, SA, Gilligan, P, Tam, SW (1999) [Dependence of the pump function of the isolated rat heart on the functional activity of sigma receptors during reperfusion]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*, 85: 1396-1408.

90. Klouz, A, Saïd, DB, Ferchichi, H, Kourda, N, Ouanes, L, Lakhal, M, Tillement, JP, Morin, D (2008) Protection of cellular and mitochondrial functions against liver ischemia by N-benzyl-N'-(2-hydroxy-3,4-dimethoxybenzyl)-piperazine (BHDP), a sigma1 ligand. *Eur J Pharmacol*, 578: 292-299.

91. Nakano, M, Osada, K, Misonoo, A, Fujiwara, K, Takahashi, M, Ogawa, Y, Haga, T, Kanai, S, Tanaka, D, Sasuga, Y, Yanagida, T, Asakura, M, Yamaguchi, N (2010) Fluvoxamine and sigma-1 receptor agonists dehydroepiandrosterone (DHEA)-sulfate induces the Ser473-phosphorylation of Akt-1 in PC12 cells. *Life Sci*, 86: 309-314.

92. Manning, BD, Cantley, LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129: 1261-1274.

93. Bhuiyan, MS, Tagashira, H, Fukunaga, K (2011) Sigma-1 receptor stimulation with fluvoxamine activates Akt-eNOS signaling in the thoracic aorta of ovariectomized rats with abdominal aortic banding. *Eur J Pharmacol*, 650: 621-628.

94. Geller, DA, Billiar, TR (1998) Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev*, 17: 7-23.
95. Sharma, SP (2004) Nitric oxide and the kidney. *Indian Journal of Nephrology*, 14: 77-84.
96. Zou, AP, Cowley, AW (1999) Role of nitric oxide in the control of renal function and salt sensitivity. *Curr Hypertens Rep*, 1: 178-186.
97. Förstermann, U, Sessa, WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 33: 829-837, 837a-837d.
98. Betz, B, Schneider, R, Kress, T, Schick, MA, Wanner, C, Sauvant, C (2012) Rosiglitazone affects nitric oxide synthases and improves renal outcome in a rat model of severe ischemia/reperfusion injury. *PPAR Res*, 2012: 219319.
99. Yamasowa, H, Shimizu, S, Inoue, T, Takaoka, M, Matsumura, Y (2005) Endothelial nitric oxide contributes to the renal protective effects of ischemic preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther*, 312: 153-159.
100. Takebayashi, M, Hayashi, T, Su, TP (2002) Nerve growth factor-induced neurite sprouting in PC12 cells involves sigma-1 receptors: implications for antidepressants. *J Pharmacol Exp Ther*, 303: 1227-1237.
101. Ogawa, S, Okuyama, S, Araki, H, Otomo, S (1994) Effect of NE-100, a novel sigma receptor ligand, on phencyclidine-induced cognitive dysfunction. *Eur J Pharmacol*, 263: 9-15.
102. Hayashi, T, Su, TP (2008) An update on the development of drugs for neuropsychiatric disorders: focusing on the sigma 1 receptor ligand. *Expert Opin Ther Targets*, 12: 45-58.
103. Struthers, A, Krum, H, Williams, GH (2008) A comparison of the aldosterone-blocking agents eplerenone and spironolactone. *Clin Cardiol*, 31: 153-158.
104. Coppey, LJ, Davidson, EP, Rinehart, TW, Gellett, JS, Oltman, CL, Lund, DD, Yorek, MA (2006) ACE inhibitor or angiotensin II receptor antagonist attenuates diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 55: 341-348.
105. Failli, P, Alfarano, C, Franchi-Micheli, S, Mannucci, E, Cerbai, E, Mugelli, A, Raimondi, L (2009) Losartan counteracts the hyper-reactivity to angiotensin II and ROCK1 over-activation in aortas isolated from streptozotocin-injected diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*, 8: 32.

