

OTKA beszámoló 2003-2006

OTKA F 042563

**A nitrogén monoxid szerepe az akut veseelégtelenségben és a krónikus
allograft nephropathiában: Genetikai és nemi különbségek**

Szabó Attila

Budapest

2007

Tartalomjegyzék:

OTKA beszámoló 2003-2006	1
Összefoglalás	5
Summary	6
Rövidítések jegyzéke	7
1. Bevezetés	8
1.1. <i>Krónikus kilökődés, krónikus allograft nephropatia vagy krónikus allograft diszfunkció?</i>	9
1.2. <i>A krónikus allograft nephropatia klinikai képe</i>	9
1.3. <i>A krónikus allograft nephropatia háttérében álló szövettani elváltozások</i>	10
1.4. <i>Rizikófaktorok</i>	12
1.4.1. <i>Alloantigéntől függő faktorok</i>	13
1.4.2. <i>Alloantigéntől független faktorok</i>	15
1.5. <i>A nem és a nemi hormonok hatása az IR vesekárosodásra és KAN-ra. A folyamatban szerepet játszó mediátorok.</i>	27
1.5.1. <i>A Na⁺/K⁺ ATP-áz (NKA)</i>	28
1.5.2. <i>A hősokk fehérje (HSP) 70-es család</i>	32
1.5.3. <i>A nitrogén monoxid szintázok (NOS)</i>	37
2. Célkitűzések	40
3. Anyagok és módszerek	41
3.1. <i>Nem és nemi hormonok hatásának vizsgálata a renális NOS rendszerre IR-s vesekárosodást követően</i>	41
3.1.1. <i>Kísérleti állatok</i>	41
3.1.2. <i>Műtéti beavatkozás</i>	41
3.1.3. <i>Vizsgálati csoportok</i>	41
3.1.4. <i>Funkcionális mérések</i>	42
3.1.5. <i>Hisztológia</i>	42
3.1.6. <i>Teljes RNS izoláció</i>	42
3.1.7. <i>Reverz-transzkripció</i>	42
3.1.8. <i>PCR reakció</i>	43
3.1.9. <i>Gélelektroforézis</i>	44
3.1.10. <i>Statisztikai analízis</i>	44
3.2. <i>A nem és a nemi hormonok hatásának vizsgálata a vese IR károsodására, a NAK és a HSP72 szerepe</i>	44
3.2.1. <i>Kísérleti állatok</i>	44
3.2.2. <i>Műtéti beavatkozás</i>	44
3.2.3. <i>Kísérleti protokoll</i>	45
3.2.4. <i>Funkcionális mérések</i>	45
3.2.5. <i>Szövettani vizsgálatok</i>	46
3.2.6. <i>RNS izoláció és Reverz-transzkripció</i>	46
3.2.7. <i>Reverz-transzkripció</i>	46
3.2.8. <i>PCR reakció</i>	46
3.2.9. <i>Gélelektroforézis</i>	47
3.2.10. <i>Western Blot</i>	47
3.2.10.1. <i>Minta előkészítés</i>	47
3.2.10.2. <i>Triton X-100 extraktibilitás</i>	47
3.2.10.3. <i>Antitestek és kontrollok</i>	48
3.2.10.4. <i>SDS-PAGE</i>	48
3.2.10.5. <i>Blottolás</i>	48
3.2.10.6. <i>Immunoblottolás</i>	49
3.2.10.7. <i>Detektálás</i>	49
3.2.11. <i>Immunofluorescens vizsgálatok</i>	49
3.2.12. <i>Enzimaktivitás mérése kapcsolt reakcióval</i>	50
3.2.13. <i>Statisztikai analízis</i>	50
3.3. <i>Renális nNOS rendszer vizsgálata</i>	50
3.3.1. <i>Kísérleti állatok</i>	50
3.3.2. <i>Műtéti beavatkozás</i>	51
3.3.3. <i>Kísérleti protokoll</i>	51

3.3.4. Funkcionális paraméterek	52
3.3.5. Szövettani vizsgálatok.....	52
3.3.6. Western blot.....	52
3.3.6.1. Minta előkészítés és Triton-X 100 extraktibilitás.....	52
3.3.6.2. Antitestek és kontrollok.....	53
3.3.6.3. SDS-PAGE, blottolás, immunoblottolás, detektálás	53
3.3.7. NOS aktivitás mérése.....	53
3.3.8. Statisztikai analízis	53
3.4. A nem és a nemi hormonok hatásának vizsgálata az immunszuppresszív kezelésre és a renális NOS rendszerre	54
3.4.1. Kísérleti állatok	54
3.4.2. Műtéti beavatkozás	54
3.4.3. Kísérleti protokoll.....	54
3.4.4. Funkcionális mérések	55
3.4.5. Szövettani vizsgálatok.....	56
3.4.6. Western Blot	56
3.4.7. Statisztikai analízis	56
3.5 Antiinflammatorikus-antioxidáns perfúziós oldat hatása a KAN-ra.....	56
3.5.1. Kísérleti állatok	56
3.5.2. Műtéti beavatkozás	56
3.5.3. Kísérleti csoportok.....	56
3.5.4. Funcionális mérések.....	57
3.5.4. Szövetteni vizsgálatok.....	57
3.5.6. Western-blot analízis	57
3.5.7. NOS aktivitás mérése.....	58
3.5.8. NADPH-függő szuperxid produkció	58
3.5.9. Statisztikai analízis	58
3.6. Restriktív fragmenthossz polimorfizmus (PCR-RFLP) vizsgálatok.....	58
3.6.1. Betegek	58
3.6.2. Immunszuppresszív kezelés	59
3.6.3. Mintavétel és genotipizálás	59
3.6.4. Statisztikai analízis	61
4. Eredmények	62
4.1. Nem és nemi hormonok hatásának vizsgálata a renális NOS rendszerre IR-s vesekárosodást követően.....	62
4.1.1. Funkcionális mérése.....	62
4.1.2. Hisztológia.....	62
4.1.3. iNOS, eNOS és nNOS mRNS expresszió.....	63
4.2. A nem és a nemi hormonok hatásának vizsgálata a vese IR károsodására. A NAK és a HSP72 szerepe.....	66
4.2.1. Nemi különbségek a szérumban BUN, CN, nátrium és kálium értékekben renális IR károsodást követően.....	66
4.2.2. Nemi különbségek a NKA működésében renális IR károsodást követően.....	68
4.2.2.1. Nemi különbségek a szövettani károsodás mértékében renális IR károsodás előtt és 2 illetve 16 órával az ischémiázás után	68
4.2.2.2. Nemi különbségek a NKA α_1 és β_1 alegységének mRNS expressziójában renális IR károsodást követően	69
4.2.2.3. Nemi különbségek a NKA α_1 és β_1 alegység fehérje expressziójában és lokalizációjában renális IR károsodást követően.....	71
4.2.2.4. Nemi különbségek a NKA β_1 alegység fehérje expressziójában és lokalizációjában renális IR károsodást követően.....	74
4.2.2.5. Nemi különbségek a NKA enzimaktivitásában.....	75
4.2.3. Nemi különbségek a HSP72 expressziójában renális IR károsodást követően.....	77
4.2.3.1. Nemi különbségek a HSP72 mRNS expressziójában	77
4.2.3.2. Nemi különbségek a HSP72 fehérje mennyiségében.....	78
4.2.3.3. Immunfluoreszcens vizsgálatok	79
4.3. A renális nNOS rendszer vizsgálata	80
4.3.1. Funkcionális paraméterek és szövettani elváltozások	80

4.3.2. nNOS expresszió a vesében	80
4.3.3. „In vitro” NOS-aktivitás mérése	82
4.4. A nem és a nemi hormonok hatásának vizsgálata az immunszuppresszív kezelésre és a renális NOS rendszerre	86
4.4.1. Grafttúlélés és funkcionális paraméterek	86
4.4.2. Szöveti elváltozások	89
4.4.3. A vizelet NO _x tartalma	92
4.4.4. eNOS és nNOS fehérje expresszió a vesében.....	92
4.5. Antiinflammatorikus-antioxidáns perfúziós oldat hatása a KAN-ra.....	96
4.5.1. Funkcionális paraméterek	96
4.5.2. Hisztológia.....	96
4.5.3. Western-blot analízis és enzimaktivitás	97
4.5.4. NADPH-függő szuperoxid produkció	98
4.6. Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (PCR-RFLP) vizsgálatok.....	100
4.6.1. eNOS gén polimorfizmus	100
4.6.2. HSPA1A G190C polimorfizmus genotípus eloszlása és allél frekvenciája.....	100
4.6.3. HSPA1B A1267G polimorfizmus genotípus eloszlása és allél frekvenciája	100
4.5.4. Klinikai adatok	102
5. Megbeszélés.....	105
5.1. Nem és nemi hormonok hatásának vizsgálata a renális NOS rendszerre IR-s vesekárosodást követően.....	105
5.2. A nem és a nemi hormonok hatásának vizsgálata a vese IR károsodására. A NAK és a HSP72 szerepe.....	108
5.3. A renális nNOS rendszer vizsgálata	114
5.4. A nem és a nemi hormonok hatásának vizsgálata az immunszuppresszív kezelésre és a renális NOS rendszerre	118
5.5. Antiinflammatorikus-antioxidáns perfúziós oldat hatása a KAN-ra.....	121
5.6. Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (PCR-RFLP) vizsgálatok.....	123
6. Eredmények összefoglalása.....	126
7. Megjelent saját közlemények bibliográfiai adatai	128
7.1. Az OTKA témához szorosan kapcsolódó közlemények	128
7.2. Az OTKA témához szorosan nem kapcsolódó közlemények.....	129
8. Irodalomjegyzék	130

Összefoglalás: A végállapotú veseelégtelenség kezelésének napjainkban leghatékonyabb módja a vesetranszplantáció. Az új immunszuppresszív szerek megjelenése megváltoztatta a transzplantált vesék elvesztésében szerepet játszó okok megoszlását. Míg korábban az akut kilökődés játszotta a legfőbb szerepet a transzplantátumok elvesztésében, addig napjainkra a krónikus allograft nephropatia limitálja a graftok hosszú távú túlélését.

A krónikus allograft nephropatia kiváltó okai alloantigéntől függő és alloantigéntől független faktorok lehetnek. Az akut rejekciós epizódok száma és intenzitása, valamint a hisztokompatibilitás szignifikáns hatással vannak a graft késői funkciójára. Bár ezen alloantigéntől függő faktorok jelentősek, az alloantigéntől független tényezők szerepe is döntő a krónikus allograft nephropatia kialakulásában. A megnyúlt ischémiás időgyulladásos folyamatot indít el, amely fibrotikus elváltozásokat és a mesenchymalis sejtek proliferációját okozza. A donorral kapcsolatos faktorok, úgy, mint az agyhalál, működő nephronok száma, életkor és a nem bizonyítottan befolyásolják a késői graftműködést. A transzplantáció után fellépő komplikációk, mint hipertónia, metabolikus faktorok és vírusfertőzések fellépése szintén hozzájárulnak a vese funkciójának progresszív romlásához. Az alkalmazott immunszuppresszív szerek közül a cyclosporin A és a tacrolimus a vesében vazokonstrikció kialakulásához és így a glomeruláris filtrációs ráta csökkenéséhez vezet. A non-compliance pedig az egyik legfontosabb rizikófaktor a krónikus allograft nephropatia kialakulásában.

Függetlenül a kiváltó októl, a krónikus allograft nephropatia pathomechanizmusa minden esetben hasonló. A felsorolt faktorok az endotélium károsodását okozzák, amely citokinek és növekedési faktorok kiválasztásán keresztül proliferatív folyamatokat indít és a graft fibrózisához vezet.

Jelen munka összefoglalja a jelenleg ismert rizikófaktorokat és azok hatását a hosszú távú graftműködésre.

