

Terápiás lehetőségek diabéteszes és allograft nefropátia megelőzésében, kezelésében.

Doktori tézisek

Dr. Prókai Ágnes

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Krónikus betegségek gyermekkori prevenciója



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

Budapest
2013

BEVEZETÉS

Ma Magyarországon minden tízedik embert érinthet vesebetegség, és évente mintegy 500-600.000 vesebeteg szorul gondozásra. Napjainkra a diabéteszes nefropátia lépett elő, mint a krónikus veseelégtelenséghez vezető legfőbb kórok. Ennek végső terápiás megoldása, a vese transzplantáció lehet, mely során alkalmazott immunosuppresszív terápiák fejlődése jelentősen csökkentette az akut kilökődések számát. Jelenleg a krónikus allograft nephropathia (KAN) az átültetett szervek elvesztésének a vezető oka. Értekezésem során először magyarázatot keresek a magas glükóz és a fokozott gyűjtőcsatornabeli renin szekréció közötti kapcsolatra, melyben a nemrégiben leírásra került G-fehérje kapcsolt receptor (GPR91), szukcinát receptor szerepét feltételezem. Ezt követően a végállapotú vesebetegség definitív terápiájaként szolgáló vese transzplantáció hosszú-távú kimenetelét befolyásoló rizikófaktorok közül hármat tárgyalok a gyógyszeres terápia aspektusából: a calcineurin inhibitorok okozta nefrotoxicitás, a calcineurin inhibitorok és egyéb rizikófaktorok kiváltotta poszt-transzplantációs diabétesz mellitust és az eritropoietin (EPO) védő mechanizmusát iszkémia/reperfúziós (I/R) vesekárosodásban.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A fluoreszcens rezonancia energia transzfer FRET-alapú renin szubsztrát specificitásának igazolása és a (pro)renin principális sejtbeli bazolaterális és a lumináris lokalizációján túl a gyűjtőcsatornából (CD) való felszabadulásának demonstrálása.
2. Diabéteszes körülmények között vizsgálni, hogy a szukcinát a GPR91 leszálló szignál kaszkádján keresztül a CD-beli lokális RAS legfőbb regulátora, egy új antifibrotikus terápiás célpontot tárva fel ezzel diabétesz mellitusban.
3. Annak igazolása, hogy a calcineurin inhibitorok (CNI) nefrotoxikus hatásukat, legalábbis részben, a lokális RAS-on keresztül fejtik ki, különös tekintettel az összekötő szegmensben és a CD-ban,

rámutatva ezzel a krónikus allograft nefropátia egy terápiás célpontjára.

4. Az eritropoietin (EPO) kezelés protektív hatásának vizsgálata súlyos, egyoldali vese I/R károsodásban; nőstény ill. hím patkányok különböző EPO hatás elemzése, hő sokk fehérje (HSP) 72 és a Na⁺/K⁺ATPáz szerepének tisztázása az EPO szignálútvonalára való hatásában.
5. Transzplantáltjaink körében az csökkent glükóz tolerancia (IGT) ill. poszt-transzplantációs diabétesz mellitusz (PTDM) incidenciájának felmérése, a gyerek vesetranszplantált populációra jellemző hajlamosító rizikófaktorok megítélése, különös tekintettel az immunosuppresszívumokra, valamint transzplantáltak gondozási protokolljában az orális glükóz tolerancia teszt (OGTT) jelentőségének megbecslése.

MÓDSZEREK

Munkám során a fenti kérdések megválaszolása részben sejtes modelleken, részben állatkísérletek által, részben klinikai vizsgálatok segítségével történt.

- Sejtvonalak és kezelésük
- Állatmodellek
- Sejtkultúra mintagyűjtése
- Szöveti minták gyűjtése
- Gén kifejeződés vizsgálatok
- Western blot
- Spektrofluorometria
- Fluorofórok
- Immunocitokémia és immunohisztokémia
- A gyűjtőcsatorna elválasztása (disszekció)
- Vese feltöltését szolgáló mikropunkciós technika
- A vese in vivo multi-foton fluoescens képalkotása
- Spektrofluorometria a vizelet renin aktivitás mérésére
- PGE₂ vizeletbe történő szekréciója

- Vesefunkciós paraméterek
- Hisztológiai analízis
- Áramlási citometria (FACS analízis)
- Statisztikai analízis
- Humán vizsgálat
- A beteg populáció és immunosuppresszió
- Labor paraméterek
- Statisztikai analízis