106. Taira, M, Toba, H, Murakami, M, Iga, I, Serizawa, R, Murata, S, Kobara, M, Nakata, T (2008) Spironolactone exhibits direct renoprotective effects and inhibits renal renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic rats. *Eur J Pharmacol*, 589: 264-271.
107. Viñas, JL, Sola, A, Genescà, M, Alfaro, V, Pí, F, Hotter, G (2006) NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 40: 992-1003.
108. Kurtz, TW, Griffin, KA, Bidani, AK, Davisson, RL, Hall, JE, Association, SoPaPEotAH (2005) Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals. Part 2: Blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the subcommittee of professional and public education of the American Heart Association council on high blood pressure research. *Hypertension*, 45: 299-310.
109. 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.
110. De, P, Das, G, Harley, K, Nair, H (2006) Review: Dual blockade of the renin-angiotensin system in diabetic nephropathy: review of literature and local experience. *The British Journal of Diabetes and Vascular Disease*: 23-28.
111. Titan, SM, M Vieira, J, Dominguez, WV, Barros, RT, Zatz, R (2011) ACEI and ARB combination therapy in patients with macroalbuminuric diabetic nephropathy and low socioeconomic level: a double-blind randomized clinical trial. *Clin Nephrol*, 76: 273-283.
112. Schjoedt, KJ, Rossing, K, Juhl, TR, Boomsma, F, Rossing, P, Tarnow, L, Parving, HH (2005) Beneficial impact of spironolactone in diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 68: 2829-2836.
113. Schjoedt, KJ, Andersen, S, Rossing, P, Tarnow, L, Parving, HH (2004) Aldosterone escape during blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic nephropathy is associated with enhanced decline in glomerular filtration rate. *Diabetologia*, 47: 1936-1939.
114. Zannad, F, McMurray, JJ, Krum, H, van Veldhuisen, DJ, Swedberg, K, Shi, H, Vincent, J, Pocock, SJ, Pitt, B, Group, E-HS (2011) Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med*, 364: 11-21.
115. 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.
116. Izuhara, Y, Nangaku, M, Inagi, R, Tominaga, N, Aizawa, T, Kurokawa, K, van Ypersele de Strihou, C, Miyata, T (2005) Renoprotective properties of angiotensin receptor blockers beyond blood pressure lowering. *J Am Soc Nephrol*, 16: 3631-3641.
117. Ewing, DJ, Campbell, IW, Clarke, BF (1981) Heart rate changes in diabetes mellitus. *Lancet*, 1: 183-186.
118. Hashimoto, M, Harada, T, Ishikawa, T, Obata, M, Shibutani, Y (2001) Investigation on diabetic autonomic neuropathy assessed by power spectral analysis of heart rate variability in WBN/Kob rats. *J Electrocardiol*, 34: 243-250.
119. De Angelis, K, Irigoyen, MC, Morris, M (2009) Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models. *Auton Neurosci*, 145: 3-10.
120. Wang, W (1994) Chronic administration of aldosterone depresses baroreceptor reflex function in the dog. *Hypertension*, 24: 571-575.
121. Goyal, BR, Solanki, N, Goyal, RK, Mehta, AA (2009) Investigation into the cardiac effects of spironolactone in the experimental model of type 1 diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol*, 54: 502-509.
122. Bell, RC, Khurana, M, Ryan, EA, Finegood, DT (1994) Gender differences in the metabolic response to graded numbers of transplanted islets of Langerhans. *Endocrinology*, 135: 2681-2687.
123. Al-Achi, A, Greenwood, R (2001) A brief report on some physiological parameters of streptozocin-diabetic rat. *Drug Dev Ind Pharm*, 27: 465-468.
124. Luther, JM, Brown, NJ (2011) The renin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis. *Trends Pharmacol Sci*, 32: 734-739.
125. Hsiao, CF, Sheu, WW, Hung, YJ, Lin, MW, Curb, D, Ranadex, K, Quertermous, T, Chen, YM, Chen, IY, Wu, KD (2012) The effects of the renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms on insulin resistance in hypertensive families. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 13: 446-454.
126. Lastra, G, Dhuper, S, Johnson, MS, Sowers, JR (2010) Salt, aldosterone, and insulin resistance: impact on the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol*, 7: 577-584.
127. Attman, PO, Knight-Gibson, C, Tavella, M, Samuelsson, O, Alaupovic, P (1998) The compositional abnormalities of lipoproteins in diabetic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 13: 2833-2841.