Kulcsszavak: veseátültetés, krónikus allograft nephropatia, rizikófaktorok

Causes of late renal allograft dysfunction

Summary: Renal transplantation is now established as the therapy of choice for end-stage renal failure. The causes of renal allograft loss have changed with the introduction of new immunosuppressive agents. In the pioneer era of transplantation most renal allografts were lost during the first year after transplantation due to acute rejection episodes. Nowadays, chronic allograft nephropathy became the leading cause of longterm graft loss.

The causes of chronic allograft nephropathy can be divided into alloantigen-dependent and alloantigen-independent factors. Acute rejection episodes and histoincompatibility have a significant influence on late graft function. Although alloantigen-related injury is of major importance, alloantigen-independent factors also play a significant role in the progression of chronic allograft nephropathy. Prolonged ischemia time leads to induction of inflammation, resulting in fibrotic scarring and proliferation of mesenchymal cells. Donor related factors such as donor brain death, age, nephron number and gender have a definite impact on late allograft function. Posttransplant complications such as hypertension, metabolic factors and viral infections contribute to accelerated deterioration of the functional units of the kidney. Immunosuppressive therapeutic agents such as cyclosporine A and tacrolimus cause vasoconstriction resulting in decreased glomerular filtration rate. Moreover, non-compliance is one of the most important risk factor for chronic allograft nephropathy.

Regardless of the cause of the initial injury the pathophysiology of chronic allograft nephropathy seems to be the same. All these factors mentioned above induce endothelial injury, which leads to increased expression of cytokines and growth factors resulting in proliferative processes, remodelling and scarring of the graft.

This work reviews current knowledge about risk factors and their effect on long-term renal allograft function.

Key words: renal transplantation, chronic allograft nephropathy, risk factors

Rövidítések jegyzéke:

A: Abláció

ACE: Angiotenzin convertáló enzim

AI: Abláció/infarcteráció

ARF: Akut veseelégtelenség

Aza: Azathioprin

CMV: Cytomegalovírus

CsA: Cyclosporin A

CRF: Krónikus vesebetegség

eNOS: endoteliális nitrogén monoxid szintáz

ESRD: Végállapotú vesebetegség

ET-1: Endotelin-1

GFR: Glomeruláris filtrációs ráta

HLA: Human leukocita antigén

ICAM-1: Intercelluláris adhéziós molekula-1

IGF: Inzulinszerű növekedési factor

iNOS: indukálható nitrogén monoxid szintáz

IR: Ischémia/reperfúzió

KAD: Krónikus allograft diszfunkció

KAN: Krónikus allograft nephropatia

KR: Krónikus rejekeció

MAP: Artériás középnyomás

MHC: Fő hisztokompatibilitási complex

MMF: Mycofenolát mofetil

NKA: Na⁺/K⁺ ATPase

nNOS: Neuronális nitrogén monoxid szintáz

NO: Nitrogén monoxid

NOS: Nitrogén monoxid szintáz

PRA: Panel-reaktív antitest

PCR: Polymerase lánreakció

PDGF-A: Thrombocita eredetű növekedési faktor-A

RAPA: Rapamycin vagy Sirolimus

RBR: Vese vérátáramlás

RVR: Renális vaszkuláris rezisztencia

Tac: Tacrolimus

TGF: Tubuloglomeruláris feedback

TGF-β1: Transzformáló növekedési faktor-β1

VCAM-1: Vaszkuláris adhéziós molekula-1

1. Bevezetés

1974 és 1984 között a cadaver donorokból származó átültetett vesék 58%-a, a rokonból származó élő-donor vesék 75%-a és a genetikailag azonos egypetűjű ikrekből származó vesék 90%-a élte túl az első évet. Tíz évvel később a cyclosporin (CsA) terápia elterjedésével a cadaver donorokból származó vesék 1 éves túlélése 90%, míg az élő-donorból származó graftok 1 éves túlélése 95% fölé emelkedett (1). Az 1 éves túlélésben tapasztalt javulás ellenére a cadaverből származó graftok féléletidejében alig következett be változás. Újabb adatok alapján a cadaverből származó vesék féléletideje 7,9 évről 13,8 évre emelkedett, de ez a növekedés nem volt összefüggésbe hozható az immunszuppresszív terápiában bekövetkezett változásokkal (2). Ezzel párhuzamosan az élő-donorból származó graftok féléletideje 12,7 évről 21,6 évre emelkedett, de itt sem volt kimutatható kapcsolat az immunszuppresszív kezelés és a hosszú távú grafttúlélés között. Európai adatok pedig összesen 1,9 év javulásról számoltak be a cadaver donorok esetén (3). Kísérletes munkánkban mi sem találtunk eltérést a CsA és a korábban használt azathioprin (Aza) terápia hatásában a hosszú távú grafttúlélésre a krónikus allograft nephropatia (KAN) állatmodelljében (4).

Mind a hazai, mind a külföldi adatok azt igazolták, hogy a veseátültetés a betegek számára előnyös, hosszabb életutat és jobb életminőséget biztosít, mint a dialízis, és annál lényegesen olcsóbb a társadalom és a biztosító számára (5, 6). Ennek hatására a veseátültetésre váró betegek száma mindenütt a világon növekszik. Ez alól Magyarország kivétel. Magyarországon csak a dializáltak száma emelkedik, azonban évek óta sem a veseátültetések, sem a várólistán lévő betegek száma nem növekedett. Magyarországon 2000-ben 5097 krónikus vesebeteget tartottak nyilván. Ezek közül 704 elhalálozott. A végállapotú vesebetegek közül 256-nál végeztek veseátültetést. Ezzel az összes transzplantált vesével élő beteg száma 1568 volt. 2004-ben 5200 dializált közül csupán 22%-a vár veseátültetésre. Ez az aránytalanság annál is inkább érdekes, mert a középkorúaknak is (20-60 év között) is csak a fele vár veseátültetésre. Figyelembe véve a Magyarországon is elért 90% feletti 1 éves túlélést, látható, hogy a transzplantált betegeknél a jelenleg is megoldásra váró probléma a graftok hosszú távú működésének megóvása, illetve meghosszabbítása (Prof. Dr. Járny Jenő adatai alapján).

1.1. Krónikus kilökődés, krónikus allograft nephropatia vagy krónikus allograft diszfunkció?

Ahhoz, hogy a vesetranszplantátumok hosszú távú működéséről beszélhessünk, tisztázni kell néhány terminológiai alapfogalmat. Az irodalmat olvasva három terminust találunk a graftok hosszú távú működésével kapcsolatban: 1. Krónikus rejekció (KR) vagy kilökődés, 2. Krónikus allograft nephropatia, 3. Krónikus allograft diszfunkció (KAD). Sajnos a három fogalmat sokszor egymást helyettesítve használják, még a témában jártas szakemberek is. Ennek magyarázata, hogy egészen az utóbbi évekig csak a krónikus rejekció meghatározást használtuk és a másik kettő csak néhány éve került bevezetésre. A megkülönböztetés, azonban igen fontos a folyamat jobb megértése szempontjából. Mi is tehát a különbség közöttük? A krónikus rejekció egy immunológiai folyamatot jelent, amely a graft állományának pusztulásához vezet. A krónikus rejekció tehát az alloantigéntől-függő immunválasz neve, amely hosszútávon krónikus allograft nephropathiához vezethet. A krónikus allograft nephropatia egy szövettani diagnózis, míg a krónikus allograft diszfunkció a graft funkcionális paramétereinek romlását jelzi. Így érthető, hogy a krónikus allograft diszfunkció mindig krónikus allograft nephropathiával jár, hiszen a funkcionális paraméterek romlásának (szérum kreatinin szint emelkedés, proteinuria növekedés) hátterében mindig szövettani elváltozást találunk. Ezzel szemben a szövettani elváltozások még sokáig rejtve maradhatnak a funkcionális paraméterek állandósága mellett. Így krónikus allograft nephropatia nem mindig jár krónikus allograft diszfunkcióval (7). Tekintettel arra, hogy a krónikus allograft nephropatia az általunk vizsgált folyamatra specifikus szövettani eltéréseket jelöli, amelyek a későbbiekben funkcionális elváltozáshoz is vezetnek, míg a krónikus allograft diszfunkció hátterében egyéb, pl. az alapbetegség kiújulása, gyógyszer okozta nephrotoxicitás következtében létrejövő morfológiai eltérés is állhat. A továbbiakban tehát a krónikus allograft nephropathiáról lesz szó.

1.2. A krónikus allograft nephropatia klinikai képe

Klinikailag a KAN-t a vesetranszplantátum működésének progresszív beszűkülése jellemzi. Míg egyes vizsgálatok a kreatinin clearance folyamatos csökkenését mutatták (8), mások nem tudtak szabályszerűséget kimutatni a kreatinin clearance változása és a progresszió lefutása között (9).

Proteinuria és hipertónia gyakran társulnak a folyamathoz. Általánosságban elfogadott, hogy a fehérjeürítés megjelenése a háttérben zajló KAN-ra hívja fel a figyelmet. A

fehérjeürítés mennyisége általában napi 1-2 g között mozog (10, 11), és csak ritkán éri el a nephrosusra jellemző magas értéket, mely ilyenkor a transzplantátumot érintő súlyos glomerulopathia eredménye (12). A KAN másik gyakori velejárója a hipertónia. A magasvérnyomás súlyossága és a graft funkcionális, valamint szövettani elváltozásai között is szoros összefüggést mutattak ki (13, 14).

1.3. A krónikus allograft nephropatia háttérében álló szövettani elváltozások

A szövettani eltérések nem specifikusak. Jellemző az arteriosclerosis, a glomeruláris laesio és sclerosis, a peritubuláris kapillárisok falának megvastagodása, interstitialis fibrosis, valamint tubuláris atrophia (15, 16). A graftot érintő arteriosclerosis koncentrikus intima megvastagodással jár, az artériákat és arteriolákat kiterjedten érinti. Mindezt gyakran az érfal makrofágokkal, lymphocytákkal és kis mértékben habos sejtekkel történő infiltrációja kíséri. Az intima megvastagodását a myofibroblastok mediából történő migrációja és lokális proliferációja, illetve extracelluláris mátrixfehérjék lerakódása okozza (17).

A glomeruláris elváltozások a glomeruláris erek kollapszusával, glomeruláris hipertrofiával, a mesangiális mátrix kiszélesedésével és fokális glomerulosclerosisokkal jellemezhetőek (18, 19). Immunfluorescens vizsgálatok kimutatták, hogy a krónikus kilökődést mutató graftokban immunglobulinok rakódnak le, melyeknek eloszlása azonban nem specifikus. Egyes esetekben lineáris IgG depozitumok mutathatók ki a glomeruláris bazálmembrán mentén, illetve granuláris IgG vagy IgA depozitumok láthatók a kapillárisok perifériáján (20).

Elektronmikroszkóppal a bazálmembránban és a mesangiumban elektrodenz depozitumok lerakódása figyelhető meg. Immunhisztokémiai módszerekkel tenascin, fibronectin és IV. típusú kollagén felszaporodása észlelhető a perifériás glomeruláris térben. Ezen molekuláknak a szöveti remodellingben van fontos szerepük, és számos vesebetegségben megtalálhatóak (21).

Iványi munkája jelentősen hozzájárult az utóbbi néhány évben a szövettani vizsgálat alapján történő diagnózis pontosításához (22). Az általa leírt szövettani eltérések segítenek a KAN-t elkülöníteni az immunológiailag aktív KR folyamatától, amely jelentős segítséget ad a kezelés tervezésében. Vizsgálatai során megállapította, hogy ultrastrukturális változások a kapillárisokban (kapillaropathia) és a glomerulusokban (glomerulopathia) a KR diagnózisát biztossá tehetik. Az ultrastrukturális elváltozások elektromikroszkóppal analizálhatóak és a kapillárisok esetében a peritubuláris kapillárisok megvastagodását és fenesztráltságuk

elvesztését jelenti, míg a glomerulusok esetében a bazálmembrán lamina densa területe és a glomeruláris kapilláris endotélium között subendotéliálisan megjelenő réteg válik láthatóvá (23).

