

Vese génterápia (RNSi) és lupus nephritis IVIG kezelésének mellékhatás-vizsgálata egérmodellen

Doktori értekezés

Dr. Rácz Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hamar Péter, MTA doktora, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Prohászka Zoltán, MTA doktora, tudományos főmunkatárs

Dr. Prechl József, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Benyó Zoltán, MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Csekő Csongor, Ph.D., főosztályvezető

Dr. Lacza Zsombor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS – IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. AZ RNS INTERFERENCIA BEMUTATÁSA	6
2.1.1. AZ RNS INTERFERENCIA TÖRTÉNETE	8
2.1.2. AZ RNS INTERFERENCIA MECHANIZMUSA ÉS JELLEMZŐI	9
2.1.2.1. Az siRNS-ek keletkezése	9
2.1.2.2. Az RNS interferencia hatásmechanizmusa	10
2.1.2.3. Az RNS interferencia energiaigénye	11
2.1.2.4. Az RNS interferencia hatásának amplifikálása	12
2.1.2.5. Az RNSi élettartalma	13
2.1.2.6. SiRNS szintézis	13
2.1.2.7. siRNS adatbázisok	15
2.1.3. A RÖVID RNS-EK INTRACELLULÁRIS BEVITELÉNEK LEHETŐSÉGEI	15
2.1.3.1. Vírus alapú bejuttatási stratégiák	16
2.1.3.2. Nem-vírus alapú bejuttatási stratégiák	17
2.1.4. AZ RNSi GYÓGYÁSZATI ALKALMAZÁSA	24
2.1.5. AZ RNS INTERFERENCIA ALKALMAZÁSA VESEBETEGSÉGEKBEN	26
2.1.5.1. Az apoptózis szabályozása vese iszkémia-reperfúziós károsodásban (IRI)	26
2.1.5.2. Az RNSi alkalmazása krónikus vesebetegségekből	26
2.1.5.3. Az RNSi alkalmazása vesetumzorokban	27
2.1.6. AZ RNSi LEHETSÉGES MELLÉKHATÁSAI	28
2.1.6.1. Az interferon válasz aktiválása, jelátviteli útvonalai, és az interferonok hatásai	28
2.1.6.2. Az Oligoadenilát-szintetáz (OAS) szerepe az antivirális válaszban	30
2.1.6.3. A célgéneken kívüli csendesítés (off-target silencing)	31
2.1.6.4. A veleszületett immunrendszer aktiválódása a Toll-Like Receptorok (TLR- ek) révén	31
2.1.6.5. A komplement aktiváció	32
2.2. KRÓNIKUS VESEBETEGSÉGEK, EZEN BELÜL A LUPUS NEPHRITIS PATOFIZIOLÓGIAI JELLEMZŐI ÉS KEZELÉSI LEHETŐSÉGEI	33
3. CÉLKITŰZÉSEK, KÉRDÉSFELTEVÉS	36
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	38
4.1. Az interferon választ vizsgáló kísérletünkben alkalmazott anyagok, módszerek	38
4.1.1. Vizsgálati állatok	38
4.1.2. siRNS-ek	38
4.1.3. Kezelések	39
4.1.4. siRNS kimutatása a szövetekben	39
4.1.5. Az állatok leölése	40
4.1.6. Az alanin aminoszteráz (ALAT) és aszpartát aminoszteráz (ASAT), vér nitrogén (BUN) mérése teljes vérben és plazmában	40
4.1.7. RNS izolálás	41
4.1.8. cDNS szintézis	41

4.1.9. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (RT-PCR).....	42
4.1.10. Szövetminták festése és kiértékelése	43
4.1.11. Plazma citokin szintek mérése ELISA módszerrel	43
4.1.12. Statisztikai elemzések.....	43
4.2. Az IVIG hatásait felmérő kísérletben használt anyagok és módszerek	44
4.2.1. A kísérleti állatok.....	44
4.2.2 Az állatok kezelése	44
4.2.3 Az állatok leölése	45
4.2.4. Szövettani vizsgálatok.....	45
4.2.5. Immunhisztokémiai vizsgálat.....	49
4.2.6. Lupus autoantitest panel vizsgálata	50
4.2.7. Statisztikai elemzések.....	50
5. EREDMÉNYEK	51
5.1. Az interferon választ vizsgáló kísérlet eredményei	51
5.1.1. A hatékony siRNS felvétel vizsgálata immunfluoreszcens mikroszkóppal....	51
5.1.2. A fiziológiás sóoldat alacsony volumenű hidrodinamikusan injektálása kismértékű emelkedést okozott a STAT1 és OAS1 gének expressziójában, mely nem fokozódott az siRNS-ek hozzáadása után	52
5.1.3. Az alacsony volumenű hidrodinamikusan injektálás hatására az általunk vizsgált szisztémás gyulladásos citokinek (IFN β , TNF α , IL-6 és IL-12p40) plazmaszintje nem mutatott szignifikáns emelkedést	54
5.1.4. A polyI:C kezelés szervi károsodással járó interferon választ váltott ki.....	56
5.1.5. Az siRNS-ek alacsony volumenű hidrodinamikusan injektálása után nem mutatkozott szervi funkcióbeli és szöveti károsodás.....	59
5.1.6. A magas volumenű hidrodinamikusan injektálás májra gyakorolt hatásainak vizsgálata.	61
5.2. Az IVIG hatásait felmérő kísérlet eredményei	64
5.2.1. A magas dózisu IVIG szisztémás adása enyhítette a bőrbetegséget.....	64
5.2.2. A glomeruláris funkció változása IVIG kezelés hatására MRL/lpr egerekben	67
5.2.3. Tubulointesztinális elváltozások.....	68
5.2.4. A vese hidropikus degenerációjának (ozmotikus nefrózis) vizsgálata a kezelések hatására	72
5.2.5. Komplement-3 (C3) lerakódás vizsgálata bőrben és vesében immunhisztokémiai módszerrel	74
5.2.6. Plazma autoantitest vizsgálata IVIG kezelt MRL/lpr egerekben ELISA módszerrel és indirekt immunfluoreszcenciával	76
6. MEGBESZÉLÉS	77
6.1. A szisztémás siRNS kezelés mellékhatásainak vizsgálata állatmodellekben	77
6.2. Az intravénás immunglobulin szisztémás lupus erythematosusra kifejtett hatásainak vizsgálata egér modellen	80
7. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ EREDMÉNYEI, KÖVETKEZTETÉSEK	85
8. ÖSSZEFOGLALÁS	88
9. SUMMARY	89
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	112
12. KÖSZÖNETVNYILVÁNÍTÁS.....	113

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

RNS	ribonukleinsav
RNSi	RNS interferencia
siRNS	rövid interferáló RNS
mRNS	messenger RNS
asRNS	Antiszensz RNS
HDI	hydrodynamic injection, hidrodinamikus bevitel
TT	testtömeg
g	gramm
MVHDI	magas volumenű hidrodinamikus injektálás
AVHDI	alacsony volumenű hidrodinamikus injektálás
IFN	interferon
IFN α	interferon alfa
IFN β	interferon béta
dsRNS	dupla szálú RNS
Jak	Janus arcú kináz
STAT	Signal Transducer And Transactivator of Transcription
OAS	oligoadenilát szintáz
ATP	adenozin trifoszfát
RNázL	ribonukleáz L
TLR	Toll Like Receptor
PolyI:C	polyinozin-polycitidilsav
ALAT	alanin amino transzferáz
mmol/l	milimol/liter
ml	mililiter
HE	hematoxylin-eozin festés
PAS	Perjódsavas-Schiff reakció
X	-szoros nagyítás
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
mGAPDH	egér glükóz aldehid foszfát dehidrogenáz
SD	standard deviáció

PAZ	Piwi-Argonaute-Zwille
AS-ODN	antiszensz oligodezoxinukleotid
esiRNS	endogén siRNS
PBMCs	perifériás csontvelői mononukleáris sejtek
DEPC	dietil pirokarbonát
TLR	Toll Like Receptor
CpG	citozin foszfo guanozin
Rpm	rear per minute
RT-PCR	real time reverse transcriptase polymerase chain reaction
nm	nanométer
μm	mikrométer
SLE	szisztémás lupus erythematodes
OD	optikai denzitás
ANA	antinukleáris antitest
IRI	iszkémia/reperfúziós károsodás
PKD	polycisztás vesebetegség
HIF2α	hipoxia indukált faktor 2α
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
PDGF	trombocita eredetű növekedési faktor
TGFα	transzformációs növekedési faktora
EGF	epidermális növekedési faktor
MMP	mátrix metalloproteáz
DNMT1	DNSmetil transzferáz1
RASSF1A	Ras assosociated domain family 1A
GAG	glükózaminoglikán
IVIG	intravénás immunglobulin
MRL/lpr	a humán lupus egy egérmodellje

2. BEVEZETÉS – IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Jelen tanulmányban a vesebetegségek kezelésének lehetőségeit vizsgáltuk modern génterápiás és hagyományos módon. Kísérleteinkben egereket kezeltünk intravénás úton a ma egyre gyakrabban használt rövid interferáló (si) RNS-ekkel, illetve intravénás immunglobulinnal (IVIG), majd megvizsgáltuk a szervezet válaszreakcióit gén (génexpresszió), sejt (enzim értékek), illetve szövet (szövettan) szinten.

Ezen egérmodelleken végzett vizsgálataink a vizsgált terápiás eljárások klinikai alkalmazhatóságát támasztják alá.

2.1. AZ RNS INTERFERENCIA BEMUTATÁSA

A vesebetegségek egyik modern kezelési lehetősége a génterápia, melynek lehetősége jelenleg a legérdekesebb kutatási témák egyike. Az első klinikai kipróbálásokat súlyos, nemkívánt mellékhatások miatt betiltották; tízből két páciensnél T-sejtes leukémia fejlődött ki az X-kromoszómához kapcsolt súlyos kombinált immunhiány (X-linked severe combined immune deficiency, X-SCID) kezelésére irányuló retrovírus alapú génterápiát követően [1]. Ennek ellenére az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyezési Hivatal (Food and Drug Administration) több mint 1000, különböző fázisokban lévő génterápiás klinikai kipróbálást tart nyilván [2]. Napjainkban már számos génterápiás módszert alkalmaztak vesebetegségek kezelésére, mint pl. az adenovírus vektorokat. A vese szöveti szerkezetének komplexitása miatt az egyszeri génbevitel általában nem elég hatásos, ezért egyéb módszerekre van szükség a génbevitel hatékonyságának fokozására, mint pl. a vese hűtése [3], az elnyújtott géntranszfer [4] vagy elektromos impulzusok alkalmazása [5]. Mivel néhány halálesetet is megfigyeltek adenovirális [6], illetve retrovirális vektorok [7] alkalmazása során, így a figyelem a mellékhatásokra irányult. A vírus vektorok mellékhatásai között szerepel a fokozott immunválasz és/vagy az inzerciós mutagenézis kialakulása (lásd később). A vesebetegségek egy új, biztonságosabb génterápiás lehetőségét biztosítaná az RNS interferencia. Kísérleteink során elsőként alkalmaztunk RNS interferenciát vesében [8], mellyel sikeresen gátoltuk a vese ischaemiát követő reperfúziós károsodását (apoptózist). További kísérleteinkben vizsgáltuk a NADPH oxidázoknak (Nox-ok) a vese iszkémia-reperfúziós károsodásában betöltött szerepét (nem közölt adatok),

azonban eddigi eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a Nox enzimek expressziójának csendesítése nem befolyásolja jelentősen a vese károsodását iszkémia-reperfúzióban.

Az antibiotikumokhoz hasonlóan, melyek a prokarióta szervezetek fejlődéséhez igen, az eukarióta szervezetek fejlődéséhez azonban nem szükséges molekulákat támadnak meg, az siRNS-vel irányított génterápia célpontjaiként is választhatunk az emberi szervezet számára idegen molekulákat. A szisztémás mellékhatások kialakulása pedig minimalizálható a célszervek kizárólagos kezelése révén. Mindezek fényében az siRNS mediált génterápia a vírusfertőzések, rosszindulatú tumoros betegségek és a szemészeti betegségek esetében áll legközelebb a klinikai alkalmazáshoz. Sőt, az siRNS-eket terápiás szerként már ki is próbálták különféle betegségekben (bakteriális és virális fertőzésekben, autoimmun betegségekben, hypercholesterinaemiában, neuropátiás fájdalomban, neurodegeneratív betegségekben, tumoros betegségekben, septicus sokkban és nemi úton átvihető betegségekben) mind *in vitro*, mind pedig *in vivo* [9]. A szerv-transzplantáció is potenciális területévé válhat az ilyen génterápiának, mivel a graft ex-vivo eltöltött időtartama ideális ablakot biztosítana a graft károsító folyamatokban (pl. iszkémia-reperfúzió, kilökődési reakció) részt vevő káros fehérjék szerspecifikus csendesítésére, anélkül, hogy a rövid RNS-eket a szisztémás keringésbe juttatnánk. Ezen esetben az *in vivo* kezelésnél sokkal hatékonyabb transzdukciós protokollok válhatnának alkalmazhatóvá, továbbá a graft beültetés előtti „kimosással” eltávolíthatnánk a fel nem vett siRNS-t és a carrier molekulát, megelőzve a lehetséges szisztémás mellékhatások kialakulását.

Az RNS interferencia (RNSi), amelyet rövid RNS-ek (short interfering RNS, siRNS-ek, valamint short hairpin, shRNS-ek) segítségével végezhetünk, a génterápia legígéretesebb területeinek egyikévé vált. Az siRNS-ek nagyságrendekkel hatékonyabbak a hagyományos antiszensz metodikáknál (antiszensz oligonukleotidok, AS-ODN-ok) [10, 11]. Az siRNS-ek alkalmazásának lehetőségei a fertőző és autoimmun betegségektől egészen a rosszindulatú daganatokig és a genetikai rendellenességekig terjedhetnek [12]. A továbbiakban az RNS interferencia történetét, hatásmechanizmusát, alkalmazási lehetőségeit és mellékhatásait mutatjuk be.

2.1.1. AZ RNS INTERFERENCIA TÖRTÉNETE

Az RNSi jelenségét először 1928-ban írták le, amikor Wingard megfigyelte, hogy a dohánymozaik vírussal (ringspot virus) fertőzött dohánynövény felső levelei rezisztensek a vírusfertőzéssel szemben [13]. Az ezen folyamat mögött álló géncsendesítési mechanizmust először növényekben [14] és gerinctelenekben [15] írták le, és a következő folyamatokkal hozták összefüggésbe:

- A növényekben megfigyelt ősi folyamattal, az úgynevezett koszuppresszióval (lásd lent),
- a gombákban megfigyelt, illetve a transzpozonok által kiváltott csendesítéssel,
- antivirális védekezési mechanizmusokkal,
- génszabályozással, valamint kromoszómális módosítással.

Növényekben és gerinctelenekben - feltehetően az antitest alapú adaptív immunitást pótolva - az RNSi védi meg a génállományt a vírusoktól és a transzpozonoktól; az emlős sejtekben betöltött szerepét még ma sem ismerjük teljesen. Jorgensen és kollégái egy szerencsés véletlen során fedezték fel a mechanizmust, amikor 1990-ben a petúnia chalcone szintetáz (chsA) génjének aktivitását kívánták fokozni külsőleg bejuttatott oligonukleotidokkal, hogy ezáltal az anthocyanin pigment termelését fokozzák, így sötétebb lila virágú növényt fejlesszenek ki. Meglepő módon, néhány igazoltan transzgenikus petúnia részlegesen elvesztette mind az endogén, mind a transzgén chalcone szintetáz aktivitását, és virágaik tarkák lettek, fehér területeket tartalmaztak [16]. Jorgensen ezt a folyamatot „koszuppresszió” nevezte el.

Később, Mello és munkatársai antiszensz RNS-eket (asRNS-eket) alkalmaztak *Caenorhabditis elegans* hengeresféregben. Ez volt a géncsendesítés első állatmodellje [17]. Megfigyelték, hogy ha *C. elegans*-ba hosszú kettős szálú RNS-eket (double stranded RNA, dsRNS) juttattak be, az a vele homológ hírvivő (messenger) RNS (mRNS) célzott degradációját okozta. Továbbá a dsRNS szensz és antiszensz RNS szálainak egyszerre történő beadása akár tízszer hatékonyabb csendesítést eredményezett, mint egy szál egyedüli használata. Ezt az eljárást poszt-transzkripció géncsendesítésnek (post-transcriptional gene silencing, PTGS) nevezték el. Felmerült, hogy a PTGS a növényekben, gombákban és *Drosophila*-ban megfigyelt koszuppresszió rokona lehet [18]. Bár az RNSi alacsonyabb rendű eukariótákban történő

felfedezése nem váltott ki számottevő érdeklődést, az orvosbiológiai kutatás figyelme egy csapásra az RNSi-re irányult, amikor annak emlős sejtekben való előfordulását is felfedezték. Tuschl és munkatársai kimutatták, hogy az RNSi emlős eredetű tenyésztett sejtekben (humán embrionális vese 293, HEK 293 és HeLa sejtekben) is kiváltható, ugyancsak szekvencia specifikusan. A folyamatot a csendesítendő génnel homológ rövid dsRNS indítja el, mely hosszabb dsRNS-ekből keletkezik a ribonukleáz III hasításának eredményeképpen [19]. Napjainkig az siRNS-eket számos állatmodellben alkalmazták már sikeresen, mint például nematoda [20], *Drosophila* [21], hidra [22], zebradánio [23], egér [24, 25] és patkány [26] modellekben.

A PTGS során tehát a dsRNS molekulák irányítják az indukáló molekula kis darabokra vágását [27], illetve a celluláris és a virális mRNS-ek lebontását [28]. E folyamatok eredménye képpen a cél mRNS nem tud felszaporodni a citoplazmában, bár mennyisége még detektálható szinten marad [29].

Összegezve, az RNS interferencia *in vivo* szerepe a gazdaszervezetnek a vírusoktól való védelemben van, mivel a vírusok életciklusa során gyakran keletkeznek dsRNS-ek [30]. Az idegen RNS szekvenciák felismerése és hasítása a vírus fertőzés gátlását eredményezi. Az RNSi a növényekben egy ősi vírus-ellenes védekezési módszer, az azonban még nem tisztázott, hogy van-e szerepe az emlős sejtek vírus-ellenes védekezésében vagy a génszabályozás más folyamataiban. Az RNSi további fontos szerepe a genom védelme az idegen genetikai elemek, transzpozonokkal szemben. Az RNSi mechanizmusának leírásáért Fire és Mello 2006-ban orvosi Nobel díjat kapott.

2.1.2. AZ RNS INTERFERENCIA MECHANIZMUSA ÉS JELLEMZŐI

2.1.2.1. Az siRNS-ek keletkezése

Az RNSi különböző lépéseinek felfedezése után lehetségessé vált az egész mechanizmus leírása. Az elmúlt években lényeges előrelépést jelentett az RNSi legfontosabb lépéseinek tisztázása. Az *in vitro* és *in vivo* kísérletek során az RNSi-nak, illetve a PTGS-nek egy kétlépéses modelljét állították fel: melyben az első lépés (RNSi kezdő lépése) az RNS nukleázok dsRNS kötése és feldarabolása 21-25 nukleotid

hosszúságú RNS fragmensekre (siRNS-ekre). A második lépés során ezek az siRNS-ek belépnek az RNS indukálta csendesítő komplexbe (RISC), amely lebontja az siRNS-sel homológ mRNS-t. Mindezek ismerete mellett lényeges megemlíteni, hogy jelenleg is keveset tudunk még az RNS-fehérje komplexekről és ezek kialakulásáról.

A hosszú dsRNS-eket egy specifikus nukleáz, a ribonukleázok RNáz III családjába tartozó dicer alakítja át siRNS-é ^[31]. A dicer a dsRNS-eket oly módon hasítja, hogy a termék 3' végén 2-3 nukleotidnyi túllógás (overhang), az, 5' végén pedig foszfát csoport legyen egységesen. A dicer közel azonos struktúrával található meg a férgekben, a gombákban, a növényekben és az emlősökben is (konzervatív fehérje).

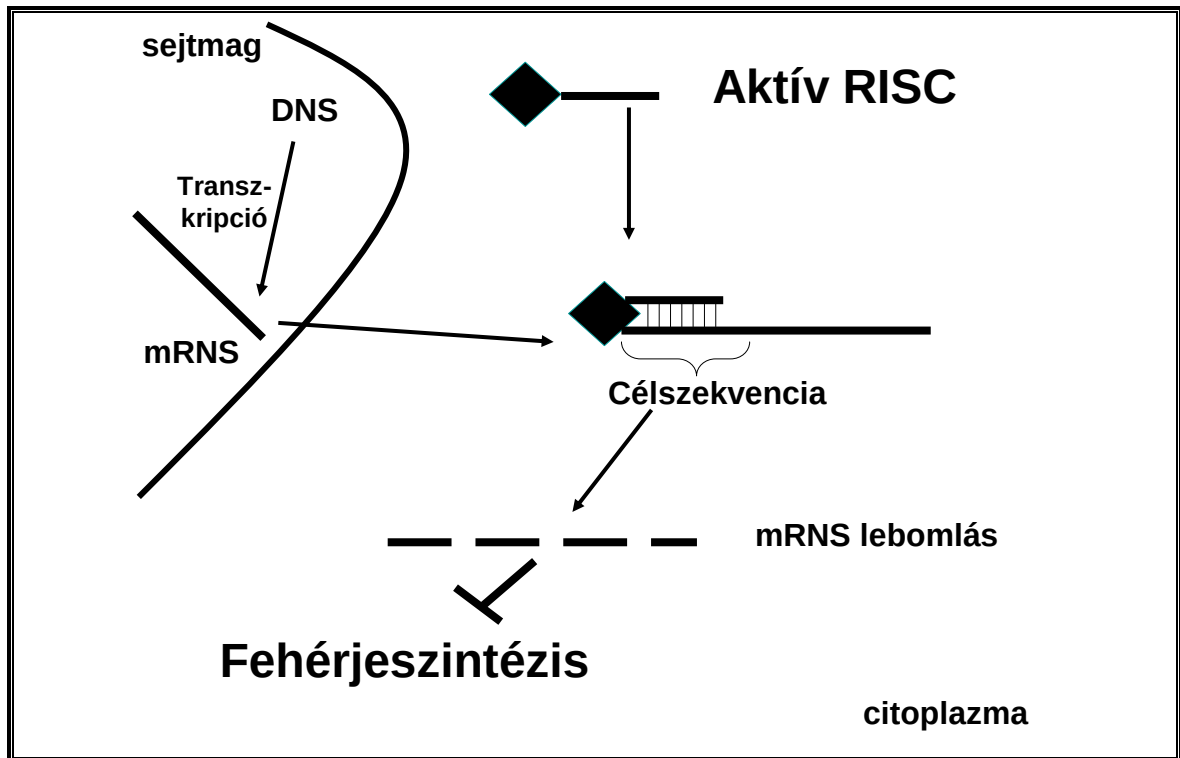
2.1.2.2. Az RNS interferencia hatásmechanizmusa

Az siRNS-ek jellegzetes szerkezetükből adódóan (egy szabad 5'-foszfát vég, amit 19 - 21bázispár (bp) hosszú kettős szálú RNS követ és a 3' végén két párosítatlan nukleotidból álló overhang található) ^[32] beépülnek az RNS által indukált csendesítő komplexbe (RNA induced silencing complex, RISC), amely egy több alegységből álló ribonukleoprotein komplex. A RISC-ben az siRNS-ek széttekerednek: egy szensz és egy antiszensz szálra bomlanak, amelyek közül az antiszensz szál irányítja a cél mRNS felismerését és hasítását. Az aktivált RISC tartalmazza

- az antiszensz RNS szálát,
- egy *Argonaute* gén homológ fehérjét, amely az RNS-eket kötő fehérje,
- továbbá egyéb faktorokat is, amelyek közé egy, a cél RNS hasításáért felelős endonukleáz is tartozik ^[33].

A RISC ATP jelenlétében aktiválódik és az siRNS szálait szétcsavarja. A továbbiakban az antiszensz szál irányítja az RNSi további lépéseit: a RISC-ben megkötött antiszensz siRNS szál kötődik a vele komplementer mRNS-hez, majd a RISC komplex feldarabolja azt.

Az mRNS elhasítása következtében a transzkripció és transzláció teljes folyamata megszakad, míg a DNS mennyisége változatlan marad. Más szóval, a fehérje szintézis a genom intaktsága mellett gátlódik (1. ábra).



1. ábra: A csendesítő mechanizmus: RNSi szintén inicializálható kémiai szintetizált siRNS-ek sejtekbe juttatásával. Ezek a molekulák 19-21 bázispár méretű RNS-ek, amelyek a célszekvenciával homológok.

Összefoglalva tehát, az RNS interferencia mechanizmusának általánosságai a következők:

- az indukáló molekula dsRNS,
- a cél mRNA feldarabolásának alapja szekvencia-homológia,
- a lebontást végző komplex számos olyan fehérjét tartalmaz, melyek szerkezete és funkciója a legtöbb szervezetben és sejtben konzervatív.

2.1.2.3. Az RNS interferencia energiaigénye

Az RNSi folyamata energiaigényes reakciókat tartalmaz (1. táblázat), melyet ATP megvonásos kísérletekkel igazoltak [34]. Az RNáz aktivitás az ATP mennyiségén kívül érzékeny az ionok (például a magnézium) koncentrációjára is; míg a dsRNS megkötésének folyamata egyáltalán nem igényel magnéziumot [35].

ATP függő lépések az RNSi során
Hosszú dsRNS hasítása siRNS-sé (dicer)
siRNS szálak széttekerése a RISC-ben (helikáz végzi)
Cél mRNS felismerése
Cél mRNS feldarabolása

1. táblázat: ATP-t igénylő reakciók az RNSi mechanizmusa során

2.1.2.4. Az RNS interferencia hatásának amplifikálása

Az RNSi egyik további tulajdonsága, hogy katalitikus természettel (siRNS amplifikáció) bír, így néhány dsRNS molekula is elegendő a folyamatosan átíródó cél mRNS hosszútávú csendesítésére. Habár a dsRNS siRNS-sé való átalakítása során történik némi amplifikáció, ez még mindig nem elégséges a fent említett nagyfokú cél mRNS degradációhoz. Lipardi és munkatársai igazolták, hogy az RNS dependens RNS polimeráz számára mind az egyszálú, mind a kétszálú RNS templátként szolgálhat. A cél mRNS feldarabolása során keletkező hosszú, dsRNS szakaszok rövid időn belül siRNS-ekké alakulnak át, amplifikálva ezáltal az RNSi folyamatát. Leírták azt is, hogy a 3' hidroxil és az 5' foszfát csoport jelenléte szigorúan kötelező az RdRP által irányított primer extenzióhoz [36]. Sijen és munkatársai mindezeket túl még azt is kimutatta, hogy a cél mRNS feldarabolása során keletkező új siRNS-ek (úgynevezett másodlagos siRNS-ek) különböznek az eredeti (trigger) siRNS-ektől. A másodlagos siRNS-ek által kiváltott RNSi-t tranzitív („átvihető”) RNSi-nak nevezte el [37].

Az RNSi mechanizmusának további érdekessége, hogy a 21 nukleotid hosszúságú antiszensz siRNS szál majdnem olyan hatékonyan csendesít, mint az siRNS duplex [38, 39], mivel az asz siRNS is beépül a RISC-be, csak kisebb hatékonysággal, mint a kettős szálú siRNS [40]. Azon tény, hogy a nagy mennyiségben beadott ds siRNS kompetitíven gátolja az asz siRNS-t, szintén alátámasztja azt a felvetést, hogy a két molekulát azonos rendszer dolgozza fel. Mivel az asz siRNS-ek gyorsabban érik el maximális aktivitásukat, mint a kettős szálúak, feltételezik, hogy az asz siRNS-ek a

mechanizmus egy későbbi - az effektor nukleázhoz közelebbi - pontján csatlakoznak a folyamathoz [41].

2.1.2.5. Az RNSi élettartalma

Az RNSi-vel végzett génexpresszió csökkenés, azaz csendesítés során a génexpresszió visszaszorításáról (knockdown) van szó és nem pedig annak kiiktatásáról (knockout). Gyorsan osztódó sejtekben az siRNS-ek maximális hatása 2-3 napig tart mind *in vitro* [42], mind *in vivo* [43] adatok alapján. A csendesítő hatás tartama azonban gazdaszervezettől függően is változik; egerekben mindössze néhány napig figyeltek meg hatékony csendesítést, míg humán főemlősökben a 11. nap után is jelentős csendesítéssel lehet számolni [44]. Az siRNS hatásának időtartama mindezek mellett függ a célszerv szerkezetétől, a célgéntől, illetve a róla folyó átírás tulajdonságaitól, a kezelt fajtól, valamint az adott sejtípus osztódási idejétől. Ez utóbbi kiemelkedő jelentőséggel bír, ugyanis az RNSi hatásának időarányos gyengülése a sejtosztódások során bekövetkező siRNS-hígulásának tudható be. Ezzel ellentétben, differenciált sejtekben, mint például a makrofágokban, az *in vivo* RNSi hatása több napig eltart egyetlen dózis beadása után is [45].

2.1.2.6. SiRNS szintézis

Az siRNS technológia segítségével elméletileg bármely sejtípus bármely génjének működése csökkenthető. A dsRNS-ekkel végzett post-transzkripcionális génszabályozás alkalmazásának számos mellékhatása ismert, mint például a dsRNS által kiváltott, nem specifikus géncsökkentés [46]. Korábban úgy vélték, hogy a 30 bázispárnál rövidebb dsRNS-ek, mint például az siRNS-ek, nem váltanak ki nem specifikus géncsökkentést. *Caenorhabditis elegans*-on és *Drosophila melanogaster*-en végzett kísérletek bebizonyították, hogy a hosszú dsRNS-ekhez hasonlóan a szintetikus, rövid siRNS-ek is képesek mellékhatások kiváltására [47]. Mindezek miatt ma már az siRNS-ek szerkezetét gondosan optimalizálják, mely elengedhetetlen az RNSi specificitásához. Mivel ugyanazon cél mRNS különböző régiókra tervezett siRNS-ek csendesítési

hatékonysága eltérő [48], kulcsfontosságú az siRNS által indukált géncsendesítés magas fokú optimalizálása, valamint a különböző - csendesítés szempontjából fontos – paraméterek, (hossz, másodlagos szerkezet, cukorgerinc típusa, és szekvencia specificitás) vizsgálata a lehetséges legtöbb kísérleti faj esetében (muslica, humán, stb) [49]. Habár általános szabály eddig nem született az siRNS-ek optimális kiválasztásával kapcsolatban, mégis, néhány követendő alapelvet érdemes figyelembe venni:

- Olyan szekvenciát válasszunk, ami a start kodontól 50 – 100 bázispárra helyezkedik el.
- A start kodonhoz közeli 5' vagy 3' UTR-t érdemes kihagyni, ugyanis az UTR-t kötő fehérjék, illetve a transzláció elindulásáért felelős fehérjekomplexek zavarhatják a RISC kötődését.
- Az siRNS guanin-citozin (GC) tartalmát tanácsos 30 és 70% között beállítani.

Mindezek mellett, Ui-Tei és munkatársai szerint a hatékony siRNS-ek szintéziséhez az alábbiak figyelembe vétele is szükséges:

- Adenin/Uracil jelenléte az antiszensz szál 5' végén,
- Guanin/Citozin jelenléte a szensz szál 5' végén,
- több, mint 4 nukleotidnyi A/U gazdag szakasz jelenléte az antiszensz szál 5' végén,
- hosszú G/C szakasz hiányozzon a szensz szál 5' végéről.

Számos, könnyedén elérhető siRNS-t tervező program létezik [50, 51], melyek a fent felsoroltakat figyelembe véve adnak javaslatot a leghatékonyabb siRNS szekvenciák tervezésére.

Az siRNS-eket tehát kémiai úton is szintetizálhatjuk [19].

Az siRNS szintézisre vonatkozó javaslatokat a 2. táblázatban foglaltuk össze.

Szekvencia	AA(N19)TT
Túlnyúló végek	2 nukleotidnyi, 3' végen UU
Hosszúság	21 nukleotid
Csoportok	5' foszfát, 3' hidroxil
Másodlagos szerkezet	siRNS, shRNS diszrupciós energiája >-10 kcal/mol [⁵²]
Terminációs jel	4-5 T a szál végén

2. táblázat: Az siRNS szintetizálásához alapvető fontosságú szempontok (A=adenin, T=timin, N=nukleotid)

2.1.2.7. *siRNS adatbázisok*

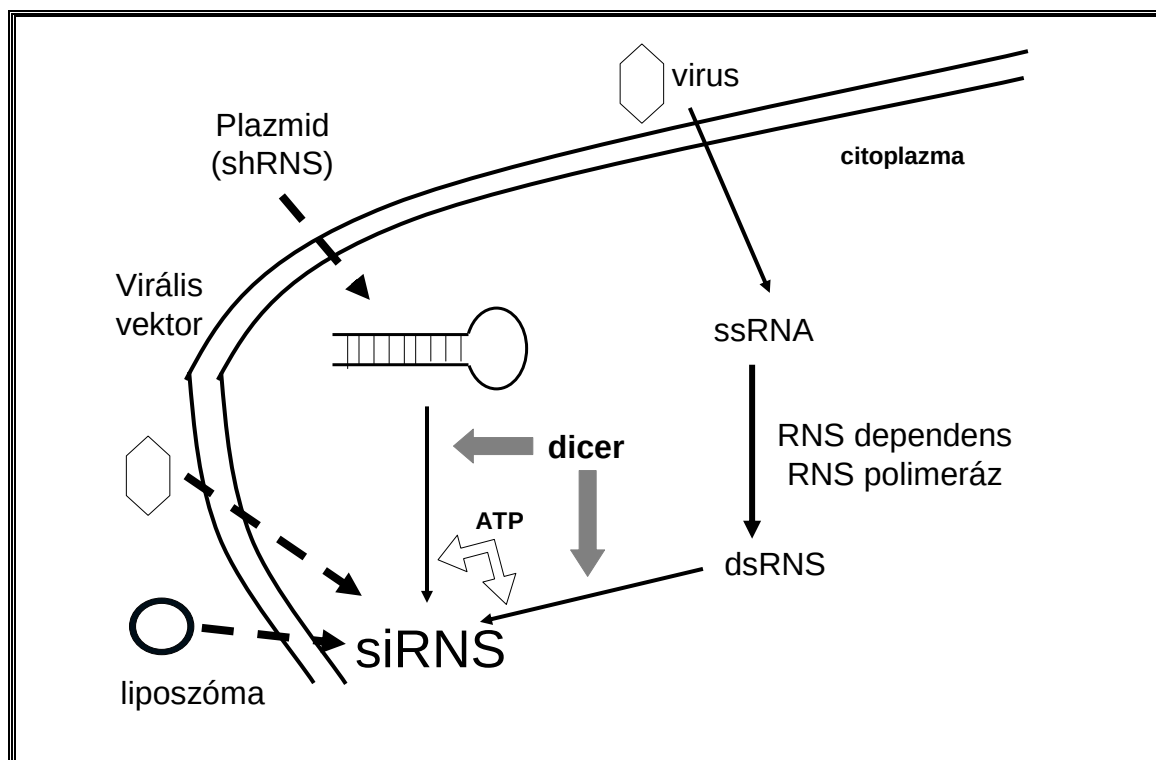
Napjainkban az RNSi-t alkalmazó kísérletek száma rohamosan nő, mely lehetővé tette az adatbázisok létrejöttét. Az siRNSdb nevű adatbázis [⁵³] az siRNS-ekkel végzett kísérletek gyűjteménye, melyet azért hoztak létre, hogy segítse a kutatókat a kísérletekben használt siRNS-ek helyes kiválasztásában. Ezen adatbázis génközpontúan nyújt segítséget az siRNS-t alkalmazó kísérletekben. Mindezeknek köszönhetően a felhasználó megismerheti az érdeklődése központjában álló siRNS gátlási képességét, főbb fizikai tulajdonságait (termodinamikai tulajdonságok) és nem specifikus hatásait [⁵⁴].