128. Neeli, H, Gadi, R, Rader, DJ (2009) Managing diabetic dyslipidemia: beyond statin therapy. *Curr Diab Rep*, 9: 11-17.
129. Karnib, HH, Ziyadeh, FN (2010) The cardiorenal syndrome in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 89: 201-208.
130. Ohtomo, S, Izuhara, Y, Nangaku, M, Dan, T, Ito, S, van Ypersele de Strihou, C, Miyata, T (2010) Body weight control by a high-carbohydrate/low-fat diet slows the progression of diabetic kidney damage in an obese, hypertensive, type 2 diabetic rat model. *J Obes*. 2010: 1-11
131. Wada, T, Kenmochi, H, Miyashita, Y, Sasaki, M, Ojima, M, Sasahara, M, Koya, D, Tsuneki, H, Sasaoka, T (2010) Spironolactone improves glucose and lipid metabolism by ameliorating hepatic steatosis and inflammation and suppressing enhanced gluconeogenesis induced by high-fat and high-fructose diet. *Endocrinology*, 151: 2040-2049.
132. Guo, C, Ricchiuti, V, Lian, BQ, Yao, TM, Coutinho, P, Romero, JR, Li, J, Williams, GH, Adler, GK (2008) Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines. *Circulation*, 117: 2253-2261.
133. Matsumoto, S, Takebayashi, K, Aso, Y (2006) The effect of spironolactone on circulating adipocytokines in patients with type 2 diabetes mellitus complicated by diabetic nephropathy. *Metabolism*, 55: 1645-1652.
134. Mogensen, CE, Christensen, CK, Pedersen, MM, Alberti, KG, Boye, N, Christensen, T, Christiansen, JS, Flyvbjerg, A, Ingerslev, J, Schmitz, A (1990) Renal and glycemic determinants of glomerular hyperfiltration in normoalbuminuric diabetics. *J Diabet Complications*, 4: 159-165.
135. Siragy, HM, Carey, RM (2010) Role of the intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*, 31: 541-550.
136. Zhou, C, Yool, AJ, Nolan, J, Byard, RW (2013) Armanni-ebstein lesions: a need for clarification. *J Forensic Sci*, 58 Suppl 1: S94-98.
137. Mather, A, Pollock, C (2011) Glucose handling by the kidney. *Kidney Int*, 79 Suppl 120: S1-6.
138. Burns, WC, Thomas, MC (2011) Angiotensin II and its role in tubular epithelial to mesenchymal transition associated with chronic kidney disease. *Cells Tissues Organs*, 193: 74-84.

139. Volpini, RA, da Silva, CG, Costa, RS, Coimbra, TM (2003) Effect of enalapril and losartan on the events that precede diabetic nephropathy in rats. *Diabetes Metab Res Rev*, 19: 43-51.
140. Fujisawa, G, Okada, K, Muto, S, Fujita, N, Itabashi, N, Kusano, E, Ishibashi, S (2004) Spironolactone prevents early renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int*, 66: 1493-1502.
141. Mavrakanas, TA, Cheva, A, Kallaras, K, Karkavelas, G, Mironidou-Tzouveleki, M (2010) Effect of ramipril alone compared to ramipril with eplerenone on diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacology*, 86: 85-91.
142. Liu, Y (2010) New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 21: 212-222.
143. Liu, Y (2004) Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*, 15: 1-12.
144. Sun, CY, Chang, SC, Wu, MS (2012) Uremic Toxins Induce Kidney Fibrosis by Activating Intrarenal Renin-Angiotensin-Aldosterone System Associated Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *PLoS One*, 7: e34026.
145. Yeh, YC, Wei, WC, Wang, YK, Lin, SC, Sung, JM, Tang, MJ (2010) Transforming growth factor- β 1 induces Smad3-dependent β 1 integrin gene expression in epithelial-to-mesenchymal transition during chronic tubulointerstitial fibrosis. *Am J Pathol*, 177: 1743-1754.
146. Rodrigues-Díez, R, Carvajal-González, G, Sánchez-López, E, Rodríguez-Vita, J, Rodrigues Díez, R, Selgas, R, Ortiz, A, Egido, J, Mezzano, S, Ruiz-Ortega, M (2008) Pharmacological modulation of epithelial mesenchymal transition caused by angiotensin II. Role of ROCK and MAPK pathways. *Pharm Res*, 25: 2447-2461.
147. Zhang, A, Jia, Z, Guo, X, Yang, T (2007) Aldosterone induces epithelial-mesenchymal transition via ROS of mitochondrial origin. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293: F723-731.
148. Lv, ZM, Wang, Q, Wan, Q, Lin, JG, Hu, MS, Liu, YX, Wang, R (2011) The role of the p38 MAPK signaling pathway in high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition of cultured human renal tubular epithelial cells. *PLoS One*, 6: e22806.
149. Shao, Q, Ren, B, Elimban, V, Tappia, PS, Takeda, N, Dhalla, NS (2005) Modification of sarcolemmal Na⁺-K⁺-ATPase and Na⁺/Ca²⁺ exchanger expression in