EREDMÉNYEK

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

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

Kontroll M1 sejtekben (gyűjtőcsatorna eredetű sejtvonala) a mért endogén renin aktivitáshoz képest a renin és aktivált prorenin aktivitás együttesen több, mint kétszeres volt. A minták 100 $\mu\text{mol/l}$ Aliskirennel történt pre-inkubációja hatvan százalékra csökkentette a renin aktivitást, míg a 250 $\mu\text{mol/L}$ Aliskiren teljes mértékben meggátolta az aktivitás fluoreszcens jelét. A FRET-alapú renin szubsztrát specificitását intakt vesébe történt mikropunkcióval *in vivo* is bizonyítottuk. Míg a kontroll db/db egér kifejezett granulációt és lumináris renin aktivitást mutatott, két hét Aliskiren kezelés (50mg/kg/nap, i.p.) szignifikáns csökkenést váltott ki a lumináris renin aktivitásban.

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

A FRET-alapú renin szubsztrát vesebeli specificitás vizsgálatának további lépéseként As 4.1 (JGA eredetű sejtvonala) és M1 sejteken folytattuk kísérleteinket. Beállítás során több koncentrációban és időtartamig kezeltük sejtjeinket az adenilcikláz-aktivátor forskolin és a foszfodiészteráz-inhibitor IBMX kevert oldatával. A renin termelés maximális stimulációját 24 órán keresztül napi kétszeri 10 μM forskolin

és 500 μM IBMX adagolás esetében tapasztaltuk. Ebben a modellben mind a JGA, mind a CD eredetű sejtvonalban megnövekedett intracelluláris cAMP aktiválta *de novo* renin szintetizáló mechanizmust tapasztaltunk. A renin antitest és a FRET-alapú renin szubsztrát intracelluláris granulumokban/felett nagy közelséget mutatott.

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

A forskolin és IBMX indukálta renin felszabadulást tanulmányoztuk élő sejtvonalakban. A renin aktivitás megjelenítése céljából FRET-alapú renin szubsztrátot adtunk a médiumhoz a képkalkotást megelőzően tíz perccel. A sejtek retikuláris mintázattal festődtek mintegy felfedve az endoplazmás retikulum és a Golgi apparátus szintetizáló mechanizmusát. Az acidikus, maghoz közel LysoTracker Red pozitív vezikulák fokozatosan sárgává, vagyis aktívvá váltak. Míg a sejtfelszínhez egész közel a sejtmembránnal fuzionált vezikulumok helyezkedtek el, melyek készek voltak aktív renin tartalmuk szekréciójára.

Egy M1 sejtcsoport két oldalán elhelyezkedő principális sejtekben jelentős granulációt láthatunk, mely granulumok nem csak tárolják az aktív renint, de az apikális lumen felé szekretálják is azt. A szekretált renin hozzákötődik az interkaláris sejt felszínéhez és ahogy azt a renin aktivitást jelző zöld sáv mutatja, további aktivitást nyer.

Gyűjtőcsatornabeli renin aktivitás ex vivo vizsgálata

Multi-foton lézer szkennelő mikroszkóp alkalmazásával és FRET-alapú renin szubsztrát felhasználásával disszekált gyűjtőcsatornában vizsgáltuk a renin aktivitását *ex vivo*. A principális sejt nagy mennyiségű renin granulációt mutatott. Granulumjai nem csak tárolták a (pro)renint, de jelentős aktivitással is rendelkeztek. Az aktív renin, felszabadulását követően, felhalmozódott a lumináris folyadékban és hozzákötődött az interkaláris sejtek felszínéhez.

Gyűjtőcsatornabeli renin aktivitás in vivo vizsgálata

Diabéteszes egér CD-je renin termelő kapacitást és nagy mennyiségű granulációt mutatott a principális sejtekben. Mítöbb, a ko-lokalizációs mintázat alapján tudjuk, hogy a granulumok nem csak tárolták a (pro)renint, de ez az enzim már aktivitással is rendelkezett. Az aktív renin felszabadulását követően felhalmozódott a lumináris folyadékban és hozzákötődött az interkaláris sejtek felszínéhez.