2.1.3. A RÖVID RNS-EK INTRACELLULÁRIS BEVITELÉNEK LEHETŐSÉGEI

Az RNSi-t alkalmazó terápia számára a rövid RNS-ek sejtbe való bejuttatása még napjainkban is komoly akadályt jelent, mivel az emlős sejtek sejtmembránja a negatív töltésű siRNS-ek számára nem vagy alig átjárható, valamint az *in vitro* módon alkalmazott transzfekciós módszerek egy része nem alkalmazható *in vivo*. Mindemellett az siRNS-ek gyors renális kiválasztása miatt az *in vivo* felezési idejük nagyon rövid (másodpercek-percek tartományba esik). A szintetikus siRNS-ek sejtbe való

bejuttatásának egyik megoldása lehet az siRNS prekursorok vírus vektorokkal való expressziója, vagy az siRNS összekapcsolása ún. hordozó lipidekkel vagy fehérjékkel (2. ábra). Az siRNS-eknek bizonyos peptidekhez való kapcsolódásáról azt is kimutatták, hogy elősegíti ill. megkönnyíti az siRNS-ek sejtmembránon keresztüli transzportját ^[55]. A sejt-specifikus bejuttatás, amely során az siRNS-eket sejtfelszíni receptor ligandokhoz vagy antitestekhez kapcsoljuk, lecsökkenthetné a potenciális toxicitást mind a virális, mind a nem-virális eredetű vektorok esetében. .

Ma már számos vírus-alapú, (adenovírus, adeno-asszociált vírus, onkoretrovírus, lentivírus vektorok) és nem-vírus alapú (liposzómák, nanorészecskék vagy peptid-lipid transzfekciós eljárások) beviteli rendszer létezik az siRNS-ek sejtekbe juttatására.



2. ábra: Külső és belső útvonalak, melyeken keresztül gátló siRNS kerülhet a sejtbe:
 Jobb oldali nyilak: RNSi élettani szerepe. Bal oldal (szaggatott nyilak): siRNS mesterséges bejuttatása a sejtbe.

2.1.3.1. Vírus alapú bejuttatási stratégiák

Az RNSi-t alkalmazó kísérletek legproblémásabb része a megfelelő vektor kiválasztása. A szövet-specifikus promóterek és a célsejtek felszínén található specifikus receptorok ellen irányított vírus antigének széles skálájának köszönhetően szinte minden sejttípust transzdukálhatunk vírus vektorokkal. A nagy választékban rendelkezésre álló vírus vektorok előnye, hogy egyszerű az előállításuk és az alkalmazásuk. Amennyiben stabil transzgén expresszióra van szükségünk, érdemes retrovírus, illetve AAV vektor-rendszereket alkalmazni. Az összes többi vektorral létrehozott expresszió átmeneti jellegű. Mindezek mellett, a vírus vektorok további fő hátránya a gazdaszervezet ellenük irányuló immunválasza: a vírust semlegesítő antitestek a vírus vektor első beadása után rövid időn belül megjelennek, amely miatt az ugyanazon szerotípusú virális vektor ismételt alkalmazása lehetetlenné válik. Ezen probléma megoldására szolgál a vírus antigének megváltoztatása, a vírus burkának módosítása, valamint az ún. pszeudotipizálás, amely során a gazda tropizmus szélesíthető vagy szűkíthető. Az irodalomban számos vírus vektorral végzett kísérlet ismeretes mint pl. az adenovírus [⁵⁶, ⁵⁷, ⁵⁸, ⁵⁹], adeno-asszociált vírus [⁶⁰, ⁶¹, ⁶², ⁶³], retrovírus [⁶⁴] és a lentivírus [⁶⁵, ⁶⁶, ⁶⁷, ⁶⁸] vektorok.

2.1.3.2. Nem-vírus alapú bejuttatási stratégiák

Az előzőekben említettek alapján a vírus vektorok számos esetben nem alkalmazhatóak. Ilyenkor a nem vírus alapú vektorral kivitelezett bejuttatási módszerek jönnek szóba. Számos stratégia létezik a hatékony, nem-vírus alapú bejuttatás esetére mind *in vitro*, mind pedig *in vivo*. A továbbiakban ezek részletezéséről lesz szó.

Hidrodinamikus injektálás (hydrodynamic injection, HDI)

Az siRNS-ek *in vivo* bejuttatásából származó gyógyászati előnyöket egerekben már kimutatták. Szintetikus siRNS-ek *in vivo* sejtbe juttathatóak az ún. módosított „hidrodinamikus transzfekciós eljárással”, amely egy magas nyomású, magas térfogatú injektálási módszer. Ezt eredetileg antiszensz oligonukleotidok és plazmid DNS sejtbe juttatására dolgozták ki. Rágcsáló modellekben a hidrodinamikus kezelés során a farok

(vagy a hímvessző) vénáit alkalmazhatjuk. Amikor az siRNS-eket rövid időn (maximum 10 másodperc) belül, nagy térfogatba (az állat keringő vértérfogatának 50-100%-a-) intravénásan injektáljuk, a folyadék feltorlódik az alsó ürös véna (vena cava inferior) rendszerében. Ez a torlódás olyan magas vénás és kapilláris nyomást hoz létre, amely során az siRNS-ek a bő vérellátású parenchimás szervek (máj, vese, stb.) fenesztrált endotél rétegén keresztül átpréselődnek ^[69]. Korábbi kísérleteinkben igazoltuk, hogy a hidrodinamikus kezelést követően az egerek hepatocitáinak körülbelül 90%-a vette fel az siRNS-t, amelynek következményeként a Fas (apoptózis) receptor expressziója 80-90%-os csökkenést mutatott ^[24].

Van de Water és kollégái leírták, hogy az siRNS intravénás beadása után az a célgén funkciójának csendesítéséhez elegendő mértékben akkumulálódik a vese proximális tubulusaiban, míg ehhez képest bizonyos szervekben (vázizom, agy, bélrendszer, tüdő, lép) mindössze negyvened annyi siRNS-t figyeltek meg. ^[70]. Larson és munkatársai a különböző lokalizációban beadott, magas nyomású beviteli módszereket hasonlította össze, melyenek eredményeit a 3. táblázatban foglaltuk össze.

Beviteli módszerek és az általuk létrehozott szignifikáns transzdukció lokalizációja			
Hidrodinamikus farokvéna kezelés (1000 µl)	Standard farokvéna kezelés (200 µl)	Intraperitoneális bevitel (200 µl)	Rectalis bevitel (100 µl)
Máj		Lép	Lép
Vese		Máj	Vastagbél
Hasnyálmirigy		Csontvelő	Csontvelő
Lép			
Csontvelő			

3. táblázat: A különböző helyre, magas nyomással beadott fluoreszcens siRNS-ek felvételi helyei ^[71].

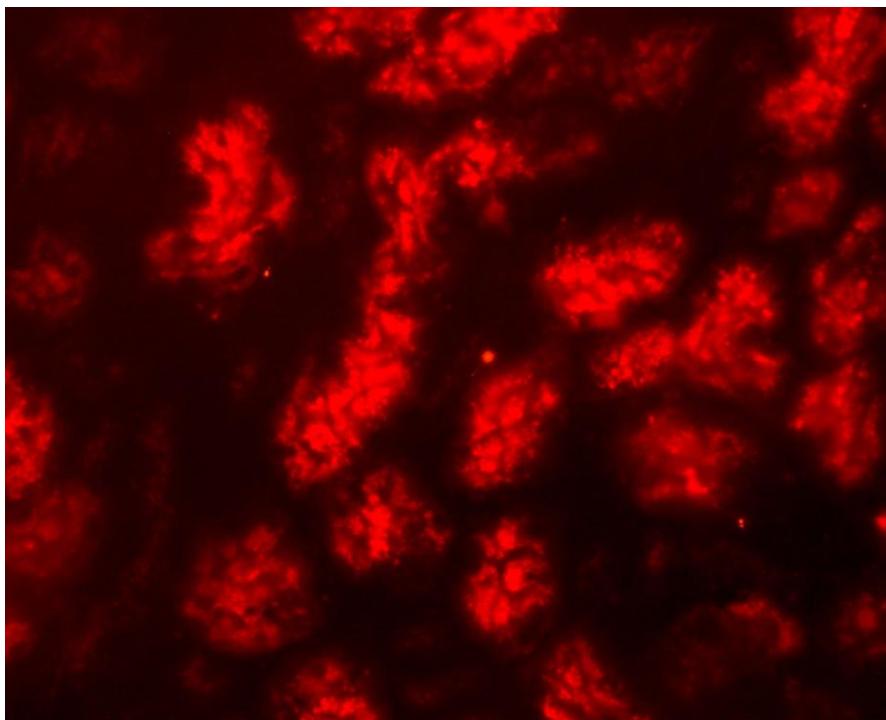
A hidrodinamikus kezelés bár rágszálókban hatékonynak bizonyult, az eljárás a beadott nagy térfogat miatt mégsem alkalmazható a humán klinikumban. Ugyanakkor létrehoztak már egy olyan számítógép által vezérelt HDI módszert, mely felveti a humán alkalmazhatóság lehetőségét [72]. Kisebb térfogatú injekció vagy helyi (szervspecifikus) vénák katéterezése megfelelő alternatíva lehet az siRNS helyi bejuttatására. Számos kísérletben bizonyították, hogy az siRNS-ek bejuttathatóak a központi idegrendszerbe [73], a szubretinális térbe, valamint [74] a peritoneális üregbe [75] is ahol megfelelő hatékonysággal fejtik ki hatásukat.

Transzfekciós reagensok

Az siRNS-ek sejtbe történő bevitelének módszere alapvető fontosságú az RNSi mechanizmusának létrejöttéhez. Ma már a legkülönbözőbb transzfekciós reagensok állnak rendelkezésre az siRNS-ek intracelluláris bevitelének elősegítésére.

Az siRNS transzfekciós reagensok leggyakrabban kationos lipid alapú vegyületek, melyek mintegy „becsomagolják” az siRNS-t, megakadályozva ezzel a lebomlásukat és fokozva a sejtbe való felvételüket akár *in vivo* is. Ilyen kationos lipid például amit vese transzdukcióra már alkalmaztak az N-[1-(2,3-Dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilammónium metilszulfát (DOTAP) [76, 77]).

A Lipofectamine RNAiMax transzfekciós reagens *in vivo* siRNS magas beviteli hatékonyságát saját eredményeink is alátámasztják. Húsz százalékos Lipofectamine oldatban 50 µg fluoreszcensen jelzett siRNS-t (Block-IT) komplexáltunk, melyet a vesevénába injektáltunk (300 µl-es végtérfogatban). Harminc perccel később a vese tubuláris epithel sejtek erős pozitivitást mutattak (lásd később, 3. ábra).



3. ábra: Az siRNS intracelluláris felvétele vesében (400X) 30 perccel a BLOCK-iT Alexa Flour Red Fluorescent Oligo hidrodinamikus injektálása után. A fényképet N2.1 filterrel készítettük (excitáció: 515 – 560 nm között) Leica DC500 mikroszkópon.

A transzfekciós reagentsek kereskedelemben beszerezhető típusait a 4. táblázatban foglaltuk össze.

Reagens neve	Gyártó cég
Rnotion transzkefcíós reagens	5PRIME
Gene Ereader siRNS transzfekciós reagens	Agilent Biotechnology-Stratagene Products
Silencer siRNS transzfekciós kit	Ambion
siPORT	Ambion
siPORT XP-1 transzfekciós reagens	Ambion
siPORT Amine transzfekciós reagens	Ambion
siPORT lipid transzfekciós reagens	Ambion
PURPLE NIMT transzfekciós reagens	Bulldog Bio Inc.
GenomeONE-Neo EX HVJ-E 1 ill. 4 virális transzfekciós reagens	Cosmo Bio Co., Ltd.
TriFECTin	Integrated DNA Technologies
Lipofectamine RNAiMAX transzfekciós reagens	Invitrogen
Lipofectamine 2000 reagens	Invitrogen
siRNS teszt kit	Lonza Cologne AG
siIMPORTER kit	Millipore
TransIT®-siQUEST transzfekciós reagens	Mirus Bio LLC.
TransIT®-TKO transzfekciós reagens	Mirus Bio LLC.
Fluorescein-siRNA transzfekciós reagens	New England Biolabs
TransPass R1 transzfekciós reagens	New England Biolabs
Lullaby®-siRNA transzkekcíós reagens	OZ Biosciences
DreamFect	OZ Biosciences
Nanofectin siRNA	PAA Laboratories, Inc.
INTERFERin siRNS transzfekciós reagens	Polypus Transfection
jetPRIME transzfekciós reagens	Polypus Transfection
jetSI conc.10 mM siRNS beviteli reagens	Polypus Transfection

jetSI-ENDO transzfekciós reagens	Polypus Transfection
PromoFectin-siRNA	Promocell GmbH
X-treme GENE siRNS transzfekciós reagens	Roche Applied Science
siRNA transzfekciós médium	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
N-TER Nanoparticle siRNS transzfekciós reagens	Sigma-Aldrich
GenMute siRNS transzfekciós reagens	SignaGen Laboratories

4. táblázat: A jelenleg rendelkezésre álló, forgalomban lévő siRNS transzfekciós reagensok listája.

Bevitel rövid hajtókanyar RNS-t (shRNA) tartalmazó plazmidokkal

Korábban, az emlős gének funkciójának vizsgálati nehézségeit a hatékony és stabil funkcióvesztést eredményező módszerek hiánya okozta. Ezen probléma megoldásának céljából speciális, siRNS-t expresszáló vektorokat fejlesztettek ki, melyek segítségével a génexpresszió stabilan csendesíthető, így funkcióvesztéses fenotípusok hozhatóak létre [78]. Ezt megvalósíthatjuk rövid hajtókanyar RNS-eket (short hairpin RNS, shRNS) expresszáló plazmidokkal is. Sikeres transzfekció után a sejtekben elkezdődik a kódolt shRNS termelődése. Az shRNS-ek rövid, speciális szerkezetű RNS-ek, melyek egy szensz szálból, egy hajtókanyarból (5-9 bp hosszúságú) és egy komplementer antiszensz szálból állnak [79].

Elektroporáció és szonoporáció: transzfekció elektromos áram és ultrahang segítségével

Az elektroporáció során elektromos áram segítségével a makromolekulák (fehérjék, DNS, RNS) sejtmembrán permeabilitása, tehát a sejtmembránon történő átjutásuk fokozódik. Leginkább *in vitro* használják, azonban *in vivo* alkalmazására is ismert néhány példa (bőr, izom, agy). Patkányokban, rögtön az siRNS veseartériába

történő beadása után alkalmazott elektroporáció a célfehérje jelentős knock-down-ját eredményezte a glomerulus mesangiális sejtjeiben [⁸⁰, ⁸¹]. Ugyanakkor számolni kell azzal is, hogy maga az elektroporálás aktiválhatja a sejtek stressz-jelátviteli útvonalait, ezzel jelentős mellékhatásokat létrehozva [⁸²]. Megvalósítható alternatívát jelentene a szonoporáció (ultrahang segítségével történő bevitel, lásd lent), mely az elektroporációhoz hasonlóan nyitja meg a sejtek pórusait és fokozza az siRNS felvételét [⁸³], azonban kevesebb mellékhatást vált ki [⁸⁴]. Az ultrahang ezen hatása tovább erősíthető az ultrahang kontrasztanyagok segítségével, melyek valójában gázzal töltött buborékok, melyek kidurranásukra gáz kilövellése során keletkezett erővel hozzák létre a terápiás molekula sejtbe történő bevitelét [⁸⁵, ⁸⁶].

SiRNS konjugálása sejt-specifikus antitestekhez

Mivel az antitestek egyik alapvető tulajdonsága a specificitás, antitestek alkalmazását is felvetették az siRNS-ek célzott bevitelére [⁸⁷]. Az antitesttel irányított bevitel előnye, hogy a monovalens antitestek nem aktiválják a komplement rendszert, ami egyébként gyakran aktiválódik különböző nukleinsavak hatására [⁸⁸]. Az antitest alapú molekulákat elsősorban a malignus szolid tumorok és a leukémiák kezelésében vélik előnyösnek, mivel nagyfokú specificitással és affinitással rendelkeznek [⁸⁹].

Tanulmányunkban a fehérje alapú (antitestekhez kötött) siRNS beviteli módszerét nem vizsgáltuk, ezért a továbbiakban csak irodalmi adatokra hivatkozunk [⁹⁰, ⁹¹, ⁹², ⁹³, ⁹⁴, ⁹⁵].

2.1.4. AZ RNSi GYÓGYÁSZATI ALKALMAZÁSA

A genomban előforduló bármilyen elváltozás a poszttranszkripció csöcsendesítés célpontja lehet. A genetikai elváltozások mellett RNSi-vel kezelhetők:

- a fertőzések (mind akut, mind krónikusgyulladás [75] vagy bakteriális szeptikus sokk [96], hepatitis C vírus [97] okozta májbetegség, súlyos akut légzési szindróma (severe acute respiratory syndrome, SARS) [98], influenza [99], HIV-1 fertőzés [100]),
- a neurodegeneratív betegségek
- és a rosszindulatú daganatok (lásd később).

Mindezeket túl végeztek már a fulmináns hepatitisz enyhítésére [24], az iszkémia-reperfúzió utáni vesekárosodás csökkentésére [8], szívtranszplantáció esetén a graft túlélésének meghosszabbítására (a perfundáló oldatba történő TNF α , complement-3, illetve Fas ellenes siRNS-ek hozzáadása révén) [101] irányuló siRNS kísérleteket is.

Kimutatták, hogy az RNSi számos más intracelluláris patogén kórokozó ellen is hatékony, például a *Mycobacterium* [102] és a *Trypanosoma* [103] ellen. Az RNSi helyi siRNS injektálással alkalmazható a tumorok növekedésének lassítására, gátolható vele a humán papilloma vírus-fertőzés (HPV) okozta carcinogenezis [104], az áttétképződés, illetve a daganatok vaszkularizációja is. Az RNSi-t mind *in vitro*, mind *in vivo* sikeresen alkalmazták rosszindulatú daganatok ellen. Az siRNS-eket és shRNS-eket alkalmazták az agy- [105], emlő- [106] és petefészek-tumorok [107] állatmodelljeiben. Neurodegeneratív betegségek szintén lehetnek az RNSi gyógyászati célpontjai, mivel a mutáns gének csöcsendesítése számos progresszív neurodegeneratív betegség kifejlődését lassíthatja, mint például az Alzheimer [108] vagy a Huntington-kórét [109].

Az RNSi-t alkalmazó terápiák egyre nagyobb jelentőséggel bírnak. Jelenleg a legfontosabb kérdés az siRNS-eknek a terápiás hatás helyére való juttatása. Klinikai vizsgálatok várhatóak fertőző, örökletes, neurodegeneratív és rosszindulatú daganatos megbetegedések siRNS-ekkel történő kezelésére.

Az Egyesült Államokban napjainkig 18 siRNS-t és egy shRNS-t használó klinikai fázisú kísérletet tartanak számon. Ezeket az 5. táblázatban mutatjuk be.

Alkalmazott dsRNS	Betegség	Azonsító kód	Fázis
siRNS	Pachonychia congenita	NCT00716014	Befejezett
siRNS	Időskori macula degeneráció	NCT00363714	Befejezett
siRNS	Időskori macula degeneráció	NCT00395057	Terminált
siRNS	Melanoma malignum	NCT00672542	Folyamatban
siRNS	Chronicus myeloid leukemia	NCT00257647	Befejezett
siRNS	Szolid tumorok	NCT00689065	Folyamatban
siRNS	Előrehaladott szolid tumorok	NCT00938574	Folyamatban
siRNS	Diabéteszes macula oedema	NCT00306904	Befejezett
siRNS	Krónikus látóideg atrófia	NCT01064505	Folyamatban
siRNS	hypercholesterinaemia ¹	NCT00927459	Terminált
siRNS	Pre-eclampsia	NCT00154934	Terminált
siRNS	Neuroblastoma	NCT01075360	Befejezett
siRNS	Időskori macula degeneráció	NCT00557791	Visszavont
siRNS	Heveny veseelégtelenség megakadályozása cardiovascularis műtéten átesett betegekben	NCT00554359	Befejezett
siRNS	Vesetranszplantáltak graft funkciójának megnyújtása	NCT00802347	Folyamatban
siRNS	TBX3 szerepe az őssejt differenciációban	NCT00581152	Ismeretlen
siRNS	Neuroblastoma onkogenezise	NCT01058798	Befejezett
siRNS	Időskori macula degeneráció	NCT00259753	Befejezett
shRNS	Antitumor vakcina	NCT01061840	Folyamatban

5. táblázat: Jelenleg az FDA által regisztrált siRNS-t, illetve shRNS-t alkalmazó klinikai fázisú kísérletek.

¹ Liposzómális siRNS készítmény

2.1.5. AZ RNS INTERFERENCIA ALKALMAZÁSA VESEBETEGSÉGEKBEN

2.1.5.1. Az apoptózis szabályozása vese iszkémia-reperfúziós károsodásban (IRI)

A vesét érintő iszkémia-reperfúziós károsodás (IRI) központi jelentőséggel bír számos kórélettani folyamatban, mint például a transzplantáció, a heveny veseelégtelenség, vagy a szepszis/shokk. A vese iszkémia-reperfúziós károsodása során kialakuló heveny tubulusnekrózis akár veseelégtelenséghez is vezethet, amely még napjainkban is a vezető halálokok között szerepel az intenzív osztályokon. Pathomechanizmus szempontjából az iszkémia során jelentkező sejtkárosodás nagyobb részt nekrozishoz vezet, míg a reperfúzió során domináló elváltozás az apoptózis. A reperfúziós fázis során létrejövő sejthalál kiterjedése akár nagyobb is lehet, mint az iszkémia alatti nekrozisé.

Korábbi munkánk során a Fas molekula expressziójának hatását vizsgáltuk egér vesében, mely során azt találtuk, hogy a Fas siRNS-t kapott egerek jobb túlélési aránnyal és vesefunkcióval rendelkeztek, mint azok, amelyek csak fiziológias sóoldatot, vagy indifferens (zöld fluoreszcens fehérje (GFP) specifikus) siRNS-t kaptak. Tehát, a helyi és szisztémás Fas siRNS kezelés (akár közvetlenül az iszkémia után is) megvédte az egerek veséjét az iszkémia-reperfúziós károsodástól [8]. Ezzel egyidejűleg a vese komplement-3 és a caspase-3 expressziója lényegesen csökkent a specifikus siRNS kezelés után, amely megvédte az egereket a halálos kimenetelű vese IRI-től. Ezeken felül a Fas-t, illetve a caspase-8-at célzó rövid hajtűkanyar RNS-ek (shRNS-ek) virális bevitelle szintén megvédte az egereket a vese IRI-től, rámutatva ezzel a pro-apoptotikus fehérjéknek RNSi-vel történő csendesítési lehetőségére és ezek reperfúziós károsodásban játszott szerepére [110]. Mindezek mellett, a Fas-t [24], illetve a caspase-8-at [111] célzó siRNS-ek beadása megóvta az egereket a fulmináns hepatitisztől és a szepszistől is (vakbél punkciós modell). Ennek során a májban és a lépben csökkent intenzitású apoptózist figyeltek meg, amely alacsonyabb szérumban májenzim szinttel és előnyösebb túléléssel társult.

2.1.5.2. Az RNSi alkalmazása krónikus vesebetegségeken

Az RNSi használatával mezangiális sejtek felszaporodását sikerült meggátolni diabéteszes nefropátia modellben a p8 molekula csendesítése révén, amely egy

endothelin által indukált molekula [¹¹²]. Egyre növekvő figyelem irányul az öröklött és a sporadikus policisztás vesebetegségekre (PKD), mivel a PKD olyan örökletes vesebetegségek, amelyek végstádiumú veseelégtelenséget okoznak. Ezek az RNSi célpontjává válhatnak. A Smad fehérjék RNSi révén elért átmeneti csendesítése a TGF β 1 által indukált tubulointersticiális fibrózis kialakulását teljes mértékben meggátolta.

2.1.5.3. Az RNSi alkalmazása vesetumorokban

A Von Hippel-Lindau (VHL) betegséget a VHL tumorszuppresszor gén inaktivációja okozza, amely testszerte előforduló haemangiómák, és vesesejtes veserák kialakulásához vezet. A VHL gén terméke (pVHL) gátolja a hypoxia indukált faktor 2 (HIF2 α)-t. Hypoxiás körülmények között a HIF2 α számos fehérjét indukál, mint avaszkuláris endoteliális növekedési faktort (VEGF), a trombocita eredetű növekedési faktor B-t (PDGF-B), a transzformációs növekedési faktor α -t (TGF α), az epidermális növekedési faktort (EGF) illetve a mátrix metalloproteázokat (MMPs). Egér modellben a HIF2 α gátlása a retrovirális vektorokkal expresszált rövid hajtűkanyar RNS-ekkel megfelelő mértékben gátolta a tumor kialakulását a pVHL-hiányos vesesejtes veserák sejtjeiben.

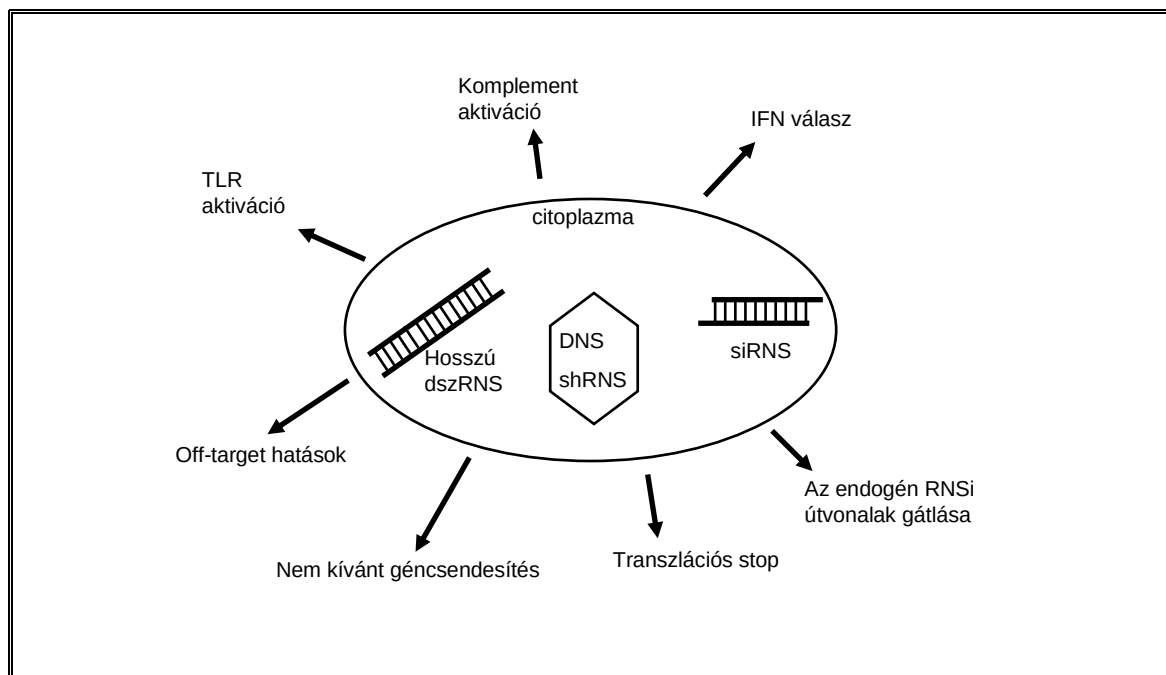
A vesesejtes veserák prognózisa meglehetősen rossz a tumor erős áttétképző tulajdonsága miatt. Az interferon alfa2 (IFN- α 2) igazoltan hosszabbította a metasztatikus vesesejtes veserákkal rendelkező betegek életét, mivel apoptózist kiváltó hatással rendelkezik. Az interferonok klinikailag is bizonyított rákellenes tulajdonságai tovább fokozhatóak vesesejtes veserákban, illetve malignus melanómában a DNS metiltranszferáz 1 (DNMT1) célzásával, amely a metilált, és ezáltal inaktív tumorszuppresszor gének (mint például a Ras Asszociált Domén Család 1A génje, RASDF1A) demetilálása révén azokat aktívvá teszi, így azok tumorelles hatást fejtenek ki.

A Ras szupercsaládba tartozó kis monomer GTPázok vesebetegségek esetén is fontos szerepet játszanak a sejtek túlzott proliferációjában, apoptózisában, migrációjában,

adhéziójában, kontrakciójában, szekréciójában és receptor expressziójában. A vesét célzó terápiák között nagy lehetőséget nyújtana a Ras géneket célzó géncsendesítés (Harvey Ras (Ha-Ras) és a Kirsten Ras (Ki-Ras) gátlása révén). A Ras-t célzó génterápia hasnyálmirigyrák kezelésében már 2-es fázisú klinikai kipróbálás alatt áll, hasznos terápiás eszköz lehetne malignus vesebetegségek kezelésében is.

2.1.6. AZ RNSi LEHETSÉGES MELLÉKHATÁSAI

A következő fejezetben az siRNS-ek nagy koncentrációban való alkalmazásának lehetséges mellékhatásait mutatjuk be (4. ábra).



4. ábra: Az RNAi lehetséges mellékhatásai (összefoglaló ábra)

2.1.6.1. Az interferon válasz aktiválása, jelátviteli útvonalai, és az interferonok hatásai

Az egyszálú RNS vírusok replikációja során köztes termékként gyakran keletkeznek dsRNS-ek [113]. A gazdasejtek erőteljes válaszreakciói miatt számos dsRNS vírus fejlesztett ki olyan replikációs stratégiát, melynek eredménye- képpen a gazdasejt

citoplazmájában nem jelenik meg a dsRNS [¹¹⁴]. A kettős szálú RNS molekulák a sejtek citoplazmájában mélyreható élettani reakciót válthatnak ki: egyetlen dsRNS molekula is elég az interferon (IFN) válasz aktiválásához. Az interferonok több funkcióval bíró citokinek, amelyek a gazdaszervezet immunológiai funkcióit modulálják. Képesek gátolni a tumorsejtek növekedést és a vírusok replikációját. Az interferonok (IFN-ok) [¹¹⁵] tehát döntő szereppel bírnak a vírus elleni védekezésben és az immunrendszer aktiválásában [¹¹⁶]. Az I-es típusú IFN-ok (IFN α és az IFN β) termelődésének direkt kiváltó faktora a (vírusok életciklusa során termelődő) kettős-szálú RNS-ek. A dsRNS-ek aktiválják a Janus arcú kináz és az átírást aktiváló (signal transducer and activator of transcription) (Jak/STAT) jelátviteli utakat [¹¹⁷], amely az IFN α/β által indukálható gének aktiválásához vezet.

A citoplazmában található dsRNS aktiválja a dsRNS által aktivált fehérje kináz-R-t (protein kinase-R, a továbbiakban PKR). A PKR egy olyan, az interferonok által indukált enzim, mely az eukarióta szervezetek széles körében kimutatható (konzervatív fehérje). A PKR a legtöbb sejttypusban konstitutív módon expresszáldó fehérje, melynek expressziója interferonok vagy a dsRNS hatására akár ötszörösére is megemelkedhet [¹¹⁸]. A PKR-t a tökéletes bázispárosodással rendelkező dsRNS-ek igen kis koncentrációja (10 - 100 ng/ml) is aktiválhatja, viszont az egyszálú RNS, DNS, RNS-DNS hibridek, valamint a módosított bázist tartalmazó dsRNS duplexek nem [¹¹⁹]. A hosszú, tökéletes bázispárosodással bíró dsRNS-ek magas koncentrációja ezzel ellentétben gátolja az enzimet. Az aktiváció következtében két jelátviteli út vonal indulhat meg:

1. Az egyik során a PKR foszforilálja a fehérjeszintézist megkezdő eukarióta iníciációs faktor (eIF2) alfa alegységét, mely révén nem specifikus módon gátolódik a transzláció folyamata, végeredményként pedig a vírusfertőzés tovaterjedése.
2. A PKR-től kiinduló másik reakcióút során az aktivált PKR foszforilálja az I κ B regulátor fehérjét, mely emiatt elengedi a Nuklális (transzkripció) faktor (NF)- κ B -t, lehetővé téve annak aktiválódását. Az aktivált NF- κ B ezután a sejtmagba jut és fokozza a promóter régiókban NF- κ B kötőhellyel rendelkező gének transzkripcióját [¹²⁰], ezek közül is leggyakrabban az IFN- β génjét.

Az antivirális válaszban betöltött fontos szerepe mellett a PKR a (vírussal nem fertőzött) sejtek osztódását, a celluláris és a virális fehérjeszintézisét szabályozza, illetve ezeken túl, normál körülmények között tumorszupresszor funkciót is tulajdonítanak neki.