Az utóbbi években a transzplantációs glomerulopathia és így a KR diagnózisát segíti a C4d depozitumok kimutatása a graftbiopsziában (24). A C4d, a komplement rendszer C4 elemének egyik degradációs terméke, a késői graftbiopsziák 34%-ban volt kimutatható (25). A KR egyéb jeleit mutató szövettani mintákban azonban 61%-ban volt jelen a peritubuláris kapillárisok körül (25). A C4d nemcsak a KR szövettani markere, hanem egyes vizsgálatok alapján független prediktora mind az 1 éves, mind a késői graft túlélésnek (26). További segítséget jelent az utóbbi időben megjelent új antitestek használata a C4d ellen, amelyek segítségével paraffinba ágyazott metszetekből is kimutatható a C4d depozitum. Ezek a vizsgálatok nemcsak a peritubuláris kapillárisok mellett, hanem a glomerulusokban is igazolták a C4d jelenlétét. A graftbiopsziák mindössze 16%-ban sikerült glomeruláris C4d-t kimutatni, a KR-s szövettani mintáknak azonban döntő többségében megtalálható volt (27). Összefoglalva a C4d további segítséget nyújt a patológusoknak a pontos szövettani diagnózis felállításában.

Számos nemzetközi rendezvényen dolgoztak ki ajánlásokat a transzplantátumok krónikus kilökődésekor észlelt szövettani elváltozások standardizálásához. A cél az volt, hogy egy objektív, reprodukálható pontrendszert állítsanak fel a nemzetközi klinikai tanulmányok, az új immunszuppresszív szerek és a terápia eredményességének a megítéléséhez.

A Banff séma (28) az interstitialis fibrosis, a tubulus atrophia, a mesangiális mátrix proliferáció, a glomerulopathia és az intima proliferáció megjelenése és súlyossága alapján állapítja meg a krónikus kilökődés mértékét. A közelmúltban a Banff-klasszifikáció mellett egy újabb egyszerűsített értékelési rendszert vezettek be, amely a CCTT (Cooperative Clinical Trials in Transplantation) nevet viseli (29). Egy harmadik, szintén újabban használt és egyre jobban terjedő pontrendszer a CADI (chronic allograft damage index) (30, 31). Mindhárom értékelési rendszer objektivitása és a másik kettővel való összehasonlíthatósága sokat vitatott, de tény az, hogy a krónikus kilökődés pontos diagnózisának mindmáig egyetlen lehetősége a szövettani vizsgálat.

Külön problémát jelent még gyakorlott hisztopatológusok számára is a KAN és a gyógyszer toxicitás (elsősorban calcineurin inhibitor CsA vagy tacrolimus (Tac)) okozta nephropatia elkülönítése. Ez utóbbira ugyanis hasonló elváltozások jellemzőek. Egyetlen eltérés, hogy a vascularis elváltozások szinte kizárólag az arteriolákon láthatók, míg a KAN esetén a többi ér is érintett. Az elkülönítés így a korai szakban még egyszerűbb, később

azonban, amikor a gyógyszer okozta nephrotoxicitás krónikus rejeckcióval is szövődik az elkülönítés nagyon nehéz (32). Egy másik problémát a hipertónia okozta, krónikus szövettani eltérések jelenthetnek. A pontos szövettani diagnózis nagyon fontos a kezelés szempontjából, hiszen az immunszuppresszív gyógyszerek okozta nephrotoxicitás esetén a dózis csökkentésére vagy a terápia megváltoztatására lehet szükség, míg KAN diagnózisakor éppen ellenkezőleg, a dózis növelésére, esetleg új szerek bevezetésére kényszerülhetünk. A hipertónia okozta elváltozások, pedig erőteljesebb antihipertenzív kezelést sürgethetnek.

1.4. Rizikófaktorok

Több éven keresztül a krónikus graftvesztéshez vezető folyamatot kizárólag az alloantigén által keltett és fenntartott immunmechanizmusnak tartották, és krónikus kilökődésnek nevezték. Újabb vizsgálatok igazolták, hogy az alloantigéntől független faktorok is fontos szerepet játszanak a folyamat létrejöttében, vagy felgyorsulásában (33). Az alloantigéntől függő, illetve az alloantigéntől független tényezők gyakran összekapcsolódnak, így az egyes tényezők önálló jelentőségét nehéz megbecsülni. A graft károsodását mind az alloantigéntől függő, mind az alloantigéntől független hatások esetében immunfolyamatok okozzák. A következőkben a legfontosabb alloantigéntől függő, illetve alloantigéntől független rizikófaktorok kerülnek áttekintésre (1. táblázat).

I. Alloantigéntől függő faktorok
1. Hisztóinkompatibilitás
2. Akut rejekciók száma és intenzitása
3. Szenzitizáció
II. Alloantigéntől független faktorok
1. Ischémia (hideg/meleg)/reperfúziós károsodás
2. Agyhalál hatása a donor vesére
3. Non-compliance, immunszuppresszív terápia, gyógyszer toxicitás
4. Metabolikus faktorok (hiperlipidémia, diabetes mellitus)
5. Hipertónia
6. Infekciók
7. Működő nephronszám csökkenése, hiperfiltráció
8. Életkor
9. Nem

1. táblázat. A KAN rizikófaktorai

1.4.1. Alloantigéntől függő faktorok

1. Hisztóinkompatibilitás

A legmeggyőzőbb érv a krónikus kilökődés immunológiai eredetére az a tény, hogy a legjobb hosszú távú graftműködést egyiptejű ikrek közötti transzplantáció esetén lehet kimutatni. A HLA-identikus donoroktól származó transzplantátumok biopsziás vizsgálata 2 évvel a transzplantációt követően sem mutatott kilökődésre utaló eltérést (34). Igazolták továbbá, hogy minél nagyobb a különbség a HLA-molekulák között, annál rövidebb a graft várható élettartama (35). Feltehető, hogy a HLA inkompatibilitás folyamatos, szubklinikai immunvédekezést generál a beültetett szervvel szemben. Már egy HLA-DR fehérjében regisztrált eltérés is az esetek 82 %-ában in vitro T sejt proliferációt okoz ezen peptidek ellen, szemben az inkompatibilitást nem mutató esetekben észlelt 8 %-kal. Hasonlóan, anti-HLA antitestek megjelenése a transzplantáció után fokozott rizikót jelent a krónikus kilökődés szempontjából (36).

2. Akut rejekciók száma és intenzitása

A korai kilökődés egyik meghatározó faktora a graftok hosszú távú túlélésének. Ezt mutatja, hogy a beültetett vese várható féléletideje kb. a felére csökken, ha akut rejekciót

szenved el. Nem minden akut rejeckió vezet azonban a KAN-hoz vagy krónikus rejeckióhoz. Fontos szerepe van az akut rejeckiók típusának, számának, intenzitásának és a transzplantáció óta eltelt időnek. Az akut vaszkuláris rejeckió sokkal rosszabb kimenetellel jár mint az akut tubulointersticiális kilökődés. A Tac alapú immunszuppresszív terápiaiban részesülő egyéneknél a vaszkuláris akut rejeckió volt a legfontosabb prognosztikai faktor a graftok középtávú túlélését illetően.

Azokban a betegekben, ahol az akut rejeckió lezajlása után a graftműködés a kilökődés előtti szintre nem állt vissza, a hosszú távon történő graftvesztés szignifikánsan nagyobb volt azokhoz képest, ahol teljes funkcionális restitúció alakult ki. Bár önmagában egy akut rejeckió epizód is csökkenti a túlélést, ismétlődő rejeckiók esetén a graftok túlélésének aránya szignifikánsan alacsonyabb (37). Az akut kilökődés száma mellett annak intenzitása is fontos szerepet játszik a graftműködés hosszú távú alakulásában. Azokban a recipiensekben, akiknél az akut rejeckió enyhe volt (kisfokú akut tubuláris intersticiális exsudatum, vaszkuláris érintettség nélkül, GFR csökkenés <50%) megfelelő kezelés mellett a túlélés nem különbözött szignifikánsan azoktól, akiknél soha nem volt akut kilökődési reakció (37). Végül az akut rejeckió időbeli fellépése is fontos jelentőséggel bírhat. Egyes tanulmányok szerint a transzplantáció után 3 hónapon belül fellépő rejeckió epizódok nem, vagy alig befolyásolják a graft hosszú távú működését. Ezzel szemben a transzplantációt követő 3-6 hónap közötti időszakban kialakuló akut kilökődési reakció jelenti az egyik legnagyobb veszélyt a graftvesztés szempontjából. Joosten és mtsai a 10 éves grafttúlélést vizsgálták az akut rejeckió epizódok fellépésének függvényében. Adataik alapján az akut rejeckió nélküli betegek graft túlélése 94%, a korai akut rejeckiót elszenvedetteké 86%, míg a késői akut rejeckiót átélteké mindössze 46% volt (24).

Amennyiben elfogadjuk, hogy az akut kilökődés a transzplantátum túlélését befolyásoló tényező, úgy érdekes kérdéseket vet fel, hogy az akut kilökődési folyamatok kezelésének fejlődése mellett, miért nem csökkent a krónikus kilökődések száma és miért nem változott a graftok hosszú távú túlélése. A valószínű válasz az, hogy ugyan mindkét folyamat alapja a fokozott immunválasz, de a pathomechanizmus mégsem egyezik meg teljesen. Azáltal, hogy az immunszuppresszív szerek segítségével beavatkozunk az akut kilökődés folyamatába még nem biztos, hogy sikerül befolyásolni a krónikus kilökődéshez vezető, de részben eltérő immunológiai választ. Egy másik magyarázat szerint az akut kilökődés immunmoduláló hatásának van szerepe a folyamatban. Azokban a recipiensekben, akiknél a donor antigénjeire csökkent válasz fejlődött ki, nem változott a graft túlélése.

3. Szenzitizáció

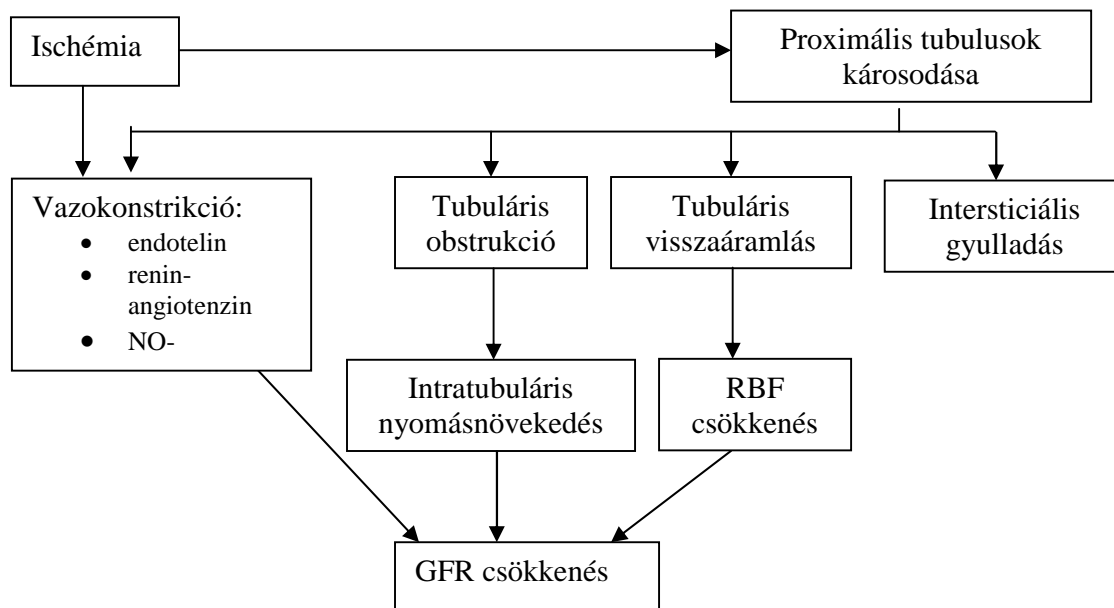
Elsősorban a terhesség, a transzfúziók és a kilöködött graftok kapcsán kialakuló HLA ellenes antitestek vizsgálata segíthet az immunválasz erősségének kiszámításában. Az utóbbi években a humán rekombináns erythropoietin használatának elterjedésével a transzfúziók száma jelentősen csökkent és ez a panel-reaktív antitestek (PRA) előfordulását is jelentősen redukálta (2, 38). A PRA jelentőségét mutatja az a tény, hogy azonos HLA különbség ellenére, szenzitizált betegekben a graft hosszú távú túlélése jelentősen csökken (39). Különösen nagy a rizikó ott, ahol mind a HLA I., mind a HLA II. osztály ellen kialakulnak antitestek (40). További fontos tényező, hogy a transzplantációt követően „de-novo” is kialakulhatnak HLA ellenes antitestek, amelyek tovább rontják a túlélés esélyeit (41).