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

GPR91 mRNS expresszió és lokalizáció M1 sejtekben és a vesében

Más releváns vese eredetű sejt vonalak összevetését követően az M1 sejtek kifejezett *de novo* GPR91 szintézisét tapasztaltuk. M1 sejtekben a GPR91 fehérje az átíródást biztosító endoplazmás retikulumban, a glikozilációt végző Golgi apparátusban, majd egy része, funkciójának megfelelően a sejtmembránban volt detektálható. Diabéteszes egér veséjének immunohisztokémiai vizsgálata hasonló lokalizációt mutatott. Továbbá az összekötő szegmenst és a CD-t a GPR91 vese kifejeződésének legfontosabb szakaszaiként azonosítottuk.

Szukcinát aktiválta intra-renális RAS jelátviteli útvonal M1 sejtekben

Western blot vizsgálatokkal az M1 sejtek renin szekréció irányába mutató jelátviteli útvonalának tagjait vizsgáltuk szukcinát kezelést követően: pERK1/2 szintje 1,28-, 1,38-, 2,08-szorosra ($p \leq 0,05$ vs. kontroll), pp38 szintje 1,31-, 1,29-, 1,35-szorosra ($p \leq 0,05$ vs. kontroll) és a COX2 szintje 1,45-, 1,76-, 1,91-szörösre ($p \leq 0,05$ vs. kontroll;) nőtt a kontroll mintákhoz képest (10 μ M, 100 μ M és 1mM szukcinát kezelést követően). A szukcinát a renin szignifikáns emelkedését eredményezte már olyan alacsony koncentrációban is, mint 10 μ M (1,30-, 1,32-, 1,98-szoros a kontrollokhoz képest; $p \leq 0,05$ vs. kontroll), míg a prorenin felhalmozódása csak 1mM-os szukcinát kezelés hatására történt meg (1,00-, 0,98-, 1,36-szoros a kontrollokhoz képest). A (pro)renin receptor [(P)RR] hasonló választ mutatott a különböző

szukcinát koncentrációkra (1,20-; 1,56-; 1,86-szoros a kontrollhoz képest).

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

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

Gyűjtőcsatornabeli GPR91 kiváltotta pERK1/2 szignál

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

PGE₂ termelés, mint a renin szekréció végső triggerre

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

A szukcinát befolyásolja a lokális RAS aktivációját in vivo

Mind a (pro)renin, mind a (P)RR fehérje expressziója kifejezett emelkedést mutatott (1,00-, 2,06-, 0,8-, 0,62-szoros, 1,00-, 4,12-, 0,68-, 1,47-szoros és 1,00-, 3,26-, 0,98-, 1,34-szoros, prorenin, renin, PRR;

WT, DM, KO, DM+KO) négy héttel a STZ kezelés által sikeresen indukált DM kialakulását követően. Ezzel szemben a STZ-kezelt, de GPR91^{-/-} állatok nem mutatták jelét a lokális RAS aktiválódásának.

Renin aktivitás a gyűjtőcsatornában és a vizeletben

A multi-foton fluoreszcens lézer szkennelő mikroszkóppal és a mikropunkció finom technikájával a FRET-alapú renin szubsztrátot közvetlenül a CD-be injektáltuk, majd *in vivo* vizualizáltuk a veseszövetet. A kontroll állatok CD-jében érdemben nem találtunk renin granulációt. A GPR91^{-/-} egerekben még az összekötő szegmens sem, ami egyébként a legnagyobb renin termelő kapacitással bíró szegmens, mutatott szignifikáns granulációt vagy aktív renint. Ezzel ellentétben a GPR91 WT diabéteszes egerek CD-je hatalmas mértékű granulációt mutatott a principális sejtekben. Továbbá, ahogy a lokalizáció feltárta, ezek a granulumok nem csak prorenint tároltak, hanem már aktív reninné konvertálódott hormont is. Negyedik csoportunkban a GPR91^{-/-} DM egerekben, a GPR91 hiánya kivédte a megnövekedett renin aktivitást (1,00-, 4,05-, 1,08-, 1,20-szoros; WT, DM, KO, DM+KO; * $p \leq 0,05$ vs.WT). A FRET-alapú fluorogénikus renin szubsztrát specificitását Aliskiren kezelést követően bizonyítottuk, 50mg/kg/nap, i.p., két héten keresztül adagolás a renin aktivitás 46%-os csökkenését eredményezte.