A fentiek mellett megemlítendő, hogy az IFN válasz kiváltásának létezik egy PKR független útja is, amely során a dsRNS akár közvetlenül is aktiválhatja az IFN-ok expresszióját. Mindegyik útvonal eredménye, hogy a sejt a környezetébe bocsátja az IFN-okat (parakrin hatás), melyek a környező sejtekben is indukálják az IFN-stimulált géneket (ISG-k) [¹²¹].

2.1.6.2. Az Oligoadenilát-szintetáz (OAS) szerepe az antivirális válaszban

A vírus ellenes válasz további részeként a dsRNS-ek aktiválják a 2',5'-oligoadenilát szintetáz (2',5'-oligoadenylate synthetase, továbbiakban OAS). Az aktív OAS ATP-t, illetve más nukleotidokat polimerizál oligoadenilát láncokká 2',5' kötések létrehozásával [¹²²]. Az IFN-ok hatásának másik fontos mediátora egy látens endoribonukleáz, a ribonukleáz L (RNázL), melyet a fent leírt 2',5'-oligoadenilátok jelenléte aktivál. Az RNázL szerepe a celluláris és virális RNS, valamint az eszRNS feldarabolása a poliuracilsavat (UpA, UpG vagy UpU-t) tartalmazó helyeken [¹²³]. Az aktív RNázL tehát nem specifikus módon bontja le az intracelluláris RNS-eket [¹²⁴], meggátolva a vírusfertőzés terjedését [¹²⁵]. Emellett az RNázL antivirális hatását az apoptózis indukálása révén is kifejti: a humán RNázL overexpressziója fokozta az egér fibroblast sejtvonal (NIH3T3) sejtjeinek apoptózist. Az analógiát követve, az RNázL gátlása csökkentette a fibroblasztok polyinozin-polycitidilsav (poly I:C) által indukált apoptózist, bizonyítva, hogy az apoptózis az RNázL révén az antivirális válaszban alapvető szereppel bír [¹²⁶].

Az siRNS-el végzett kísérletek kezdetén azt gondolták, hogy az siRNS-ek túl rövidek ahhoz, hogy interferon választ indukáljanak. Sledz és munkatársai azonban felfedezték, hogy a különböző célgének ellen tervezett siRNS-ek in vitro interferon választ indukálnak [¹²⁷]. Fish és munkatársai megfigyelték, hogy 21 nukleotid hosszúságú

shRNS szekvenciákat expresszáló lentivírus vektorokkal fertőzött sejtekben az OAS1 gén indukálódott [¹²⁸].

2.1.6.3. A célgének kívüli csendesítés (off-target silencing)

Az siRNS és a cél mRNS közötti tökéletes bázispárosítás következtében az RNSi által létrehozott csendesítés igen specifikus. Megfigyelték azonban [¹²⁹], hogy az siRNS-ek magas koncentrációja képes célgének kívüli, egyéb gének csendesítésére is (off-target silencing). A célponton kívüli csendesítés azt jelenti, hogy az siRNS nem csak az eredetileg célzott gén mRNS-ét, hanem a részlegesen komplementer szekvenciákat is csendesíti. A multiplex endokrin neoplázia 1 (MEN1) gén ellen tervezett tíz-féle siRNS közül egy fokozta a p53 és a p21 fehérjéexpresszióját, volt olyan siRNS, amely csökkentette a p21 fehérjeexpressziót, míg további kettő nem okozott jelentős változást egyik fehérje expressziójában sem az ál-transzfektált sejtekhez képest. Az siRNS-ek koncentrációjának 10 nM-ra való titrálása sem szüntette meg a p53-ra és a p21-re gyakorolt nem specifikus hatást [¹³⁰]. Következésképpen, a célgénen kívüli csendesítést már alacsony koncentrációjú siRNS is kiválthatja. A probléma megoldható az siRNS-ek gondos tervezésével és/vagy különböző siRNS szekvenciák tesztelésével.

Sledz és munkatársai megfigyelték, hogy hosszú, 500 bp méretű dsRNS-k (amelyek megtalálhatóak *Drosophila*-ban és hengeresféregben) a PKR aktiválásával képesek nem specifikus szuppressziót létrehozni (mely PKR hiányos sejtekben 25%-os volt, ezzel szemben a vad fenotípusú sejtekben 75%) [127].

Jackson és munkatársai megfigyelték, hogy emlős sejtenyészetben az eredeti siRNS koncentráció ezredére való csökkentése sem szüntette meg teljesen a célgénen kívüli csendesítést [¹³¹]. A nem szekvencia specifikus csendesítés problémájának megoldása a különböző szekvenciák in vivo (állatmodellekben végzett) tesztelése lehet.

2.1.6.4. A veleszületett immunrendszer aktiválódása a Toll-Like Receptorok (TLR-ek) révén

A TLR-ok emlősökben fontos szerepet játszanak a veleszületett immunrendszer működésében a patogénekhez asszociált molekuláris mintázatok (pathogen associated

molecular patterns, PAMPs) felismerésében [¹³²], történjen az a sejtfelszínen vagy az endoszómákban. Ilyen PAMP pl. a baktériumok sejtfalának lipopoliszacharid (LPS) endotoxinja, a virális dsRNS vagy a citozin-foszfoguanin (CpG) motívumok. Néhány szekvencia, mint például a GU dinukleotidok vagy a GUCCUCAA és az UGUGU szekvenciák [^{133, 135}] felelősek a veleszületett immunválasz TLR-okon keresztüli aktiválásáért. A TLR-ok a duplaszálú siRNS-t is felismerik, melynek következményeként intracelluláris jelátviteli útvonalak aktiválódnak. A TLR-ek számos típusa [¹³⁴] közül a TLR 3 [¹³⁵], illetve a TLR 9 köti meg az RNSi-ban szerepet játszó dsRNS-eket [¹³⁶] és a CpG motívumokat tartalmazó bakteriális/virális DNS-eket [¹³⁷]. Munkacsoportunk vizsgálatai nem terjedtek ki a TLR-ek szerepére, ezért a továbbiakban csak szakirodalmi adatokra hagyatkozunk [^{138, 139}].

2.1.6.5. A komplement aktiváció

A komplement aktivációnak három útvonala létezik:

1. A klasszikus útvonal, mely során az antigén által kötött antitest (Ag-Ab) aktiválja a komplement-1 (C1)-et.
2. Az alternatív útvonal, mely a C3 közvetlen hidrolízisével aktiválódik.
3. A lektin útvonal, melyet a mannóz-kötött lektin (MBL) aktivál.

A három útvonal a C3 aktivációjánál konvergál.

Az alternatív útvonalat konstitutívnak vélik, ez azonban normál körülmények között szupresszált állapotban van a negatív módon szabályozó komponensek (mint például a H Faktor) révén. A H faktor egy olyan szolubilis glikoprotein, amely a szérumban cirkulál, illetve negatívan töltött glükózaminoglikánokhoz (GAGs) kapcsolódik. A folyadék fázisban lévő vagy felszínhez kötött polianionok (kis RNS-ek és egyéb oligonukleotidok) utánozhatják a GAG-ok hatását, mely során a H-faktor szintje lecsökken. Ez utóbbi az alternatív útvonal aktiválódásához vezet [¹⁴⁰], amely alapvetően függ a H faktor koncentrációjától (a minimális H faktor depléciós küszöbkonzentráció 50 µg/ml) [¹⁴¹].

Mindemellett a kationos liposzómákba csomagolt oligonukleotidok ugyancsak képesek a komplement rendszer aktiválására majmokban, melyet sokkal inkább a

liposzómáknak, mint az oligonukleotidoknak tulajdonítottak [¹⁴²]. Nem humán főemlősökben siRNS tartalmú nanorészecskék intravénás beadásakor viszont nem jelentkezett komplement aktiváció [¹⁴³].

2.2. KRÓNIKUS VESEBETEGSÉGEK, EZEN BELÜL A LUPUS NEPHRITIS PATOFIZIOLÓGIAI JELLEMZŐI ÉS KEZELÉSI LEHETŐSÉGEI

A heveny veseelégtelenség az etiológiától függetlenül az 50%-ot meghaladó funkcióvesztés után a kiváltó ok megszüntetése ellenére is végstádiumú veseelégtelenséghez vezethet. A krónikus veseelégtelenségnek a vesetraszplantációt és a dialízist leszámítva, az egyetlen hatásos gyógyszeres kezelése a renin-angiotensin-aldoszteron rendszer (RAAS) különböző támadáspontú gátlása. Ez azonban a vesefibrózis folyamatát megállítani nem tudja.

Krónikus veseelégtelenséget gyakran okoznak autoimmun betegségek. A szisztémás lupus erythematosus (SLE) az egyik leggyakoribb autoimmun betegség, mely a nyugati országok populációjának 0,5%-át érinti [¹⁴⁴]. A betegség patomechanizmusában a III-as típusú hiperszenzitivitás játszik szerepet. A keringő immunkomplexeknek a vesében és bőrben való lerakódása lokálisan aktiválja a komplement rendszert [¹⁴⁵]. Mivel a betegségnek egyénre szabottan eltérő szervi manifesztációi lehetségesek, illetve a betegség lefolyását illetően is egyéni eltérések mutatkoznak, felmerül, hogy a betegség kialakulásában más patomechanizmusok is szerepet játszhatnak [¹⁴⁶, ¹⁴⁷]. A humán SLE-nek számos klinikai manifesztációja ismert, melyek a betegség lefolyását illetően sem egységesek. A spektrum a súlyosabb szervi érintettséget nem okozó antifoszfolipid szindrómától - az enyhe kután lupuson, valamint a súlyosabb lupus nephritisen keresztül, egészen a fulmináns lefolyású, gyakran halálos kimenetelű idegrendszert támadó neurolupusig vagy fulmináns antifoszfolipid szindrómáig terjed [¹⁴⁸].

A III-as típusú hiperszenzitivitási reakció során immunkomplexek lerakódása aktiválja a komplement rendszert [¹⁴⁹]. Ez az általános mechanizmus nem magyarázza a betegség széles spektrumú klinikai manifesztációját. Számos lokális faktorról bizonyosodott be, hogy jelentős szerepet játszanak a bőr, illetve a vese lupus

manifesztációiban. Ilyenek például a vaszkuláris celluláris adhézións molekula (VCAM-1) [¹⁵⁰, ¹⁵¹], a thrombomodulin [¹⁵²], az E-selectin [¹⁵³], a neutrophil gelatinase-B(NGAL)/lipocalin-2 [¹⁵⁴], a natural killer T (NKT)-sejtek [¹⁵⁵], az ösztrogén [¹⁵⁶], a tumor nekrosis faktor-alfa (TNF α) [¹⁵⁷], az interferon gamma (IFN γ) és az interleukin-12 (IL-12) [¹⁵⁸]. Mindezek mellett néhány genetikai faktor is [¹⁵⁹], mint például a CD1d [¹⁶⁰], a béta(2)-mikroglobulin [¹⁶¹], az MHC II osztály (Ia) antigénje [¹⁶²], az Yaa gén [¹⁶³] befolyásolni látszik egerekben a szervspecifikus autoimmun eltéréseket. Ezen adatok birtokában mi is vizsgáltuk egér modellünkön a bőr és a vese érintettség eltérő patomechanizmusait.

Napjainkban az SLE kezelésében alkalmazott terápiák nem specifikusak és számos toxikus mellékhatással rendelkeznek [¹⁶⁴]. A mellékhatások minimalizálása érdekében a modern terápiás lehetőségek sokkal inkább az immunválasz szabályozására, mint szupprimálására irányulnak. Ilyen immunmoduláló tulajdonsággal bíró szer az intravénás immunglobulin (IVIG) [¹⁶⁵], mely vélhetően az antitestek neutralizálása, a komplement faktorok megkötése és a membrán károsító komplex (membrane attack complex, MAC) kialakulásának megakadályozása révén fejt ki hatását [¹⁶⁶]. A magas dózisú IVIG számos autoimmun betegség bőr manifesztációját enyhítette, közöttük a lupusét is [¹⁶⁷]. Klinikai fázisú kísérletekben a tünetek remisszióját, az anti-DNS antitest szint csökkenését és emelkedett össz komplement koncentrációt igazoltak [¹⁶⁸, ¹⁶⁹, ¹⁷⁰]. Az IVIG indikációi (2 g/kg-os dózisban) közé tartoznak az SLE súlyosabb manifesztációjú esetei [¹⁷¹, ¹⁷²] vagy a terápiájában alkalmazott szteroidok, illetve cyclophosphamidok dózisának csökkentése [¹⁷³, ¹⁷⁴]. Fontos azonban tudni, hogy a magas dózisú (0.8–5 g/kg) IVIG terápiának súlyos mellékhatása lehet az IVIG által indukált nefrotoxicitás amely azonban ritkán fordul elő [¹⁷⁵, ¹⁷⁶, ¹⁷⁷, ¹⁷⁸]. Az IVIG asszociált veseelégtelenség kialakulásának pontos mechanizmusa még ismeretlen. A vese szövettani vizsgálata az elsődleges kanyarult csatornák (proximális tubulus) epitel sejtek vakuolizációját és duzzadását igazolta, melyet ozmotikus nefrózisnak, más néven hidropikus degenerációnak neveznek [¹⁷⁹]. Az ozmotikus nefrózis kialakulását egyes rizikófaktorok egyidejű jelenléte elősegíti [¹⁸⁰]. Ilyenek:

- 65 év feletti kor
- korábbi vesebetegség, vagy veseelégtelenség

- cukorbetegség
- egyéb nefrotoxikus szer használata az IVIG kezeléssel egy időben
- volumenhiány

Az ozmotikus nefrózis talaján kialakult heveny veseelégtelenség incidenciája megközelítően 1% [¹⁸¹, ¹⁸², ¹⁸³]. Korábbi kutatások eredményei szerint a nefrotoxicitás oka az IVIG készítményekben található cukor komponens [¹⁸⁴], melyet az immunglobulin G harmadlagos szerkezetének stabilizálásához használnak [¹⁸⁵, ¹⁸⁶]. A legerősebb, ozmotikus nefrózist kiváltó hatással a felhasznált szénhidrátok közül a szacharóz rendelkezik [¹⁸⁷, ¹⁸⁸]. A modern IVIG preparátumokban cukor molekulák helyett aminosavat (glicint) használnak a harmadlagos térszerkezet stabilizálására. A glicin egy intracellulárisan is jelenlévő aminosav, melyet a szacharózzal ellentétben a vese tubulus hámsejtjei képesek lebontani. Ebből következik, hogy amíg a szacharóz által stabilizált IVIG vesekárosodást okozott, addig a glicin tartalmú IVIG nem, vagy ritkábban váltotta ki ezt a hatást [¹⁸⁹]. A maltóz tartalmú IVIG készítmények a glicinhez hasonlóan biztonságosabb szernek bizonyultak a szacharóz tartalmúakkal szemben, mivel a maltáz enzim jelen van az elsődleges kanyarulat csatornák epitél sejtjeinek kefeszegélyében, biztosítva ezáltal annak lebontást.

Az MRL/MpJ-Faslpr egértörzsben (a továbbiakban csak MRL/lpr), melyet a humán SLE modellezésére hoztak létre [¹⁹⁰], autoreaktív lymphoproliferáció és autoantitest termelés alakul ki 8 hetes életkortól kezdődően [¹⁹¹]. Mindezek mellett IgG lerakódással, hypercellularitással és gyulladásos sejtes beszűrődéssel társult súlyos glomerulonephritis is jelentkezik [¹⁹², ¹⁹³]. A bőrelváltozások a humán lupuséhoz hasonlóak [¹⁹⁴], melyben immunkomplexek és (döntően 3-as típusú) komplement lerakódás mutatható ki [¹⁹⁵]. A bőrelváltozások főleg a lapockák közötti bőrterületen, a füleken és az orron mutatkoznak. Munkacsoportunk és mások is [¹⁹⁶] felismerték, hogy a terhesség [¹⁹⁷] vagy egyéb immunmoduláló szerek használata során [¹⁹⁸] az MRL/lpr egerek bőr és vese manifesztációi eltérő lefolyást mutattak. Ennek során az egerek bőrtünetei enyhültek, míg a vesetünetek súlyosbodtak. A lupus szervspecifikus megjelenésében a natural killer T-sejtek (NKT sejtek) is szerepet játszanak, melyek hatása úgy tűnik, hogy a bőrben fontosabb, mint a vesében [¹⁵⁶, ¹⁶¹]. Ez tovább hangsúlyozza a lupus szervspecifikus megjelenését.

3. CÉLKITŰZÉSEK, KÉRDÉSFELTEVÉS

Munkánk első részében célunk a napjainkban mind állat, mind humán kísérletekben egyre gyakrabban alkalmazott RNSi mellékhatásainak feltérképezése volt, mely során az alábbi kérdéseket kívántuk megválaszolni:

1. A hidrodinamikus úton, in vivo beadott rövid dsRNS-ek aktiválják-e az interferon választ a szervezet szintjén?

Vizsgálatunkban arra kerestük a választ, hogy az irodalmi adatokból ismert in vitro rövid dsRNS kezelés esetén leírt **interferon válasz** megjelenik-e a szisztémásan alkalmazott rövid dsRNS kezelés során.

2. Ha igen, akkor ez milyen gén- (STAT1 és OAS1), illetve citokin (TNF α , IL-6, IL-12p40 és IFN β) expressziós mintázattal jár?

Vizsgálatainkban az interferon válasz-specifikus gének expressziós profilja (RT-PCR) mellett vizsgáltuk a gyulladásos válaszreakcióban leggyakrabban résztvevő citokinek vérszintjét (ELISA).

3. Okoz-e a magas volumenű hidrodinamikus injektálással szemben az alacsony volumenű hidrodinamikus injektálás un. nem specifikus mellékhatásokat?

A korábbi irodalmi adatoknak megfelelően a kezelés hatására leginkább hasúri parenchimás szervek (máj, vese és lép) károsodását vártuk, ezért ezen szervek szövettani és szervfunkciós paramétereit (ALAT, ASAT, BUN) tanulmányoztunk.

Munkánk második részében, mely során SLE egérmodelljében hosszú távú, magas dózisú IVIG kezelést alkalmaztunk, a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Hogyan befolyásolja a hosszú távú, magas dózisú glicinnel stabilizált IVIG kezelés MRL/lpr egerek lupusának vese -és bőrmanifesztációját?

Az irodalmi adatokból ismert, hogy az IVIG kezelés hatására a vese –és a bőrelváltozások eltérő válaszreakciókat mutatnak. Vizsgálatunkban arra kerestük a választ, hogy az MRL/lpr egértörzsben kialakult lupust, különös tekintettel a bőr –és veseérintettségre, hogyan befolyásolja az általunk választott IVIG kezelés.

2. Látható-e szervspecifikus eltérés a hosszú távú, magas dózisú, glicinnel stabilizált IVIG kezelés hatására (vesefunkció, autoantitest szint mérése, szövettani kiértékelés)?

Összehasonlítottuk az általunk alkalmazott IVIG-el kezelt állatok szövettani eltéréseit (bőr és vese), vesefunkciós paramétereit és szérum autoantitest szintjeit a fizioológias sóoldattal kezelt kontroll csoport paramétereivel.

3. Rendelkezik-e a hosszú távú, magas dózisú, glicinnel stabilizált IVIG kezelés *in vivo* toxicitással a cukor oldattal kezelt kontroll csoporthoz képest?

Vizsgáltuk a glicinnel stabilizált IVIG kezelés vesére gyakorolt hatását a cukorkomponenssel ill. fizioológias sóoldattal kezelt esetekhez képest (szövettan és vesefunkciós paraméterek).

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleteink során egy-egy egérmodellen vizsgáltuk a vese RNS interferenciával (RNSi) és az SLE intravénás immunglobulinnal (IVIG) történő kezelésének hatékonyságát, valamint lehetséges mellékhatásait. A veseműködés funkcionális vizsgálatát részletes morfológiai és molekuláris biológiai módszerekkel kiegészítve elemeztük.

Az alább leírt módszerek közül az ELISA vizsgálatokat Godó Mária, a szövettani eljárásokat Pekár Magdolna végezte, a többi módszert témavezetőm irányítása alapján magam végeztem el.

4.1. Az interferon választ vizsgáló kísérletünkben alkalmazott anyagok, módszerek

4.1.1. Vizsgálati állatok

A kísérletben használt hím, 25-30 g tömegű, NMRI (Naval Medical Research Institute) egereket a ToxiCoop-tól (Budapest, Magyarország) szereztük be. Az állatokat általános rágszáló táppal és vízzel láttuk el. A kísérleteket az intézmény szabályzata (Simmelweis Egyetem Bizottság 53/2001. (V.31.) ET.) és a magyarországi állatvédelmi törvények (1998/XVIII, 243/1998(XII.31)) alapján végeztük.

4.1.2. siRNS-ek

A csupasz, liofilizált siRNS-eket a Dharmacon-tól (Lafayette, USA) vásároltuk. A következő szekvenciákat használtuk:

egér Fas (*mFas*):

5-pGUGCAAGUGCAAACCAGACdTdT-3 (szensz)

5-pGUCUGGUUUGCACUUGCACdTdT-3 (antiszensz),

Zöld Fluoreszcens Fehérje (Green Fluorescent Protein, *GFP*):

5-pGGCUACGUCCAGGAGCGCACC-3 (szensz),

5-pUGCGCUCCUGGACGUAGCCUU-3 (antiszensz).

Az siRNS-eket dietil-pirokarbonáttal (DEPC) RNáz mentesített desztillált vízben oldottuk fel. Ezen törzsoldatot közvetlenül a kezelés előtt tovább hígítottuk úgy, hogy 1 ml (alacsony volumenű hidrodinamikusan injektálás, AVHDI) steril fiziológiás sóoldat 50 µg csupasz siRNS-t tartalmazzon (SalsolA, HUMAN, Gödöllő, Magyarország).

4.1.3. Kezelések

Az siRNS-eket a módosított in vivo hidrodinamikusan injektálás (HDI) protokollja szerint [199] jutattuk be az egerekbe, Zhang módszere szerint. 50 µg siRNS-t 1 ml (AVHDI) fiziológiás sóoldatban oldottunk fel, majd ezt rövid idő alatt (maximálisan 10 másodpercen belül) injektáltuk be az egerek meleg vízfürdő segítségével kitágított farokvénájába (n=24). Az siRNS oldat beadása után 30 másodpercig komprimáltuk a kezelési területet, hogy megakadályozzuk az injektált oldat visszafolyását. Vizsgálatainkban három kontroll csoportot használtunk.

1, A kezelés kontrollban használt állatokat fiziológiás sóoldattal kezeltük (n=24), a hidrodinamikusan injektálás hatásainak vizsgálata céljából.

2, A negatív kontroll csoport további 5 egeret tartalmazott, amelyek nem kaptak kezelést.

3, Az interferon válasz indukálása érdekében a pozitív kontroll csoport (n=24) állatait 50 µg polyinozin-policitidil savval (polyI:C) (Sigma, P9582, Budapest, Magyarország) kezeltük, melyet 0,1 ml fiziológiás sóoldatban oldottunk fel (végkoncentráció: 500 µg/ml) és az irodalmi adatoknak megfelelően intraperitoneálisan injektáltunk [200].

A magas volumenű hidrodinamikusan injektálás irodalomban leírt májkárosító hatásának modellezésére az állatok farokvénájába 10 másodpercen belül a testsúly 10 %-ának megfelelő térfogatú fiziológiás sóoldatot adtunk be, majd az állatokat 1, 3, 6, 16 és 24 óra múlva leöltük (n=10/csoport).

4.1.4. siRNS kimutatása a szövetekben

Az siRNS-ek sikeres felvételének, illetve intracelluláris lokalizációjának kimutatása céljából fluoreszcensen jelzett siRNS-t (BlockiT Alexa Fluor Red Fluorescent Oligo, Invitrogen, 14750-100, Budapest) adtunk be az állatoknak a fent leírt hidrodinamikusan, majd 10–30 perccel a kezelés után veséből, májból és lépéből

származó szövetmintákat helyeztünk fagyasztó médiumba (O.C.T. Compound, 01480, Surgipath Medical Inc., Richmond, USA) majd a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Az 5 µm vastag metszeteket DAPI tartalmú médiummal fedtük le (Mounting Medium for Fluorescence with DAPI, S3023, DAKO, Biomarker, Budapest), majd a mintákat Leica DC500 CCD fényképezőrendszerrel ellátott Leica DMR mikroszkóppal (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) 24 órán belül vizsgáltuk (Leica IM50 software).

4.1.5. Az állatok leölése

A kísérletben használt egereket 6 és 24 órával a kezelések után öltük le. Az állatok egy külön csoportját az AVHDI kezelés után másfél, 2, 6 és 9 órával öltünk le a szervfunkciós paraméterek és a plazma citokin szintjének mérése céljából. A leöléseket éteres anesztéziával (08640-1-01-65, REANAL, Budapest, Magyarország) és a véralvadás gátlásához használt heparinizálással (4958, Heparin Biochemie 5000NE/ml, Németország) kezdtük. Vért vettünk a bal kamrából és centrifugálással (4 °C, 2000 rpm, 10 perc) szeparáltuk a plazmát. Az egereket ezután 20 ml, 4 °C-os Hank féle pufferolt sóoldattal (Hank's Buffered Salt Solution, Sigma-Aldrich, H9394, Budapest, Magyarország) perfundáltuk, amelyet a szív bal kamrájába juttatunk be fecskendőhöz csatlakoztatott, 18G-s tű segítségével. A veséből, májból és lépéből kivágott szövetmintákat további RNS vizsgálatok céljából műanyag fagyasztócsövekbe helyeztünk és a továbbiakban -80 °C-on tároltuk.

4.1.6. Az alanin aminoszferáz (ALAT) és aszpartát aminoszferáz (ASAT), vér nitrogén (BUN) mérése teljes vérben és plazmában

Az alanin aminoszferáz (ALAT), aszpartát aminoszferáz (ASAT) (U/l) és a vér nitrogén (BUN) (mg/dl) szintjeit Reflotron Plus automata segítségével határoztuk meg enzim alapú reagensekkel (Boehringer Mannheim, Németország). A méréseket 32 µl plazmából, illetve teljes vérből végeztük a kezelés után 1, 3, 6, 16 és 24 órával..

4.1.7. RNS izolálás

Teljes RNS-t izoláltunk a leölések során gyűjtött vese, máj, és lép mintáinkból TRIzol reagens segítségével (Invitrogen, 15596-018, Budapest, Magyarország). Az izolálás során a gyártó által javasolt felhasználási utasításokat követtük [201]. Röviden, 1 ml 4 °C-os TRIzol-t adtunk 30-50 mg fagyasztott szövethez, melyet ezután (szöveti szerkezettől függően) 40-100 másodpercig homogenizáltunk FastPrep homogenizátorban. A mintákat 0,2 ml chloroform (C2432, Sigma-Aldrich, Budapest) jelenlétében szeparáltuk. A vizes fázisban megjelent RNS-t 0,5 ml isopropyl alkohol (I9516, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) hozzáadásával precipitáltuk. Centrifugálás után az RNS pelleteket 75% ethanollal mostuk és rövid ideig száradni hagytuk. A pelleteket ezután 50-250 µl DEPC-cel kezelt vízben oldottuk fel, a pellet méretétől függően. Az izolált RNS-eket a továbbiakban -80 °C-on tároltuk. A reverz transzkripció előtt RNS mintáinkat TURBO DNáz-zal (Ambion, 2238, Austin, USA) kezeltünk a genomiális DNS kontamináció megszüntetése céljából.

4.1.8. cDNS szintézis

Azonos mennyiségű (1 µg) RNS mintát SuperScript III (Invitrogen, 1808-093, Budapest, Magyarország) enzim és random hexamerek (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA) felhasználásával cDNS-sé alakítottunk az alábbiak szerint. Egy µg DNS-mentes RNS mintát 1 µl, 10 mM dNTP-vel (Molecular Bioprobes, 18427-013, Csertex, Budapest, Magyarország) és 1,2 µl random hexamerrel kevertünk össze és 65 °C-on inkubáltuk 5 percig, ezután 1 percig jégre helyeztük a mintákat, hogy leállítsuk a reakciót. Ezek után 4 µl 5X „first strand” puffert, 1 µl 0,1 M dithiothreitol-t (DTT), 1 µl RNase Out rekombináns ribonukleáz gátlót (Invitrogen, 10777-019, Budapest, Magyarország) és SuperScript III reverz transzkriptázt (18080-044, Invitrogen, Budapest, Magyarország) (200U/ µl) vagy nukleáz mentes vizet (a reverz transzkripció nélküli reakciókhoz, mely a genomiális DNS-sel kontaminált minták kimutatására szolgált) adtunk a mintákhoz, lecentrifugáltuk a csöveket, és 1 órán át 50 °C-os vízfürdőben inkubáltuk őket. A reakciót 15 perces, 70 °C-on történő inkubálással állítottuk le. A cDNS-eket -20 °C-on tároltuk a RT-PCR reakciók lefuttatásáig.

4.1.9. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (RT-PCR)

Az RT-PCR reakciókat 1 µl cDNS minta, valamint Platinum Taq polimeráz (Invitrogen, 10966-018) felhasználásával, egy IQ5 Bio-Rad iCycler (Bio-Rad, Budapest, Magyarország) gépen végeztük korábbi leírások szerint [202]. A reakciókat 25 µl-es térfogatban, 96 lyukú plate-eken, triplikátumokban végeztük, a kontroll gének reakcióit a vizsgált génekével párhuzamosan futtattuk. A következő primereket használtuk:

GAPDH forward 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3',

reverse 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3',

STAT1 forward 5'-TTTGCCAGACTCGAGCTCCT-3',

reverse 5'-GGGTGCAGGTTTCGGGATTCAA-3',

OAS1 forward 5'-TATGCCCTGCCTCCCTTCCATC-3',

reverse 5'-CTGTTGGGCTTTGGGCACCTTC-3'.

A PCR termékek kimutatásához SYBR Green-t (Molecular Probes, 67563, Budapest, Magyarország) használtunk. A PCR reakciót a következő paraméterek szerint futtattuk le:

1. 5 perc 95 °C-on (Taq aktiváció, kezdeti denaturálás),
2. 40 ciklus:
 - a. 95 °C, 20 másodperc (denaturálás),
 - b. 60 °C, 20 másodperc (primer kötődés),
 - c. 65 °C, 1 perc (termék szintézise).

A STAT1 és OAS1 gének relatív expresszióját a referencia génként használt glükóz aldehid foszfát dehidrogenáz (*GAPDH*) segítségével határoztuk meg. A termék homogenitásának ellenőrzése céljából olvadáspont analízist végeztünk 55 °C-95 °C-on, mely a termékek homogenitását és a primerek specifikus kötődését támasztotta alá.

4.1.10. Szövetminták festése és kiértékelése

A májból, lépéből és a veséből kis (0,5x0,5 cm) szövetmintákat vágunk ki 6 illetve 24 órával az AVHDI után és formalinban (4,5%-os, pufferolt) fixáltuk egy napig, ezután dehidráltuk és paraffinba ágyasztuk. A 4-6 μm vastag lemezszekeket deparaffináltuk, rehidráltuk és megfestettük hematoxin-eozinnal (H&E), illetve perjód savas Schiff (PAS) reakciót végeztünk el rajtuk. Mintáinkat vak módon értékeltük ki. A fotódokumentációt Leica DC500 mikroszkóppal készítettük.

4.1.11. Plazma citokin szintek mérése ELISA módszerrel

A plazma interleukin-6 (IL-6), interleukin-12 (IL-12p40) (88-7064, 88-7120, eBioscience), tumor nekrosis faktor alfa (TNF α) (MTA00, R&D Systems, Budapest, Magyarország) és interferon béta (IFN β) szintjét kvantitatív módon határoztuk meg (n=4) a forgalomban rendelkezésre álló enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (42400-1, PBL Interferon Source, Budapest, Magyarország) kitek segítségével. A kiteket a gyártó ajánlása szerint használtuk a következők szerint. A 96 lyukú műanyag lemezeket (plate-eket) antitesttel fedtük be (coat-oltuk), majd 100 μl standard mintát, valamint 100 vagy 50 μl mintát vittünk fel minden lyukba. Ezután egy éjszakán át 4 °C-on (IL-6 és IL-12p40), vagy két órán át szobahőmérsékleten (TNF α) inkubáltuk a plate-eket. Ötszöri mosás után 100 μl detekciós antitestet mértünk a lyukakba, majd 1 óráss inkubálás következett. Újabb ötszöri mosás után avidin-torma peroxid oldatot adtunk a lyukakhoz (100 μl /lyuk), és további 30 perces inkubáció következett szobahőmérsékleten. A lyukak ötszöri mosása után TMB szubsztrát oldatot adtunk a reakciókhoz (100 μl /lyuk) és 15 percig állni hagytuk szobahőmérsékleten. Az optikai denzitást 5 percen belül mértük le 450 nm-en (Perkin Elmer Victor 3 1420 Multilabel counter).

4.1.12. Statisztikai elemzések

Az eredményeket n számú független kísérlet alapján az átlag $\pm$ standard hiba (SEM) formájában fejeztük ki. A többszörös összehasonlítások esetében a statisztikai elemzéseket egyoldalú ANOVA, illetve posthoc Tukeys HSD teszttel végeztük

(Statistica8 program segítségével). A $p < 0,05$ értéket vettük statisztikailag szignifikánsnak.

4.2. Az IVIG hatásait felmérő kísérletben használt anyagok és módszerek

4.2.1. A kísérleti állatok

MRL/lpr (MRL/MpJ-fasTnfrlpr, MHC haplotípus: H2:k) hím egereinket (Jackson Laboratories, USA) patogén mentes környezetben tartottunk filteres, egyénileg ventilált ketrecekben (Charles River Ltd, Budapest, Magyarország). A hagyományos rágszáló táp (Altromin, Lage, Németország) és a víz korlátlanul az állatok rendelkezésére állt. Azonos alomból származó 4 állatot tartottunk egy ketrecben a szociális kapcsolat fenntartása érdekében. A testsúlyt heti rendszerességgel ellenőriztük.

4.2.2 Az állatok kezelése

A hosszú távú, magas dózisú IVIG kezelés hatásainak felmérése céljából az állatokat heti egy alkalommal kezeltük 10 %-os, glicinnel stabilizált immunglobulin (Bayer Gamimune N, 10%, Leverkusen, Németország) oldattal 6 hetes kortól 5 hónapos korig (10 kezelés). Az állatokat 5 hónapos korukban öltük le. A kezelési dózis 0,2 ml (0,02 g)/10 g testsúly volt, farokvénán keresztül. A magas dózisú humán IVIG kezeléshez képest (400 mg/kg) egereink 2000 mg/kg dózisban kapták az IVIG-et. Az egereket a kezeléseik során diethyl-éterrel elbódítottuk, testtömegüket lemértük, majd IVIG-gel (n=8) vagy fiziológiás sóoldattal (n=10) (steril Salsol A infúzió, 308 mOsm/l, HUMAN, Gödöllő, Magyarország) kezeltük valamelyik oldalsó farokvénán keresztül, melyet előzetesen meleg vízbe történő merítéssel (52-55 °C, maximum 5 másodpercig) tágítottunk ki.