heart failure by blockade of renin-angiotensin system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288: H2637-2646.

150. Ottlecz, A, Bensaoula, T (1996) Captopril ameliorates the decreased Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37: 1633-1641.

151. Galuska, D, Pirkmajer, S, Barrès, R, Ekberg, K, Wahren, J, Chibalin, AV (2011) C-peptide increases Na,K-ATPase expression via PKC- and MAP kinase-dependent activation of transcription factor ZEB in human renal tubular cells. *PLoS One*, 6: e28294.

152. Garvin, JL (1991) Angiotensin stimulates bicarbonate transport and Na⁺/K⁺-ATPase in rat proximal straight tubules. *J Am Soc Nephrol*, 1: 1146-1152.

153. Isenovic, ER, Meng, Y, Jamali, N, Milivojevic, N, Sowers, JR (2004) Ang II attenuates IGF-1-stimulated Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase activity via PI3K/Akt pathway in vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med*, 13: 915-922.

154. Meier-Kriesche, HU, Kaplan, B (2002) Waiting time on dialysis as the strongest modifiable risk factor for renal transplant outcomes: a paired donor kidney analysis. *Transplantation*, 74: 1377-1381.

155. Cuevas, J, Behensky, A, Deng, W, Katnik, C (2011) Afobazole modulates neuronal response to ischemia and acidosis via activation of sigma-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 339: 152-160.

156. Bhuiyan, MS, Tagashira, H, Shioda, N, Fukunaga, K (2010) Targeting sigma-1 receptor with fluvoxamine ameliorates pressure-overload-induced hypertrophy and dysfunctions. *Expert Opin Ther Targets*, 14: 1009-1022.

157. Tagashira, H, Bhuiyan, S, Shioda, N, Hasegawa, H, Kanai, H, Fukunaga, K (2010) Sigma1-receptor stimulation with fluvoxamine ameliorates transverse aortic constriction-induced myocardial hypertrophy and dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299: H1535-1545.

158. Taler, M, Gil-Ad, I, Lomnitski, L, Korov, I, Baharav, E, Bar, M, Zolokov, A, Weizman, A (2007) Immunomodulatory effect of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) on human T lymphocyte function and gene expression. *Eur Neuropsychopharmacol*, 17: 774-780.

159. Basterzi, AD, Aydemir, C, Kisa, C, Aksaray, S, Tuzer, V, Yazici, K, Göka, E (2005) IL-6 levels decrease with SSRI treatment in patients with major depression. *Hum Psychopharmacol*, 20: 473-476.