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

A calcineurin inhibitorok hatása a vese renin-angiotenzin rendszerére

Immunosuppresszívumok kiváltotta renin termelés multi-foton mikroszkóppal való detektálása

Három csoportban vizsgáltuk az immunosuppresszívumok okozta renin mennyiségének, termelődésének és szekréciójának változását. Kontroll

egerek JGA-jában csupán néhány renint szekretáló granuláris sejtet láttunk, ám gyűjtőcsatornájukban alig, ha egyáltalán látható volt granuláció. Ezzel szemben a Tac kezelt csoport állatainak JGA-ja nagyobb számú, renin termelő sejtekké visszadifferenciálódott granuláris sejtet tartalmazott. Kétségtelenül a gyűjtőcsatorna lokalizációban is fokozott granuláció volt megfigyelhető. A CyA kezelt csoport hasonló képet mutatott, mindkét általunk vizsgált lokalizációban a kontroll egerekhez képest szignifikánsan megnőtt a renin jelenléte.

Immunoszuppresszívumok kiváltotta renin termelés áramlási citometriával való mérése

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

Fokozott renin termelés következtében kialakuló vazokonstriktió multifoton mikroszkóppal való detektálása

A renin közvetlen hatásának egyikeként, az érátmérők változását multifoton technika felhasználásával vizsgáltuk. A kontroll állatok megközelítőleg 7 μm -es átlagos érátmérője közel 2 μm -t csökkent, a megnövekedett renin szekréció így 50%-os kontrakciót hozott létre mindkét vizsgált csoportban.

Fokozott renin termelés következtében kialakuló vazokonstriktió és hipoxia hisztológiai leírása

A kontroll állatok Masson festése nem mutatott fibrotikus elváltozást, míg a két kezelt csoportban fellelhetők voltak az erek mellett futó köteges, kollagén rostok kék színben való festődése.

Immunosuppresszívumok kiváltotta vesefunkció romlás labor paramétereivel való megítélése

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

Az eritropoietin szerepe a vese iszkémia/reperfúziós károsodásában

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

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

Szérumban EPO szintek

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

Szérumban karbamid és kreatinin szintek

Mint azt a vesefunkciós paraméterek progresszív emelkedése jelezte, ötven perc iszkémia mindkét nemből a T2 időpontra akut

veseelégtelenséget eredményezett (kontroll, T2 vs. T24 $p \leq 0,05$). Hímekben, az EPO kezelés mérsékelte a poszt-iszkémiás veseelégtelenséget, ahogy azt az alacsonyabb BUN és kreatinin szintek mutatták (T24 vehikulum vs. EPO kezelt $p \leq 0,05$), míg a nőstényekben az EPO-nak nem volt hatása. Mitöbb, T24-ben EPO kezelés mellett a vesefunkciós paraméterek még alacsonyabbak is voltak a hímekben, mint a nőstényekben.

Vese Hisztológia

Minden kontroll csoportra normál vesestruktúra volt jellemző. Ötven perc iszkémiát követően jelentős progressziót figyeltünk meg a tubulus epitelsejt károsodás kiterjedésében (kefeszegély eltűnése, tubulus vakuolizálódás, a mag integritásának elvesztése és a sejt halál), valamint a hialin törmelék mennyiségének növekedésében T24 időpontig bezárólag (kontroll vs. T2 vs. T24 minden csoportban $p \leq 0,05$). Az EPO nemi különbség nélkül minden vizsgált paraméter értékén javított ($p \leq 0,05$ vs. vehikulum).

HSP72 fehérje nem-függő változása iszkémia/reperfúziós vesekárosodást követően

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

Na⁺/K⁺ATPáz- α 1 fehérje aleggység nem-függő változása iszkémia/reperfúziós vesekárosodást követően

Hasonlóan a HSP72 fehérjéhez, a poszt-iszkémiás Na⁺/K⁺ ATPáz- α 1 fehérje szintek dinamikája különbözött a nemekben. Minden időpontra igaz volt, hogy a Na⁺/K⁺ATPáz- α 1 fehérje szintek magasabbak voltak

a nem kezelt nőstényekben, mint a hímeekben ($p \leq 0,05$). Ezzel ellentétben az EPO kezelés csupán a hímeekben bizonyult hatásosnak, s úgy megemelte a T24-es időpontra a $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPáz-}\alpha 1$ szintjét (kontroll és T2 vs. T24; $p \leq 0,05$), mint az EPO kezelt nőstényekben volt látható ($p \leq 0,05$).