A cukor (szaharóz, maltóz) által stabilizált IVIG preparátumok mellékhatásainak vizsgálata végett lupusra nem hajlamos, Naval Medical Research Institute (NMRI) egereket kezeltünk 5%-os szaharóz, illetve 10%-os maltóz oldattal (amely megfelel az IVIG készítményekben használt szaharóz, illetve maltóz koncentrációknak) három egymást követő napon az IVIG kezeléssel azonos protokoll szerint (n=10).

Pozitív kontroll egereinket egyszeri, 20%-os szaharóz, vagy 20%, illetve 40%-os maltóz oldattal kezeltük szintén intravénásan, korábbi irodalom szerint (n=10) [203].

Az összes állatkísérletet a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Bizottságának jóváhagyása után végeztük el.

4.2.3 Az állatok leölése

Az összes, IVIG-gel, illetve fiziológiás sóoldattal kezelt állatot 5 hónapos korban öltük le pentobarbitál anesztézia mellett: intraperitoneálisan 1%-os Nembutalt (pentobarbitál 10%, Phylaxia-Sanofi, Budapest, Magyarország) adtunk be, mely mellé heparint is adtunk (Heparin Biochemie, 500 U/ml, Biochemie GmbH, Kundl, Ausztria) a vérárvadás megakadályozásának céljából. A testtömeget lemértük, majd a lapockák között leborotváltuk a szőrt, hogy a lupus bőr érintettségét megvizsgálhassuk. Átlagosan 1 ml vért vettünk a retroorbitalis vénás plexusból, majd a plazmát azonnal szeparáltuk centrifugálással (1000 rpm/10 perc/4 °C). Az egereket 4 °C-os HBSS-sel (Ca és Mg nélkül, Gibco, Budapest, Magyarország) perfundáltuk a vér szövetekből történő kimosása céljából. A perfúziós folyadékot és a vért az alsó ürös vénán (vena cava inferior) ejtett metszéscn át engedték távozni az érpályából. Az interscapuláris bőrt és a vesét kicparáltuk és eltávolítottuk további vizsgálatok céljából. A vesefunkció felmérése érdekében a vér urea nitrogén (BUN; mg/dl) szintjét mértük le Reflotron Plus laboratóriumi automatán, enzimátikus csíkreakensek segítségével (Boehringer Mannheim, Mannheim, Németország) a leöléscor vett vérből. A szérumot 100 µl-es frakciókban fagyasztottuk le folyékony nitrogénben, majd további felhasználásig –80 °C-on tároltuk.

4.2.4. Szövettani vizsgálatok

A bőrből és a veséből 0,5x0,5 cm-es szövetrészeket fagyasztottunk le OCT fagyasztó médiumba (O.C.T. Compound, 01480, Surgipath Medical Inc., Richmond, USA), valamint formalinba helyezve fixáltuk (4,5%-os, foszfát pufferolt, Semmelweis Egyetemi Gyógyszertár, Budapest, Magyarország) egy napig, majd dehidráltuk és beágyaztuk paraffinba. Négy-hat µm vastag metszeteket készítettünk, ezeket deparaffiáluk, rehidráltuk, majd megfestettük hematoxylin-eosinnal (H&E), valamint Mallory-féle trikómmal. Mindezek mellett perjód savas-Schiff reakciót is végeztünk (PAS) mintáinkon. A mintákat vak módon értékeltük ki.

A kísérletünkben látott cutan lupus makroszkópos kiértékelését az interscapularis régióban, a füleken és az orron végeztük el az állatok leölésekor, majd később mikroszkóposan kiértékelést is végeztünk. Az interscapularis terület bőrének, valamint a fül pontozásának leírását a 6/A táblázatban tüntetjük fel. A csoportok pontszámai az egyes esetek pontszámainak átlagát jelzik.

A mikroszkópos kiértékelést egy Leica DC500 mikroszkópon végeztük különböző nagyításokat használva. Az összes fényképet ugyanezen mikroszkóp segítségével készítettük.

A mikroszkópos kiértékelés szempontjai a bőrben (6/B. táblázat):

- hyperkeratózis (a keratin réteg kiszélesedése az epidermisben),
- acantózis (a tüskés réteg – stratum spinosum – kiszélesedése),
- a bazálembrán elváltozásai: megvastagodás, vacuolizáció, eosinophil depozítumok, kanyargósság mértéke),
- dermális elváltozások (eosinophil depozítumok a kollagénekötegek között, a dermis kiszélesedése),
- gyulladásos sejtes beszűrődés (döntően lymphocyták, plazma sejtek).

Megfigyelés	0	1	2	3
Interscapuláris régió	Nincs bőrelváltozás	Enyhe sebesedés, szőrzetvesztés nélkül	Súlyos elváltozások	Kiterjedt fekélyesedés a fül érintettségével
Fülek	Nincs elváltozás	Hyperemia	Sebek kevesebb, mint a fül felének felületén	Kiterjedt sebesedés a fül felületének több, mint felén

6/A. táblázat

Megfigyelés	Nagyítás	0	1	2
Hyper-/parakeratózis	200X	Normális	enyhe/ súlyos (a keratin vastagsága = epidermis)	Súlyos (keratin vastagsága > epidermis)
Akantózis	200X	maximálisan 3–5 sejtsor a stratum spinosumban	Középsúlyos megvastagodás	A stratum spinosum “utcakő rajzolatának” eltűnése
Bazális membrán (BM)	400X	Normális BM	Középsúlyos megvastagodás, vacuolizáció	Extrém vacuolizáció, megvastagodás, eosinophil depozítumok, membrán kanyargóssá válása
Dermális elváltozások	200X	Normális	Középsúlyos megvastagodás	masszív eosinophil depozítumok
Gyulladás	200X	Nincs	Középsúlyos subkután gyulladásos sejtes beszűrődés	masszív gyulladás

6. táblázat: Bőrelváltozások pontozási rendszere: makroszkópos (A), mikroszkópos (B)

A kiértékelés szempontjai vesében (7. táblázat):

- glomeruláris cellularitás (a gyulladásos sejtes infiltráció mértéke, mesangiális proliferáció, és következetes kapilláris obstrukció)
- perivaszkuláris és tubulointersiciális gyulladásos sejtes beszűrődés (a gyulladásos sejtek mennyisége a subcorticalis, periglomerularis, illetve peritubularis artériák körül és az interstíciumban)
- tubulus nekrosis (10 kérgi látómezőt random módon pontoztunk Chatterjee és munkatársai által kidolgozott protokoll szerint [²⁰⁴])
- az erek elváltozásait a kérgi és periglomeruláris középnyag veseartéria ágakban értékeltük ki
- a tubulointersiciális fibrózist Mallory-féle trikrómmal megfestett metszeteken értékeltük
- a tubularis epithél sejtek hidropikus degenerációját H&E és PAS festett metszeteken becsültük fel 400X-os nagyítás mellett

Megfigyelés	Nagyítás	0	1	2	3
Glomeruláris cellularitás	400x	Normális	Enyhe	Középsúlyos	Súlyos
Capilláris obstrukció	400x	Nincs	Glomerulusok $\leq \frac{1}{3}$ -ában	Glomerulusok $\frac{1}{3} - \frac{2}{3}$ -ában	Teljes, a glomerulusok $\geq \frac{2}{3}$ -ában
Tubuloint. (mononukleáris) gyulladás	200x	Normális	Enyhe (perivenuláris és periglom.)	Középsúlyos (invázió a peritub. térbe)	Súlyos (peritubuláris, periglom. és perivenuláris)
Tubuláris nekrosis	400X	Nincs	TEC duzzadása, kefeszegély és magfestődés elvesztése a	Magfestődés elvesztése a tubulusok $\frac{1}{3} - \frac{2}{3}$ -ában	Magfestődés elvesztése a tubulusok $> \frac{2}{3}$ -ában

			tubulusok <1/3-ában		
Érelváltozások	200X	Nincs	Endothelitis	tunica muscularis lymphocytás beszűrődése	Transmurális elváltozás / fibrinoid nekrózis

7. táblázat: Vese mikroszkópos kiértékelési rendszere

Egy adott veseminta végleges pontértékét a részpontok összeadásával kaptuk.

4.2.5. Immunhisztokémiai vizsgálat

A komplement 3 (C3) lerakódás kimutatására a paraffinba ágyazott mintákon immunhisztokémiai reakciót végeztünk korábbi leírás szerint [205]. Az átlagosan 5 µm vastag metszeteket 10 percen át 4 °C-os acetonban fixáltuk, majd deparaffináltuk, rehidráltuk Tris-sel pufferolt sóoldatban (Tris buffered saline, TBS). Az endogén peroxidáz aktivitást 3%-os (methanolban hígított) borjú szérum albuminnal (bovine serum albumin, BSA) végeztük. A blokkoló oldatban feloldott, kecske anti –egér C3 (1:200) elsődleges antitestet (Cappel Laboratories, Cochranville, PA, USA) 60 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten a mintáinkon. A másodlagos nyúl anti-kecske, peroxidázzal jelölt (IgG típusú) antitestet (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) 30 percig inkubáltuk 1:200-as hígításban. Kétszeri TBS-es mosás után (2-5 perc) előhívtuk az antigén-antitest reakciót 3,3'-diaminobenzidine (DAB) kromogén segítségével. A metszeteken Mayer hemalaunnal festettük meg a magokat 5 percig. A metszeteket lefedtük.

A glomeruláris festést vak módon értékeltük ki 600X-os nagyítás mellett. Mintánként 30 glomerulust pontoztunk le az alábbi szemikvantitatív módszerrel:

- 0 = nincs festődés;
- 1 = gyenge/ <50% festődés;
- 2 = középérős festődés a glomerulus >50%-ában.

A bőr C3 depozítumait a capillárisokban számoltuk látóterenként, 200X-os nagyítás mellett.

4.2.6. Lupus autoantitest panel vizsgálata

A mérésekhez Anti-Smiths (Sm), duplaszálú DNA (dsDNA) és anti-hisztón (H) antitesteket használtunk a forgalomban jelen lévő enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Orgentec, Mainz, Germany) kitéken a használati javaslat szerint. Detekciós antitestként torna peroxidázzal (horseradish peroxidase, HRP) konjugált anti-egér IgG (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) használtunk (1:1000 hígítás PBS-en, kiegészítve 1% Tween-nel, illetve 1% BSA-val). Az autoantitestek normál határértékeit 12 egészséges NMRI egér szérumának lemerésével határoztuk meg. Az adatokat optikai denzitás (OD)±SD formájában fejeztük ki. Az antinukleáris antitestet (ANA) indirekt immunfluoreszcencia (IIF) révén határoztuk meg, szubsztrátként Hep-2 sejteket használtunk (The Binding Site, UK) a gyártó javaslatai szerint. Detekciós antitestként FITC-konjugált anti-egér IgG-t alkalmaztunk (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Negatív kontrollként 12 egészséges egér szérumát mértük le. Szemikvantitatív pontozási rendszert használtunk a kiértékeléshez, ahol az alábbiak szerint pontoztuk a mintáinkat:

- 0: negatív minta,
- 1: az alacsony hígításban (1:40) enyhén pozitív esetek,
- 2: az alacsony hígításban (1:40) erősen pozitív esetek,
- 3: az alacsony és magas (1:80) hígításban egyaránt pozitív esetek,
- 4: a mindkét hígításon erős pozitíviást adó minták.

Az adatokat az átlagos szemikvantitatív pont±SD formájában fejeztük ki.

4.2.7. Statisztikai elemzések

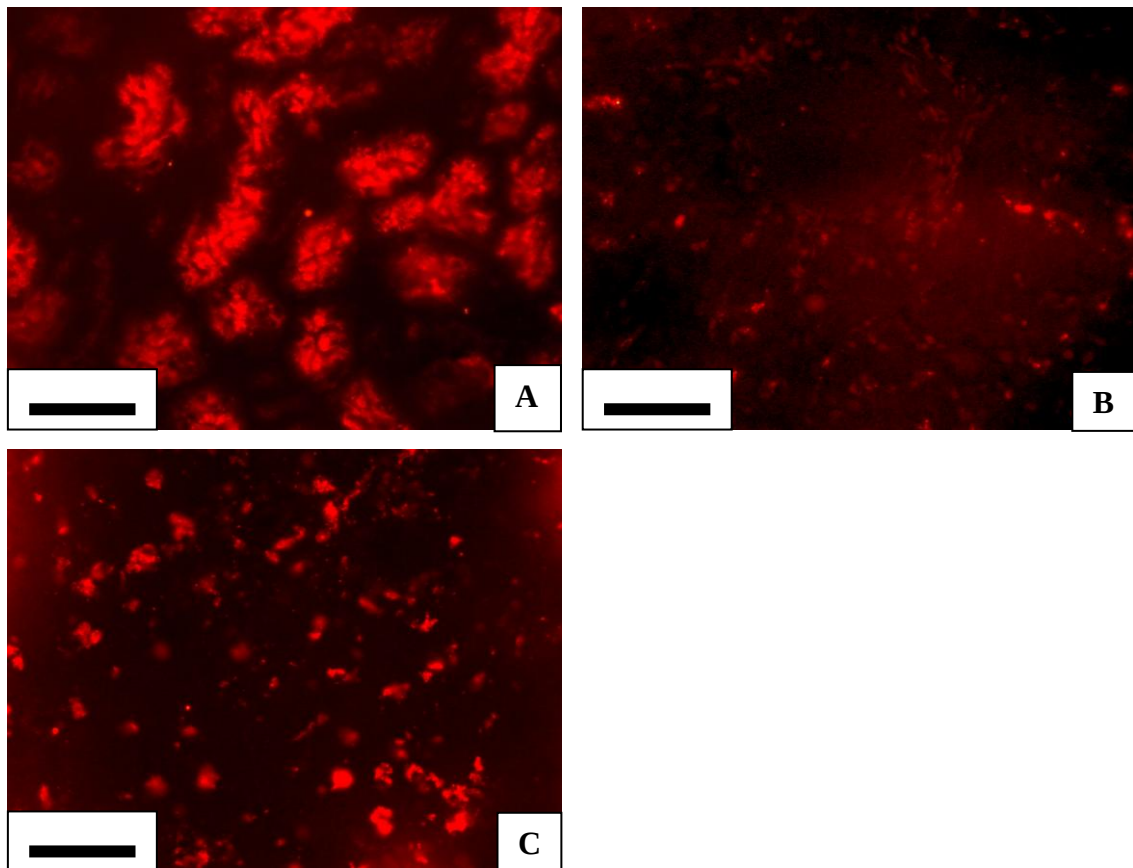
Az adatokat átlag ± standard deviáció formájában fejezzük ki. A non-parametrikus értékeket chi-négyzet teszttel, az átlagos és a többi folyamatos változót t-próbával, illetve Mann–Whitney U-teszttel hasonlítottuk össze. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Az interferon választ vizsgáló kísérlet eredményei

5.1.1. A hatékony siRNS felvétel vizsgálata immunfluoreszcens mikroszkóppal

A fluoreszcens jelzéssel ellátott siRNS (BlockiT) alacsony volumenű, farokvénán keresztüli hidrodinamikus injektálása után azt találtuk, hogy az siRNS-ek sikeresen bejutottak a vese tubulus hámsejtjeibe (5/ A ábra), a májba (5/B ábra) és a lépbe (5/C ábra). Az injektált siRNS-ek már 10-15 perccel a beadás után megjelentek a tubuláris hámsejtek citoplazmájában.



5. ábra: Az siRNS-ek intracelluláris felvétele vesében (A), májban (B), és lépben (C) 30 perccel a BLOCK-iT oligonukleotid alacsony volumenű hidrodinamikus injektálása után. (Leica DC500). A vonaljelölés 37,5 μm -t reprezentál. (400X)

Munkacsoportunk korábbi kísérletei során RT-PCR-rel igazolta, hogy az egér Fas (mFas) mRNS-t célzó siRNS szekvencia specifikusan csendesítette a Fas expresszióját az egerek veséjében [⁸].

5.1.2. A fízioológias sóoldat alacsony volumenű hidrodinamikus injektálása kismértékű emelkedést okozott a STAT1 és OAS1 gének expressziójában, ami nem fokozódott az siRNS-ek hozzáadása után

RT-PCR méréseink szerint a polyI:C-vel kezelt pozitív kontroll egereinkben szignifikáns STAT1 és OAS1 génexpresszió fokozódást láttunk 6 és 24 órával a kezelés után. Ez utóbbit az általunk vizsgált szervek (vese, máj, lép) mindegyikében megfigyeltük (6. táblázat). Ezzel ellentétben, a májban és a vesében 6 órával a fízioológias sóoldat AVHDI-a után csak kisfokú STAT1 és OAS1 génexpresszió fokozódást figyeltünk meg, a kezeletlen állatok értékeihez viszonyítva. A lépben nem figyeltünk meg STAT1, OAS1 expresszió fokozódást. Az OAS1 gén vese expressziója az idő függvényében kis mértékben tovább emelkedett, 24 órával a kezelés után (8. táblázat).

Az siRNS-sel kezelt állatok STAT1 és OAS1 génexpressziója nem mutatott szignifikáns változást sem a szervtől, sem az siRNS szekvenciától sem pedig az időponttól függően a csak fízioológias sóoldattal kezelt állatok génexpressziós mintázatahoz képest. Tehát, az siRNS-ek fízioológias sóoldathoz történő adása nem vezetett a STAT1 és OAS1 gének expressziójának további, szignifikáns fokozódásához.

Kezelés utáni órák	Vizsgált gén	siRNS típusa	Vese	Máj	Lép
6	STAT1	mFas	13,4 ±4,1*	0,94 ±0,1	3,5±3,5
6	STAT1	GFP	15,9 ±5,5*	1,3 ±0,2	2,5±0,5
6	STAT1	Fiz. só	14,6 ±3,7*	1,21 ±1,0	2,7±1,3
6	STAT1	polyI:C	72,4 ±4,8**	115,8 ±3,5**	287,1 ±72**
6	OAS1	mFas	4,4 ±3,8	3,1 ±1,5	7,1±1,7
6	OAS1	GFP	6,5 ±2,2	5,5 ±3,8	9,4±5,5
6	OAS1	Fiz. só	3,8 ±0,8	8,5 ±2,2*	9,5±6,6
6	OAS1	polyI:C	19,5 ±2,0**	24,7 ±3,9**	32,1 ±4,0**
24	STAT1	mFas	14,09 ±2,9*	2,1 ±1,1	1,9 ±2,1
24	STAT1	GFP	17,1 ±6,0*	2,0 ±1,1	3,0±2,2
24	STAT1	Fiz. só	16,2 ±5,2*	1,7 ±0,7	4,3±3,5
24	STAT1	polyI:C	43,5 ±0,7**	67,7 ±1,7**	125,1 ±88,1**
24	OAS1	mFas	8,8 ±5,8*,#	10,7 ±6,0*	4,81±9,6
24	OAS1	GFP	11,1 ±9,0* ,#	12,6 ±6,0*	8,55±5,2
24	OAS1	Fiz. só	10,7 ±3,5* ,#	13,3 ±7,3*	7,93±7,2
24	OAS1	polyI:C	28,9 ±4,1**	33,1 ±2,8**	28,35 ±6,0**
0	STAT1	Kezeletlen	10,3±2,6	0,8±3,7	2,2±2,4
0	OAS1	Kezeletlen	3,4±1,3	3,5±1,3	4,2±1,9

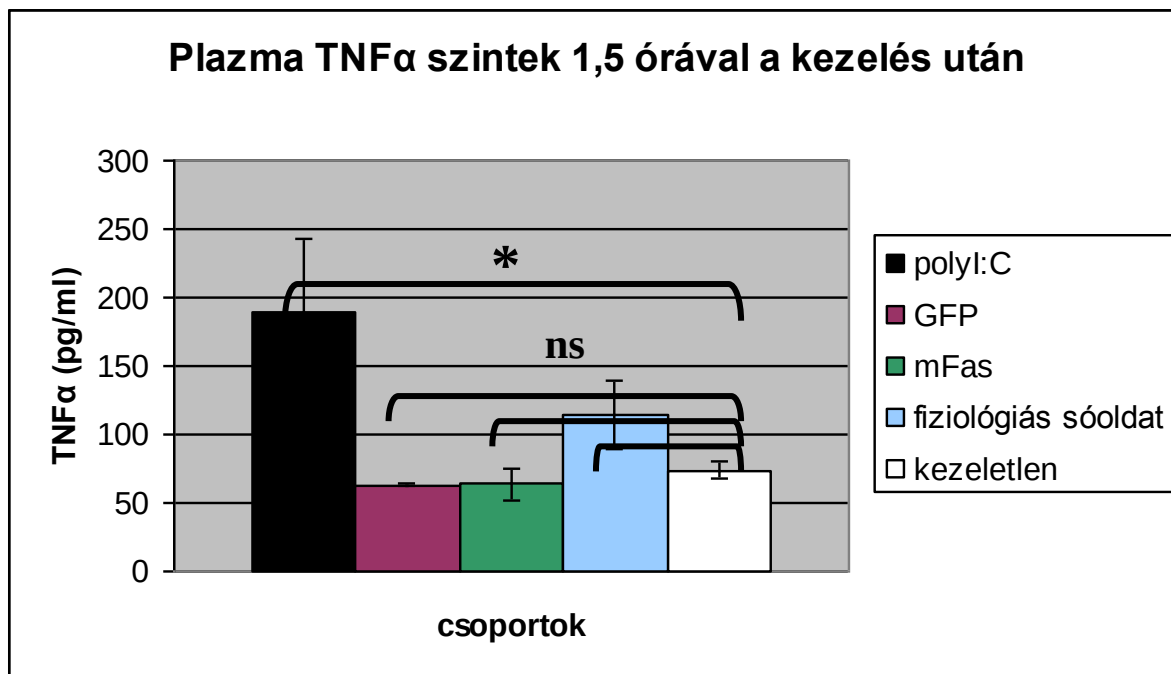
8. táblázat: A STAT1 és OAS1 génexpressziójának vizsgálata alacsony volumenű hidrodinamikus kezelés után RT-PCR módszerrel. mFas = mouse (egér) Fas, GFP = Green Fluorescent Protein, zöld fluoreszkáló fehérje). * = $p < 0,05$ vs. kezeletlen csoport, ** = $p < 0,01$ vs. kezeletlen csoport, #: $p < 0,05$ vs a megfelelő 6 órás csoport.

5.1.3. Az alacsony volumenű hidrodinamikus injektálás hatására az általunk vizsgált szisztémás gyulladásos citokinek ($IFN\beta$, $TNF\alpha$, $IL-6$ és $IL-12p40$) plazmaszintje nem mutatott szignifikáns emelkedést

A kezeletlen negatív kontroll egerekben az általunk vizsgált citokinek ($TNF\alpha$, $IL-6$, $IL-12p40$) plazmaszintje normál tartományon belül mozgott. A polyI:C kezelés a pozitív kontroll csoportban ezen citokinek szintjét megemelte. Ezzel ellentétben az siRNS kezelés nem eredményezte jelen citokinek plazmaszintjének szignifikáns emelkedését, a polyI:C kezelt csoporthoz képest.

A plazma $IFN\beta$ szintje 2 órával a polyI:C beadása után emelkedett meg ($210,85 \pm 164,28$ pg/ml), míg a többi csoportban az $IFN\beta$ szintje mérhetetlenül alacsony maradt.

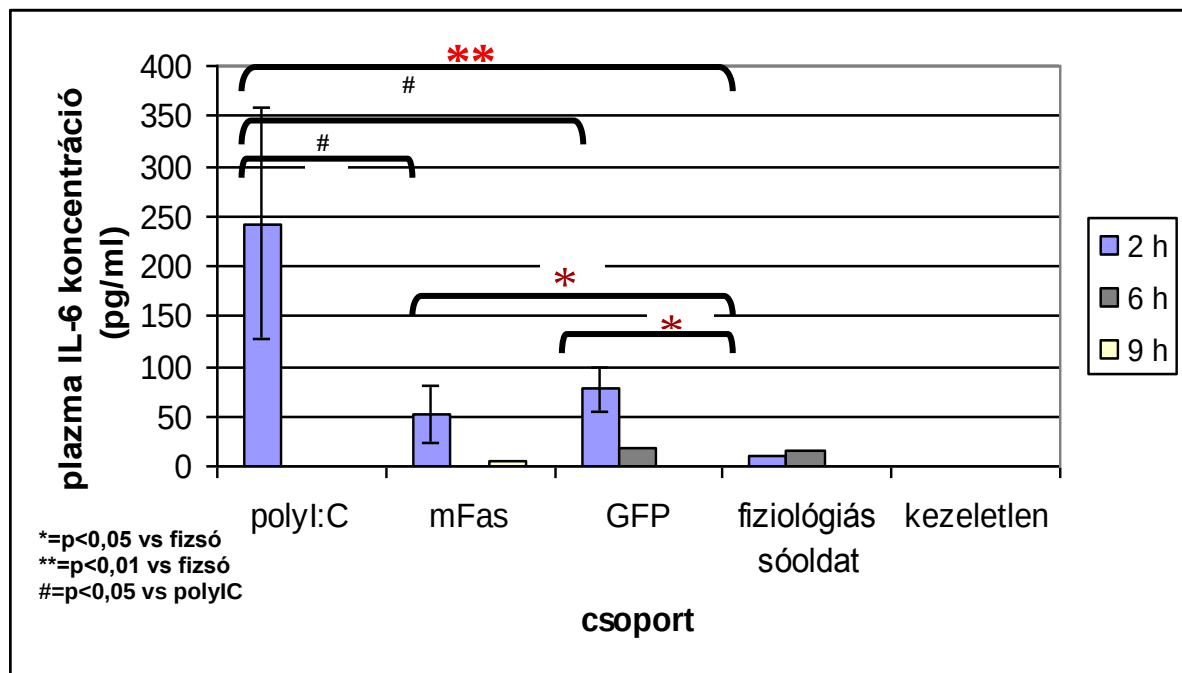
A $TNF\alpha$ plazma szintje mindössze másfél órával a polyI:C kezelés után volt mérhető (6. ábra), majd azután visszatért (mérhetetlen) alapszintjére, így az összes siRNS-sel kezelt, illetve nem kezelt állatban 6 és 24 órával a kezelések után már nem tudtuk kimutatni jelenlétét a plazmában.



6. ábra: A plazma $TNF\alpha$ szintjének vizsgálata ELISA módszerrel másfél órával az mFas siRNS (Fas), GFP siRNS (GFP), fiziológiás sóoldat és polyI:C alacsony

volumenű hidrodinamikusan beadása után. Az oszlopok az egyes csoportokat jelölik, a hibavonalak a standard deviációt. mFas = mouse (egér) Fas, GFP = Green Fluorescent Protein, zöld fluoreszcens fehérje. * = $p < 0,05$ vs. fiziológias sóoldattal kezelt csoport, ns = nem szignifikáns vs. kezeletlen csoport.

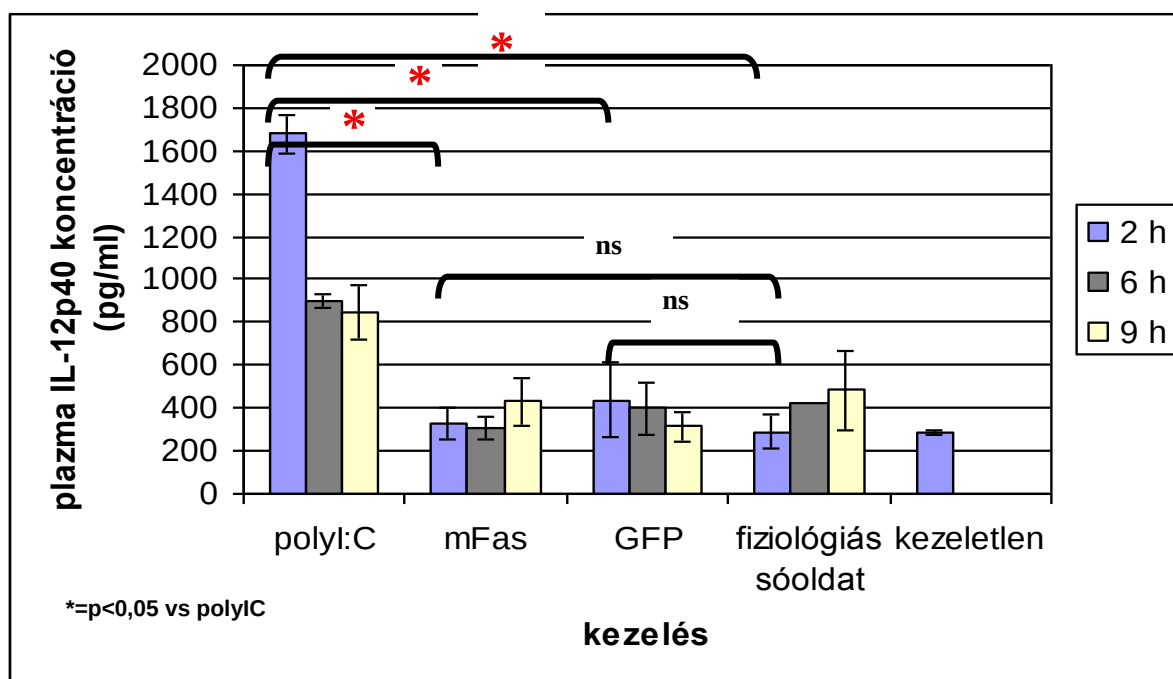
A plazma IL-6 koncentrációja mérhetetlenül alacsony volt a kezeletlen egerekben. A polyI:C injektálása jelentős IL-6 szint emelkedést okozott, melynek csúcspontja 2 órával a kezelés után jelentkezett, majd ezután koncentrációja gyors csökkenést mutatott. Az siRNS-sel kezelt állatok mintáiban szintén 2 órával a kezelés után figyeltük meg a csúcskoncentrációt, a 6 illetve 9 órás mintákban azonban már visszatért az alap szintre (7. ábra). Az siRNS-selés a csak fiziológias sóoldattal kezelt állatok plazmáinak IL-6 szintjei szignifikánsan alacsonyabb koncentrációt mutattak a polyI:C-val kezelt pozitív kontroll csoporthoz képest (7. ábra).



7. ábra: A plazma IL-6 szintjének vizsgálata ELISA módszerrel 2, 6 és 9 órával az mFas siRNS (mFas), GFP siRNS (GFP), fiziológias sóoldat és polyI:C alacsony volumenű hidrodinamikusan beadása után. Az oszlopok a csoportokat jelképezik, a hibavonalak pedig a standard deviációt. mFas = mouse (egér) Fas, GFP = Green Fluorescent Protein, zöld fluoreszkáló fehérje. * = $p < 0,05$ vs. fiziológias sóoldattal

kezelt csoport, ** = $p < 0,01$ vs fiziológiás sóoldattal kezelt csoport, #: $p < 0,05$ vs polyI:C-vel kezelt csoport.

A plazma IL-12p40 koncentrációja lényegesen magasabb volt a polyI:C kezelt pozitív kontroll csoportba a csak fiziológiás sóoldattal kezelt csoporthoz képest ($p=4,32E-08$). Az IL-12p40 csúcspontját 2 órával a kezelés után érte el. Az siRNS beadása nem emelte meg szignifikánsan a plazma IL-12p40 szintjét sem a kezeletlen, sem a csak fiziológiás sóoldattal kezelt csoport mintáihoz képest (8. ábra).



8. ábra: A plazma IL-12p40 szintjének vizsgálata ELISA módszerrel 2, 6 és 9 órával az mFas siRNS (mFas), GFP siRNS (GFP), fiziológiás sóoldat és polyI:C alacsony volumenű hidrodinamikus beadása után. Az oszlopok a csoportokat jelképezik, a hibavonalak pedig a standard deviációt. mFas = mouse (egér) Fas, GFP = Green Fluorescent Protein, zöld fluoreszkáló fehérje. * = $p < 0,05$ vs. fiziológiás sóoldattal kezelt csoport, ns = nem szignifikáns a kezeletlen csoporthoz képest.

5.1.4. A polyI:C kezelés szervi károsodással járó interferon választ váltott ki

A polyI:C intraperitoneális injektálása súlyos szöveti elváltozásokat okozott a vesében.