160. Derocq, JM, Bourrié, B, Ségui, M, Le Fur, G, Casellas, P (1995) In vivo inhibition of endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines production by the sigma ligand SR 31747. *J Pharmacol Exp Ther*, 272: 224-230.
161. Allahtavakoli, M, Jarrott, B (2011) Sigma-1 receptor ligand PRE-084 reduced infarct volume, neurological deficits, pro-inflammatory cytokines and enhanced anti-inflammatory cytokines after embolic stroke in rats. *Brain Res Bull*, 85: 219-224.
162. Shin, TK, Kang, MS, Lee, HY, Seo, MS, Kim, SG, Kim, CD, Lee, WS (2009) Fluoxetine and sertraline attenuate postischemic brain injury in mice. *Korean J Physiol Pharmacol*, 13: 257-263.
163. Meunier, J, Hayashi, T (2010) Sigma-1 receptors regulate Bcl-2 expression by reactive oxygen species-dependent transcriptional regulation of nuclear factor kappaB. *J Pharmacol Exp Ther*, 332: 388-397.
164. Barua, A, Standen, NB, Galiñanes, M (2010) Dual role of nNOS in ischemic injury and preconditioning. *BMC Physiol*, 10: 15.
165. Rivera, LR, Pontell, L, Cho, HJ, Castelucci, P, Thacker, M, Poole, DP, Frugier, T, Furness, JB (2012) Knock out of neuronal nitric oxide synthase exacerbates intestinal ischemia/reperfusion injury in mice. *Cell Tissue Res*, 349: 565-576.
166. Tojo, A, Onozato, ML, Fujita, T (2006) Role of macula densa neuronal nitric oxide synthase in renal diseases. *Med Mol Morphol*, 39: 2-7.
167. Roh, DH, Choi, SR, Yoon, SY, Kang, SY, Moon, JY, Kwon, SG, Han, HJ, Beitz, AJ, Lee, JH (2011) Spinal neuronal NOS activation mediates sigma-1 receptor-induced mechanical and thermal hypersensitivity in mice: involvement of PKC-dependent GluN1 phosphorylation. *Br J Pharmacol*, 163: 1707-1720.
168. Hiemke, C, Härtter, S (2000) Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther*, 85: 11-28.
169. Hayashi, T, Su, TP (2007) Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell*, 131: 596-610.

9. Saját közlemények bibliográfiai adatai

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Bánki, NF, Kőszegi, S, Wagner, L, Lénárt, L, Varga, D, Gellai, R, Hodrea, J, Vér, Á, Szabó, AJ, Tulassay, T, Fekete, A (2013) Új terápiás támpontok a diabéteszes nefropátia kezelésében: a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer és a Na/K ATPáz szerepe. *Gyermekgyógyászat* 64: 70-74.
2. Bánki, NF, Ver, A, Wagner, LJ, Vannay, A, Degrell, P, Prokai, A, Gellai, R, Lenart, L, Nagy Szakal, D, 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. **IF: 4,092**
3. Prókai, Á, Fekete, A, Pásti, K, Rusai, K, Bánki, NF, Reusz, G, Szabó, AJ (2012) The importance of different immunosuppressive regimens in the development of posttransplant diabetes mellitus. *Pediatric Diabetes*, 13: pp. 81-91. **IF: 2,160**
4. Prókai, Á, Fekete, A, Bánki, NF, Müller, V, Vér, Á, Degrell, P, Rusai, K, Wagner, L, Vannay, Á, Rosta, M, Heemann, U, Langer, RM, Tulassay, T, Reusz, Gy, Szabó, AJ (2011) Renoprotective effect of erythropoietin in rats subjected to ischemia/reperfusion injury: Gender differences. *Surgery*, 150 : 39-47. **IF: 3,103**
5. Fekete, A, Rusai, K, Müller, V, Prókai, Á, Vér, Á, Bánki, NF, Gál, K, Tulassay, T, Reusz, Gy, Szabó, AJ (2009) Iszkémia/reperfúziós vesekárosodás patomechanizmusának experimentális vizsgálata. *Gyermekgyógyászat*, 60: 14-20.

Az értekezés témájában megjelent absztraktok

1. Hosszú, Á, Bánki, NF, Antal, Zs, Kőszegi, S, Wagner, L, Prókai, Á, Gellai, R, Lénárt, L, Vannay, Á, Müller, V, Szabó, AJ, Tulassay, T, Fekete, A (2012) Sigma-1 receptor agonist treatment is protective against renal ischemia/reperfusion injury. *Pediatric Nephrology*, 27: 1618-1619.
2. Kőszegi, S, Bánki, NF, Wagner, L, Hosszú, Á, Lénárt, L, Gellai, R, Tulassay, T, Fekete, A (2012) Renin-angiotensin-aldosterone system blockers in diabetic nephropathy: the role of epithelial to mesenchymal transition. *Pediatric Nephrology*, 27: 1783.