A HSP 72 és a $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPáz-}\alpha 1$ aleggység immunolokalizációja

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

Poszt-transzplantációs diabétesz mellitusz gyermek transzplantáltakban

Vesetranszplantált gyermekek demográfiai és anamnesztikus adatai

1990 és 2006 között, negyvenöt vesetranszplantált beteget gondoztunk az I. sz. Gyermekgyógyászati Klinikán. Negyvenötből 32 gyermeknél (71%, 20 fiú/12 lány) találtunk normális glükóz toleranciát. IGT hét esetben volt kimutatható (16%, 3 fiú/4 lány). Az IGT-ben szenvedő betegekben az OGTT során a szérum glükóz szint $5,3 \pm 0,95$ mmol/l (0 perc), $10,9 \pm 1,3$ mmol/l (60 perc) és $9,6 \pm 0,6$ mmol/l (120 perc) értéknek adódott. PTDM hat betegben fejlődött ki (13%, 2 fiú /4 lány). A PTDM átlagosan 25,8 hónappal a transzplantáció után alakult ki (0,5–119); habár ez az időszak a betegek 70%-ban rövidebb volt, mint egy év. A PTDM+IGT-ben szenvedő betegek fiatalabbak voltak ($14,1 \pm 4$ év), mint azok, akik normális glükóz háztartással rendelkeztek ($18,4 \pm$

6 év; $p = 0,02$). Nem találtunk ellenben különbséget a dialízis típusában, a dialízis időtartalmában vagy a cadaver/élő donációban. Diabétesz mellitusz szempontjából pozitív családi anamnézissel több PTDM+IGT beteg rendelkezett, mint normál glükóz háztartású gyermek ($p = 0,03$). A PTDM+IGT betegekben a szisztémás vércukor és szérum triglicerid szintek emelkedettek voltak összehasonlítva azokkal, akikben nem volt metabolikus eltérés ($p = 0,02$ és $0,039$). Más vizsgált paraméterekben nem találtunk szignifikáns különbséget.

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

Immunoszuppresszívumok szerepe a poszt-transzplantációs diabétesz mellitusz kialakulásában

Tanulmányunk következő lépéseként megbecsültük a különböző immunoszuppresszív rezsimek és a glükóz metabolizmus eltérései (PTDM + IGT) közötti kapcsolatot: harmincnégy Tac kezelt betegből tizenkettőben (35%) alakult ki PTDM+IGT-t; a CyA kezelték esetén tizenegyből csak egy esetben találtunk eltérést (9%; $p < 0,05$). A Tac vérszintek magasabbak voltak a PTDM+IGT csoportban, mint azokban, ahol normális glükóz háztartást diagnosztizáltunk ($p = 0,04$).

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

szintek ($p = 0,0002$) valamint a szteroid lökésterápiák és HOMA-R ($p = 0,038$) között.

TÉZISEK

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

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

2013

Csohány Rózsa, **Prókai Ágnes**, Kosik Anna, Szabó J. Attila. A gyűjtőcsatorna meghatározó szerepe a vese lokális renin-angiotenzin rendszerében. *Orvosi hetilap. Közlésre elfogadva. (IF:0)*

Csohány Rózsa, **Prókai Ágnes**, Kosik Anna, Szabó J. Attila. Multi-foton mikroszkópia a vesekutatásban. *Gyermekgyógyászat. Közlésre elfogadva. (IF:0)*

2012

Prókai Ágnes, Berta Nóra, Vannay Ádám, Sziksz Erna, Kis-Petik Katalin, Fekete Andrea, Toma Ildikó, Tulassay Tivadar, Kellermayer Miklós, Peti-Peterdi János, Szabó J. Attila. Multifoton-képkalkotás a vese szabályozó mechanizmusának vizsgálatában. *Hypertonia és Nephrologia. 2012;16:4-9. (IF:0)*

Prókai Ágnes, Himer Leonóra, Berta Nóra, Kosik Anna, Vannay Ádám, Kis-Petik Katalin, Szabó J Attila. A reninszekréció vizsgálata multifoton-mikroszkóppal a vese akut és krónikus kórfolyamataiban. *Orvosképzés. 2012;87:35-40 (IF:0)*

Prókai Ágnes, Himer Leonóra, Berta Nóra, Kosik Anna, Vannay Ádám, Kis-Petik Katalin, Szabó J Attila. A renin szekréció vizsgálata multi-foton mikroszkóppal a vese akut és krónikus kórfolyamataiban. *Magyar Tudomány. 2012:5-16. (IF:0)*