A glomeruláris károsodás az alábbi formákban nyilvánult meg:

- a mezangiális sejtek nekrozisa
- a mezangiális compartment kiszélesedése
- a glomeruláris kapilláriskacsok összenyomódása

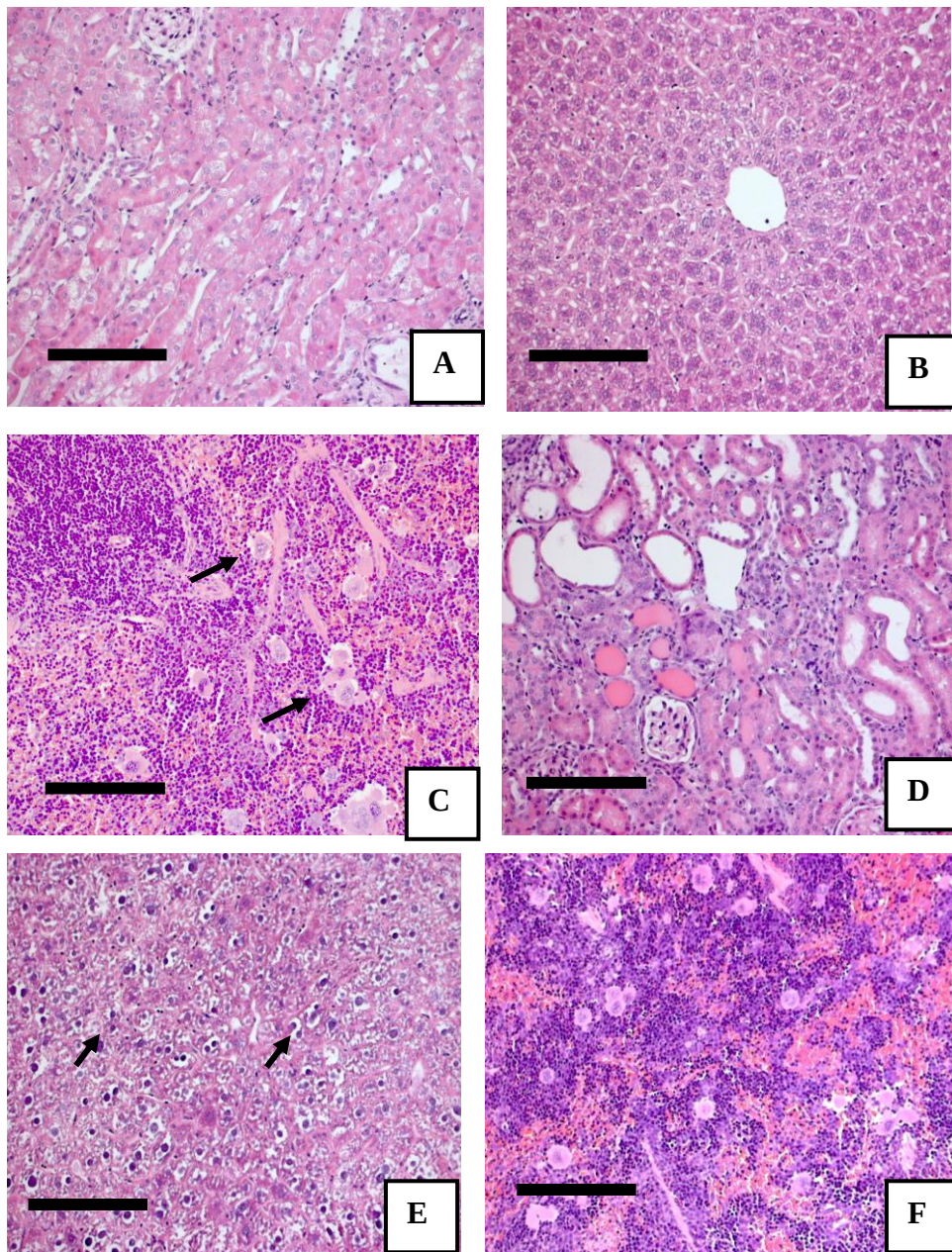
Mindezek mellett tubuláris nekrozist is megfigyeltünk, mely mind az elsődleges, mind a másodlagos kanyarultatos csatornácskákat érintette. A fent említett elváltozások súlyossága az idő függvényében fokozódott, melynek jeleként a glomeruláris és a tubuláris funkció romlását láttuk (9. táblázat).

Leölési idő	Csoport	Urea (mg/dl)	ASAT (U/L)
2	mFas siRNS	47,7±6,5 (0,1)	167,5±13 (1,0)
	GFP siRNS	46,1±2,6 (0,1)	174,5±11,4 (0,5)
	Fiziológiás sóoldat	41,8±5,1 (0,4)	167,3±22,1 (0,5)
	PolyI:C	46,7±1,8 (0,1)	258,1±78,1 (0,01)*
6	mFas siRNS	41,6±13,7 (0,9)	167,2±10,3 (0,7)
	GFP siRNS	40,6±14,8 (0,8)	161,4±73,6 (0,9)
	Fiziológiás sóoldat	42,5±4,1 (0,5)	164,9±13,8 (0,6)
	PolyI:C	48,1±4,4 (0,01)*	290,5±118,7 (0,1)*
9	mFas siRNS	39,8±7,3 (0,2)	165,6±14,1 (0,1)
	GFP siRNS	48,1±4,4 (0,3)	153,3±13,6 (0,5)
	Fiziológiás sóoldat	45,3±4,9 (0,5)	144,1±30,06 (0,4)
	PolyI:C	53,5±2,7 (0,01)*	503±195,7 (0,01)*
24	mFas siRNS	46,9±2,2 (0,8)	165,5±3,5 (0,7)
	GFP siRNS	47,2±17,4 (0,9)	159,5±6,4 (0,9)
	Fiziológiás sóoldat	46,1±2,9 (0,3)	156,5±30,4 (0,9)
	PolyI:C	57,9±6,3 (0,01)*	550,7±56,2 (0,01)*
-	Kezeletlen	43,6±1,3	158,6±22,8

9. táblázat: Teljes vér urea szintjének és aszpartát amino transferáz (ASAT) aktivitásának vizsgálata 2, 6, 9 és 24 órával 50 µg mouse (egér) Fas (mFas) siRNS, Green Fluorescent Protein (zöld fluoreszkáló fehérje) (GFP) siRNS, polyinozin-cytydil sav (polyI:C), illetve 1 ml fiziológiás sóoldat alacsony volumenű

hidrodinamikus injektálás után. A kezeletlen (negatív) kontrol állatok urea szintjét és ASAT aktivitásának adatait a táblázat utolsó sorában tüntettük fel. A számok az adott csoport adatainak átlagát $\pm$ SD-ját jelzik ($n=6/\text{csoport}$). Az összes csoportot a csak fiziológiás sóoldattal kezelt csoport értékeihez viszonyítottuk (* = $p<0,05$).

A polyI:C kezelés hatására a lépben a megakarioblasztok száma megnövekedett. A májban a hepatocyták apoptózisa alakult ki, melynek jeleként a sejtmagok piknotikussá váltak (9. ábra). A polyI:C által okozott szöveti károsodásokra vonatkozóan irodalmi adatot nem találtunk.



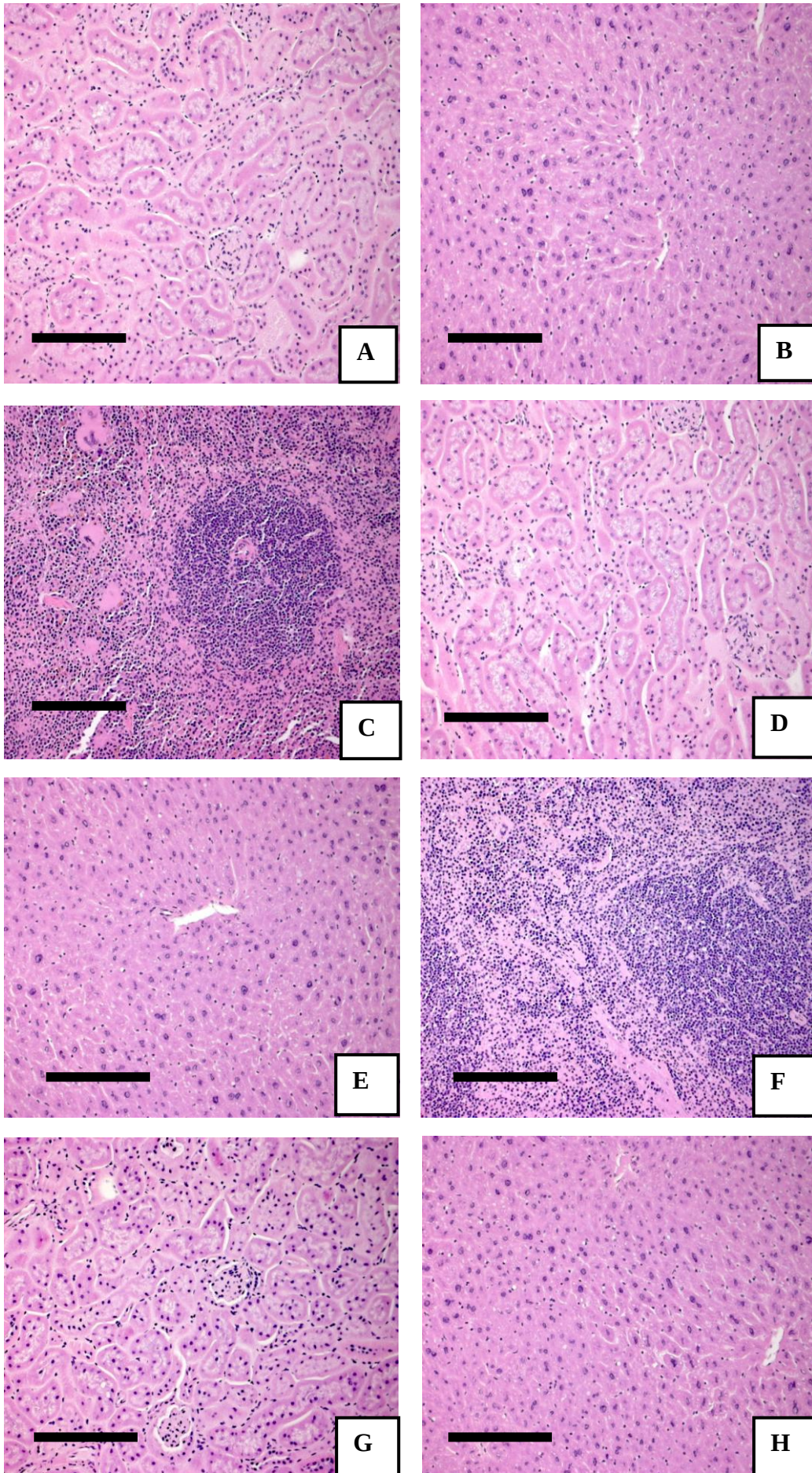
9. ábra: Szervi károsodás szöveti megjelenése a polyI:C-vel kezelt egerekben. A polyI:C kezelés a vesében glomeruláris károsodást és tubuláris nekrozist, a májban hepatocyták apoptózisát, (a nyilak az 9/E ábrán piknotikus sejtmaggal rendelkező apoptotikus hepatocytákra mutatnak) illetve a lépben a megakariocyták számának növekedését okozták (nyilak, 9/C). A kezelést követő 6-ik órában ezek az elváltozások még enyhék voltak (A, B, C), majd a 24-ik órára súlyosságuk fokozódott mind a vesében (D), mind a májban (E) és a lépben is (F). A vonaljelölés 25 μm -t reprezentál. (HE, 200X)

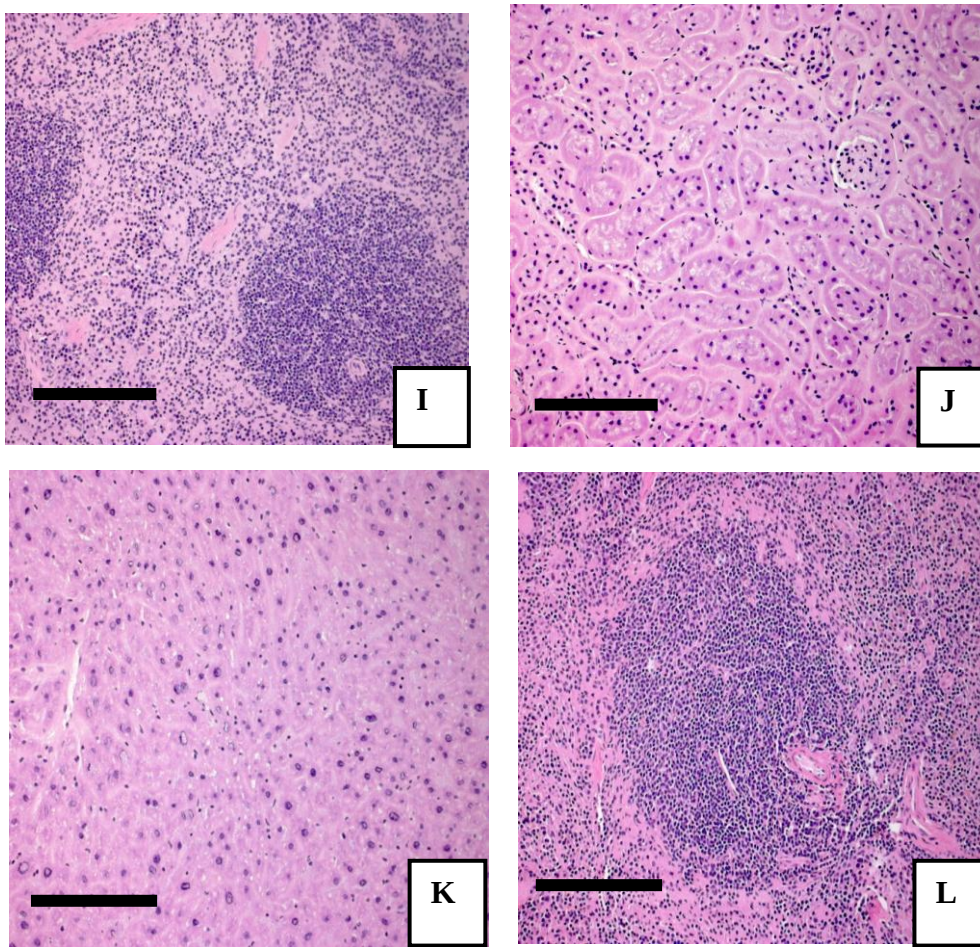
5.1.5. Az siRNS-ek alacsony volumenű hidrodinamikus injektálása után nem mutatkozott szervi funkcióbeli és szöveti károsodás

Az alacsony volumenű protokoll szerint siRNS-sel kezelt egerek veséjében, májában és lépében ép szöveti szerkezetet láttunk a leölés utáni 6-ik és 24-ik órában (10. ábra).

A vese szöveti képe korrelált a vese glomeruláris, illetve tubuláris funkciójának papramétereivel. A siRNS kezelés során mind a vér urea nitrogén szintje, mind az aszpartát amino transzferáz (ASAT) (9. táblázat) aktivitása hasonló értékeket mutatott a kezeletlen negatív kontroll csoporthoz képest.

A máj szerkezete megtartott volt (trabekuláris), a portális terek ugyancsak ép szerkezetet mutattak, gyulladásra vagy destrukcióra utaló jelet nem láttunk.



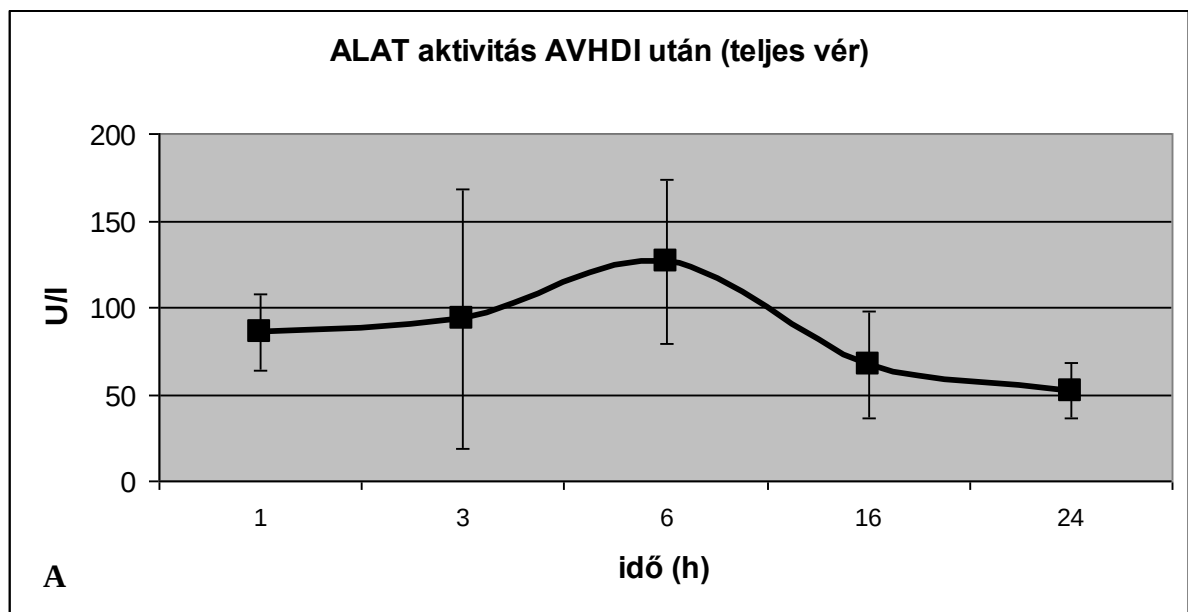


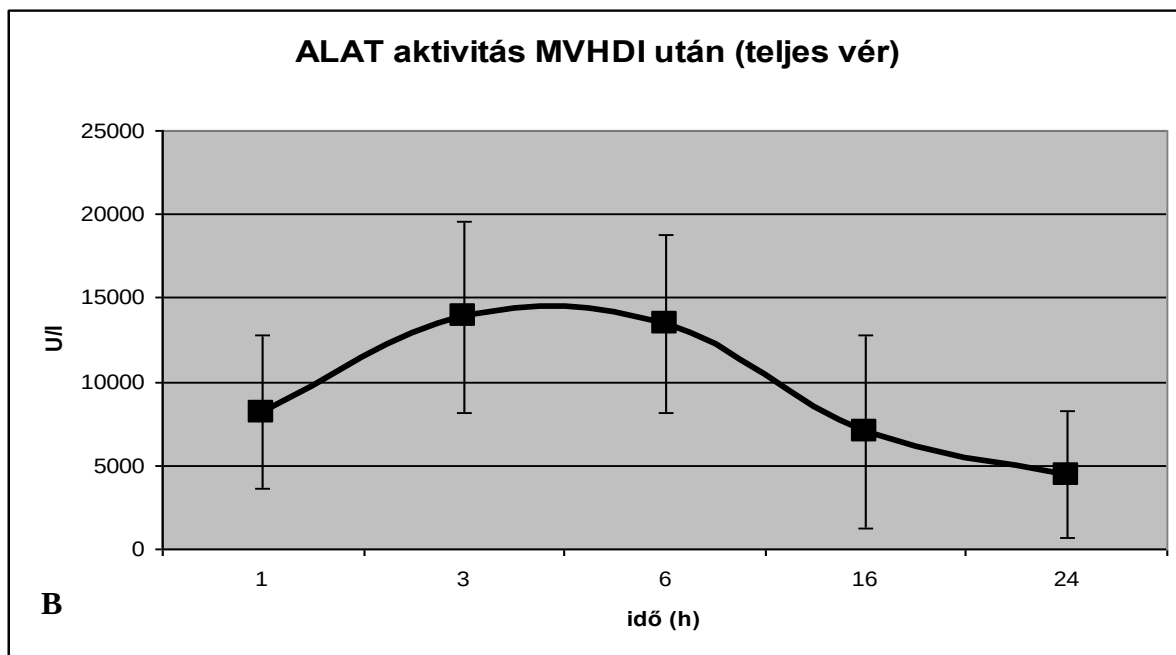
10. ábra: A vese, a máj és a lép szövettani vizsgálata mFas siRNS (A, B, C), GFP siRNS (D, E, F) és fiziológias sóoldat (G, H, I) alacsony volumenű hidrodinamikus kezelés után 24 órával és kezeletlen (J, K, L) állatokban. A vonaljelölés 25 μ m-t reprezentál. (HE, 200X)

5.1.6. A magas volumenű hidrodinamikus injektálás májra gyakorolt hatásainak vizsgálata.

Vizsgálatunkban a különböző kezelésben részesített egerek alanin amino transzferáz (ALAT) plazma szintjét hasonlítottuk össze, mivel ezen enzim szintjének emelkedése tükrözi legjobban a hepatocyták károsodását. A kezeletlen egerek csoportjában az ALAT aktivitása $13,33 \pm 0,85$ mmol/l volt. Az ALAT aktivitása mintegy kétszeresére emelkedett meg az alacsony volumenű hidrodinamikus injekció (AVHDI:

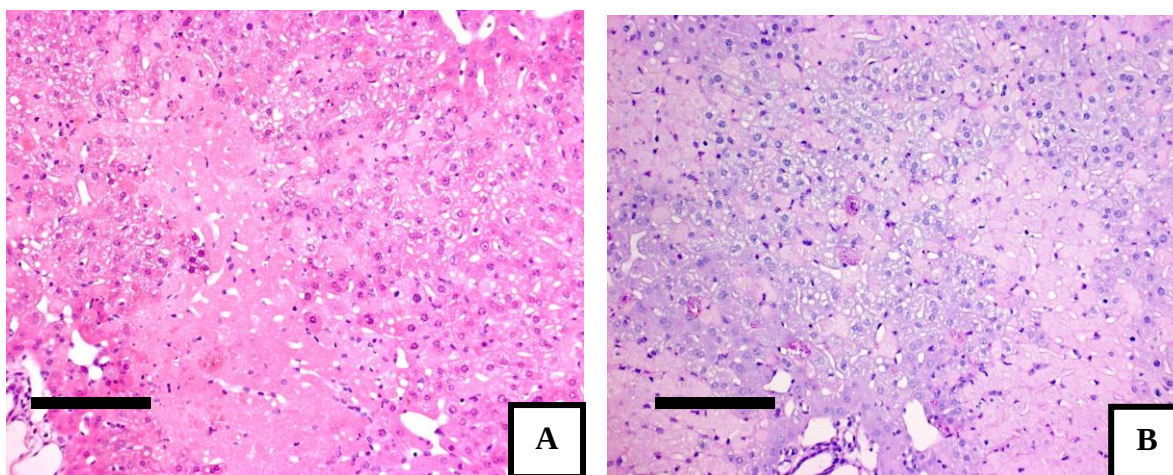
1 ml) után a kezeletlen állatokéhoz képest (11/A ábra), majd 24 órán belül visszatért az alapértékére. Ezzel ellentétben, a magas volumenű MVHDI (2,5 ml) protokollja szerint kezelt egerek esetében az ALAT aktivitása két nagyságrenddel nőtt. A legmagasabb értéket 3 órával a kezelés után mértük, mind az AVHDI, mind a MVHDI esetében, azonban 24 órával a MVHDI után az ALAT aktivitása még mindig két nagyságrenddel magasabb szintet mutatott (11/B ábra).





11. ábra: Májkárosodás időlefolyása alacsony (A) és magas volumenű hidrodinamikus kezelés (B) hatására 1 és 24 óra között.

A MVHDI súlyos májkárosodást okozott, amely szövettanilag kiterjed, konfluáló nekrosis képében jelent meg (12. ábra).



12. ábra: Konfluáló hepatocytá nekrózis 24 órával a magas volumenű hidrodinamikus injektálás után A: H&E festett, B: PAS reakció. A vonaljelölés 25 μm -t reprezentál. (200X)

5.2. Az IVIG hatásait felmérő kísérlet eredményei

5.2.1. A magas dózisu IVIG szisztémás adása enyhítette a bőrbetegséget

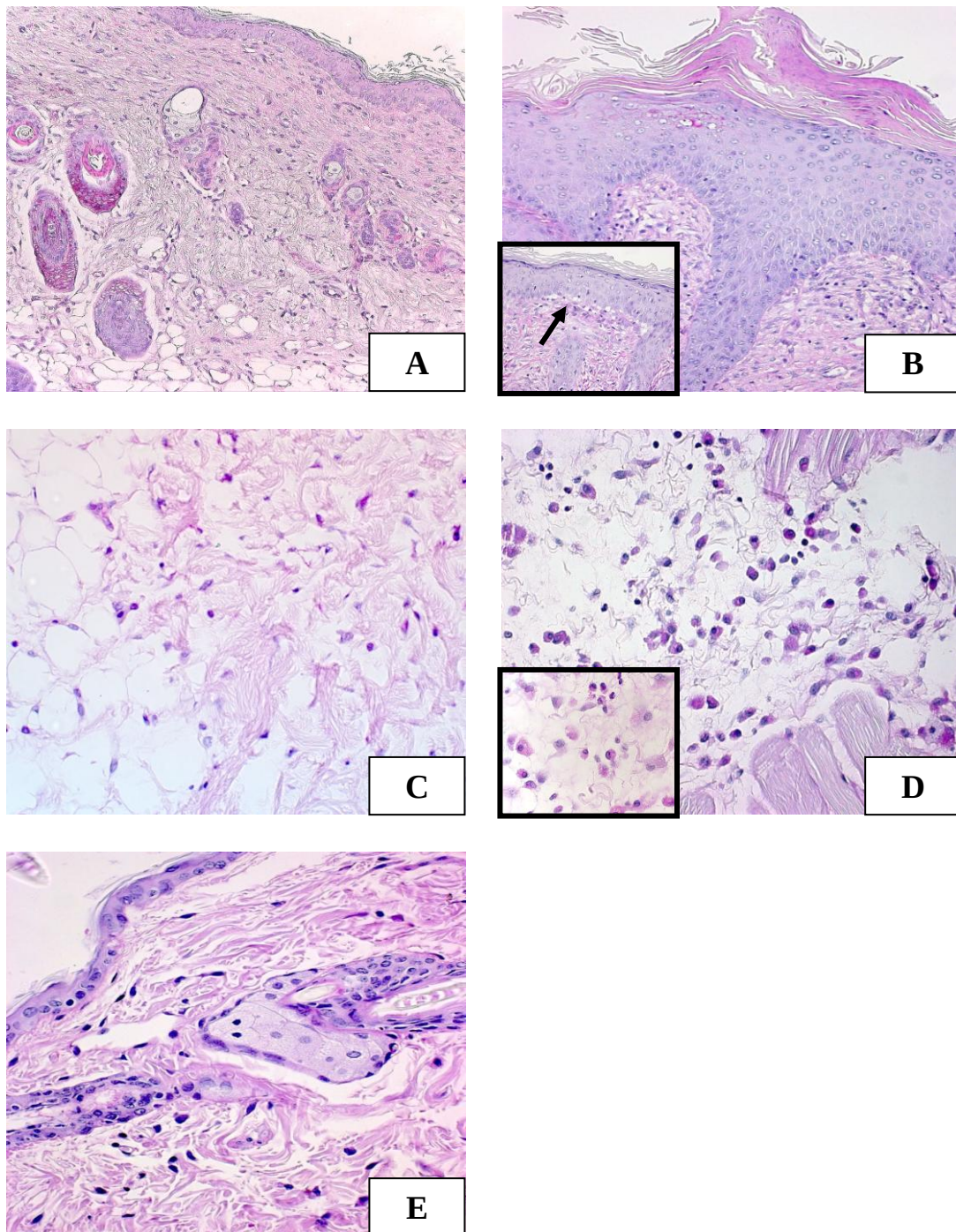
A fiziológias sóoldattal kezelt MRL/lpr egerekben a bőrbetegség 3 hónapos korban jelent meg legelőször, amely során az interscapuláris régióban és a füleken szőrhullás (alopecia) és sebek jelentkeztek. Az állatok leölésekor (az állatok 5 hónapos korában) kifeléyesedést és kiterjedt szöveti destrukciót figyeltünk meg minden állaton. Az IVIG kezelés szembetűnően enyhítette a leöléskor makroszkóposan látott a bőrön és a füleken megjelenő tüneteket (10. táblázat).

A bőr szövettani vizsgálata során súlyos intradermalis gyulladásos beszűrődést láttunk, amely a dermis kiszélesedéséhez vezetett. Hyper-és/vagy parakeratózis, a tüskés réteg kiszélesedése (acanthosis), illetve ez utóbbinak struktúrális destrukciója (az ún. “utcakő rajzolat” elvesztése) volt látható. Ezen bőrelváltozások nagyrészt enyhültek, vagy gyakorlatilag eltűntek az IVIG kezelés hatására (13. ábra). A bőr bazálmembránjának megvastagodása, vakuolizációja és kanyarulatossá válása ugyancsak gyakori elváltozás volt a kontroll (fiziológias sóval kezelt) állatokban (10. táblázat). A mononukleáris

(lymphocyták, plazmasejtek, monocyták, ritkán eosinophil granulocyták) gyulladásos sejtes beszűrődés szintén szignifikánsan csökkent az IVIG kezelt csoportban. A bőrelváltozások makroszkópos és mikroszkópos kiértékeléséhez használt szemikvantitatív pontrendszer alapján azt találtuk, hogy az IVIG kezelés szignifikánsan enyhítette a bőrtüneteket. Továbbá megfigyeltük, hogy a kontroll csoport tagjaiban generalizált nyirokcsomó megnagyobbodás alakult ki, míg az IVIG kezelt állatokban nyirokcsomó megnagyobbodás kevésbé volt észlelhető (nem közölt adatok).

IVIG (n=8)		Fiziológiás sóoldat (n=10)	P érték
Makroszkópos			
Bőr	0,75±0,34	1,3±0,4	<0,03
Fül	0,25±0,12	0,8±0,2	<0,05
Mikroszkópos			
Dermális elváltozások	0,58±0,47	1,21±0,58	0,001
Bazális membrán megvastagodás	0,41±0,2	0,95±0,54	0,001
Hyper-és/vagy parakeratózis	0,39±0,1	0,66±0,28	0,02
Stratum spinosum kiséledése	0,23±0,11	0,61±0,28	0,212 (ns)
Kifekélyesedés	0,11±0,33	0,4±0,51	0,089 (ns)
Gyulladásos beszűrődés	0,35±0,21	0,75±0,42	0,123 (ns)
Összesített mikroszkópos pontszám	0,34±0,29	0,76±0,56	0,05

10. táblázat: A bőrelváltozások makroszkópos és mikroszkópos jellemzői IVIG-gel és fiziológiás sóoldattal kezelt MRL/lpr egerekben. A pontszámok az egy csoportba tartozó esetek pontszámainak átlagait jelzik. A vizsgált paraméterek közül a non-parametrikusokat chi-négyzet teszttel, az átlagot és a többi folyamatos változót t-próbával hasonlítottuk össze.



13. ábra: Bőr érintettség vizsgálata az IVIG (bal oszlop) és fiziológias sóoldattal (jobb oszlop) kezelt MRL/lpr egerekben. Elterést nem mutató (A), és minimális szubkután gyulladásos beszűrődést mutató bőrrészlet (C) IVIG kezelt egerekből. Hyper-, és parakeratózis (*) kiszélesedett stratum spinosummal, mononukleáris sejtes beszűrődéssel (200X), valamint megvastagodott, vakuolizált (nyíl) bazálmembrán részlete (inzert) fiziológias sóoldattal kezelt kezelt állat bőréből (B). Kifejezett

szubkután plazmasejtes beszűrődés fiziológias sóoldattal kezelt egér bőrből (200X, inzert: 1000X, PAS) (D). Ép szerkezetű bőr NMRI egérből (E, 400X).

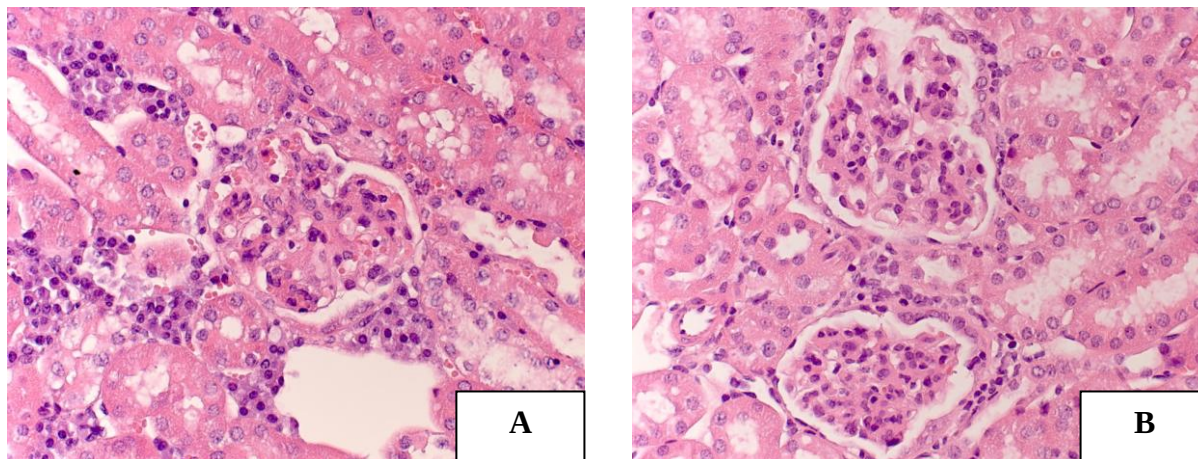
5.2.2. A glomeruláris funkció változása IVIG kezelés hatására MRL/lpr egerekben

A kezeletlen MRL/lpr egerekben proliferatív típusú, hipercelluláris lupus nephritis alakult ki. A mezangiális sejtszaporulat mellett mononukleáris gyulladásoos beszűrődés alakult ki amelyhez glomerularis hyalin lerakódás is társult. Ez utóbbiak a kapilláriskapcsok obstrukciójához vezettek. Ezen elváltozások jelenléte mind a fiziológias sóoldattal, mind az IVIG-el kezelt állatokban egyformán detektálható volt (11. táblázat, 14. ábra).

A vér urea nitrogén szintje, amely a glomeruláris filtráció alapvető jellemzője, hasonlóképpen emelkedett volt mindkét csoportban, igazolva azt, hogy a hosszú távú, magas dózisú, glicinnel stabilizált IVIG kezelés nem befolyásolta a vesefunkciót (12. táblázat).

Megfigyelés	IVIG	Fiziológias sóoldat	P értékek
Glomeruláris cellularitás	1,96±0,5	2,19±0,38	0,296
Arteritis	0,723±0,24	0,729±0,44	0,974
Glomeruláris fibrózis (%)	2,2±3,2	3,15±1,78	0,468

11. táblázat: Az IVIG-el és fiziológias sóoldattal kezelt állatok veséjének szövettani vizsgálata. Az összesített pontszámok a csoportba tartozó esetek pontszámainak átlagait jelzik.

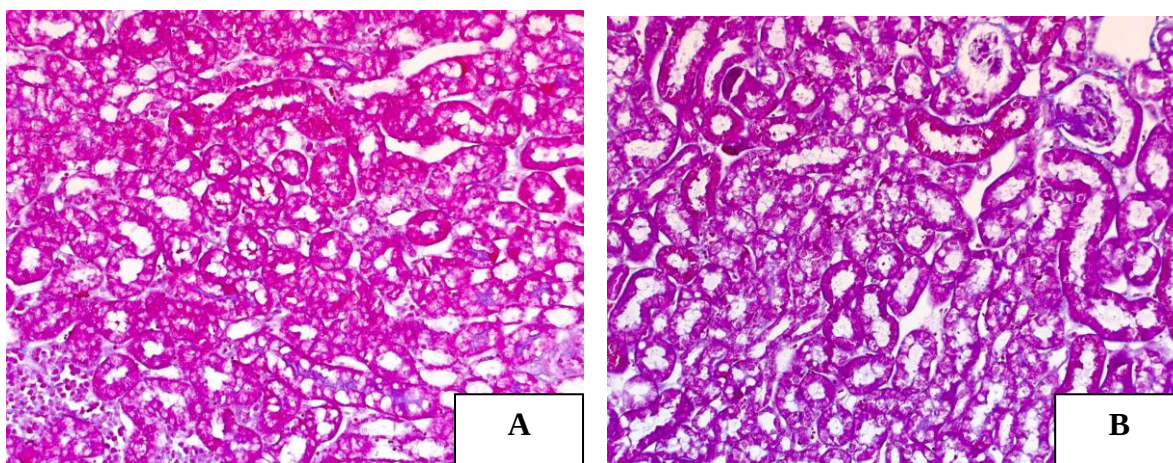


14. ábra: Glomeruláris elváltozások IVIG-gel (A, közép súlyos glomeruláris hipercellularitás), és fiziológiás sóoldattal (B, közép súlyos glomeruláris hipercellularitás) kezelt MRL/lpr állatokban. (HE, 400X).