1.4.2. Alloantigéntől független faktorok

1. Ischémia/reperfúziós (IR) károsodás

A transzplantátum-működés beindulásának késése, illetve a graft kezdeti funkciójának csökkenése növeli a beültetett szervek késői elvesztésének az esélyét (42, 43), sőt ez lehet az egyik fő faktor a krónikus graftvesztés folyamatában.

Fiziológiás körülmények között a perctérfogat 20- 25%-a a vesébe áramlik, nagyobb része a kortexbe, kisebb része a medullába. A medulla külső részében mért oxigénnyomás a vese többi részénél jelentősen alacsonyabb, így ez a régió élettani körülmények között is alacsonyabb oxigén ellátottságú (44). Figyelembe véve, hogy az oxigén- és energiaigényes transzportfolyamatok jelentős része a medullában zajlik, érthető, hogy miért olyan érzékeny ez a terület a renális véráramlás (RBF) kismértékű változásaira is. A donor szerv kivételét követő ischémia során az oxigénhiány intrarenális hemodinamikai változásokhoz, illetve a tubulussejtek ischémiás és toxikus károsodásához vezet. Ezek a tényezők együttesen intrarenális vazokonstriktiót, a glomeruláris filtrációs nyomás csökkenését, tubuláris obstrukciót és intersticiális aszpecifikus gyulladást okozva, a GFR gyors és nagymértékű csökkenését eredményezik (1. ábra).

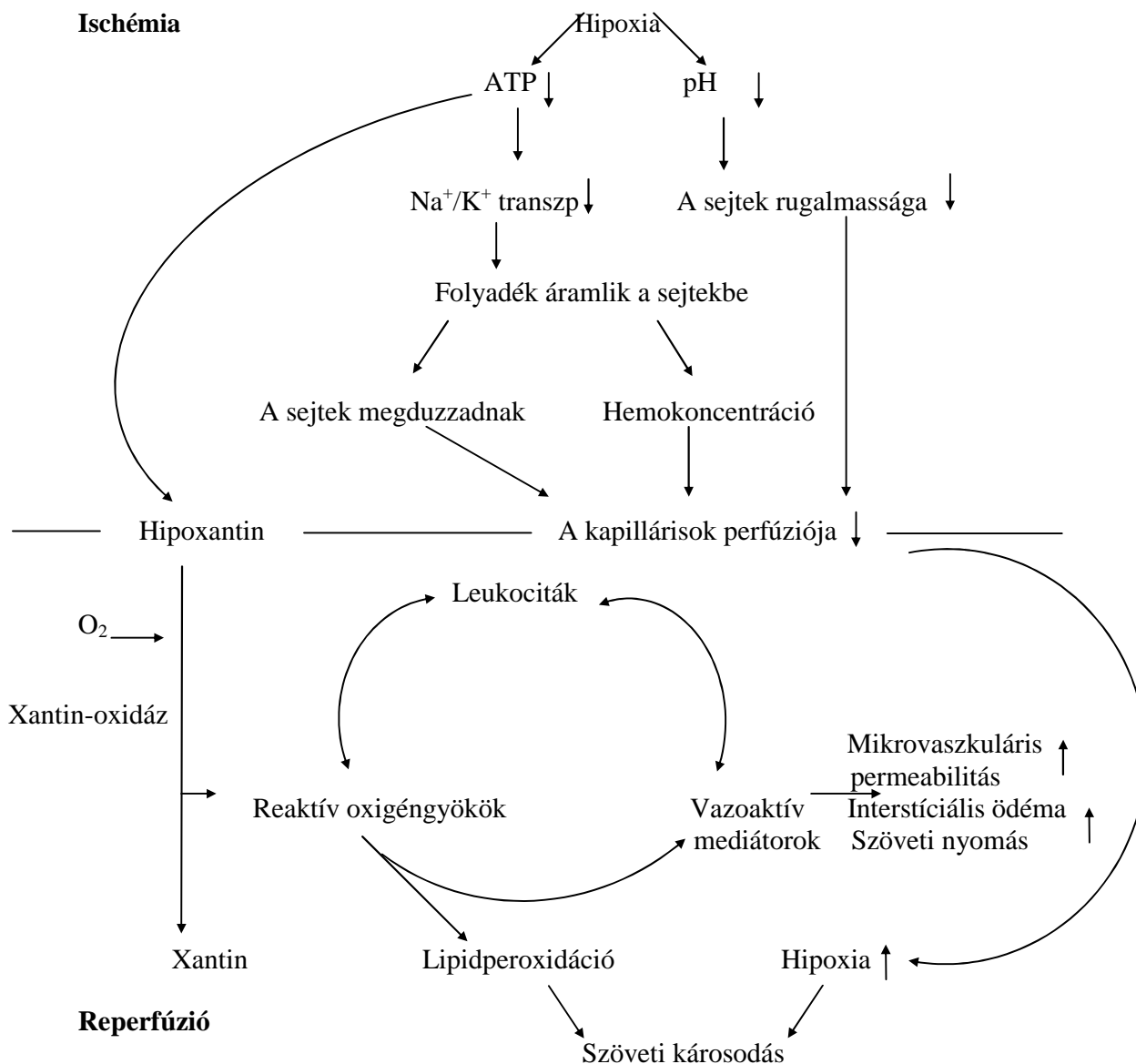


1. ábra. Az ischémiás vesekárosodás patofiziológiai folyamatai

Az ischémiás periódusban a sejtek ATP raktárai kimerülnek, ez az ATP igényes folyamatok csökkenéséhez illetve leállításához (membrántranszport folyamatok, protein szintézis, lipogenezis) vezet. Az ATP szint csökkenéssel párhuzamosan nő az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció. A transzportfolyamatok gátlása Na^+ retenciót és következményes vízbeáramlást okoz, ami az endotélsejtek duzzadását eredményezi. Az intracelluláris tér megnövekedett víztartalma és az endotélsejtek duzzadása lokális hemokoncentrációhoz, fokozott viszkozitáshoz és a hemodinamikai viszonyok megváltozásához vezet. A kapilláris keringést tovább rontja a vér sejtjes elemeinek acidózis okozta csökkent rugalmassága. Ezek a változások együttesen akár a kapillárisáramlás megszűnését is okozhatják (45).

Az ischémia okozta szöveti károsodás mértéke függ az ischémiás periódus hosszától és az azt követő reperfúziótól. A reperfúzió ugyan elengedhetetlen az ischémiás szövetek túlélése szempontjából, paradox módon mégis súlyosbítja a szöveti károsodást, ugyanis a reperfúzió során keletkező reaktív oxigéngyökök lipidperoxidációt, DNS-degradációt illetve a poliszacharid-depolimerizáció növekedését okozzák. A kezdeti ischémiás károsodást tehát, a reperfúzió okozta károsodás követi (46). Míg az ischémiás periódus főként a kapillárisok vérátáramlását csökkenti, addig a reperfúziós károsodás során elsősorban az endotél sérülése dominál. A sérülés miatt felszabaduló lokális vazokonstriktor ágensek (pl. endotelin), illetve a leukociták aktivációja és a posztkapilláris venulák endotéljéhez való

kitapadása az endotél integritásának megszűnéséhez és a plazma makromolekuláinak extravazációjához vezet (47). A reaktív oxigéngyökök aktiválják a leukocitákat (neutrofil granulocitákat) és a trombocitákat. Az oxigéngyökök keletkezéséért elsősorban a xantin-oxidáz enzim tehető felelőssé. Az enzim a hipoxantint oxigén segítségével xantinná alakítja, miközben reaktív oxigéngyökök keletkeznek. Az ischémia hatására az enzim indukálódik, emellett szubsztrátja, az ADP-degradáció végterméke, a hipoxantin is felszaporodik. A reperfüzió során fellépő „oxigéndömping” hatására az enzim működése megindul, a molekuláris oxigénből reaktív oxigéngyökök képződnek. Olyan enzimről van tehát szó, melynek egyik szubsztrátját (hipoxantin) az ischémia, a másikat (O_2) pedig a reperfüzió szolgáltatja (48, 49). Az aktivált leukociták további oxidánsokat és mediátorokat szabadítanak fel (platelet activating factor, citokinek, hisztamin). Az IR károsodás által aktivált oxigéngyökök, leukociták, trombociták és a felszabaduló mediátorok circulus vitiosus-t alkotnak, tovább csökkentve az endotél integritását és fokozva az intersticiális ödémát és gyulladást (2.ábra). Tekintettel arra, hogy az IR károsodás szükségszerű velejárója a transzplantációnak, ezt a rizikófaktort kiküszöbölni nem tudjuk. A károsodás csökkentésére különböző összetételű perfúziós folyadékokat használnak, amellyel a donor vesét perfundálják a beültetés előtt. Napjaink transzplantációs kutatásainak egyik központi témája azon szerek felkutatása, amelyekkel az IR károsodás csökkenthető. Ezen szerek közül a legnagyobb figyelem a különböző antioxidánsok hatásának vizsgálatára irányul.



2. ábra. Az IR károsodás patomechanizmusa

2. Agyhalál hatása a donor vesére

Évtizedek óta ismert tény, hogy az élő-donor transzplantáció esetén hosszabb grafttúléléssel számolhatunk, mint cadaver donor esetén. Ezt a megfigyelést egyszerűen az élő, rokon donor esetén meglévő nagyobb genetikai azonossággal és a szükségszerűen rövidebb ischémiás idővel magyarázták. Az utóbbi években, az élő de nem rokon donorok számának növekedésével kiderült azonban, hogy az élő-donor transzplantáció függetlenül a genetikai különbségtől jobb hosszú távú graftműködéssel jár. Ezt a cadaver és élő-donor transzplantáció között fennálló diszkrepanciát önmagában az ischémiás károsodással nem lehetett magyarázni. Számos donorral kapcsolatos faktor vizsgálatát követően vetődött fel a

lehetőség, hogy a cadaver donoroknál beállt agyhalál és ennek szisztémás hatásai lennének részben felelősek a cadaver graftok rosszabb funkciójáért (50). Egyik mechanizmus, amellyel az agyhalál a hosszú távú graftműködés romlásához vezet, a központi idegrendszert érő katasztrófa következtében bekövetkező, az egész szervezetre kiterjedő gyulladós folyamat, amely a beültetendő szervben olyan elváltozásokat indít el, amelyek megnövelik a recipiensben kialakuló immunválaszt. A krónikus allograft nephropatia állatmodelljén sikerült igazolni, hogy az agyhalál, függetlenül egyéb faktoroktól beindít egy gyulladós folyamatot, amely során a donor szervben megnövekszik az immunsejtek száma, megnő a gyulladós mediátorok expressziója, sőt a krónikus folyamatok kialakulásában fontos szerepet játszó növekedési faktorok képződése is (51). Mindezen vizsgálatok azt mutatták, hogy az agyhalál során már a kivétel előtt károsodás indul meg a beültetésre szánt szervekben és ez egy dinamikus folyamat, amely az agyhalál fennállásának hosszától jelentős mértékben függ. Úgy tűnik tehát, hogy az agyhalott donor kezelésének pontos megtervezésével, új szerek bevezetésével javíthatunk a graftok rövid és hosszú távú működésén. A kérdés azonban természetesen nem ennyire egyszerű, hiszen számos etikai kérdést és problémát kell tisztázni, amíg minde erre sor kerülhet.