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

2011

Ágnes Prókai, Andrea Fekete, Nóra Fanni Bánki, Veronika Müller, Ágota Vér, Péter Degrell, Krisztina Rusai, László Wagner, Ádám Vannay, Rosta Máté, Uwe Heemann, Róbert M. Langer, Tivadar Tulassay, György Reusz, Attila J. Szabó. Renoprotective effect of erythropoietin in rats subjected to ischemia/reperfusion injury: gender differences. *Surgery. 2011;150:39-47. (IF: 3,603, független citáció:1)*

2010

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

2008

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

2007

Prókai Ágnes, Reusz György, Sallay Péter, Körner Anna, Madácsy László, Szabó J Attila: Poszttranszplantációs diabetes mellitus vesetranszplantált gyermekekben. *Hypertonia és Nephrologia*. 2007; 11: 7-12. (IF:0)

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

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

2013

Prókai Ágnes. Miért nem lesz urémiás a téli álmot alvó, anuriás medve? *Gyermekgyógyászat*. Közlésre elfogadva. (IF:0)

Andreas Linkermann, Jan Ole Heller, **Agnes Prokai**, Joel M. Weinberg, Federica De Zen, Nina Himmerkus, Attila J. Szabo, Jan H. Brasen, Ulrich Kunzendorf, Stefan Krautwald. Osmotic nephrosis and contrast-induced acute kidney injury are prevented by the RIP1 kinase inhibitor necrostatin-1 in mice. *JASN*. Közlésre elfogadva. (IF:9,663)

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

2012

Wagner L, Bánki N F, Vér Á, **Prókai Á**, Kőszegi S, Hosszú Á, Szabó A, Fekete A. Az aldoszteron-antagonisták monoterápiában is hatékonyak diabeteses nephropathiában. *Diabetologia Hungarica*. 2012;20:162. (IF:0)

Nóra F Bánki, Ágota Vér, László J Wagner, Máté Rosta, Ádám Vannay, Péter Degrell, **Ágnes Prókai**, Dorottya Nagy Szakál, Klára Rosta, György Reusz, Attila J Szabó, Tivadar Tulassay, Chris Baylis, Andrea Fekete. Aldosterone antagonists in monotherapy are protective against STZ-induced diabetic nephropathy: the potential role of the sigma-1 receptor – Akt – Na/K ATPase pathway. *PLoS One*. 2012;7:e39938 (IF: 4,411)

Rusai K, Schmaderer C, Baumann M, **Prókai A**, Kis E, Szabó AJ, Leban J, Doblhofer R, Ammendola A, Lutz J, Heemann U. Immunosuppression with 4SC-101, a novel inhibitor of dihydroorotate dehydrogenase in a rat model of renal transplantation. *Transplantation*. 2012;93:1101-1107. (IF:3,676, független citáció:1)

2011

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

Sziksz Erna, Veres Gábor, Vannay Ádám, **Prókai Ágnes**, Himer Leonóra, Ónody Anna, Korponay-Szabó Ilma Rita, Reusz György, Szabó András, Arató András, Szebeni Beáta. Fokozott hőszokk fehérje 72 expresszió gyermekkori lisztérzékenységekben. *Gyermekgyógyászat*. 2011. (IF: 0)

2010

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

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

Vannay A, Sziksz E, Prókai A, Veres G, Molnár K, Szakál DN, Onódy A, Korponay-Szabó IR, Szabó A, Tulassay T, Arató A, Szebeni B. Increased expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in coeliac disease. *Pediatr Res*. 2010;68:118-122. (IF: 2,607)

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

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

2009

Péterfi Z, Donkó A, Orient A, Sum A, **Prókai A**, Molnár B, Veréb Z, Kovács KJ, Müller V, Szabó AJ, Geiszt M. Peroxidasin is secreted and incorporated into the extracellular matrix of myofibroblasts and fibrotic kidney. *Am J Pathol*. 2009; 175:725-735. (IF: 5,673, független citáció: 10)

2008

Fekete A, Rosta K, Wagner L, **Prókai A**, Degrell P, Ruzicska E, Vegh E, Toth M, Ronai K, Rusai K, Somogyi A, Tulassay T, Szabo AJ, Ver A. Na⁺,K⁺-ATPase is modulated by angiotensin II in diabetic rat kidney--another reason for diabetic nephropathy? *J Physiol*. 2008 15; 586:5337-5348. (IF: 4,605, független citáció: 7)