5.2.3. Tubulointesticiális elváltozások

A gyulladásos sejtek beáramlása a tubulointersticiumba általánosan megfigyelt elváltozás volt mindkét csoportban. A gyulladásos beszűrődés mértéke minimális egyéni eltéréseket mutatott ugyan, azonban a két vizsgált csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget. A látott arteritis és a tubuláris károsodás (tubulitis, tubuláris atrofia) mértéke ugyancsak hasonló volt a két csoportban (13. táblázat). A heveny gyulladás jeleit (tubuláris nekrózis, tubulitis kiterjedt gyulladással és következményes hámsejt pusztulással) mind az IVIG, mind a fiziológiás sóoldattal kezelt állatok vesecsatornácskáiban megfigyeltük.

Az állatok leölésének idejében a legjellemzőbb szöveti kép a tubulusok nekrózisa volt: a tubuláris hámsejtek duzzadása, a kefeszegély és a magfestődés elvesztése jellemezte ezt a képet (16/C-F ábra) ($2,42 \pm 0,33$ vs $2,22 \pm 0,446$, $p=0,269$). Az intersticiális fibrózis, melynek kimutatására Mallory-féle trikróm festést alkalmaztunk, nem volt jelen egyik csoportban sem (15. ábra), egy-egy esetet leszámítva.



15. ábra: Az intersticiális fibrózis vizsgálata az IVIG-gel (A), és fiziológias sóoldattal (B) kezelt MRL/lpr egerekben. Egyik esetben sem jelentkezett a fent leírt elváltozás. (Mallory féle trikróm festés, 200X)

A leölés időpontjában látott leggyakoribb érelváltozás a perivenuláris és a periartrioláris lymphocytás beszűrődés volt, melyek szintén nem mutattak eltérést a két csoport között (lásd 11. táblázat).

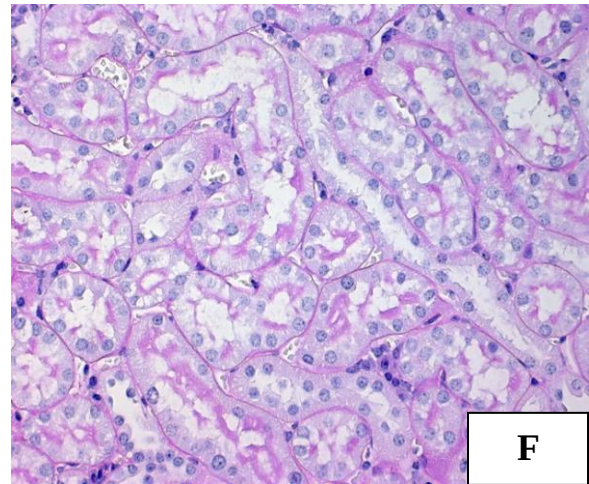
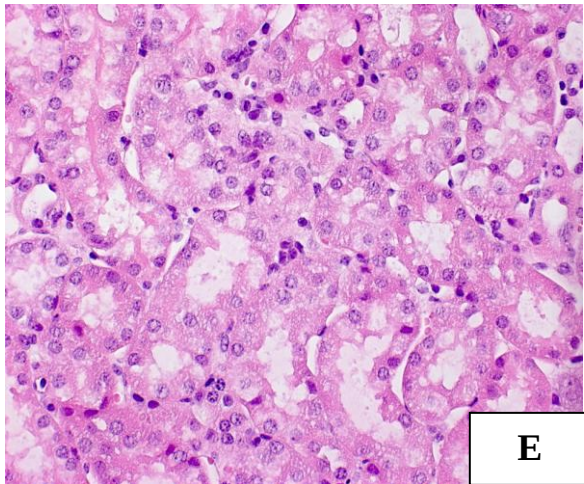
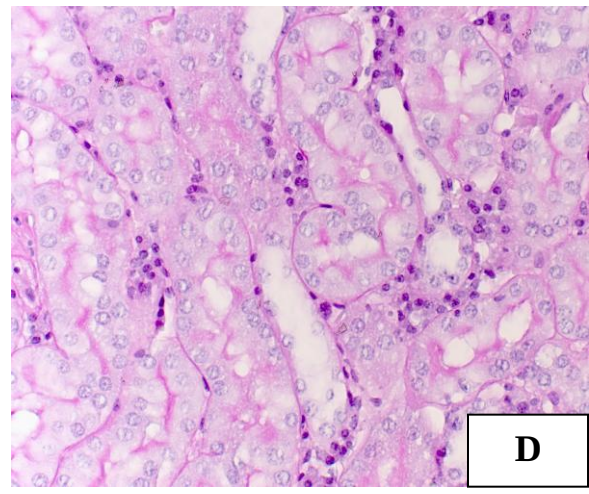
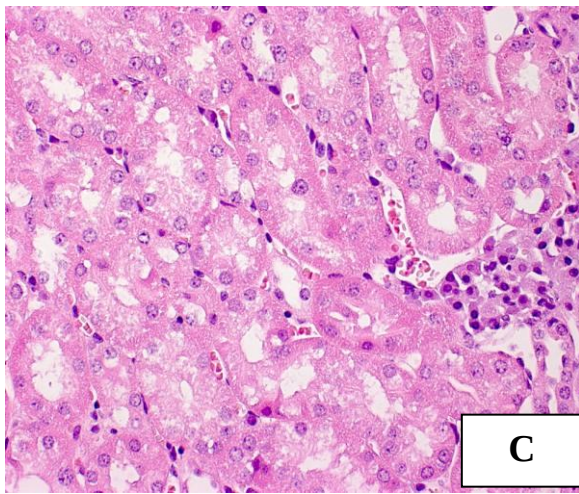
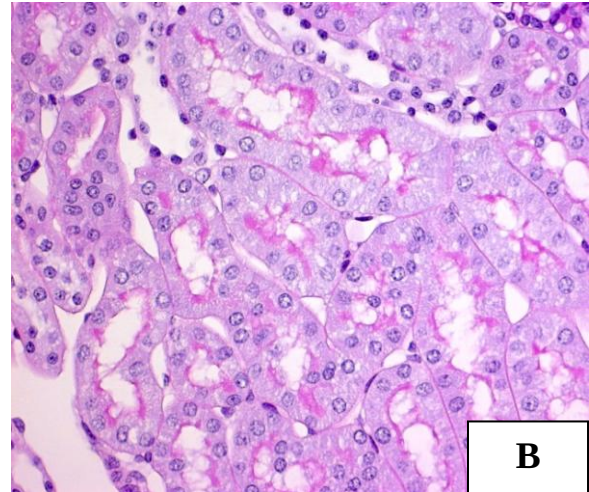
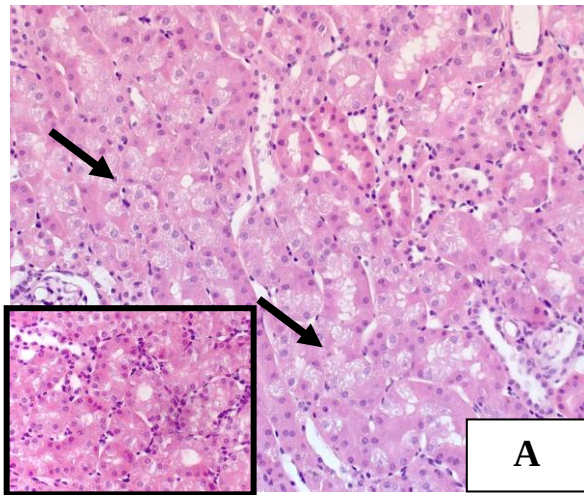
Kezelés	Urea (mg/dl)	SD (n=10)	P érték
IVIG *	103,2	63,57	>0,05
Fiziológias sóoldat	84,8	22,23	
5% szaharóz (háromszor)	47,4	2,08	>0,05
20% szaharóz (egyszer)	64,3	4,03	<0,05
10% maltóz (háromszor)	53,2	6,04	<0,05
20% maltóz (egyszer)	65,2	14,51	<0,05
40% maltóz (egyszer)	60,8	5,1	<0,05
Kezeletlen állatok	39,26	4,12	

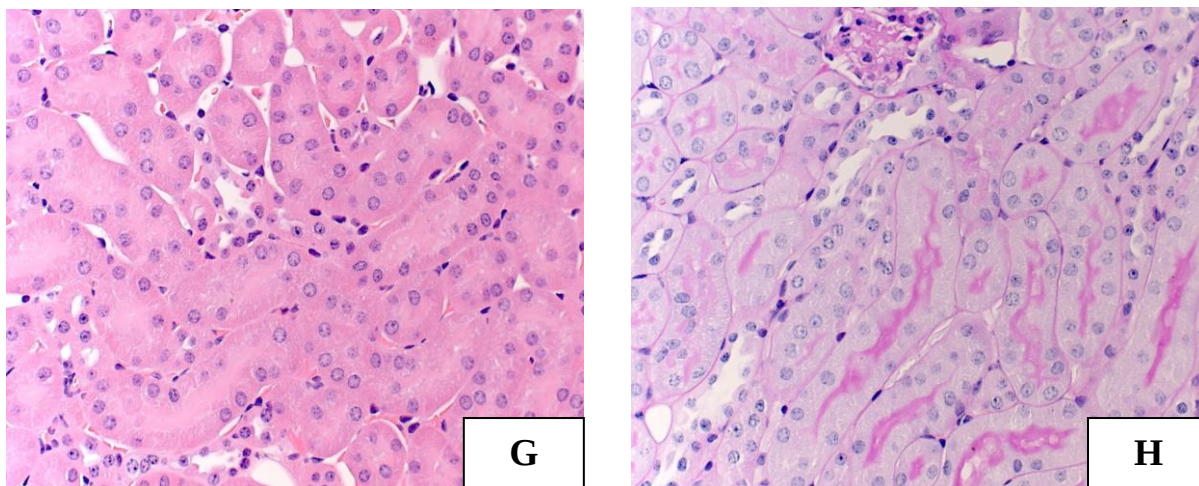
12. táblázat: Vesefunkciós paraméterek (vér urea nitrogén, BUN) vizsgálata IVIG és fiziológias sóoldattal kezelt MRL/lpr egerekben, valamint szaharózzal, és maltózzal kezelt, illetve kezeletlen NMRI egerekben. A p értéket az IVIG-gel kezelt állatok esetében a fiziológias sóoldattal kezelt állatok értékeihez hasonlítotva számoltuk,

míg a pozitív kontroll állatok esetében a kezeletlen állatok értékeihez viszonyítottuk* ezen csoportban n=8.

Megfigyelés	IVIG kezelt egerek (n=8)	Fiziológiás sóoldattal kezelt egerek (n=10)
Hyalin cseppek	2	2
Tubulitis	3	2
Tubuláris atrófia	1	0
Plazma sejtek jelenléte	2	1

13. táblázat: A szövettani vizsgálat során látott tubulointersticiális elváltozások összegzése IVIG és fiziológiás sóoldattal kezelt MRL/lpr egerekben (a számok a kóros esetek számát jelzik)

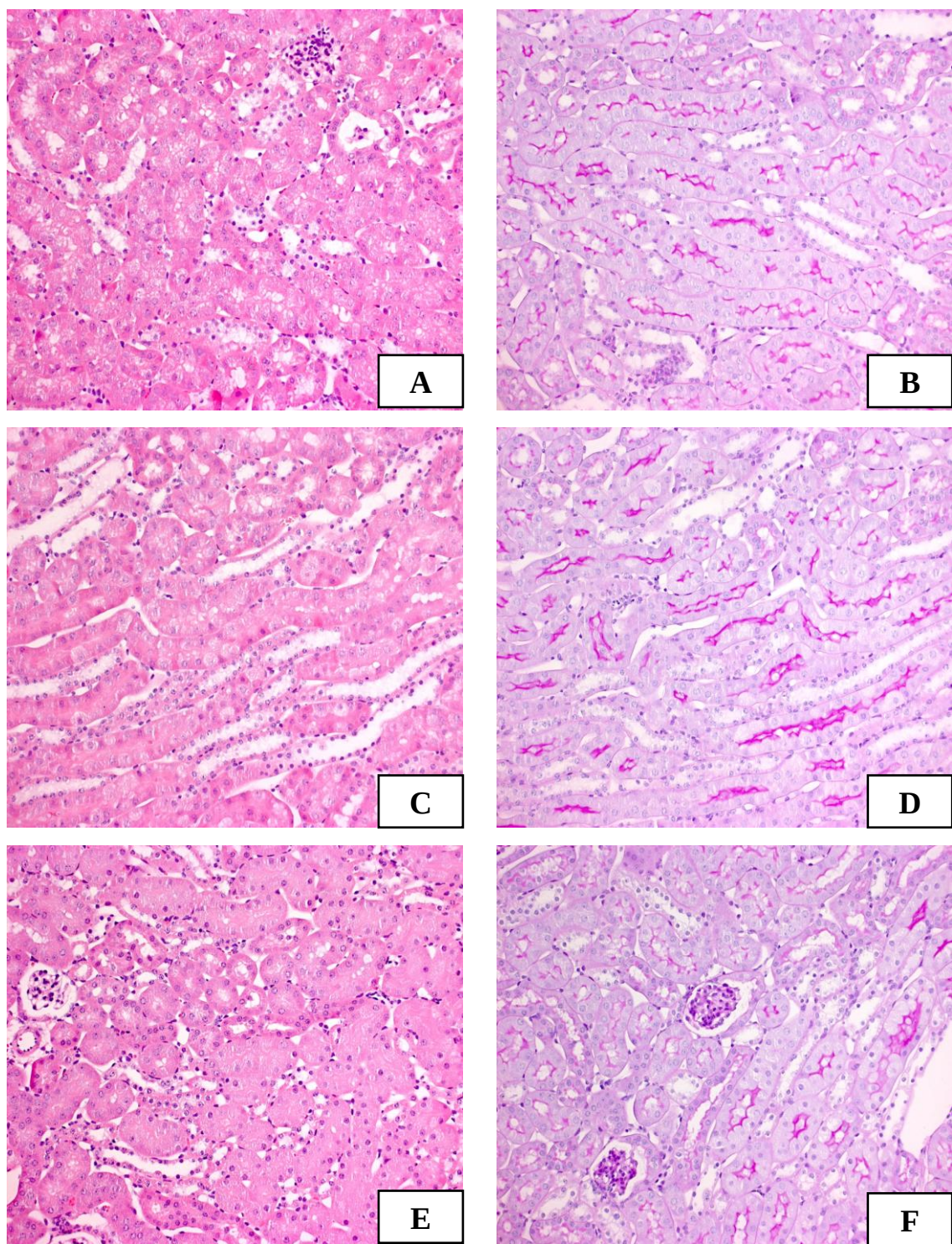




16. ábra: MRL/lpr és NMRI egerek veséjének szövettani vizsgálata . HE festés (bal oszlop), PAS reakció (jobb oszlop). A és B: 5 %-os szaharóz oldat három egymást követő beadása után látott hidropikus degeneráció a tubuláris hámsejtekben (nyilak) NMRI egérben Inzert: a hidropikus degenerációra jellemző finom, szitaszerű citoplazmatikus elváltozás (H&E, 400X). C és D: Tubuláris nekrosis hidropikus degeneráció nélkül IVIG kezelt MRL/lpr egerekben. E és F: Fiziológias sóoldattal kezelt MRL/lpr egerek veséjében látott tubularis nekrosis. G és H: NMRI egér eltérést nem mutató veseképe: megtartott kefeszegély-és tubuláris hám, valamint tubuláris bazálmembrán. (HE és PAS, 400X)

5.2.4. A vese hidropikus degenerációjának (ozmotikus nefrózis) vizsgálata

A szaharózzal kezelt pozitív kontroll csoport egereinek veséjében kialakult elváltozásokat a proximális kanyarulat csatornában figyeltük meg, amely a tubuláris hámsejtek megduzzadásából, a citoplazma finom, egyenletes megjelenésű, szitaszerűen áttűnő vakuolizáltságából állt. Ez utóbbi szöveti eltéréseket egyetlen IVIG, illetve fiziológias sóoldattal kezelt MRL/lpr állatban sem figyeltünk meg, megfigyeltük azonban az 5 %-os szaharóz oldattal kezelt pozitív kontrollokban (17. ábra).



17. ábra: **A vese hidropikus degenerációjának vizsgálata maltóz kezelt NMRI egerekben.** Jobb oszlop: HE, bal oszlop: PAS reakció. A és B: Három egymást követő 10%-os maltóz kezelés utáni veseelváltozás szöveti képe. C és D: Egyszeri, 20%-os

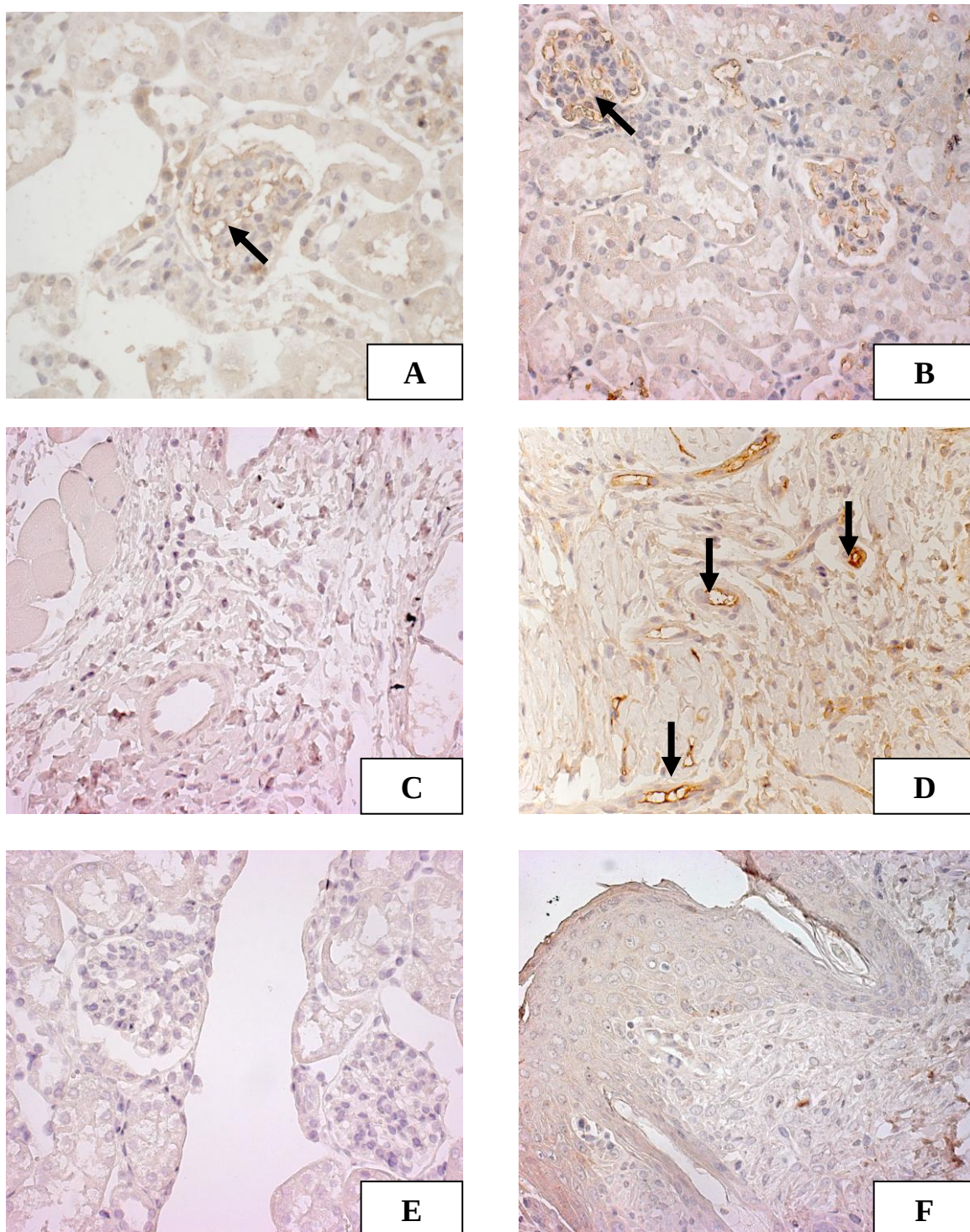
maltóz kezelésre adott szöveti reakció. E és F: 40%-os maltóz kezelés után megfigyelt elváltozások. (HE, PAS, 200X)

A maltózzal kezelt pozitív kontrollokban ugyancsak láttunk hidropikus degenerációt, ami azonban enyhébb volt a szaharózzal kezelt csoporthoz képest. A szöveti elváltozások súlyossága dózisfüggőnek mutatkozott (17. ábra). A maltóz, illetve szaharóz kezelésben részesült állatok vér urea nitrogén szintje a normál és az MRL/lpr egerek értékei között helyezkedett el. A legmagasabb értékeket a 20%-os szaharóz, illetve 20%-os maltóz beadása után láttuk. A legkisebb mértékű vesefunkció károsodást a 10%-os maltózzal kezelt csoportban észleltük, amely megfelel a kereskedelmi forgalomban megvásárolható IVIG készítmények maltóz koncentrációjának (12. táblázat).

5.2.5. Komplement-3 (C3) lerakódás vizsgálata bőrben és vesében immunhisztokémiai módszerrel

A bőr esetében a C3 lerakódását döntően az atrériákban figyeltük meg, ezen belül is endotel sejtekben. Az IVIG kezelés hatására a C3 lerakódás csökkenését láttuk (18. ábra).

Ezzel ellentétben, az IVIG kezelt egerek veséjében nem láttunk C3 csökkenést a fiziológiás sóoldattal kezelt egerkehez képest ($0,387 \pm 0,289$ vs $0,384 \pm 0,267$; $p=0,975$). A C3 depozitumok lerakódását főként a glomerulus kacsokban, ritkán az elsődleges kanyarult csatornák hámsejtjeiben, valamint a tubulointersticiális ereken figyeltük meg.



18. ábra: **Komplement-3 (C3) lerakódás vizsgálata bőrben és vesében IVIG (bal oszlop) és fizioiógiás sóoldattal kezelt (jobb oszlop) MRL/lpr egerekben immunhisztokémiai reakcióval. A és B: a C3 lerakódás vesében nem mutat különbséget. C és D: Bőrben az IVIG kezelés hatására csökkent a C3 lerakódás. E és F:**

Negatív kontroll: NMRI egerek eltérést nem mutató veséje. (E, 400X), és bőre (F, 200X) (400 X)

5.2.6. Plazma autoantitest vizsgálata IVIG kezelt MRL/lpr egerekben ELISA módszerrel és indirekt immunfluoreszcenciával

Az anti-Sm, anti-DNS és anti-hisztin autoantitestek szérumban szintjében nem találtunk szignifikáns eltérést egyik csoport esetében sem. Az ANA indirekt immunfluoreszcenciával vizsgált mintázata szintén hasonló volt (nem volt szignifikáns eltérés) a két csoportban: az esetek többségében homogén (IVIG n=6, fiziológiás sóoldat, n=5), néhány esetben granuláris megjelenésű (IVIG n=3, fiziológiás sóoldat n=4) mintázatot láttunk (14. táblázat).

Csoport	Anti-Sm	Anti-DNS	Anti-hisztin	Anti-nukleáris At
IVIG (MRL/lpr)	3,7±1.2	3,7±0,2	1,9±1,1	2,8±1,0
Fiziológiás sóoldat (MRL/lpr)	3,8±1.7	3,6±0,3	1,4±0,4	3,0±1,5
NMRI	0,01±0,1	0,10±0,02	0,02±0,01	Negatív

14. táblázat: IVIG és fiziológiás sóoldattal kezelt MRL/lpr egerek betegség specifikus (lupus) panele a negatív kontroll NMRI egereivel összehasonlítva (átlag optikai denzitás±SD), (p<0,05). Az IVIG és a fiziológiás sóoldattal kezelt egerek értékei között nem volt szignifikáns eltérés.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. A szisztémás siRNS kezelés mellékhatásainak vizsgálata állatmodellekben

A vesebetegségeket célzó modern terápiás lehetőségek egyik leggyakrabban alkalmazott formája a rövid RNS-eket (siRNS, shRNS, stb) alkalmazó ún. RNS interferencia. Az siRNS-t alkalmazó klinikai fázisú kísérletek száma napjainkban folyamatosan nő (<http://www.clinicaltrials.gov/ct/action/GetStudy>), Magát a folyamatot egyre több oldaláról vizsgálják, azonban a géncsendesítés nem kívánt, nem specifikus ill. toxikus in vivo hatásairól még keveset tudunk. A humán génterápia gyorsabb és könnyebb elterjedésének további akadályai az optimális beviteli módszer hiánya [206]. Rágcsáló modellekben a hidrodinamikus injektálás (HDI) az in vivo siRNS terápia egyik legelterjedtebb beviteli formája, melyet hatékonysága miatt már humán alkalmazásra is javasoltak. Ez utóbbi azonban az emberi szervezetre gyakorolt súlyos hatásai (nem tolerálható beviteli térfogat) miatt nem alkalmazható. A HDI első protokolljában a testtömeg 10%-ának megfelelő folyadékmennyiséggel (2,5 ml/25g egér) végezték az injektálást, mely a májban reverzibilis és irreverzibilis szöveti elváltozásokat okozott [207]. A módszer alapja, hogy a hirtelen megemelkedett intravaszkuláris nyomás a vena cava rendszeréhez tartozó parenchimás szervek (mint például a máj, a vese, illetve a lép) ereinek belfelszínén elhelyezkedő endothel sejtek közötti fenesztrációk megnyílásához vezet [208, 209]. Következésképpen, ezen szervek sejtjei az oldószerekkel együtt felveszik az oligonukleotidokat is, melyek később létrehozzák a géncsendesítést/génexpresszió beindulását. A májsejtek membrán-felszakadásának következményeként már az injektálást követő huszadik percben megemelkedett az alanin amino transferáz (ALAT) enzim szintje, mely csak a 4. napon normalizálódott [210, 211]. A májkárosodás feltehetően reverzibilis volt: a nekrosis után megfigyelt sok mitotikus sejt a regenerációra utalt [212]. Az irreverzibilis sejtkárosodás elkerülésére munkacsoportunk [8] és mások is [213] az eredeti protokollban alkalmazottnál alacsonyabb térfogatú oldószert használtak (1 ml /25 g egér). Az AVHDI még hatékonyabbnak bizonyult az siRNS-ek célsejtbe történő felvételéhez és a géncsendesítés kivitelezéséhez [8].

Munkánk első részében az AVHDI egész szervezetre gyakorolt mellékhatásait vizsgáltuk és hasonlítottuk össze az alacsony és a magas volumenű HDI egerekre gyakorolt hatását. Az AVHDI utáni kisfokú, átmeneti jellegű ALAT emelkedés hátterében feltételezéseink szerint a hepatocyták felszínén keletkező ideiglenes pórusok megnyílása állhat, mely nagyságrendileg lényegesen alacsonyabb a korábbi kísérletekben használt MVHDI utáni extrém magas ALAT értékekkel, mely a májsejtek elhalása miatt alakulhatott ki. Ezt a feltételezést a kísérleteinkben látottak is alátámasztották:

- AVHDI: átmeneti, enyhe szöveti károsodás - alacsony ALAT értékek
- MVHDI: májsejtelhalás - magas ALAT értékek.

A kísérlet további részében azt vizsgáltuk, hogy az AVHDI kezelés hatására jelentkezik-e expresszió fokozódás az interferon válasz génjeiben. Eredményeink azt mutatták, hogy kisfokú STAT1 és az OAS1 génexpresszió emelkedés jelentkezett az egerek szöveteiben 6 és 24 órával a HDI kezelés után. Mindez azt jelzi, hogy maga a HDI is képes indukálni a gyulladásos válaszban részt vevő fehérjék génjeit, például az interferon válasz génjeit. Az enyhe STAT1 és OAS1 expressziós emelkedés szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a polyI:C-vel kezelt, pozitív kontroll állatokban, jelezvén, hogy a fiziológiás sóoldattal (illetve siRNS-sel) kezelt állatok STAT1 és OAS1 expressziós növekedése egy olyan nem specifikus immunaktiváció része volt, melynek nagyságrendje nem hasonlítható össze a polyI:C-vel kezelt pozitív kontroll egerekben látott masszív interferon válasz nagyságrendjével. A kezelt állatokban ezen túl a kezelésre adott szöveti válaszreakciókat is megvizsgáltuk (szöveti módszerekkel) és azt találtuk, hogy az összes állat általunk vizsgált szervében (lép, máj és vese) megtartott szerkezetet láttunk, gyulladásos jelek nélkül. A szöveti morfológiai vizsgálatainkat szöveti funkciók mérésekkel is kiegészítettük (urea, ASAT és ALAT), mely vizsgálatok megerősítették, hogy a vizsgált szervek működése nem károsodott egereinkben. Ezen megfigyelés alátámasztotta génexpressziós eredményeinket. A fentiek mellett vér citokin (IL-6, IL12p40, TNF α és IFN β) mérések is alátámasztották az immunaktiváció hiányát. A méréseket az adott citokin csúcskoncentrációjának időintervallumában kivitelezettük (például, a TNF α mérésének

időpontjául a kezelést követő 1,5 órát vettük, mivel korábban igazolták, hogy a TNF α szintje adott stimulus után 1,5-2 óra múlva éri el maximumát, majd 4-6 óra múlva pedig visszatér a normál szintre [²¹⁴]), ennek ellenére sem találtunk szignifikáns koncentrációemelkedést a vizsgált citokinek esetében. Tehát, az IFN-ok által stimulált gének (ISG-k) már kis celluláris, illetve szubcelluláris károsodás, mint például az AVHDI hatására is up-regulálódnak jellegzetes szöveti megjelenés, valamint gyulladásos citokineltérés nélkül.

Mindezek mellett, kísérletünkben a szisztémás siRNS kezelés után kialakuló mellékhatásokat is vizsgáltuk, ezen belül is az interferon választ. [²¹⁵]. Az RNSi alkalmazásának kezdetén úgy vélték, hogy a rövid, 19-21 nukleotid hosszúságú dsRNS-ek nem aktiválják az IFN választ [²¹⁶]. Ezt a megállapítást később *in vitro* [¹²⁷], majd *in vivo* is megkérdőjelezték. Az interferon választ, mint az siRNS kezelés egy lehetséges mellékhatását először Sledz és munkatársai írták le, akik igazolták az ISG-ek és a Jak/STAT útvonal *in vitro* aktiválódását siRNS kezelés után [¹²⁷]. Később beszámoltak arról, hogy a módosítatlan, 19 nukleotid hosszúságú siRNS-ek dózisfüggően kiválthatják az IFN α és a TNF α termelődést perifériás vér mononukleáris sejtvonalban (PBMCs) [²¹⁷]. Igaz, ezzel ellentétes állítást is közöltek; mely szerint kémiaiilag szintetizált siRNS-ek nem indukáltak IFN termelődést, miközben az *in vitro* (plazmidok használata révén) átírt siRNS-ek igen [²¹⁸]. Wesche-Soldato és kollégái nem találtak szignifikáns IFN α és IL-6 emelkedést Fas és caspase-8 ellenes siRNS-ek szisztémás beadása után [²¹⁹]. Tehát, az siRNS-ek mellékhatásainak létéről és spektrumáról merőben ellentétes vélemények alakultak ki. Mindezek tudatában, saját kísérletünkben az alacsony volumenű hidrodinamikus úton bevitt siRNS-ek hatására létrejövő interferon választ vizsgáltuk egerekben. Első lépésként a korábban is vizsgált két ISG (tehát a STAT1 és az OAS1) expressziós mintázatát mértük fel. Eredményeink azt mutatták, hogy az általunk vizsgált fő parenchimás szervekben a csupasz siRNS kezelőoldathoz (fiziológiás sóoldathoz) adása nem vált ki szignifikáns emelkedést a STAT1 és az OAS1 gének expressziójában, összehasonlítva a pusztán fiziológiás sóoldattal, avagy polyI:C-vel (pozitív kontroll) kezelt állatokkal. Második lépésként a szöveti károsodás mértékét mértük fel szövettani vizsgálatok révén, melyek során azt találtuk, hogy szöveti károsodás egyik leölési időpontban, valamint egyik szervben sem

volt jelen. Szöveti morfológiai kiértékelésünket szervfunkciós vizsgálatokkal is kiegészítettük (urea, ASAT és ALAT), melyek szerint szervfunkciós károsodás csak a pozitív kontroll (polyI:C) állatokban volt jelen. Harmadik lépésként a vér citokin szintjeit is megvizsgáltuk az siRNS kezelések után. A $\text{TNF}\alpha$ szintje, mely egy szisztémás gyulladásos marker, kísérleteink során nem mutatott emelkedést a szisztémásan alkalmazott siRNS kezelés után, mely azt igazolja, hogy *in vivo* az siRNS-ek AVHDI-a nem vált ki szisztémás gyulladásos válaszreakciót. Eredményeink szerint a $\text{TNF}\alpha$ mindössze 1,5 órával a polyI:C kezelés után emelkedett meg, és szintje a kezelés utáni hatodik órára mérés határ alá csökkent.

Heidel és munkatársai kimutatták, hogy a csupasz siRNS-ek (2,5 mg/kg) egyszeri, magas volumenű beadása után az $\text{IFN}\alpha$ és az IL-12 plazma szintje nem emelkedik szignifikánsan a polyI:C-vel kezelt pozitív kontroll csoporthoz képest, ami az interferon válasz hiányára utal [220]. Adataink alátámasztották Heidel hasonló megfigyeléseit, mivel szignifikáns IL-6, IL-12 és $\text{IFN}\beta$ koncentrációemelkedés csak a polyI:C-vel kezelt egerekben volt jelen 2 órával a kezelés után. Az $\text{IFN}\beta$ termelődését enyhén indukálta az mFas illetve GFP siRNS kezelés a két órás időpontban, azonban ez sokkal kisebb fokban indukálódott a polyI:C kezelt pozitív kontrollokhoz képest, és a 6. illetve a 9. órában a kezelés után már el is tűnt. Mivel Sioud és munkatársai leírták, hogy az siRNS-ek komplexálása fokozhatja a gyulladásos citokinek termelődését (jelentős IL-6 termelődést figyeltek meg 6 órával az siRNS-kationos liposzóma farokvéna kezelés után [221]), mi továbbra is előnyben részesítjük a csupasz siRNS-ek használatát. Tehát, az *in vivo* beadott csupasz siRNS-ek nem/igen kis valószínűséggel váltanak ki IFN választ, azonban maga a hidrodinamikus injektlás kiválthat enyhe ISG expresszió fokozódást.