3. Non-compliance, immunszuppresszív terápia, gyógyszer toxicitás

A betegek együttműködésének hiánya az egyik legfontosabb és nehezen befolyásolható oka a poszttranszplantációs terápia sikertelenségének. Egyes tanulmányok szerint a non-compliance a graftok elvesztésének 8-40%-ában lehet felelős (52). A háttérben részben a beteg személyiségéből adódó okok, részben a betegség és annak kezelése során szerzett negatív tapasztalatok és érzelmek állnak. Érdeemes azonban elgondolkodni azon is, hogy a minél jobb eredmény érdekében egyre nagyobb mennyiségű gyógyszer elfogyasztására kényszerítjük a betegeket, akik egy részénél egyfajta dacreakciót kiváltva non-compliance-hez vezet a túlzott gyógyszerelés. Nagyon fontos ezért a krónikus betegek és így a transzplantáltak életvezetésénél a pszichológus segítsége is. További segítség lehet olyan társaságok létrehozása, amelyben a hasonló problémával küzdő emberek találkozhatnak, beszélhetik meg kérdéseiket, adhatnak tanácsot egymásnak az életvezetéssel kapcsolatban és kérhetnek segítséget hozzáértő szakemberektől. Magyarországon a transzplantáltak számára jól szervezett egyesület működik, ahol a fenti problémákon kívül a szabadidő értelmes és megfelelő eltöltésében is segítenek.

A transzplantációt követő immunszuppresszív terápia mellékhatásai befolyásolhatják a KAN kialakulását. Az immunszuppresszív szerek közül leggyakrabban alkalmazott CsA és

a vele rokon vegyület Tac, a citokinek, eikozanoidok és endotelin felszabadításán keresztül vazokonstriktiót okoznak. Ennek hatására lecsökken a GFR, ami a vese kiválasztó funkciójának károsodásához vezet. Emellett mindkét szer közvetlen endotél és simaizom sejt károsító hatással is rendelkezik (53). A CsA és a Tac ugyanakkor indukálja a transzformáló növekedési faktor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) szintézisét, fibroblaszt proliferációt idézve elő (54).

Az újabb immunszuppresszív szerek közül a mycophenolát mofetil (MMF) a vírusinfekciók számának növekedésével, a gastrointestinalis mellékhatások növekedésével, a rapamycin (RAPA) pedig a metabolikus funkciók rontásával okozhatnak graftvesztést.

A szteroid kezelés mellékhatásai – diabetes, hipertónia kialakulása – szintén jól ismertek.

A gyógyszerek toxikus hatásaitól való félelem azonban e szerek aluldozírozásához és ezzel az akut rejekciók kialakulásához vezethet. Segítség a gyógyszerek szintjének és a graftfunkciónak a folyamatos monitorozása, amely erre felkészült centrumokban folyik.

4. Metabolikus faktorok (hiperlipidémia, diabetes mellitus)

A kardiovaszkuláris rizikófaktorok hatása a transzplantált betegeknél még fokozottabban jelentkezik. A vesetranszplantált betegek vizsgálata azt mutatja, hogy a metabolikus faktorok és a hipertónia nemcsak a graft elvesztését okozhatja, de a transzplantáció után működő graffal való elhalálozás több mint feléért is ezek a faktorok és az általuk okozott kardiovaszkuláris megbetegedések a felelősek.

A metabolikus zavarok háttérében részben az immunszuppresszív szerek mellékhatása, részben a kialakuló KAN és krónikus veseelégtelenség áll.

A transzplantáltaknál észlelhető kóros lipidszintek és diszlipidémia alapján felvetődött, hogy a zsírsanyagcsere elváltozásai szerepet játszhatnak a KAN során észlelt graft arteriosclerosis kialakulásában (55, 56, 57). Állatkísérletekben alkalmazott magas koleszterin tartalmú diéta a transzplantált vese funkciójának progresszív romlásához és krónikus kilökődéshez vezetett. Klinikai megfigyelések korrelációt mutattak ki a szérumban koleszterin- és triglicerid-szintek valamint a szövettani elváltozások között (58). A koleszterinszegény diéta szignifikánsan megnövelte a graft életidejét (59). Alacsony lipidszintek a transzplantációt megelőzően, illetve azt követően szignifikánsan hosszabb grafttúlélést tettek lehetővé (60). A hiperlipidémia erélyes kezelése segíthet tehát a graftok funkciójának hosszú távú megőrzésében. Terápiás megoldásként a statinok az elsődlegesen választandó szerek, hiszen lipid-szintet csökkentő hatásuk mellett kifejezett antiproliferatív és antioxidáns hatással is rendelkeznek (61, 62). Az utóbbi években sikerült igazolni, hogy

a magas homocystein szint önmagában is rizikót jelent a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásában, elsősorban az arteriosclerosist indukáló hatásán keresztül. A hyperhomocysteinémia fokozottan jelentkezik krónikus vesebetegeknél és a transzplantáció után sem csökken lényegesen szintje. A magas homocystein szint a vesetranszplantátum elvesztésének egyik faktora lehet, az akcelerált graft arteriosclerosisra keresztül. A hyperhomocysteinémia kezelésére a folsav vagy B-12 vitamin terápia ajánlott, amelyekkel még az igen magas homocystein szint is rendezhető (63).

A hiperglikémia és diabetes mellitus a felnőttkori krónikus veseelégtelenség egyik leggyakoribb oka. A hiperglikémia mint kóroki tényező a KAN patomechanizmusában is szerepet játszik, részben a lipidanyagcsere kedvezőtlen irányba történő megváltoztatása, részben közvetlenül arteriosclerosist indukáló hatásán keresztül. Nem elhanyagolható tényező azonban a fertőzésekre és a hipertóniára való nagyobb hajlam a diabeteses betegek esetében (64).

5. Hipertónia

A hipertónia szerepe az arteriosclerosis és a miokardiális infarktus kialakulásában ismert és hozzájárul ezen megbetegedések transzplantációt követő halmozott előfordulásához is (65). A transzplantációt követő hipertónia előfordulásának gyakorisága az egyes centrumokban nagyon eltérő, 6% és 80% között változik (66, 67). A transzplantációt megelőző hipertónia szerepét és a vesével való szoros kapcsolatát mutatják azon experimentális és klinikai megfigyelések, melyben hipertóniás donorok veséjét normotenzív recipiensekbe ültetve gyakrabban észlelhető poszttranszplantációs hipertónia (68). A transzplantáció során jelentkező vesekárosodás a már fennálló hipertóniát súlyosbítja, illetve normotenzív betegekben növeli a magasvérnyomás kialakulásának veszélyét. A graft túlélése jelentősen csökken, ha a betegek artériás középnyomása meghaladja a 107 Hgmm-t (140/90 Hgmm). Ezzel párhuzamosan a transzplantátumban észlelt szövettani elváltozások korrelálnak a fennálló hipertónia fokával (69). A vesetranszplantációt követően kialakuló hipertónia, sőt a diurnális ritmus felborulása is összefüggést mutat a szérum kreatinin szint emelkedésével, a graftműködés beszűkülésével, a dialízishez való gyorsabb visszatéréssel és a beteg halálával is (70, 71, 72). Az artériás hipertónia a krónikus kilökődés kialakulásában is fontos szerepet játszik (73, 74).

A folyamatosan fennálló magasabb vérnyomás gátolja az afferens arteriola szabályozó működését, fokozva a glomeruláris fal feszülését, mely lokális angiotenzin II termelődését indukálja. Az így felszabaduló angiotenzin II fokozza a TGF- β 1 termelődését, mely

interstitialis fibrosishoz vezet, valamint fokozza a renintermelést, és így e folyamatok circulus vitiosus tartanak fent (75). Újabb vizsgálatok igazolták, hogy az angiotenzin II növeli a monocyták mesangiális sejtekhez történő adhézióját és serkenti a makrofágok és lymphocyták kemotaxisát (76).

A hipertónia KAN-ban betöltött fontos szerepét bizonyítja, hogy a megfelelő antihipertenzív kezelés lassítja a KAN folyamatát.

Az egyik leggyakrabban használt, ugyanakkor talán leginkább vitatott gyógyszer-csoport az ACE-gátlók és angiotenzin-receptor blokkolók családja. Az ACE-gátlók transzplantáltak hipertóniájában való használatának ellenzői felvetik, hogy az efferens arteriolák relaxációján keresztül csökkentik a GFR-t, és ezáltal gyorsítják a graft elvesztésének folyamatát. Ezt a hipotézist azonban eddig jól megalapozott vizsgálatokkal még nem sikerült alátámasztani. Számos kísérletes és klinikai vizsgálat támasztja viszont alá a jótékony hatását a transzplantált betegeknek (77). Ezek a vizsgálatok azt mutatják, hogy a vesében kialakuló fibrosis és sclerosis progressziójának egyik legjobb terápiája a krónikus vesebetegekben és transzplantáltakban a renin-angiotenzin rendszer gátlása (78). Az ACE gátlók azonban nemcsak szisztémás antihipertenzív hatásuknál fogva jelentenek kezelési lehetőséget a vesebetegségek és a KAN folyamatában, hanem attól függetlenül is rendelkeznek terápiás hatással. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy alkalmazásuk normotenzív betegekben is csökkentette a vesebetegség progresszióját (79).

Ez a hatás részben a glomeruláris kapilláris nyomás csökkentésén keresztül valósulhat meg. A krónikus veseelégtelenségben mikropunkciós mérések igazolták a glomeruláris kapilláris nyomás emelkedését és az ACE-gátló kezelés glomeruláris kapilláris nyomás csökkentő hatását. Bár KAN-ban még nem történtek mikropunkciós mérések, de a krónikus veseelégtelenséghez hasonló pathomechanizmus alapján feltételezhető, hogy a graftban is nő a glomeruláris kapilláris nyomás (80).

Egy másik lehetséges, a szisztémás antihipertenzív hatástól független mechanizmus a glomerulus membrán permeabilitás és ezzel a proteinuria csökkentése (81). A harmadik lehetséges hatásmechanizmus a szisztémás és lokális renin-angiotenzin rendszer gátlása. Az angiotenzin II az efferens arteriolák rezisztenciájának emelésén kívül (82, 83) egy igen hatásos növekedési faktor a glomerulus és tubulus sejtek számára.

Az angiotenzin II közvetlenül képes a kollagén szintézis indukálására, valamint befolyásolja a TGF- β_1 és a thrombocitához kötődő növekedési faktor A (PDGF-A) lánca expresszióját is, amelyek a simaizom sejtek és a mátrix proteinek proliferációját serkenti. Újabb

vizsgálatok igazolták, hogy az angiotenzin II növeli a monociták adhézióját a mesangialis sejtekhez és serkenti a makrofágok és limfociták kemotaxisát (76).

Korábbi munkánkban igazoltuk, hogy az ACE-gátló enalapril közvetlenül intrarenalisan is képes csökkenteni a citokinek és növekedési faktorok expresszióját (84). Újabb vizsgálatok pedig az angiotenzin-1 receptor blokkolók hasonló hatását mutatták. Mai ismereteink szerint a transzplantációt követő hipertónia kezelésében az angiotenzin rendszerre ható szerek az elsődlegesen választandók.