3. Bánki, NF, Hosszú, Á, Antal, Zs, Kőszegi, S, Wagner, L, Gellai, R, Lénárt, L, Vannay, Á, Müller, V, Szabó, AJ, Tulassay, T, Fekete, A (2012) The role of the Sigma-1 receptor - Akt - eNOS pathway in renal ischemia/reperfusion injury. *Pediatric Nephrology*, 27: 1618.
4. Wagner, L, Bánki, NF, Vér, Á, Prókai, Á, Kőszegi, S, Hosszú, Á, Szabó, AJ, Fekete, A (2012) Az aldoszteron-antagonisták monoterápiában is hatékonyak diabeteses nephropathiában. *Diabetologia Hungarica*, XX: 162.
5. Bánki, NF, Wagner, L, Vér, Á, Prókai, Á, Rosta, M, Vannay, Á, Gellai, R, Szabó, AJ, Tulassay, T, Fekete, A (2011) The renin-angiotensin-aldosterone-system (RAAS) blockers in diabetic nephropathy (DN). *Pediatric Nephrology*, 26: 1640.
6. Wagner, L, Bánki, NF, Prókai, Á, Szabó, AJ, Vér, Á, Fekete, A (2010) The Effect of Losartan on NA/K-ATPase (NKA) and Heat Shock Protein (HSP) 72 in Rats with Diabetic Nephropathy. *Pediatric Nephrology*, 25: 1833.
7. Bánki, NF, Wagner, L, Prókai, Á, Vér, Á, Vannay, Á, Szabó, AJ, Fekete, A (2010) The Difference between Renin-Angiotensin-Aldosterone-System (RAAS) Inhibitors in Diabetic Nephropathy. *Pediatric Nephrology*, 25: 1834.
8. Prókai, Á, Fekete, A, Rusai, K, Bánki, NF, Müller, V, Wagner, L, Vér, Á, Tulassay, T, Szabó, AJ (2009) The Effect Of Erythropoietin (Epo) On Hypoxia Inducible Factor (Hif)System During Renal Ischemic Reperfusion (I/R) Injury: Gender Differences. *Pediatric Nephrology*, 24: 1875.
9. Prókai, Á, Fekete, A, Rusai, K, Müller, V, Wagner, L, Degrell, P, Bánki, NF, Vannay, Á, Szabó, B, Tulassay, T, Szabó, AJ (2008) The protective role of erythropoietin (EPO) in renal ischemic reperfusion (I/R) injury: gender differences. *Pediatric Nephrology*, 23: 1594.

Más témában megjelent publikációk

1. Bánki, NF, Rusai, K, Károly, É, Szabó, B, Vannay, Á, Sallay, P, Reusz, Gy, Tulassay, T, Szabó, AJ, Fekete, A (2012) A hősokkfehérje 72 genetikai polimorfizmusainak összefüggése a gyermekkori vesebetegségekkel *Hypertonia és Nephrologia*, 16: 213-217.
2. Olbrich, H, Schmidts, M, Werner, C, Onoufriadis, A, Loges, NT, Raidt, J, Bánki, NF, Shoemark, A, Burgoyne, T, Al Turki, S, Hurles, ME, UK10K, Köhler, G, Schroeder, J, Nürnberg, G, Nürnberg, P., Chung, EMK, Reinhardt, R, Marthin, JK,