6.2. Az intravénás immunglobulin szisztémás lupus erythematosesre kifejtett hatásainak vizsgálata egér modellen

A vesebetegségek kezelésében azonban érdemes megemlíteni a korábban alkalmazott terápiás eszközöket is. Napjainkban számos, korábban használt terápiás eljárást kezdtek el újra alkalmazni a vesebetegségek kezelésében. Ilyen terápiás eljárás az intravénás immunoglobulin kezelés (IVIG), melynek alkalmazása autoimmun

betegségekben régóta vizsgált kérdés [²²², ²²³]. Kísérletünkben lupusra hajlamos MRL/lpr egereken vizsgáltuk az IVIG betegségre kifejtett hatásait. Az MRL/lpr egerekben már 6-8 hetes korban elkezdődik az autoantitestek termelődése. Kísérletünkben az volt a célunk, hogy az IVIG kezelést a betegség legkorábbi manifesztációja, valamint a már irreverzibilis szervi károsodás (a bőr hegesezése, vagy a vesekárosodás) előtt kezdjük meg. Mindezek miatt, kísérletünkben az IVIG kezelést az állatok 6 hetes korában kezdtük meg. Az IVIG használata korábban számos jótékony terápiás eredményt ért el az SLE kezelésében, ennek ellenére a ritka, vesét érintő komplikációk miatt kontraindikálták az IVIG használatát. A heveny veseelégtelenség kialakulásának esélye miatt az IVIG használata SLE-ben kontraindikált, annak ellenére, hogy számos közleményben leírták jótékony hatását lupus nefritiszben (a fehérjeürítés csökkenése, a vesefunkció stabilizálása, szövettanilag igazolt aktivitás csökkenés) [¹⁶⁸, ²²⁴, ²²⁵]. Miután kiderült, hogy az IVIG nefrotoxicitását valószínűleg a cukorkomponensnek (szaharóz) okozhatják, az IVIG készítményeket megváltoztatták és jelenleg döntően glicint, vagy maltózt használnak az immunglobulinok szerkezetének stabilizálásra. Mindezek mellett, még mindig léteznek egyéb típusú cukorral (szaharóz, glükóz) stabilizált IVIG preparátumok is [²²⁶].

A lupus nefritisz esetében az IVIG kezelést (korábbi tapasztalatok alapján) kétélű kardhoz hasonlították, mivel voltak esetek, melyekben egyértelműen javult a vesebetegség lefolyása, de voltak olyan esetek is, melyekben a lupus nephritist tovább rontotta a kezelés. Saját egérmódelünkben hosszú távon és magas dózisban glicinnel stabilizált IVIG-el kezeltük lupusos egereinket és vizsgáltuk a vese funkcióját, szöveti eltéréseit. Eredményeink azt mutatták, hogy a lupus nefritisz lefolyását és súlyosságát nem befolyásolta a hosszú távú IVIG kezelés: a vér urea nitrogén szintje és a vesekárosodás szöveti megjelenése nem mutatott szignifikáns eltérést az IVIG-gel, valamint a fiziológiás sóoldattal kezelt állatokban. A vesefunkciós és egyéb szervfunkciós paraméterek mérésekor látott magas szórás az állatok heterogenitásából fakadt.

Az ozmotikus nefrózis jelenlétét szintén vizsgáltuk az állatok veséjében. A szövettani kiértékelés egyértelműen igazolta a hidropikus degeneráció jelenlétét a pozitív kontroll csoportokban (5% és 20%-os szaharóz oldat), míg ezen elváltozást nem

azonosítottuk az IVIG kezelt csoportban. Egy korábbi kísérlet eredményeivel összhangban [²²⁷] tehát mi is igazoltuk, hogy a magas dózisú, hosszú távú, glicinnel stabilizált IVIG kezelés nem váltott ki ozmotikus nefrózist.

Manapság maltózzal stabilizált IVIG készítmények is forgalomban vannak az ozmotikus nefrotoxicitás elkerülésére, habár néhány közlemény leírja a heveny veseelégtelenség kialakulását maltózzal stabilizált IVIG használata után is. Chako [²²⁸] és Metallidis [²²⁹] leírta, hogy számos lupus nefritiszben szenvedő betegben jelentkezett heveny veseelégtelenség maltóz tartalmú IVIG terápia után. Ezen állapot szövettani képe megfelelt az ozmotikus nefrózis szöveti képének. Mindezt alátámasztja tanulmányunk, melyben a maltóz kezelés (10, 20 és 40%-os maltóz oldattal) után szintén kialakult vakuoláris degeneráció (dózisfüggő módon).

A vesebetegség mellett a bőrtünetek súlyosságát is vizsgáltuk kísérletünkben. Korábbi irodalmi adatok szerint a komplement rendszernek nagy jelentőséget tulajdonítanak a lupus bőr manifesztációjának kialakulásában, hiszen már korábban C3 lerakódásokat találtak az SLE-s betegek, klinikailag ép, betegségmentesnek tűnő bőrén [²³⁰]. Ez a megfigyelés azt sugallja, hogy a komplementek lerakódása megelőzi a lupus bőrmanifesztáció klinikai megjelenését. Azt is leírták, hogy a komplementek gátlása védő hatással bír a vaszkuláris érintettséggel szemben, de nem befolyásolta az anti-dsDNA antitest, valamint a keringő immunkomplexek szintjét egerekben [²³¹]. Kísérletünkben a bőrérzettséget mind makroszkóposan (fekélyesedés, alopecia), mind mikroszkóposan (hyper-és parakeratosis, acanthosis, basal membrán elváltozásai, gyulladásos beszűrődés, dermalis elváltozások) kiértékeltek, és azt találtuk, hogy a hosszú távú, magas dózisú IVIG kezelés szignifikánsan enyhítette a bőrtünetek súlyosságát, egyes esetekben szinte el is tüntette azt. Komplement-3 immunhisztokémiai reakciónk kimutatta, hogy az IVIG kezelés hatására szignifikánsan csökkent a komplement-3 pozitív erek száma a bőrben, a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz képest. Munkánkhoz hasonlóan, Gaedicke [²³²] és Ballow [²³³] is bebizonyította, hogy az IVIG kezelés enyhíti a lupus bőr manifesztációját.

A komplement aktiváció szerepe lupus nefritiszben még nem ismert teljesen. A komplement-3 tartalmú immunkomplex lerakódás közismert jelenség lupus glomerulonefritiszben [²³⁴]. Néhány komplement faktor, mint például a B faktor hiánya [²³⁵] védő hatással rendelkezik lupus nefritiszben, míg mások (C1q, C4, C2) hiánya a lupus kialakulásával hozható összefüggésbe mind egerekben, mind pedig emberekben. Az MRL/lpr egerek glomeruláris károsodása az esetek többségében immunglobulin lerakódással jár [²³⁶]. Mindezek mellett, az egerek lupus nefritiszének különböző megjelenési formáit is leírták, melyek háttérében az endoteliális adhézis molekulák helyi expresszióbeli különbségei [²³⁷] és különféle nefritogén antitestek jelenléte állt [²³⁸]. Sekine és mások is kimutatták, hogy C3 knockout MRL/lpr egerekben erőteljesebb albuminúria és glomeruláris IgG lerakódás jelentkezett, mint a heterozigóta, illetve vad típusú egerekben. A szerzők azt a következtetést vonták le, hogy a C3 aktivációja nem feltétlenül szükséges az immunkomplexekkel jellemzett veseérintettség kialakulásához [²³⁹, ²⁴⁰]. A kísérletünkben végzett komplement-3 immunhisztokémiai vizsgálat azt mutatta, hogy az általunk alkalmazott hosszú távú IVIG kezelés a vese C3-pozitivitását nem befolyásolta, mely arra enged következtetni, hogy egyrészt az IVIG kezelés nincs hatással a vesében a komplement rendszerre, másrészt, hogy a terápia különböző módon befolyásolja a komplement redszert a lupus bőr-, illetve vese érintettségének szempontjából.

Mindazok ellenére, hogy a magas dózisú IVIG kezelést ma már újra terápiás szerként használják a szisztémás lupus erythematosesben, az IVIG jótékony hatásának mechanizmusai még ma sem tisztázottak. Feltételezik, hogy az IVIG telíti az Fc receptorokat, amely az endogén autoantitestek fokozott clearance-éhez vezet [²⁴¹]. Továbbá, a nagy mennyiségű humán gamma globulin szolubilizálhatja a glomeruláris IgG depozítumokat [²⁴²], illetve az IVIG-ben lévő anti-idiotípus antitestek (anti-Id) semlegesíthetik a patogén antitesteket [²⁴³, ²⁴⁴]. Kísérletünkben a magas dózisú, hosszú távú IVIG kezelés nem csökkentette az autoantitest termelődést MRL/lpr egerekben. Tehát az általunk megfigyelt bőr és vese manifesztáció közti különbség nem magyarázható az autoantitest eltávolítással. Az egyetlen logikus magyarázat erre az, hogy a humán anti-idiotípus antitesteket tartalmazó humán IVIG nem reagált az egér

autoantitestekkel, ezért a továbbiakban érdemesnek tartjuk az egér immunglobulin hatásának felmérését, a hatásmechanizmus tisztázása végett. Habár, az IVIG köztudottan módosítja a komplement aktivitást: a magas dózisú IVIG mind *in vitro*, mind *in vivo* megköti a folyadék fázisú C3a-t és C5a-t [²⁴⁵], illetve verseng az újonnan keletkező C3b-ért [²⁴⁶]. A C3 tehát felelős a szöveti károsodásért, mely csökkenthető IVIG kezeléssel. A fent említettek szerint, tanulmányunkban az alkalmazott hosszú távú IVIG kezelés hatására a C3 pozitivitás főként a bőrben csökkent, ami azt sugallja, hogy az MRL/lpr egértörzsben a komplement rendszer eltérő szereppel bír a bőr és a vese manifesztációkban. Mindezek alapján megállapítható, hogy egér modellünkön a humán IVIG kezelés nem befolyásolta a mért autoantitest szinteket, az IVIG kezelés bőrre kifejtett jótékony hatása pedig a komplement megkötése révén jöhetett létre. Adataink azt demonstrálják, hogy egérmodellünkön a glicinnel stabilizált IVIG kezelés szignifikánsan enyhítette a kután lupus megjelenését anélkül, hogy rontotta volna a lupus nefritist a magas dózisú, hosszú távú terápia során.

Kísérleteink során a vizsgált nefrológiai kezelésekről sikerült kimutatnunk, hogy használatuk során nem jelentkezik potenciális mellékhatás, mely a kezelések klinikai alkalmazásának akadályát jelenthetné. Kísérleteink segítségével igazoltuk, hogy az RNS interferencia terápiás alkalmazása a vesében nem jár szignifikáns interferon válasszal, illetve lupus nephritis kezelésében az új típusú (nem cukorral stabilizált) IVIG készítmények alkalmazása nem okoz hidropikus degenerációt és heveny veseelégtelenséget. A jövőben munkacsoportunk szeretné mélyebben is vizsgálni az IVIG hatásait döntően a betegség megjelenése után, egerkből származó IVIG használata révén.

7. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ EREDMÉNYEI, KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink eredményei alapján elmondhatjuk, hogy egérmodelljeinken a szervezetet károsító mellékhatások fellépésével nem kell számolnunk sem az siRNS-ek hidrodinamikusan beadott, sem az IVIG intravénás kezelése során.

1. Az alacsony volumenű hidrodinamikusan beadott rövid dsRNS-ek nem aktiválják az interferon választ.

A mai legmodernebb terápiás eszköz a génterápia, azon belül is az RNS interferencia, melyet leggyakrabban rövid interferáló RNS-ek alkalmazásával érünk el. Az ígéretes terápiás lehetőségek mellett, a mellékhatások, mint például az interferon (IFN) válasz, az immunrendszer aktiválódása, illetve a szervi károsodás még mindig nem teljesen ismert. Kísérletünkben azt találtuk, hogy a szisztémás, rövid interferáló RNS kezelést követően nem alakul ki *in vivo* az immunrendszer aktivációja. RT-PCR vizsgálataink kimutatták, hogy az siRNS kezelés nem aktiválja a Jak/STAT útvonalat. Szöveti vizsgálataink alátámasztották az expressziós mintázatokat: célszervi károsodást egyik, általunk vizsgált szervben (vese, máj és lép) sem láttunk.

2. A STAT1, és az OAS1 gének expressziója és a TNF α , IL-6, IL-12p40, és az IFN γ citokinek vér-szintje nem fokozódik az siRNS-ek szisztémás beadása után.

Az AVHDI után megmértük a STAT1 és OAS1 gének expresszióját, a plazma citokin koncentrációit és nem láttunk szignifikáns expresszióbeli emelkedést egyik siRNS kezelés hatására sem. A gyulladásos citokinek plazma szintjei és a szervi károsodás nem volt jelen az AVHDI után, függetlenül attól, hogy a beadott folyadék tartalmazott-e siRNS-t vagy sem.

3. Az alacsony volumenű hidrodinamikusan beadott injektálásnak vannak nem specifikus mellékhatásai, ezek azonban lényegesen enyhébbek a magas volumenű kezeléssel szemben.

Az AVHDI kismértékű alanin aminotranszferáz (ALAT) emelkedést, valamint enyhe hepatocita károsodást okozott, míg a MVHDI jóval magasabb ALAT szintekkel és kifejezett hepatocita nekrozissal járt. Mindezek mellett azt láttuk, hogy maga a

hidrodinamikus injektálás kiváltott kisfokú STAT1 és OAS1 génexpresszió fokozódást. Tehát az AVHDI enyhe szervi károsodást és IFN válasz génexpresszió emelkedést okozhat.

Az intravénás immunglobulin (IVIG) számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik az autoimmun betegségek kezelésében. Immunmoduláló és komplement gátló hatása révén az IVIG-et korábban már kipróbálták szisztémás lupus erythematosesben (SLE), azonban az IVIG-et stabilizáló cukorkomponensek jelenléte miatt kialakult ozmotikus tubuluskárosodás miatt a lupus nephritis progresszióját figyelték meg néhány betegben, így az IVIG kezelést betiltották. A napjainkban már rendelkezésre álló, nem cukorral stabilizált IVIG elérhetősége felvetette az SLE IVIG kezelésének újraértelmezését. Kísérletünkben a magas dózisú, hosszú távú, glicinnel stabilizált IVIG kezelés hatásait mértük fel humán SLE egér modelljén.

1. A magas dózisú, hosszútávú, glicinnel stabilizált IVIG kezelés enyhítette az MRL/lpr egerek bőr lupusát.

MRL/lpr egereket heti egy alkalommal kezeltünk glicinnel stabilizált IVIG-gel vagy fiziológiás sóoldattal (0,2 ml/10 g) 6 hetes és 5 hónapos kor között. Az állatok leölésekor (tehát már makroszkóposan is) azt találtuk, hogy az IVIG enyhítette a lupus bőrmanifesztációját. A szövettani kiértékelés során szignifikáns különbséget láttunk az IVIG-el és fiziológiás sóoldattal kezelt állatok között.

2. Az IVIG kezelés hatására nem láttunk változást a vese érintettség tekintetében

A részletes szövettani vizsgálatok és a komplement-3 immunhisztokémiai festés alátámasztotta a bőrbetegség szignifiáns enyhülését IVIG kezelés után. A kezelés során a vesetünetek nem enyhültek.

3. A glicinnel stabilizált IVIG nem rendelkezik *in vivo* vese toxicitással

A glicinnel stabilizált IVIG kezelés során a vese szövettani vizsgálata során nem láttuk az 5%-os szaharózzal, illetve 10%-os maltózzal (IVIG stabilizálására használt cukrok, alkalmazott koncentrációban) kiváltott típusos un. ozmotikus nefrózist.

Adataink igazolják, hogy az IVIG enyhítette a kután lupust anélkül, hogy a vesében bármilyen mellékhatást okozott volna. Az SLE szervspecifikus megjelenésének

mélyebb megértése nagyban előlendítené a személyre szabott és a hagyományosnál jóval hatékonyabb kezelést.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a vesebetegségek kezelése még napjainkban is komoly problémát állít a klinikus elé. Egy modern, vesebetegségek esetében is használható terápiás eszközt vizsgáltunk, ez az RNS interferencia. Az RNSi egy géncsendesítési módszer, alkalmazásának korlátja a bevitel módja, illetve a lehetséges mellékhatások. Eredményeink azt igazolják, hogy az siRNS in vivo nem indukál interferon választ egerekben. Habár a testtömeg 10%-ának megfelelő térfogattal történő hidrodinamikus kezelés esetén figyelembe kell venni a súlyos májkárosodás lehetőségét, mely önmaga megváltoztathatja bizonyos gének expresszióját, addig az alacsony térfogatot használó módszer csak átmeneti szövetkárosodást okoz kisfokú IFN válasszal kísérve. Tehát a beviteli módszer által okozott mellékhatásokat szintén érdemes figyelembe venni az siRNS mellékhatásai mellett.

Az újabb terápiás lehetőségek mellett a korábban már alkalmazott intravénás immunglobulin kezelés, mint immunmoduláló terápia ismételten a figyelem középpontjába került. Kísérletünkben a glicinnel stabilizált IVIG kezelés után a bőrtünetek enyhülését írtuk le, mialatt a vesetünetek nem mutattak változást a kezelés hatására. Ez utóbbi háttérében a kután lupus és a lupus nefritisz eltérő patomechanizmusa feltételezhető. A két szervi érintettségben a komplement rendszer különböző szerepe magyarázhatja az általunk megfigyelt, IVIG kezelés utáni terápiás választ. Tehát, az SLE patomechanizmusa véleményünk szerint nem annyira egységes, mint azt korábban feltételezték. A glicinnel stabilizált IVIG előnyös betegség módosító hatása új lehetőségeket nyithat meg az SLE klinikai kezelésében.

A fentiek tudatában megállapíthatjuk, hogy mind az intravénás immunglobulin, mind az RNS interferencia hasznos és hatékony módja lehet a vesebetegségek kezelésének.

9. SUMMARY

Summarized, we claim that treatment of renal diseases is still a hard task for clinicians. We examined a modern way of therapy for renal diseases; RNA interference. RNAi is a gene silencing method, the human use of which is hindered by the lack of proper delivery methods, and the knowledge on side effects. According to our results, we can declare that siRNAs did not induce interferon response in mice *in vivo*. Although, in the case of hydrodynamic injection with a volume of 10% of body weight, we have to take into account the possibility of liver injury, which itself might alter the expression level of certain genes, while in the case of low volume hydrodynamic injection organ damage is mild and transient, and is associated with mild interferon response. As a conclusion, we should pay attention not only to the possible side effects of siRNAs, but also to the side effects caused by the delivery method.

Beside the new therapeutic possibilities, old ones can have new indications, such as the intravenous immune globulin, as immune regulating agent. In our experiment we observed that skin but not renal disease was attenuated by glycine stabilized IVIG therapy. We hypothesize different pathomechanisms of cutaneous lupus and lupus nephritis. The two different organ manifestations could be associated with the different roles of the complement system in these target organs. This theory explains the therapeutic response after IVIG treatment. Thus, we hypothesize that the pathomechanism of SLE is not as uniform as it has been thought previously. The beneficial effect of glycine stabilized IVIG on SLE might open new doors for the therapy of this disease. Summarized, we can claim that both intravenous immunoglobulin, both RNA interference might provide useful and effective therapeutic tools for renal diseases.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- ¹ Milhavet O, Gary DS, Mattson MP: RNA Interference in Biology and Medicine. *Pharmacol Rev.* 2003;55:629-648.
- ² www.clinicaltrials.gov. ghv. nlm. nih. Gov
- ³ Zhu G, Nicolson A, Cowley B, Rosen S, Sukhatme V: In vivo adenovirus-mediated gene transfer into normal and cystic rat kidneys. *Gene Ther.* 1996;3:298–304.
- ⁴ Heikkila P, Parpala T, Lukkarinen O, Weber M, Tryggvason: Adenovirus-mediated gene transfer into kidney glomeruli using an ex vivo and in vivo kidney perfusion system - first steps towards gene therapy of Alport syndrome. *Gene Ther* 1996;3:21–27.
- ⁵ Tsujie M, Isaka Y, Nakamura H, Imai E, Hori M: Electroporation-mediated gene transfer that targets glomeruli. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12:949–954.
- ⁶ Lehrman S: Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature.* 1999;401: 517–518.
- ⁷ Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A: A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 2003;348:255–256.
- ⁸ Hamar P, Song E, Kokeny G, Chen A, Ouyang N, Lieberman J: Small interfering RNA targeting Fas protects mice against renal ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:14883-14888.
- ⁹ Dallas A, Vlassov AV: RNAi: a novel antisense technology and its therapeutical potential. *Med Sci Monit.* 2006;12:RA67-74.
- ¹⁰ Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C: Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;296:1000-1004.
- ¹¹ Grunweller A, Wyszko E, Bieber B, Jahnel R, Erdmann VA, Kurreck J: Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3185-3193.
- ¹² Devroe, E., Silver, P. A: Therapeutic potential of retroviral RNAi vectors. *Expert Opin Biol Ther.* 2004;4:319-327.
- ¹³ Wingard SA.: Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. *J Agric Res.* 1928,37:127-153.

-
- ¹⁴ Vaucheret H, Beclin C, Fegard MJ: Post-transcriptional gene silencing in plants. *Cell Sci.* 2001;114:3083-3091.
- ¹⁵ Agrawal N, Malhotra P, Bhatnagar RK: siRNA-directed silencing of transgene expressed in cultured insect cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320:428-434.
- ¹⁶ Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R: Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell.* 1990;2:279-289.
- ¹⁷ Grishok A, Mello CC: RNAi (nematodes: *Caenorhabditis elegans*). *Adv. Genet.* 2002; 46:339-360.
- ¹⁸ Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 2000;404:293-296.
- ¹⁹ Elbashir SM, Harboth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T: Duplexes of 21-nt RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001;411:494-498.
- ²⁰ Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391:806-811.
- ²¹ Kennerdell JR, Carthew RW: Use of ds-RNA mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell.* 1998;95:1017-1026.
- ²² Lohmann JU, Endl I, Bosch TC: Silencing of developmental genes in *Hydra*. *Dev Biol.* 1999;214:211-214.
- ²³ Wargelius A, Ellingsen S, Fjose A: Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;263:156-161.
- ²⁴ Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J: RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Medicine.* 2003;9:347-351.
- ²⁶ Gou D, Narasaraaju T, Chintagari NR, Jin N, Wang P, Liu L: Gene silencing in alveolar type II cells using cell-specific promoter in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:e134.

-
- ²⁷ Bender J: A vicious cycle: RNA silencing and DNA methylation in plants. *Cell*. 2001;106:129-132.
- ²⁸ Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409:363-366.
- ²⁹ Fagard M, Vaucheret H: (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 2000;51:167-194.
- ³⁰ Kumar M, Carmichael GG: Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in higher eukaryotes. *MMBR*. 1998;62:1415-1434.
- ³¹ Nicholson AW: Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev*. 1999;23:371-390.
- ³² Zamore PD, Tuschl T, Sharp P, Bartel DP: RNAi Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 2000;101:25-33.
- ³³ Tomari Y, Zamore PD: Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev*. 2005;19:517-529.
- ³⁴ Nykanen A, Haley B, Zamore D: ATP requirement and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*. 2001;107:309-321.
- ³⁵ Provost P, Dishard D, Doucet J, Frendewey D, Samuelsson B, Radmark O: Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO*. 2002;21:5864-5874.
- ³⁶ Lipardi C, Wei Q, Paterson BM: RNAi as random degradation PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNA that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*. 2001;101:297-307.
- ³⁷ Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plaster RH, Fire A: On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*. 2001;107:465-476.
- ³⁸ Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD: Evidence that siRNA function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol Cell*. 2002;10:537-548.
- ³⁹ Amarzguoui M, Holen T, Babaie E, Prydz H: Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:589-595.

-
- ⁴⁰ Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lühmann R, Tuschl T: Single-stranded antisense siRNA guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. 2002;110:563-574.
- ⁴¹ Holen T, Amarzuioui M, Babaie E, Prydz H: Similar behaviour of single-stranded and double-stranded siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:2401-240.
- ⁴² Watanabe A, Arai M, Yamazaki M, Koiabashi N, Wuytack F, Kurabayashi M: Phospholamban ablation by RNA interference increases Ca²⁺ uptake into rat cardiac myocyte sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37:691-698.
- ⁴³ Cristoph T, Grunweller A, Mika J, Schafer MK, Wade EJ, Weihe E, Erdmann VA, Frank R, Gillen C, Kurreck B: Silencing of vanilloid reseptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;350:238-243.
- ⁴⁴ Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Rohl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Koteliansky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachan I: RNAi mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*. 2006;441:111-114.
- ⁴⁵ McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon DS, Kay MA: RNA interference in adult mice. *Nature*. 2002;418:38-39.
- ⁴⁶ McManus MT, Sharp PA: Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*, 2002;3:737-747.
- ⁴⁷ Yang D, Lu H, Erichson JW: Evidence that processed small dsRNS may mediate sequence specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol*. 2000;10:1191-1200.
- ⁴⁸ Holen T, Amarzuioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prídz H: Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor. *Nucleic Acid Res*. 2002;30:1757-1766.
- ⁴⁹ Schwartz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD: Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human pathways. *Mol Cell*. 2002;10:537-548.
- ⁵⁰ www.Ic.sunysb.edu/stu/shiklin/rnai.html,
http://www.ambion.com/techlib/misc/silencer_siRNA_template.html
- ⁵¹ <http://www.dharmacon.com/product/productlandingtemplate.aspx?id=167&tab=1>

⁵² Shao Y, Chan CY, Maliyekkel A, Lawrence CE, Roninson IB, Ding Y: Effect of target secondary structure on RNAi efficiency. *RNA*. 2007;13:1631-1640.

⁵³ siRNA.cgb.ki.se

⁵⁴ Chalk AM, Warfinge RE, Georgii-Hemming P, Erik LL: siRNADB: a database of siRNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:D131-134.

⁵⁵ Simeoni F, Morris MC, Heutz F: Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNAs into mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:2717-2724.

⁵⁶ Vorburger SA, Hunt KK: Adenoviral gene therapy. *The Oncologist*. 2002;7:46-59.

⁵⁷ Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC: Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene therapy*. 2004;11:10-17.

⁵⁸ Benrt, K., Liang, M., Ye, X. és mtsai: A new type of adenovirus vector that utilizes homologous recombination to achieve tumor-specific replication. *J Virol*. 2002;76:10994-11002.

⁵⁹ Seregin SS, Amalfitano A: Overcoming pre-existing adenovirus immunity by genetic engineering of adenovirus-based vectors. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2009;9:1521-1531.

⁶⁰ Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA: Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *The EMBO Journal*. 1991;17:3941-3950.

⁶¹ Garraway SM, Xu Q, Inturrisi CE: Design and evaluation of small interfering RNAs that target expression of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene in the spinal cord dorsal horn. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322:982-988.

⁶² Zaiss AK, Liu Q, Bowen GP, Wong NC, Bartlett JS, Muruve DA: Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. *J Virol*. 2002;76:4580-4590.

⁶³ Chirmule N, Propert K, Magosin S, Qian R, Wilson J: Immune response to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther*. 1999;6:1574-1583.

⁶⁴ Hacein – Bey – Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JJ, deSain Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist

F, Fischer A, Cavazzana-Calco M: LMO2-associated clonal Tcell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003;302:400-419.

⁶⁵ Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DC, Wong LF, Bilsland LG, Greensmith L, Kingsman SM, Mitrophanous KA, Mazarakis ND, Azzouz M: Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Net Med*. 2005;11:429-433.

⁶⁶ Dissen GA, Lomniczi A, Neff TL, Hobbs TR, Kohama SG, Kroenke CD, Galimi F, Ojeda SR: In vivo manipulation of gene expression in non-human primates using leniviral vectors as delivery vehicles. *Methods*. 2009;49:70-77.

⁶⁷ Amendola M, Passerini L, Pucci F, Gentner B, Bacchetta R, Naldini L: Regulated and multiple miRNA and siRNA delivery into primary cells by lentiviral platform. *Mol Ther*. 2009;17:1039-1052.

⁶⁸ Manjunath N, Wu H, Subramanya S, Shankar P: Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;61:732-745.

⁶⁹ Jie Wang, Ze Lu, M. Guillaume Wientjes, Jessie L.-S. Au: Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers. *AAPS J*. 2010;12:492–503.

⁷⁰ Van de Water F, Boerman OC, Wouterse A, Peters JGP, Russel FGM, Masereeuw R: Intravenously administered short interfering RNA accumulates in the kidney and selectively suppresses gene function in renal proximal tubules. *Drug Metabolism and disposition*. 2006;34:1393-1397.

⁷¹ Larson SD, Jackson LN, Chen LA, Rychahou PG, Evers BM: Effectiveness of siRNA uptake in target tissues by various delivery methods. *Surgery*. 2007;142:262-269.

⁷² Suda T, Suda K, Liu D: Computer-assisted hydrodynamic gene delivery. *Mol Ther*. 2008;16:1098-1104.

⁷³ Davidson BL, Paulson HL: Molecular medicine for the brain: silencing of disease genes with RNA interference. *Lancet Neurol*. 2004;3:145-149.

⁷⁴ Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, Tang W, Yang X, Maguire AM, Bennett J, Tolentino MJ: Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF efficiently inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *J Molecular Vision*. 2003;9:210-216.

⁷⁵ Flynn MA, Casey DG, Todryk SM, Mahon BP: Efficient delivery of small interfering RNA for inhibition of IL-12p40 expression in vivo. *J Inflamm. (Lond)*. 2004;1:4-16.

⁷⁶ Larson SD, Jackson LN, Chen LA, Rychahou PG, Evers BM: Effectiveness of siRNA uptake in target tissues by various delivery methods. *Surgery*. 2007;142:262-269.

-
- ⁷⁷ Hassan A, Tian Y, Zheng W, Ji H, Sandberg K, Verbalis JG: Small interfering RNA-mediated functional silencing of vasopressin V2 receptors in the mouse kidney. *Physiol Genomics*. 2005; 21:382-388.
- ⁷⁸ Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R: A system for stable expression of short interfering RNAs in mamalian cells. *Science*. 2002;296:550-553.
- ⁷⁹ Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hahhon GJ, Conklin DS: Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*. 2002;16:948-958.
- ⁸⁰ Takabatake Y, Isaka Y, Mizui M, Kawachi H, Takahara S, Imai E: Chemically modified siRNA prolonged RNA interference in renal disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;363:432-437.
- ⁸¹ Takabatake Y, Isaka Y, Mizui M, Kawachi H, Shimizu F, Ito T, Hori M, Imai E: Exploring RNA interference as a therapeutic strategy for renal disease. *Gene Ther*. 2005;12:965-973.
- ⁸² Chiarella P, Massi E, De Robertis M, Sibilio A, Parrella P, Fazio VM, Signori E: Electroporation of skeletal muscle induces danger signal release and antigen-presenting cell recruitment independently of DNA vaccine administration. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8:1645-1657.
- ⁸³ Kinoshita M, Hynynen K: A novel method for the intracellular delivery of siRNA using microbubble-enhanced focused ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335:393-399.
- ⁸⁴ Deng CX, Sieling F, Pan H, Cui J: Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound Med Biol*. 2004;30:519-526.
- ⁸⁵ Prentice P, Cushierp A, Dholakia K, Prausnitz M, Campbell P: Membrane disruption by optically controlled microbubble cavitaion. *Nat Phys*. 2005;1:107-110.
- ⁸⁶ Neigishi Y, Endo Y, Fukuyama T, Suzuki R, Takizawa T, Omata D, Maruyama K, Aramaki Y: Delivery of siRNS into the cytoplasm by liposomal bubbles and ultrasound. *J Controlled Release*. 2008;132:124-130.
- ⁸⁷ Liu B: Exploring cell type-specific internalizing antibodies for targeted delivery of siRNA. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2007;6:112-119.
- ⁸⁸ Wiedermann G, Miescher PA, Franklin EC: Effect of mercaptoethanol on complement binding ability of human 7 S gammaglobulin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1963;113:609-613.

-
- ⁸⁹ Christiansen J, Rajasekaran AK: Biological impediments to monoclonal antibody-based cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2004;3:1493-501.
- ⁹⁰ Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA, Lieberman J. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotech.* 2005;23:709-717.
- ⁹¹ Xia CF, Boado RJ, Pardridge WM: Antibody-mediated targeting of siRNA via the human insulin receptor using avidin-biotin technology. *Mol Pharm.* 2009;6:747-751.
- ⁹² Rothdiener M, Muller D, Castro PD, Scholz A, Schwemmlein M, Fey G, Heidenreich O, Kontermann RE: Targeted delivery of siRNA to CD33-positive tumor cells with liposomal carrier systems. *J Control Release.* 2010;144:251-258.
- ⁹³ Gao J, Sun J, Li H, Liu W, Zhang Y, Li B, Qian W, Wang H, Chen J, Guo Y: Lyophilized HER2-specific PEGylated immunoliposomes for active siRNA gene silencing. *Biomaterials.* 2010;31:2655-2664.
- ⁹⁴ Asgeirsdottir SA, Talman EG, de Graaf IA, Kamps JA, Satchell SC, Mathieson PW, Ruijters MH, Molema G: Targeted transfection increases siRNA uptake and gene silencing of primary endothelial cells in vitro-a quantitative study. *J Control Release.* 2010;141:241-251.
- ⁹⁵ Hauser PV, Pippin JW, Kaiser C, Krofft RD, Brinkkoetter PT, Hudkins KL, Kerjaschki D, Reiser J, Alpers CE, Shankland SJ: Novel siRNA delivery system to target podocytes in vivo. *PLoS One.* 2010;5:e9463.
- ⁹⁶ Reiley W, Zhang M, Wu X, Granger E, Sun SC: Regulation of the Deubiquitinating Enzyme CYLD by I κ B Kinase Gamma-Dependent Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology.* 2005;25:3886-3895.
- ⁹⁷ Kapaida SB, Brideau – Andersen , Chisari FV: Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:2014-2018.
- ⁹⁸ Wang Z, Ren L, Zhao X, Hung T, Meng A, Wang J, Chen YG: Inhibition of Severe Acute Respiratory Syndrome Virus Replication by Small Interfering RNAs in Mammalian Cells. *J Virol.* 2004;78:7523-7527.
- ⁹⁹ Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J: Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:8676-8681.