6. Infekciók

Az immunszuppresszív terápia elkerülhetetlen következménye, hogy a kezeltekben megnövekszik a különböző infekciók kialakulásának veszélye. A vírusinfekciók közül a transzplantátum diszfunkciójához, vagy elvesztéséhez leggyakrabban a cytomegalovírus (CMV) infekció vezet (85, 86). A CMV a normál populációban igen gyakran előforduló vírus, amely immunszupprimáltakban súlyos akut, életet veszélyeztető fertőzés formájában, vagy krónikus lefolyással jelentkezik. Ez utóbbi esetben bizonyítottan hozzájárul a krónikus allograft nephropatia kialakulásához. További problémát jelenthet, hogy krónikus formában elősegíti az arteriosclerosis kialakulását. A transzplantált betegekben a fertőzés egyik lehetséges útja a CMV negatív recipiensbe transzplantált CMV pozitív szerv. A másik, gyakoribb lehetőség az immunszuppresszió kapcsán reaktiválódó addig látens vírusinfekció (87).

Feltehetően a vírus direkt sejtkárosító hatásán kívül aktiválja a szervezet immunreakcióját, növelve ezzel mind az akut, mind a krónikus kilökődés kockázatát. A vírus egyik korai génje által kódolt fehérje keresztreakciót ad a HLA-DR antigén β láncával, egy másik virális glikoprotein pedig homológ az MHC I antigén nehézláncával és képes kötődni a molekula könnyűláncához. A CMV fertőzést követően fokozódik egyes adhéziós molekulák (intercelluláris adhéziós molekula-1, vaszkuláris adhéziós molekula 1 (ICAM-1, VCAM-1)) expressziója is, ami szintén gyorsítja a KAN folyamatát. A CMV infekció zajlásakor ezekkel a molekuláris folyamatokkal párhuzamosan a szérumban a kreatinin szint emelkedését, a graftban pedig szövetkárosodást és monocita infiltrációt észlelhetünk (86, 88).

Sajnos a betegség sokszor csak szerény tünetekkel jár, esetleg egyetlen jelzés a graftműködés beszűkülése lehet. A CMV fertőzés meglétét vagy hiányát minden erregyanús esetben azonnal igazolni kell, vagy ki kell zárni, mert a késői beavatkozás nemcsak a graft, de a páciens elvesztéséhez is vezethet.

A CMV infekciónak három kezelési stratégiája ismert. Az első esetben preemptív terápiáról

beszélünk, ha a vérben szenzitív metodikával (PCR) észlelt CMV-t még az aktív betegség kialakulása előtt antivirális terápiával kezeljük. A második esetben profilaktikus terápiáról beszélünk, ha a rizikócsoporthoz tartozó (pl. szeronegatív recipiens szeropozitív grafttal) betegeket részesítjük kezelésben. A harmadik lehetőség a már klinikai tüneteket mutató betegség kezelése. A leggyakrabban használt szer a CMV fertőzés kezelésében a ganciclovir (89, 90).

A CMV mellett az infekciók okozta mortalitás másik fő oka az invazív gomba fertőzés (91). További súlyos megbetegedést okozhatnak a herpes simplex, human herpes vírus 6, varicella zoster vírus, polyomavírus és az Epstein-Barr vírus (92, 93, 94). Gyakorlati szempontból gyakori problémát jelentenek még egyes hepatitis fertőzések is (95, 96).

Különös fontossággal bírnak a húgyúti infekciók, amelyek nemcsak gyakrabban fordulhatnak elő vesetranszplantált betegeknél, de bizonyítottan gyorsítják is a krónikus allograft nephropatia kialakulását (97). A húgyúti infekciók gyors diagnosztizálása és adekvát kezelése segíthet a graftok funkciójának hosszabb megőrzésében.

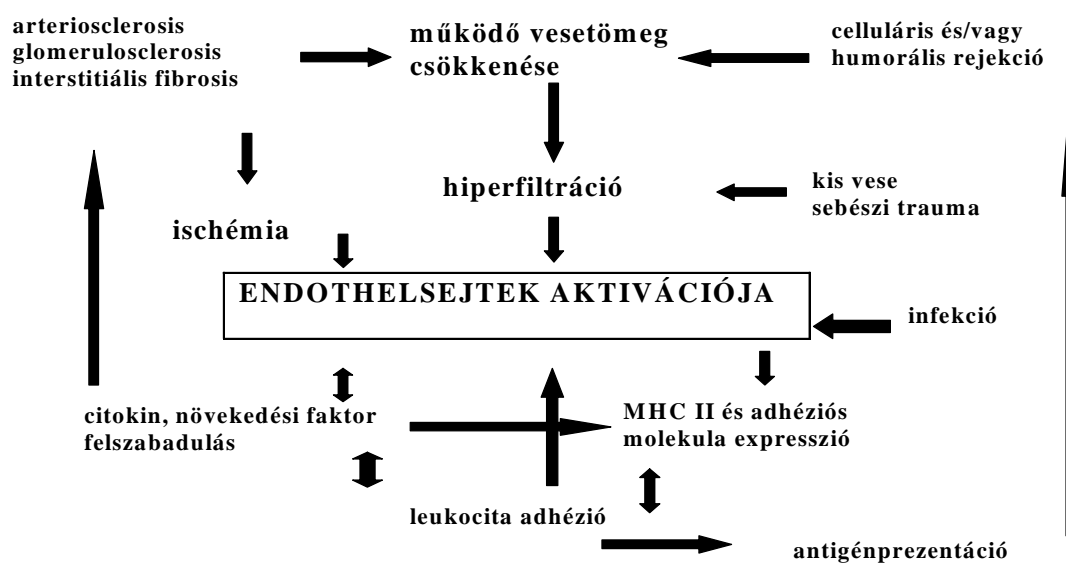
7. A működő nephronszám csökkenése, hiperfiltráció

Az a hipotézis, hogy a donor és a recipiens között fennálló testsúly-vesesúly aránytalanságok miatt nem megfelelő mennyiségű működő nephron kerül a recipiens szervezetébe, lehet a KAN egyik magyarázata (98). A nephronszám csökkenése számos okból bekövetkezhet. Az egyik legkézenfekvőbb magyarázat, hogy általában csak egy vese kerül beültetésre, illetve a további noxa mint a műtét, illetve az IR károsodás csökkentheti a nephronszámot. Ezen felül a graft működése során bekövetkező akut kilökődés, gyógyszer nephrotoxicitás, hipertónia, infekciók vezetnek a működő nephronok számának csökkenéséhez. Állatkísérletek bizonyították, hogy a nephronszám sebészi redukciója 5/6 nephrectomiával, a vesében létrejövő hemodinamikai változásokon keresztül glomerulosclerosisához és veseelégtelenséghez vezet (99). Humán vizsgálatok igazolták, hogy a testsúly, testfelszín és vesetömeg összefüggést mutat a nephronok számával, így a nem és az etnikum szerepe is felvetődött (100). Egyes vizsgálatok szerint a nőknek kisebb a veséjük és kevesebb a nephronjaik száma, csakúgy, mint az Afro-Amerikaiaknak (101). Más eredmények azonban nem támasztják alá ezt az összefüggést (102).

A hiperfiltrációs teória alapján a kevesebb glomerulusra háruló azonos mennyiségű feladat miatt glomeruláris hipertenzió és hiperfiltráció alakul ki, mely fokális glomerulosclerosisához vezet (103). A megmaradt nephronokon nagyobb mennyiségű vér áramlik át és az addigi lamináris áramlás turbulenssé válik. Ez az endotélsejtek

aktivációjához vezet, amely az adhéziós molekulákon, citokineken és növekedési faktorokon keresztül fokozza a leukocita adhéziót, migrációt és proliferációt, és ezeken a hatásokon keresztül progresszív sclerosishoz vezet (104). A folyamat legvégül a funkcionális tartalékok kimerülésével veseelégtelenséget okoz (105). A hiperfiltrációs teória problematikája azonban, hogy a többi transzplantált szervnek nincsenek nephronjai, ugyanakkor a krónikus graft diszfunkció ezekben az esetekben is megjelenik. A glomerulosclerosison kívül a többi szövettani elváltozás, mint az arteriosclerosis, gyulladásos sejtes infiltráció megtalálható a többi transzplantált szervben is (106).

A közös patológiai eltérés az endotélsejtek aktivációja lehet. Az endotélsejtek számos noxa által aktiválódnak, és az így indukált folyamatok KAN kialakulásához vezetnek. A hiperfiltráció esetén valószínűleg a különböző okokból aktiválódott endotélium és az így aktivált immunológiai folyamatok okoznak nephronpusztulást, és a nephronszám egy kritikus mennyiség alatt önmagában is képes a folyamat fenntartására (107).



3. ábra A KAN-hoz vezető tényezők és az endotél központi szerepe a folyamatban

8. Életkor

A donor életkora szintén befolyással van a transzplantáció kimenetelére. A nagyon fiatal donoroktól származó vesék átültetése után megfigyelhető rosszabb eredmények elsősorban technikai problémákra vezethetők vissza (108). Idős donoroktól származó graftokkal

kapcsolatban eltérnek a vélemények. Ismert, hogy a kor előrehaladtával csökken a GFR, fokozatosan súlyosbodik a glomerulosclerosis, atherosclerosis és interstitialis fibrosis előfordulása (109). Ezzel szemben más esetekben a veseműködés normális marad (110). Idősebb donoroknál észlelt hosszú távú graftműködés beszűkülést a csökkent vesetömeggel hozzák összefüggésbe, mely a recipiensben megnövekedett igényt nem tudja kielégíteni, így hiperfiltráció és következményesen glomerulosclerosis alakul ki (111). Felmerült az a lehetőség is, hogy a transzplantációt követően az öregedési folyamat felgyorsulása következik be, és ez okozza a szövettani elváltozásokat (112). A transzplantációt követő terápiás lehetőségek javulásával azonban, ma már idős donoroktól származó szervekkel is jobb hosszú távú eredményeket lehet felmutatni (113).

A recipiens életkorát tekintve elsősorban az 5 évesnél fiatalabb betegeknél lehet rizikó a donor és recipiens közötti nagy korkülönbség. Ezekben az esetekben a méretbeli különbségekből adódóan növekszik a sebészi és posztoperatív szövödmények száma és a gyermekek növekedése során nem megfelelő a graft adaptációja sem (114, 115). További problémát jelenthet a fiatal korban agresszívabb immunreakció is (116). Az idősebbek immunreakcióját korábban gyengébbnek vélték, azonban több jelen munka is kifejezetten aktívnak írta le (117, 118), ezért a csökkentett időskori immunszuppresszió hozzájárulhat a graft elvesztéséhez (119).

9. A nem szerepe a krónikus allograft nephropatiában

A hiperfiltrációval foglalkozó bekezdésben már szó volt róla, hogy az eltérő nephronszámmal magyarázzák a graftok funkciójában mutatkozó különbségeket a nemek között. Sokáig tartotta magát az az elképzelés, hogy nagy férfi vesét (sok nephront) kapó női recipiensben jobban működik a graft, mint fordított helyzetben. Ma már sokkal árnyaltabb a tudásunk a nemek közti különbségekről. Úgy tűnik, hogy a hiperfiltrációs teória önmagában nem magyarázat és anatómiai vizsgálatok is azt mutatják, hogy férfiak és nők veséjében nem különbözik a nephronszám (120).

Egy 2001-ben elvégzett klinikai vizsgálat kimutatta, hogy összességében a férfi és női transzplantált betegeknél a hosszú távú graftműködés azonos. Szubanalízis azonban igazolta azt a régebbi feltételezést, hogy nőkben magasabb az akut kilökődések száma és így az egy éves grafttúlélés alacsonyabb, míg a KAN kevésbé alakul ki nőkben, mint a férfiakban (121). Az ösztrogének védő szerepe a miokardiális ischémia és arteriosclerosis esetén már régen ismert. Az ösztradiol részben a krónikus sclerotikus folyamatokat gátolja a növekedési faktorok expressziójának csökkentésével és az endotél védelmével, részben az

ischémiás károsodást csökkenti. Hasonló mechanizmusokon keresztül vezethet a graftműködés hosszú távú funkciójának megőrzéséhez is.