- Nielsen, KG, Mitchison, HM, Omran, H (2012) Recessive HYDIN mutations cause Primary Ciliary Dyskinesia without randomization of left/right body asymmetry. *Am J Hum Gen*, 91: 672-684. **IF: 10,603**
3. Molnár, K, Vannay, A, Szebeni, B, Bánki, NF, Sziksz, E, Cseh, A, Györffy, H, Lakatos, PL, Papp, M, Arató, A, Veres, G (2012) Intestinal alkaline phosphatase in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 18:3254-9. **IF: 2,471**
 4. Molnár, K, Vannay, A, Sziksz, E, Bánki, NF, Györffy, H, Arató, A, Dezsőfi, A, Veres, G (2012) Decreased mucosal expression of intestinal alkaline phosphatase in children with coeliac disease. *Virchows Archiv*, 460:157-161. **IF: 2,491**
 5. Molnar, K, Vannay, A, Sziksz, E, Bánki, NF, Cseh, A, Gyorffy, H, Dezsofi, A, Arato, A, Veres, G (2012) Az intestinalis alkalikus foszfataz szerepe gyermekkori gyulladasos belbetegsegen es coeliakiaban. *Orvosi Hetilap*, 153: 1389-1395.
 6. Molnár, K, Vannay, A, Szebeni, B, Györffy, H, Sziksz, E, Cseh, A, Bánki, NF, Dezsőfi, A, Lakatos, PL, Papp, M, Arató, A, Tulassay, T, Veres, G (2011) Intesztinális alkalikus foszfatáz vizsgálata krónikus bélgyulladásban (IBD) szenvedő gyermekek bélnyálkahártyájában. *Gyermekgyógyászat*, 62: 105-109.
 7. Rusai, K, Bánki, NF, Prokai, A, Podracka, L, Szebeni, B, Tulassay, T, Reusz, GS, Sallay, P, Körmendy, R, Szabo, AJ, Fekete, A (2010) Heat shock protein polymorphism predisposes to urinary tract malformations and renal transplantation in children. *Transplantation Proceedings*, 42: 2309-2311. **IF: 0,993**
 8. Fekete, A, Szabó, AJ, Bánki, NF, Györffy, B, Tulassay, T, Vásárhelyi, B (2008) Pooling Analysis of Genetic Data: Heat Shock Protein HSPA1B (1267)G Allele: a Possible Selection Factor for Civilization Diseases?! New York: Nova Science Publishers Inc., pp. 153-163.
 9. Karoly, E, Fekete, A, Bánki, NF, Szebeni, B, Vannay, A, Szabo, AJ, Tulassay, T, Reusz, GS (2007) Heat shock protein 72 (HSPA1B) gene polymorphism and Toll-like receptor (TLR) 4 mutation are associated with increased risk of urinary tract infection in children. *Pediatric Research*, 61: 371-374. **IF: 2,839**

Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönetemet fejezem ki Tulassay Tivadar professzor úrnak, hogy az általa vezetett PhD program résztvevője lehettem az I. sz. Gyermekklinika Nefrológiai kutatólaboratóriumában. Hálás vagyok, hogy munkámat a kezdetektől fogva tanácsaival és odafigyelésével segítette.

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Fekete Andreának, hogy szakértelmével, kritikus észrevételeivel mindvégig támogatta munkámat. Hálával tartozom önzetlen szakmai és emberi segítségéért, mellyel hozzájárult tudományos szemléletem, személyiségem fejlődéséhez.

Köszönöm Dr. Szabó Attilának, Dr. Vannay Ádámnak, Dr. Vér Ágotának és Reusz György professzor úrnak, hogy szakmailag és emberileg segítettek a munkám során felmerülő nehézségek megoldásában, valamint a tudományos közlemények megírása kapcsán.

Köszönettel tartozom Prof. Heymut Omrannak, hogy freiburgi tanulmányutam során befogadott kutatócsoportjába, ahol számos technikai és elméleti tudással gazdagodhattam.

Köszönöm Dr. Prókai Ágnesnek, Dr. Molnár Krisztának és Dr. Pásti Krisztának, hogy PhD tanulmányaink során együtt, egymást támogatva oldottuk meg a munkánk során felmerülő nehézségeket és hogy velük együtt, baráti légkörben tölthettem ezt az időszakot.

Köszönöm Bernáth Máriának, Végh Editnek és Cselenyák Attilának munkám technikai kivitelezése során nyújtott asszisztálást és baráti támogatást.

Hálával tartozom az 1. sz. Gyermekgyógyászati Klinika és a SE-MTA Nefrológiai kutatólaboratórium valamennyi dolgozójának, hogy szakmai kérdésekben segítettek és munkám során baráti hangulatot biztosítottak.

És utoljára, de nem utolsósorban, mérhetetlen hálával tartozom családomnak, akik saját érdekeiket háttérbe szorítva mindvégig elősegítették szakmai fejlődésemet és minden nehezítő tényező ellenére folyamatosan bíztattak.