-
- ¹⁰⁰ Song E, Lee SK, Dykxhoorn DM, Novina C, Zhang D, Crawford K, Cerny J, Sharp PA, Lieberman J, Manjunath N, Shankar P: Sustained Small Interfering RNA-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Inhibition in Primary Macrophages. *J. Virol.* 2003;77:7174-7181.
- ¹⁰¹ Zheng XZ, Lian D, Wong A, Bygrave M, Ichim TE, Khoshniat M, Zhang X, Sun H, De Zordo T, Lacefeld JC, Garcia B, Jevnikar AM, Min WP: Novel small interfering RNA-containing solution protecting donor organs in heart transplantation. *Circulation.* 2009;120:1099-1107.
- ¹⁰² Vieira OV, Harrison RE, Scott CC, Stenmark H, Alexander D, Liu J, Gruenberg J, Schreiber AD, Grinstein S: Acquisition of Hrs, an Essential Component of Phagosomal Maturation, Is Impaired by Mycobacteria. *Mol Cell Biol.* 2004;24:4593-4604.
- ¹⁰³ Liang XH, Liu Q, Michaeli S: Small nucleolar RNA interference induced by antisense or double-stranded RNA in trypanosomatids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:7521-7526.
- ¹⁰⁴ Schiffelers RF, Ansari A, Xu J, Zhou Q, Tang Q, Storm G, Molema G, Lu PY, Scaria PV, Woodle MC: Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:149.
- ¹⁰⁵ Boado RJ: RNA Interference and Nonviral Targeted Gene Therapy of Experimental Brain Cancer *Neurorx.* 2005;2:139-150.
- ¹⁰⁶ Onodera Y, Hashimoto S, Hashimoto A, Morishige M, Mazaki Y, Yamada A, Ogawa E, Adachi M, Sakurai T, Manabe T, Wada H, Matsuura N, Sabe H: Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *The EMBO Journal.* 2005;24:963-973.
- ¹⁰⁷ Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Oza BP, Ropero S, Colomer R, Lupu R: Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *PNAS USA.* 2004;101:10715-10720.
- ¹⁰⁸ Miller VM, Gouvion CM, Davidson BL, Paulson HL: Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:661-668.
- ¹⁰⁹ Dou F, Netzer WJ, Tanemura K, Li F, Hartl FU, Takashima A, Gouras GK, Greengard P, Xu H: Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *H. Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:721-726.
- ¹¹⁰ Du C, Wang S, Diao H, Guan Q, Zhong R, Jevnikar AM: Increasing resistance of tubular epithelial cells to apoptosis by shRNA therapy ameliorates ischemia-reperfusion injury. *Am J Transpl.* 2006;6:2256-2267.

-
- ¹¹¹ Zender L, Hütker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, Walthemathe M, Gösling T, Flemming P, Malek NP, Trautwein C, Manns MP, Kühnel P, Kubicka S: Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *PNAS USA* 2003;100:7797-7802.
- ¹¹² Goruppi S, Bonventre JV, Kyriakis JM: Signaling pathways and late-onset gene induction associated with renal mesangial cell hypertrophy. *EMBO J.* 2002;21:5427-5436.
- ¹¹³ Groskreutz DJ, Babor EC, Monick MM, Varga SM, Hunninghake GW: Respiratory syncytial virus limits α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) phosphorylation to maintain translation and viral replication. *J Biol Chem.* 2010;285:24023-24031.
- ¹¹⁴ Berkhout B: A new Houndini act: multiple routes for HIV-1 escape from RNAi-mediated inhibition. *Future Microbiol.* 2009;4:151-154.
- ¹¹⁵ Isaacs A, Lindenmann J, Valentine RC: Virus interference. I. The interferon. *Proc Roy Soc (Biol).* 1957;147:258-267.
- ¹¹⁶ Goodbourn S, Didcock L, Randall RE: Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 2000;81:2341-2364.
- ¹¹⁷ Li XL, Hassel BA: Involvement of proteasomes in gene induction by interferon and double-stranded RNA. *Cytokine.* 2001;14:247-252.
- ¹¹⁸ Clemens MJ: PKR- a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29:945-949.
- ¹¹⁹ Ui-Tei K, Naito Y, Zenno S, Nishi K, Yamato K, Takahashi F, Juni A, Saigo K.: Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:2136-2151.
- ¹²⁰ Bonnet MC, Weil R, Dam E, Hovanessian AG, Meurs EF: PKR stimulates NF- κ B irrespective of its kinase function by interacting with the I κ B kinase complex. *Mol Cell Biol.* 2000;20:4532-4542.
- ¹²¹ Kumar M, Carmichael GG: Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62:1415-1434.
- ¹²² Kerr IM, Brown RE: pppA₂'A₂'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *PNAS.* 1978;75:256-260.

-
- ¹²³ Floyd-Smith G, SLattery E, Lengyel P: Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5') oligoadenylate-dependent endonuclease. *Science*. 1981;212:1030-1032.
- ¹²⁴ Dong B, Silverman RH: 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A. *J Biol Chem*. 1995;270:4133-4137.
- ¹²⁵ Castelli J, Wood KA, Youle RJ: The 2-5A system in viral infection and apoptosis. *Biomed. Pharmacother*. 1998;52:386-390.
- ¹²⁶ Castelli JC, Hassel BA, Wood KA, Li XL, Ameiya K, Dalakas MC, Torrence PF, Youle RJ: A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2-5A system. *J Exp Med*. 1997;186:967-972.
- ¹²⁷ Sledz CA, Holko M, Veer MJ, Silverman RH, Williams BR: Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*. 2003;5:834-839.
- ¹²⁸ Fish RJ, Kruithof EKO: Short-term cytotoxic effects and long-term instability of RNAi delivered using lentiviral vectors. *BMC Mol Biol*. 2004;5:9-24.
- ¹²⁹ Scacheri PC, Rozenblatt - Rosen O, Caplan NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, Hughes CM, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Meyerson M, Collins FS: Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *PNAS*. 2004;101:1892-1897.
- ¹³⁰ Walters DK, Jelinek DF: The Effectiveness of Double-Stranded Short Inhibitory RNAs (siRNAs) May Depend on the Method of Transfection. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 2002;12:411-418.
- ¹³¹ Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS: Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology*. 2003;21:635-637.
- ¹³² Medzhitov R, Janeway C Jr: Innate immunity. *NEJM*. 2000;343:338-344.
- ¹³³ Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougères A, Endres S, Hartmann G: Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med*. 2005;11:263-70.
- ¹³⁴ Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783-801.
- ¹³⁵ Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA: Recognition of double-stranded RNA and activation of NK-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413:732-738.

-
- ¹³⁶ Marques JT, Williams BR: Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat Biotechnol.* 2005;23:1399-405.
- ¹³⁷ Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *NAture.* 2000;408:740-745.
- ¹³⁸ Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C: Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science.* 2004;303:1529-1531.
- ¹³⁹ Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, Albuquerque RJC, Yamasaki S, Itaya M, Pan Y, Appukuttan B, Gibbs D, Yang Z, Karikó K, Ambati BK, Wilgus TA, DiPietro LA, Sakurai E, Zhang K, Smith JR, Taylor EW, Ambati J: Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature.* 2008;452:591-597.
- ¹⁴⁰ Meri S, Pangburn MK: Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of the complement: regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H. *PNAS USA.* 1990;87:3982-3986.
- ¹⁴¹ Henry SP, Giclas PC, Leeds J, Pangburn M, Auletta C, Levin AA, Kornbrust DJ: Activation of the Alternative Pathway of Complement by a Phosphorothioate Oligonucleotide: Potential Mechanism of Action. *Pharmacology.* 1997;281:810-816.
- ¹⁴² Gokhale PC, Zhang C, Newsome JT, Pei J, Ahmad I, Rahman A, Dritschilo A, Kasid UN: Pharmacokinetics, toxicity, and efficacy of ends-modified raf antisense oligodeoxyribonucleotide encapsulated in a novel cationic liposome. *Clin Cancer Res* 2002;8:3611-3621.
- ¹⁴³ Heidel JD, Yu Z, Liu JYC, Rele SM, Liang Y, Zeidan RK, Kornbrust DJ, Davis ME: Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *PNAS.* 2007;104:5715-5721.
- ¹⁴⁴ Danchenko N, Satia JA, Anthony MS: Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus.* 2006;15:308–18.
- ¹⁴⁵ Holers VM: Anti-C1q autoantibodies amplify pathogenic complement activation in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 2004;114:616-619.
- ¹⁴⁶ Kökény G, Godó M, Nagy E, Kardos M, Kotsch K, Casalis P, Bodor C, Rosivall L, Zenclussen AC, Hamar P: Skin disease is prevented but nephritis is accelerated by multiple pregnancies in autoimmune MRL/LPR mice. *Lupus.* 2007;16:465-77.

-
- ¹⁴⁷ Nicoletti F, Di Marco R, Zacccone P, Xiang M, Magro G, Grasso S, Morrone S, Santoni A, Shoenfeld Y, Garotta G, Meroni P: Dichotomic effects of IFN-g on the development of systemic lupus erythematosus-like syndrome in MRL-lpr / lpr mice. *European Journal of Immunology*. 2000;30:438- 447.
- ¹⁴⁸ Tokano Y, Morimoto S, Amano H, Kawanishi T, Yano T, Tomyo M, Sugawara M, Kobayashi S, Tsuda H, Takasaki Y, Hashimoto H: The relationship between initial clinical manifestation and long-term prognosis of patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol*. 2005;15:275-282.
- ¹⁴⁹ Theofilopoulos AN, Dixon FJ: Immune complexes in human diseases. *Am J Pathol*. 1980;100:529-594.
- ¹⁵⁰ Pizarro S, Monárrez Espino J, Ruiz A, Jara LJ, Nava A, Riebeling-Navarro C: Soluble vascular cell adhesion molecule-1 indicates SLE disease activity and specific organ involvement. *Rev Alerg Mex*. 2007;54:189-195.
- ¹⁵¹ Tesar V, Masek Z, Rychlik I, Merta M, Bertunková J, Stejsalová A, Zabka J, Janatková I, Fuciková T, Dostál C, Becvár R: Cytokines and adhesion molecules in renal vasculitis and lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13:1662-1667.
- ¹⁵² Frijns R, Fijnheer R, Schiel A, Donders R, Sixma J, Derksen R: Persistent increase in plasma thrombomodulin in patients with a history of lupus nephritis: endothelial cell activation markers. *J Rheum*. 2001;28:514-519.
- ¹⁵³ Harari OA, Marshall D, McHale JF, Ahmed S, Haskard DO: Limited endothelial E- and P-selectin expression in MRL/lpr lupus-prone mice. *Rheum*. 2001;40:889-895.
- ¹⁵⁴ Rubinstein T, Pitashiny M, Putterman C: The novel role of neutrophil gelatinase-B associated lipocalin (NGAL)/Lipocalin-2 as a biomarker for lupus nephritis. *Autoimmun Rev*. 2008;3:229-234.
- ¹⁵⁵ Yang JQ, Saxena V, Xu H, Van Kaer L, Wang CR, Singh RR: Repeated α -galactosylceramide administration results in expansion of NK T cells and alleviates inflammatory dermatitis in MRL-lpr/lpr mice. *The Journal of Immunology*. 2003;171:4439-4446.
- ¹⁵⁶ Carlsten H, Nilsson N, Jonsson R, Backman K, Holmdahl R, Tarowski A: Estrogen accelerates immune complex glomerulonephritis but ameliorates T cell-mediated vasculitis and sialadenitis in autoimmune MRL/lpr mice. *Cell Immunol*. 1992;144:190-202.
- ¹⁵⁷ Yokoyama H, Kreft B, Kelley VR: Biphasic increase in circulating and renal TNF-alpha in MRL-lpr mice with a differing regulatory mechanism. *Kid Internat*. 1995;47:122-130.

-
- ¹⁵⁸ Kikawada E, Lenda DM, Kelley VR: IL-12 deficiency in MRL-Fas^{lpr} mice delays nephritis and intrarenal IFN- γ expression, and diminishes systemic pathology. *J Immunol.* 2003;170:3915-3925.
- ¹⁵⁹ Mitchell DA, Pickering MC, Warren J, Fossati-Jimack L, Cortes-Hernandez J, Cok HT, Botto M, Walport MJ: C1q deficiency and autoimmunity: the effects of genetic background on disease expression. *J Immunol.* 2002;37:111-123.
- ¹⁶⁰ Yang JQ, Chun T, Liu H, Hong S, Bui H, Van Kaer L, Wang CR, Singh RR: CD1d deficiency exacerbates inflammatory dermatitis in MRL-lpr/lpr mice. *Eur J Immunol.* 2004;34:1723-1732.
- ¹⁶¹ Chan OT, Paliwal V, McNiff JM, Park SH, Bendelac A, Shlomik MJ: Deficiency in beta(2)-microglobulin, but not CD1, accelerates spontaneous lupus skin disease while inhibiting nephritis in MRL-Fas(lpr) mice: an example of disease regulation at the organ level. *J Immunol.* 2001;167:2985-2990.
- ¹⁶² Wuthrich RP, Yui MA, Mazoujian G, Nabavi N, Glimcher LH, Kelley VE: Enhanced MHC class II (reactive with CD4 T-cells) expression in renal proximal tubules precedes loss of renal function in MRL/lpr mice with lupus nephritis. *Am J Pathol.* 1989;134:45-51.
- ¹⁶³ Suzuka H, Yoshifusa H, Nakamura Y, Miyawaki S, Shibata Y: Morphological analysis of autoimmune disease in MRL-lpr, Yaa male mice with rapidly progressive systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 1993;14:275-282.
- ¹⁶⁴ D'Cruz DP, Hughes GRV: The treatment of lupus nephritis. *BMJ.* 2005;330:377-378.
- ¹⁶⁵ Kaveri SV, Dietrich G, Hurez V, Kazatchkine MD: Intravenous immunoglobulins (IVIg) in the treatment of autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol.* 1990;86:192-198.
- ¹⁶⁶ Mouthon L, Kaveri SV, Spalter SH, Lacroix-Desmazes S, Lefranc C, Desai R, Kazatchkine MD: Mechanisms of action of intravenous immune globulin in immune-mediated diseases. *Clin Exp Immunol.* 1996;104:S3-9.
- ¹⁶⁷ Generau T, Chosidow O, Danel C, Chérin P, Herson S: High-dose intravenous immunoglobulin in cutaneous lupus erythematosus. *Arch Dermatol.* 1999;135:1124-1125.
- ¹⁶⁸ Winder A, Molad Y, Ostfeld I, Kenet G, Pinkhas J, Sidi Y: Treatment of systemic lupus erythematosus by prolonged administration of high dose intravenous immunoglobulin: report of 2 cases. *J Rheumatol.* 1993;3:495-498.

-
- ¹⁶⁹ Levy Y, Sherer Y, Ahmed A, Langevitz P, George J, Fabbrizzi F, Terryberry J, Meissner M, Lorber M, Peter JB, Shoenfeld Y: A study of 20 SLE patients with intravenous immunoglobulin-clinical and serologic response. *Lupus*. 1999;8:705-712.
- ¹⁷⁰ Corvetta A, Della Bitta R, Gabrielli A, Spaeth PJ, Denieli G: Use of high-dose intravenous immunoglobulin in systemic lupus erythematosus: report of three cases. *Clin Exp Rheumatol*. 1989;3:295-299.
- ¹⁷¹ Lafferty TE, Smith JB, Schuster SJ, DeHoratius RJ: Treatment of acquired factor VIII inhibitor using intravenous immunoglobulin in two patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*. 1997;4:775-778.
- ¹⁷² Sherer Y, Levy Y, Langevitz P, Lorber M, Fabbizzi F, Shoelfeld Y: Successful Treatment of Systemic Lupus Erythematosus Cerebritis with Intravenous Immunoglobulin. *Clin Rheumatol*. 1999;18:170-173.
- ¹⁷³ Boletis JN, Ioannidis JPA, Boki KA, Moutsopoulos HM: Intravenous immunoglobulin compared with cyclophosphamide for proliferative lupus nephritis. *The Lancet*. 1999;354:569-570.
- ¹⁷⁴ Lin CY, Hsu HC, Chiang H: Improvement of histological and immunological change in steroid and immunosuppressive drug-resistant lupus nephritis by high-dose intravenous gamma globulin. *Nephron*. 1989;53:303-310.
- ¹⁷⁵ Tan E, Hajinazarian M, Bay W, Neff J, Mendell JR: Acute renal failure resulting from intravenous immunoglobulin therapy. *Arch Neurol*. 1993;50:137-139.
- ¹⁷⁶ Monova D, Belovezhkov N, Altunkova I, Monov S: Intravenous immunoglobulin G in the treatment of patients with chronic glomerulonephritis: clinical experience lasting 15 years. *Nephron*. 2002;90:262-266.
- ¹⁷⁷ Orbach H, Tishler M, Shoenfeld Y: Intravenous immunoglobulin and the kidney – a two-edged sword. *Sem Arthritis Rheum*. 2004;34:593-601.
- ¹⁷⁸ Barton JC, Herrera GA, Galla JH, Bertoli LF, Work J, Koopman WJ: Acute cryoglobulinemic renal failure after intravenous infusion of gamma globulin. *Am J Med*. 1987;82:624-9.
- ¹⁷⁹ Wajanaponsan N, Cheng SF: Acute renal failure resulting from intravenous immunoglobulin therapy. *Hawaii Med J*. 2004;63:266-267.
- ¹⁸⁰ Sati HIA, Ahya R, Watson HG: Incidence and associations of acute renal failure complicating high-dose intravenous immunoglobulin therapy. *British Journal of Haematology*. 2001;113:556-557.

-
- ¹⁸¹ Fakhouri F: Intravenous immunoglobulins and acute renal failure: mechanism and prevention. *Rev Med Interne*. 2007;28:4-6.
- ¹⁸² Allen AC: The kidney. Medical and surgical diseases. Grune and Stratton.: New York, 1951.
- ¹⁸³ Cantu TG, Hoehn-Saric EW, Burgess KM, Racusen L, Scheel PJ: Acute renal failure associated with immunoglobulin therapy. *Am J Kidney Dis*. 1995;2:228-234.
- ¹⁸⁴ Ahsan N, Wiegand LA, Abendroth CS, Manning EC: Acute renal failure following immunoglobulin therapy. *Am J Nephrol*. 1996;16:532-536.
- ¹⁸⁵ Haskin JA, Warner DJ, Blank DU: Acute renal failure after large doses of intravenous immune globulin. *Ann Pharmacother*. 1999;33:800–803.
- ¹⁸⁶ Szenczi Á, Kardos J, Medgyesi GA, Závodszky P: The effect of solvent environment on the conformation and stability of human polyclonal IgG in solution. *Biologicals*. 2005;34:5-14.
- ¹⁸⁷ Vo AA, Cam V, Toyoda M, Puliya DP, Lukovsky M, Bunnapradist S, Peng A, Yang K, Jordan SC: Safety and Adverse Events Profiles of Intravenous Gammaglobulin Products Used for Immunomodulation: A Single-Center Experience. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1:844-852.
- ¹⁸⁸ Scott A Chapman, Pham D: Acute Renal Failure and Intravenous Immune Globulin: Occurs with Sucrose-Stabilized, but Not with D-Sorbitol–Stabilized, Formulation. *The Annals of Pharmacotherapy*. 2004;38:2059-2067.
- ¹⁸⁹ Hansen-Schmidt S, Silomon J, Keller F: Osmotic nephrosis due to high-dose immunoglobulin therapy containing sucrose (but not with glycine) in a patient with immunoglobulin A nephritis. *Am J Kidney Dis*. 1996;3:451-453.
- ¹⁹⁰ Cohen PL, Eisenberg RA: Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:243-269.
- ¹⁹¹ Pisetsky DS, McCarty GA, Peters DV: Mechanisms of autoantibody production in autoimmune MRL mice. *J Exp Med*. 1980;152:1302-1310.
- ¹⁹² Kolaja GJ, Fast PE: Renal lesions in MRL mice. *Vet Pathol*. 1982;19:663-668.
- ¹⁹³ Diaz GC, Jevnikar AM, Brennan DC, Florquin S, Pacheco-Silva A, Kelley VR: Autoreactive kidney-infiltrating T-cell clones in murine lupus nephritis. *Kidney Int*. 1992;42:851-859.

-
- ¹⁹⁴ Kanauchi H, Furukawa F, Imamura S: Characterization of cutaneous infiltrates in MRL/lpr mice monitored from onset to the full development of lupus erythematosus-like skin lesions. *J Invest Dermatology*. 1991;96:478-483.
- ¹⁹⁵ Furukawa F, Tanaka H, Sekita K, Nakamura T, Horiguchi Y, Hamashima Y: Dermatopathological studies on skin lesions of MRL mice. *Arch Dermatol Res*. 1984;276:186-194.
- ¹⁹⁶ Yang JQ, Saxena V, Xu H, Van Kaer L, Wang CR, Singh RR: Repeated α -galactosylceramide administration results in expansion of NK T cells and alleviates inflammatory dermatitis in MRL-lpr/lpr mice. *J Immunol*. 2003;171:4439–4446.
- ¹⁹⁷ Ostensen M: SWex hormones ang pregnancy in rheumaatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Annals of New York Academy of Sciences*. 1999;876:131-144.
- ¹⁹⁸ Carlsten H, Nilsson N, Jonsson R, Backman K, Holmdahl R, Tarkowski A: Estrogen accelerates immune complex glomerulonephritis but ameliorates T cell-mediated vasculitis and sialadenitis in autoimmune MRL/lpr mice. *Cell Immunol*. 1992;144:190–202.
- ¹⁹⁹ Zhang G, Budker V, Wolff JA: High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther*. 1999;10:1735-1737.
- ²⁰⁰ Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K: Inducible gene targeting in mice. *Science*. 1995;269:1427-1429.
- ²⁰¹ <http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/15596018%20pps%20Trizol%20Reagent%20061207.pdf>
- ²⁰² Palliser D, Chowdhury D, Wang QY, Lee SJ, Bronson RT, Knipe DM, Lieberman J: An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature*. 2006;439:89-94.
- ²⁰³ Wilmer HA: The mechanism of sucrose damage of the kidney tubules. *Am J Physiol*. 1944;141:431-438.
- ²⁰⁴ Chetterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, Zacharowski K, Stewart KN, Mota-Filipe H, Thiernemann C: Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int*. 2000;58:658-673.
- ²⁰⁵ Girardi G, Berman J, Redecha P, Spruce L, Thurman JM, Kraus D, Hollmann TJ, Casali P, Carroll MC, Wetsel RA, Lambris JD, Holers VM, Salmon JE: Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest*. 2003;112:1644-1654.

-
- ²⁰⁶ Rácz Zs, Hamar P: SiRNA technológia, a jövő génterápiája? Orvosi Hetilap 2008;149:153-159.
- ²⁰⁷ Budker VG, Subbotin VM, Budker T, Sebestyen MG, Zhang G, Wolff JA: Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. II. Morphological studies. J Gene Med. 2006;8:874–888.
- ²⁰⁸ Kobayashi N, Kuramoto T, Yamaoka K, Hashida M, Takakura I: Hepatic Uptake and Gene Expression Mechanisms following Intravenous Administration of Plasmid DNA by Conventional and Hydrodynamics-Based Procedures. JPET. 2001;297:853-860.
- ²⁰⁹ Liu F, Song Y, Liu D: Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. Gene Ther. 1999;6:1258-66.
- ²¹⁰ Liu F, Song Y, Liu D: Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. Gene Ther. 1999;6:1258–1266.
- ²¹¹ Rossmanith W, Chabicovsky M, Herkner K, Schulte-Hermann R: Cellular gene dose and kinetics of gene expression in mouse livers transfected by high-volume tail-vein injection of naked DNA. DNA Cell Biol. 2002;21:847–853.
- ²¹² Budker VG, Subbotin VM, Budker T, Sebestyen MG, Zhang G, Wolff JA: Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. II. Morphological studies. J Gene Med. 2006;8:874–888.
- ²¹³ Zheng X, Zhang X, Sun H, Feng B, Li M, Chen G, Vladau C, Chen D, Suzuki M, Min L, Liu W, Zhong R, Garcia B, Jevnikar A, Min WP: Protection of Renal Ischemia Injury using Combination Gene Silencing of Complement 3 and Caspase 3 Genes. Transplantation. 2006;27:1781-1786.
- ²¹⁴ Wang P, Ning Li, Jie-Shou Li, Wei-Qin Li: The role for endotoxin, TNF- α , and IL-6 in inducing the state of growth hormone insensitivity. World J Gastroenterol. 2002;8:1007-9327.
- ²¹⁵ Stark GR, Kerr IM, Williams BR G, Silverman RH, Schreiber RD: How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem. 1998;67:227-264.
- ²¹⁶ Dahlgren C, Wahlestedt C, Thonberg H: No induction of anti-viral responses in human cell lines HeLa and MCF-7 when transfecting with siRNA or siLNA. Biochem Biophys Res Commun. 2006;341:1211-1217.
- ²¹⁷ Zamanian-Daryoush M, Marques JT, Gantier MP, Behlke MA, John M, Rayman P, Finke J, Williams BR: Determinants of cytokine induction by small interfering RNA in

human peripheral blood mononuclear cells. *J Interferon Cytokine Res.* 2008;28:221-233.

²¹⁸ Kim DH, Longo M, Han Y, Lundberg P, Cantin E, Rossi JJ: Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotech.* 2004;22:321-325.

²¹⁹ Wesche-Soldato DE, Chung CS, Lomas-Neira J, Doughty LA, Gregory SH, Ayala A: In vivo delivery of caspase-8 or Fas siRNA improves the survival of septic mice. *Blood.* 2005;106:2295–2301.

²²⁰ Heidel JD, Hu S, Liu XF, Riche TJ, Davis ME: Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. *Nat. Biotechnol.* 2004;22:1579-182.

²²¹ Sioud M, Sorensen DR: Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312:1220–1225.

²²² Gürcan HM, Ahmed AR: Efficacy of various intravenous immunoglobulin therapy protocols in autoimmune and chronic inflammatory disorders. *Ann Pharmacother.* 2007;5:812-823.

²²³ Ruetter A, Ludger TA: Efficacy and safety of intravenous immunoglobulin for immune-mediated skin disease: current view. *AmJ Clin Dermatol.* 2004;5:153-160.

²²⁴ Boletis JN, Ioannidis JPA, Boki KA, Moutsopoulos HM: Intravenous immunoglobulin compared with cyclophosphamide for proliferative lupus nephritis. *The Lancet.* 1999;354:569–570.

²²⁵ Monova D, Belovezhkov N, Altunkova I, et al. Intravenous immunoglobulin G in the treatment of patients with chronic glomerulonephritis: clinical experience lasting 15 years. *Nephron* 2002; 90: 262–266.

²²⁶ <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a682815.html>

²²⁷ Hansen-Schmidt S, Silomon J, Keller F: Osmotic nephrosis due to high-dose immunoglobulin therapy containing sucrose (but not with glycine) in a patient with immunoglobulin A nephritis. *Am J Kidney Dis.* 1996;3:451–453.

²²⁸ Chacko B, John GT, Balakrishnan N, Kirubakaran MG, Jacob CK: Osmotic nephropathy resulting from maltose-based intravenous immunoglobulin therapy. *Ren Fail.* 2006;28:193-195.

²²⁹ Metallidis S, Papaioannu M, Bokolas G, Kollaras P, Gogou V, Nikolaidis P: Acute renal failure following intravenous immunoglobulin therapy in HIV-infected patient. *Clin Nephrol.* 2009;71:196-197.

-
- ²³⁰ Ullman S, Halberg P, Wolf-Jürgensen P: Deposits of immunoglobulins and complement C3 in clinically normal skin of patients with lupus erythematosus. *Acta Derm Venereol.* 1975;55:109-112.
- ²³¹ Alexander JJ, Bao L, Jacob A, Kraus DM, Holers VM, Qugg RJ: Administration of the soluble complement inhibitor, Crry-Ig, reduces inflammation and aquaporin 4 expression in lupus cerebritis. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1639:169-176.
- ²³² Gaedicke G, Telle WM, Kohne E, Dopfer R, Niethammer D: IgG therapy in systemic lupus erythematosus. *Annals os Hematology.* 1984;48:387-390.
- ²³³ Ballow M, Parke A: The uses of intravenous immune globuline in collagen vascular disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 1989;84:608-612.
- ²³⁴ Zabaleta-Lanz ME, Munoz LE, Tapanes FJ, Vargas-Arenas RE, Daboin I, Barrios Y, Pinto Y, Bianco NE: Further description of early clinically silent lupus nephritis. *Lupus.* 2006;15:845-851.
- ²³⁵ Watanabe H, Garnier G, Circolo A, Wetsel RA, Ruiz P, Holers VM, Boackle SA, Colten HR, Gileson GS: Modulation of renal disease in MRL/lpr mice genetically deficient in the alternative complement pathway factor B. *J Immunol.* 2000;164:786-794.
- ²³⁶ Ito MR, Terasaki S, Kondo E, Shiwaku H, Fukuoka Y, Nose M: Experimental lupus nephritis in severe combined immunodeficient (SCID) mice: remodelling of the glomerular lesions by bystander IgM antibodies. *Clin Exp Immunol.* 2000;119:340-345.
- ²³⁷ Nakatani K, Fujii H, Hasegawa H, Terada M, Arita N, Ito MR, Ono M, Takahashi S, Saiga K, Yoshimoto S, Iwano M, Shiiki H, Saito Y, Nose M: Endothelial adhesion molecules in glomerular lesions: association with their severity and diversity in lupus models. *Kidney Int.* 2004;65:1290-1300.
- ²³⁸ Itoh J, Nose M, Takahashi S, Ono M, Terasaki S, Kondoh E, Kyogoku M: Induction of different types of glomerulonephritis by monoclonal antibodies derived from an MRL/lpr lupus mouse. *Am J Pathol.* 1993;143:1436-1443.
- ²³⁹ Sekine H, Reilly CM, Molano ID, Garnier G, Circolo A, Ruiz P, Holers VM, Boackle SA, Gilkeson GS: Complement component C3 is not required for full expression of immune complex glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *J Immunol.* 2001;166:6444-6451.
- ²⁴¹ Bleeker WK, Teeling JL, Hack CE: Accelerated autoantibody clearance by intravenous immunoglobulin therapy: studies in experimental models to determine the magnitude and time course of the effect. *Blood.* 2001;98:3136-3142.

-
- ²⁴² Tomino Y, Sakai H, Takaya M, Suga T, Endoh M, Nomoto Y: Solubilization of intraglomerular deposits of IgG immune complexes by human sera or gamma-globulin in patients with lupus nephritis. *Clin Exp Immunol.* 1984;58:42-48.
- ²⁴³ Blank M, Manosroi J, Tomer Y, Manosroi A, Kopolovic J, Charcon-Polak S, Shoenfeld Y: Suppression of experimental systemic lupus erythematosus (SLE) with specific anti-idiotypic antibody-saporin conjugate. *Clin Exp Immunol.* 1994;98:434-441.
- ²⁴⁴ Tomer Y, Shoenfeld Y: Successful treatment of psychosis secondary to SLE with high-dose intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Rheumatol.* 1992;10:391-393.
- ²⁴⁵ Basta M, Van Goor F, Luccioli S, Billings EM, Vortmeyer AO, Baranyi L, Szebeni J, Alving CR, Carroll MC, Berkower I, Stojilkovic SS, Metcalfe DD: F(ab)'2-mediated neutralization of C3a and C5a anaphylatoxins: a novel effector function of immunoglobulins. *Nat Med.* 2003;9:431-438.
- ²⁴⁶ Berger M, Rosenkranz P, Brown CY: Intravenous and standard immune serum globulin preparations interfere with uptake of ¹²⁵I-C3 onto sensitized erythrocytes and inhibit hemolytic complement activity. *Clin Immunol Immunopathol.* 1985;34:227-236.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Rácz Z, Hamar P: Can siRNA technology provide the tools for gene therapy of the future? *Curr Med Chem*. 2006;13(19):2299-307. IF=5,207

Rácz Z és Hamar P: SiRNA technológia, a jövő génterápiája? *Orvosi Hetilap* 2008;149(4):153-159.

Rácz Z, Hamar P: RNA interference in research and therapy of renal diseases, *Contributions to Nephrology*, editor: G. Remuzzi, Karger, 2008, Vol 159, 78-95. IF=1,83

Rácz Z, M Godó, C Révész and P Hamar. Immune activation and target organ damage are consequences of hydrodynamic treatment but not delivery of naked siRNAs in mice. *Nucleic Acid Ther*. 2011 21: 215-24. IF=2,986

Kaucsár T, **Rácz Z**, Hamar P. Post-transcriptional gene-expression regulation by micro RNA (miRNA) network in renal disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(14):1390-401. IF=13,577

Stokman G, Qin Y, **Rácz Z**, Hamar P, Price LS. Application of siRNA in targeting protein expression in kidney disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(14):1378-89. IF=13,577

Rácz Z, T Kaucsar, P Hamar: The huge world of small RNAs: regulating networks of microRNAs. *Acta Physiologica Hungarica*. 2011 98: 243-254. IF=1,226

Rácz Z, Nagy E, Rosivall L, Szebeni J, Hamar P: Sugar-free, glycine-stabilized intravenous immunoglobulin prevents skin but not renal disease in the MRL/lpr mouse model of systemic lupus. *Lupus* 2009. 0, 1-14. IF=2,6

Összesített IF=41,003

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Hamar Péternek az együtt töltött évek alatt nyújtott segítségéért, támogatásáért, és a sok kritikáért, melyekkel tudományos tanulmányaimat fejlesztette.

Köszönöm programvezetőmnek, Prof. Dr. Rosivall Lászlónak az állandó figyelmességét és a segítőkészségét.

Hálával tartozom mindazon tudományos diákköri, illetve PhD halgatónak, és asszisztensnek, akik együttműködésével sok eredményünk született meg sikeresen, kiemelten Godó Máriának az ELISA vizsgaáltok elvégzéséért.

Köszönettel tartozom Édesanyámnak, aki mindvégig hangsúlyozta tudományos fejlődésem fontosságát, még akkor is, amikor én ezt nem így gondoltam.

Végül, de nem utolsó sorban lovamnak, Lancelotnak szeretném kifejezni végtelen hálámat, aki folyamatosan biztosította számomra a lelki és testi egyensúlyt.