További magyarázat lehet a nemek közti eltérésre az immunszuppresszív szerek, elsősorban a CsA tekintetében megfigyelt különbség. Ösztradiol elősegíti a CsA metabolizmusát és kiürülését (122). Mindehhez társul, hogy az általában nagyobb testsúlyú férfiak nagyobb dózis CsA-t kapnak. Összetéve az adatokat elképzelhető, hogy nőknek elégtelen mennyiségű immunszuppresszívumot adunk, különösen a kezdeti fázisban, amikor az egyébként is agresszívabb immunrendszerük miatt más dózis alkalmazására lenne szükség.

1.5. A nem és a nemi hormonok hatása az IR vesekárosodásra és KAN-ra. A folyamatban szerepet játszó mediátorok.

Napjainkban egyre több tanulmány vizsgálja és igazolja a különféle betegségekben a nem, valamint a nemi hormonális milieu központi szerepét. Nemcsak a betegségek incidenciájában, de a progresszióban és a terápiás válaszkészségben is jelentős különbségek figyelhetők meg a nemek között.

Humán és állatkísérletes vizsgálatok kimutatták, hogy a legtöbb vesebetegség incidenciájában és a betegség progressziójában nemi különbségek állnak fenn. A különbségek részben a vese strukturális és funkcionális eltéréseiből, illetve a nemi hormonok hatásaiból adódnak.

A végállapotú vesebetegség (ESRD) prevalenciája férfiaknál magasabb, mint nők esetében (123, 124, 125) (2. táblázat). Állatkísérletes eredmények szerint, hím patkányokban a korral spontán proteinuria és glomeruloszklerózis alakul ki, míg nőstény állatoknál, ösztrogénnel kezelt és kasztrált hímeknél ezek az eltérések nem jelentkeznek (126).

Bizonyított továbbá, hogy a legtöbb élettani és patofiziológiai folyamat a két nemből eltérő módon zajlik le. Ismert, hogy a női nem számos, ischémiás károsodásnak kitett szerv esetében protektív hatású, amiért elsősorban az ösztradiol felelős, bár az utóbbi időben a különbség háttérében az androgének szerepe is felmerült. Miokardiális IR modellekben, β -ösztradiol adása a miokardiális hemodinamikai paraméterek javulását és az aritmiák előfordulásának csökkenését eredményezi (127). Ösztradiol adása splanchnikus (128) és cerebrális (129) ischémia esetében is csökkenti a mortalitást és az ischémiás károsodást. Mindezek ellenére ischémiás eredetű akut veseelégtelenség kialakulásával és progressziójával kapcsolatos kísérleteket csak hím állatokon végeztek, a nem és a nemi hormonok szerepét a vese IR károsodásában mindeddig nem vizsgálták. Szintén nem

történtek korábban vizsgálatok a nem és nemi hormonok hatásáról a KAN pathomechanizmusában. Tekintettel arra, hogy az IR egyik legfontosabb rizikófaktora a KAN kialakulásának és progressziójának a nem és nemi hormonok hatásának vizsgálata mindkét folyamatban fontos lehet.

	Férfi : Nő arány
Végállapotú vesebetegség (ESRD)	1,4 : 1
ESRD-be progrediáló glomerulonephritis	1,6 : 1
ESRD-be progrediáló hipertónia	1,4-1,6 : 1
Minimal change glomerulonephritis gyerekeknél	2 : 1
Minimal change glomerulonephritis felnőtteknél	1 : 1
Focalis segmentalis glomerulosclerosis	Enyhe férfi dominancia
Membranosus nephropatia	2-3 : 1
SLE	1:1,5-2
IgA nephropatia	2,2 : 1
Goodpasture-szindróma	2-3 : 1
Membranoproliferatív glomerulonephritis	1 : 1

2.táblázat. Nemi különbségek a vesebetegségek prevalenciájában

1.5.1. A Na^+/K^+ ATP-áz (NKA)

A vese IR károsodása során az ATP szint csökkenése az energiaigényes NKA enzim működését is nagymértékben befolyásolja.

A NKA fiziológiás körülmények között szinte minden humán sejtben jelen van, központi szerepet játszik a szervezet víz és elektrolit homeosztázisának fenntartásában. Az enzim egy α (112 kDa), β (53 kDa) és γ (10 kDa) alegységből áll; az α alegység felelős a NKA katalitikus aktivitásáért, a β biztosítja az α alegységek stabilizációját és membrán integrációját, míg a vesében expresszálandó γ alegység szerepe egyelőre nem tisztázott (130). Az alegységeknek számos izoformáját különítették el, melyek előfordulása, aránya szervenként és szövetenként változó. A vesében elsődlegesen az $\alpha 1$ és $\beta 1$ alegység izoformák fordulnak elő (131).

Az enzim aktivitása és mennyisége szövetenként eltérő, legnagyobb mennyiségben az agyban és a vesében van jelen. A vesében a NKA aktív transzportja a sejtek energiafelhasználásának 50-70%-át teszi ki (132). Működése során egy molekula ATP

hidrolízisével két K^+ -ot transzportál az extracelluláris térből az intracelluláris térbe, miközben három Na^+ -ot juttat ki a sejtől. A sejtmembrán két oldala között így kialakult elektrokémiai potenciálgrádiens biztosítja a sejtmembránon keresztül zajló, másodlagosan aktív transzportfolyamatok (pl. Na^+/Ca^{2+} antiport, $Na^+/glükóz$ ko-transzport stb.) számára az energiát. Az enzim ezért alapvetően befolyásolja a szervezet folyadéktereinek összetételét és a sejtek térfogatát (133).

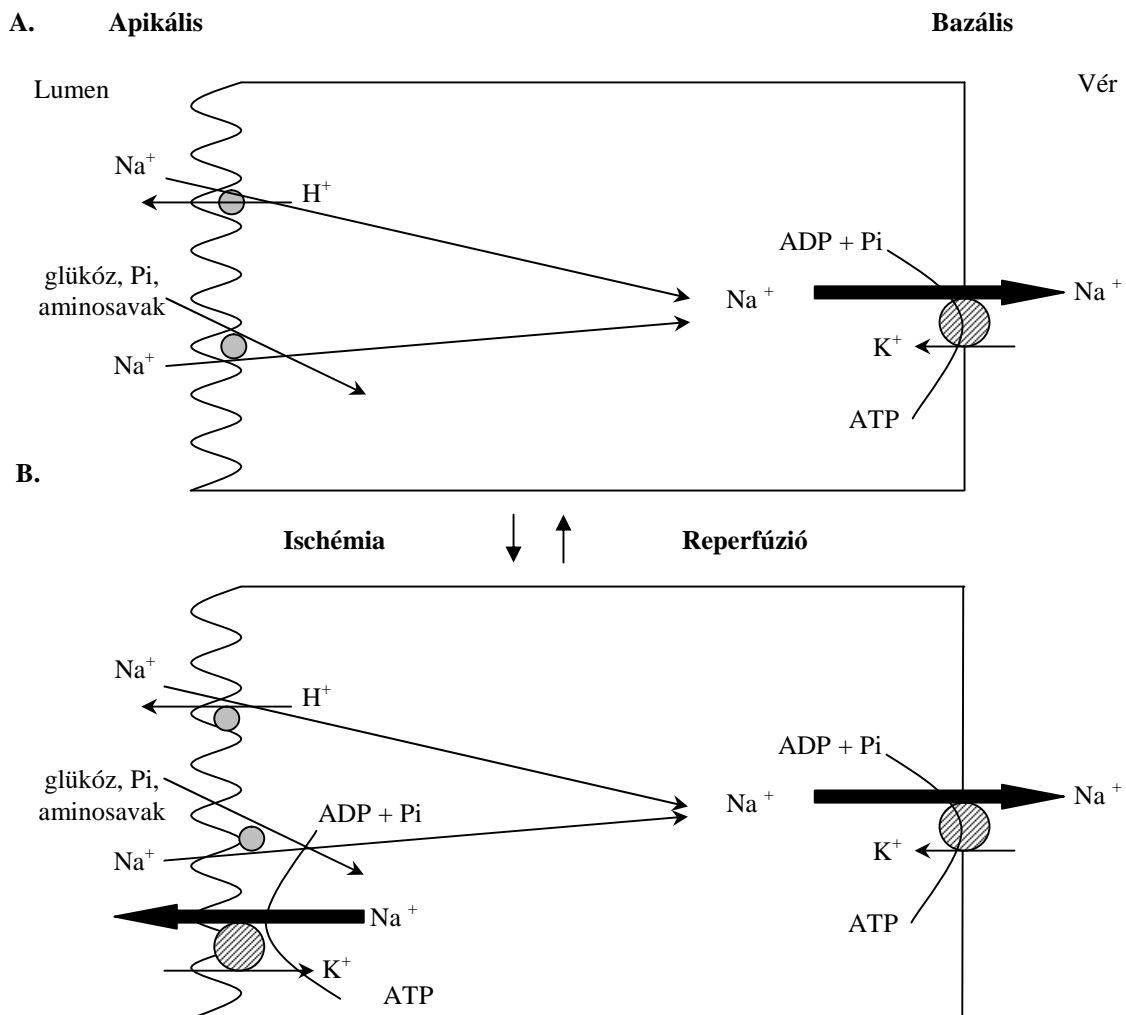
A vese proximális tubulusának epitelsejtjeiben egyirányú transzportfolyamatok (víz, ionok és makromolekulák) zajlanak a vér és glomeruláris filtrátum között. A tubulussejteken az apikális oldal tekint a vizeletelvezető rendszer lumene felé, míg a bazális membrán a belső rész (vér) felé. A két membrán fizikokémiai szerkezete, transzport tulajdonságai alapvetően különböznek. Az újonnan szintetizált membránalkotórészek és citoskeletális struktúrák - melyek barrierként szolgálnak az apikális és bazális membrán között - eltérő eloszlást mutatnak a membrán két oldalán. A NKA a membrán bazális oldalán található, így tudja biztosítani a Na^+ intracelluláris térből történő kielégítő reabszorpcióját (134). Ez a polaritás szükséges a tubuláris transzport megfelelő működéséhez.

A renális ischémia hatására bekövetkező folyamatok közül szinte elsőként, a proximális tubulussejtek veszítik el polaritásukat. Ennek következtében a NKA molekulák elszakadnak az aktin-alapú citoskeletonról és egy részük eredeti bazálmembránhoz kötött helyéről a citoszólba, illetve az apikális membránra kerül át (135). A glomerotubuláris feedback mechanizmus miatt csökken a GFR, károsodik a Na^+ és víz visszaszívás illetve számos ko-transzporter molekula (K^+ , glükóz, P^{3+}) intracelluláris koncentrációja. Ezt a jelenséget renális IR károsodást követően mind kísérletes, mind klinikai körülmények között megfigyelték (3. ábra).

Az ischémia hatására nemcsak a NKA molekulák kihelyeződése következik be, de változik a NKA alegységek mRNS és fehérje szintézise is. A változás mértéke szövetenként eltérő és nagymértékben függ az ischémias periódus hosszától. Vesében 30-60 perces ischémiát követően hím patkányokban az $\alpha 1$ és $\beta 1$ mRNS szint jelentős csökkenését mutatta ki több munkacsoport (136, 137, 138), de a folyamat háttérében álló molekuláris szintű változások legnagyobb részt ismeretlenek. A reperfüzió periódusa alatt, az mRNS szint lassú folyamatos növekedéssel néhány nap alatt eléri a kiindulási értéket és az enzimaktivitás is normalizálódik (136, 139).

Az mRNS szint váltoásaival párhuzamosan változik a NKA alegységek protein expressziója. Coux és mtsai kimutatták, hogy renális ischémiát követően jelentős mértékben lecsökken a NKA $\alpha 1$ és $\beta 1$ alegységek fehérje expressziója és a pumpa aktivitása (140). Az

aktivitás csökkenése magyarázható egyrészt a csökkent proteinszintézissel, másrészt a NKA redisztribúciójával. Triton X-100 extrakcióval Aufricht és mtsai a veseszövet homogenizátumot egy Triton – inszolubilis (citoszkeletális struktúrát reprezentáló) és egy Triton – szolubilis frakcióra (egyéb sejtalkotók) különítették el (141). Kimutatták, hogy renális ischémiás inzultust követően az inszolubilis frakcióban lecsökken, míg a szolubilis frakcióban megnő a NKA $\alpha 1$ és $\beta 1$ alegységek fehérje mennyisége. A reperfúzió során folyamatosan visszaáll a NKA fiziológias eloszlása, ami a fehérjeszintekben is tükröződik. Ezek az eredmények tovább erősítik a NKA redisztribúció jelentőségét a posztischémias vesekárosodás során (142). Bár a nem és a nemi hormonok befolyásolják a NKA működését, a fenti kísérletek mindegyikét hím állatokon végezték, nőstények esetében nincs adat az enzim IR károsodást követő változásairól.



3. ábra Az IR NKA megoszlására és Na^+ transzportra gyakorolt hatása. Fiziológias körülmények (A): Na^+ az elektrokémiai grádiense mentén az apikális membránon keresztül kerül be a sejtbe, majd a bazolaterális membránon elhelyezkedő NKA pumpálja ki. Ischémiát követően

(B): NKA kihelyeződik az apikális membránra is, ezáltal visszapumpálja a lumenbe a Na^+ -ot csökkentve a Na^+ reabszorpció hatékonyságát és növelve a tubuláris Na^+ exkréciót.

A nem és a nemi hormonok NKA-ra gyakorolt hatásairól ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre. A nemi hormonok eltérően befolyásolják a NKA enzim expresszióját és aktivitását az egyes fajokban és szövetekben.

In vitro körülmények között, egér izolált szívizomsejtjein kimutatták, hogy 17- β ösztadiol kezelés csökkenti a NKA enzim aktivitást. A folyamatban az ösztrogén receptor-2 közvetlen szerepét feltételezik, mivel a receptor blokkoló tamoxifen hatására az aktivitásnövekedés elmarad (143). Ezzel ellentétben humán vörösvértesten (144) és limfocita sejt kultúrákban (145) több, független munkacsoport a 17- β ösztadiol kezelés serkentő hatását írta le.

Az in vivo modellekben nyert eredmények hasonlóan ellentmondásosak. Míg egér hippocampusában a 17- β ösztadiol semmilyen hatást nem gyakorolt a pumpa működésére (146), addig könnymirigyben a szintetikus ösztrogén, a dietil-stilbösztrol a NKA aktivitásának kifejezett csökkenését eredményezte (147). Az ösztrogén a NKA aktivitás gátlását váltotta ki egér ductus efferensében is (148).

Ezzel szemben Ziegelhoffer és mtsai 17- β ösztadiol adását követően a NKA pumpa aktivitásának növekedését figyelték meg patkány szívizomsejtjeiben. Feltételezéseik szerint az ösztadiol az enzimen részleges konformációváltozást indukál, ezáltal megnövekedik a K^+ kötő helyek affinitása és erősödik az egyes kötőhelyek közötti kapcsolat. Az aktivitásnövekedés csak in vivo körülmények között, integrált szívizomsejteken észlelhető. Ez arra enged következtetni, hogy nem kizárólag közvetlen hatásról van szó, hanem az ösztrogén adagolását követően valamilyen, még ismeretlen mediátor szabadul fel a miocitákból és ez vezet a pumpafunkció növekedéséhez (149).

A tesztoszteron hatásairól jóval kevesebb adat áll rendelkezésre. A NKA aktivitásának növekedését észlelték patkány agy (150), illetve máj (147) szövethomogenizátumok vizsgálata során is. Más kísérletek azonban tesztoszteron kezelést követően nem találtak változást patkány submandibuláris mirigyének pumpafunkciójában (151).

Bár a NKA működése a vesében kiemelt fontosságú és az enzim működése élettani körülmények között az agyszövet mellett a vesében a legaktívabb, a nem és a nemi hormonok hatását a veseszövetben szinte alig vizsgálták. Quintas és mtsai szerint nőstény patkányokban fiziológiás körülmények között is magasabb a NKA $\alpha 1$ alegységének mRNS expressziója, valamint az enzim aktivitása, mint hímekben (152). Más munkacsoport

azonban nem talált különbséget a vese NKA aktivitásában sem élettani körülmények, sem tesztoszteron illetve ösztrogén kezelést követően (153).

1.5.2. A hősokk fehérje (HSP) 70-es család

Az IR károsodás során a felszabaduló reaktív oxigéngyökök hatására a citoszkeletont alkotó fehérjék, illetve a legtöbb membrán- és transzportfehérje denaturálódik. A tönkrement fehérjék aggregátumokat képeznek, eliminálásuk nehéz. A sejtmembrán károsodása miatt a membrán-kapcsolt transzportfolyamatok, így a NKA működése is zavart szenved. Az ischémiás inzultust követően, a károsodott proteinek struktúrájának helyreállítása illetve eliminálása tehát kulcsfontosságú a szövetek túlélése szempontjából. Ezekben a helyreállító folyamatokban a HSPk központi szerepet töltenek be.

A HSPk, molekuláris chaperonok vagy más néven dajkafehérjék élettani és kóros állapotban egyaránt jelen vannak a sejtekben. Más fehérjék instabil alakjaihoz kötve, azokat rögzítve, megszabják az adott fehérje további sejten belüli sorsát (154, 155). Fiziológiás körülmények között részt vesznek a fehérjék szintézisében, transzportjában, valamint szerepük van a lebontott fehérjék eliminációjában is (156).

A dajkafehérjék rendkívül konzervatív struktúrák, a bakteriális és humán HSPk génszekvenciája szinte teljesen megegyezik (157). Működésüket *passzív és aktív* hatásokra oszthatjuk. A *passzív chaperon hatás* lényege a hidrofób aminosavakban gazdag polipeptidláncok nagy affinitású kötése, mely meggátolja a denaturált fehérjék aggregációját. Passzív hatása mindegyik dajkafehérjének van (158).

Az *aktív chaperon hatás* ezzel szemben mindig energiaigényes folyamat: vagy ATP hidrolízise (HSP60, HSP70, HSP110) vagy a redoxpotenciál (diszulfid hidak reverzibilis redukciója) terhére történik. Az *aktív chaperon hatás* segít az újonnan szintetizálódó fehérjék harmadlagos térszerkezetének kialakításában, illetve denaturálódott fehérjék esetében, a szerkezet helyreállításában. Hozzájárul a fehérje oligomerek összeszereléséhez és az endoplazmás retikulumba juttatásához, valamint részt vesz a károsodott proteinek lízisében, illetve zárványokba zárásában (159).

A dajkafehérjék nagy része stresszfehérje. Ezek a szervezetet ért károsító ágens hatására rendkívül gyorsan expresszálódnak és szintézisük fokozódik. Ezáltal a sejt képessé válik működésének helyreállítására, vagy - akár az ismétlődő károsító inger ellenére - működésének fenntartására.

A dajkafehérjék csoportosítása és elnevezése molekulatömegük alapján történik.

A HSP70 család tagjai élettani körülmények között szerepet játszanak a frissen szintetizálódott fehérjék térszerkezetének kialakításában, a részlegesen károsodott vagy hibás fehérjék átstrukturálódásában és a denaturálódott proteinek degradációjában. Kötődnek a citoszkeletális struktúrákhoz és ezáltal részt vesznek egyes fehérjék membránon keresztüli transzlokációjában (159). Ezek a folyamatok mind ATP igényesek, a HSP70 azonban önmagában gyenge ATPáz aktivitással rendelkezik, ezért a szubsztrátok kötéséhez szükséges energiát kofaktorok (pl. HSP40) biztosítják (160).

A fehérjecsalád tagjai rendkívül változatos csoportot alkotnak. A citoszólban és a sejtmagban kimutatható egy állandóan jelenlevő konstitutív forma a HSP73 és egy stressz-indukált forma a HSP72. A mitokondriumban és az endoplazmatikus retikulumban fordul elő a HSP70-hom és a Grp78. A HSP73 és a HSP70-hom aminosavsorrendje 90%-ban megegyezik, tulajdonságaik, funkcióik nagymértékben hasonlóak (161).

A HSP73 a vese minden részében kimutatható, közel azonos mennyiségben expresszálódik a kortikális és medulláris részen. Elsősorban fiziológiai körülmények között felelős a megfelelő fehérjetranszportért és degradációért.

A HSP72, az indukálható forma a sejtet ért károsító hatást (hőmérsékletemelkedés, hipoxia, hiperoxia, gyulladás, fertőzés, toxikus károsodás) követően termelődik. A vesében a HSP72 mRNS szintje a kortikopapilláris tengely mentén fokozatosan emelkedik. Fiziológiai körülmények között elhanyagolható mennyiségű HSP72 mRNS és fehérje expresszálódik a vese kortexben, közepes mennyiséget tartalmaz a külső medulla és a legmagasabb a HSP72 szintje a belső medullában. Előzetes adatok szerint a medullában mért magas HSP72 expresszió összefügg a koncentráló vesében mért magas ozmolalitás értékekkel (162).

Ischémiás károsodást követően a legtöbb fehérje szintézise gátlódik, ezzel szemben a HSPk mRNS és fehérje expressziója gyorsan és jelentős mértékben (15-25%-kal) megnő (163). A szintetizálódott stresszfehérjék chaperone funkciójuk révén részt vesznek a mitokondriumok károsodásának kivédésében és a sejtszerkezet megőrzésében. Irodalmi adatok szerint ischémia során, ATP hiányában a HSP72 a károsodott proteinek hidrofób felszínéhez kötődik és ezáltal mintegy „kivonja a forgalomból” a denaturált fehérjéket. A véráramlás megindulásával az ATP hidrolízise során keletkező energiát felhasználva, a HSP72 konformációváltozáson megy át és így válik képessé a károsodott proteinek térszerkezetének stabilizálására ill. helyreállítására, valamint a helyreállított fehérjék elengedésére (164).

IR károsodást követően számos szervben a HSP72 expresszió növekedéséről számolnak be állatkísérletes és humán vizsgálatok egyaránt. Előzetes kísérletek szerint miokardiális

infarktust követően az emelkedett HSP72 expresszió csökkenti az infarktusz terület kiterjedését (165). Kimutatták továbbá, hogy a stresszfehérjék nem elsősorban a szívizomsejtekben, hanem a kapilláris endotélben termelődnek, bár pontos hatásmechanizmusuk még nem tisztázott.

A szívhez hasonlóan, az agy hipoxiás károsodása során is megfigyelték a HSPk jótékony hatását a károsodott szövetek regenerációjában. Yenari és mtsai vizsgálatai szerint, HSP70-t expresszáló vektorokkal végzett génterápia növeli a neuronsejtek ellenállóképességét és segíti a túlélést cerebrovaszkuláris ischémiás infarktust követően (166). Kimutatták továbbá, hogy a károsodás után az idegsejtekénél sokkal ellenállóbb gliasejtek jóval több HSP72-t szintetizálnak, ami még inkább alátámasztja a stresszfehérjék protektív szerepét az IR károsodás folyamatában (167).

Humán és állatkísérletes vizsgálatok egyaránt igazolták a HSP72 jelentőségét a vese IR károsodásában is. Vicencio és mtsai újszülött állatok veséjének vizsgálatai során bizonyították, hogy a HSP72 expressziója fokozódik renális ischémiát követően, továbbá, hogy az elégtelen HSP72 szintézis az ischémiás tolerancia csökkenéséhez és a vesefunkciók romlásához vezet (168).

Aufricht és mtsai kimutatták, hogy a renális ischémia hatására indukált és expresszált HSP72 fehérjék segítik a citoskeleton struktúrájának reintegrációját és a tubuláris epithel polaritásának megőrzését. Immunhisztokémiai vizsgálatok során igazolták, hogy az expresszált HSP72 lokalizációja megegyezik az ischémia hatására eredeti helyéről a citoszólba került NKA elhelyezkedésével (141). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a tubuláris rendszerben központi szerepet játszó NKA működésének helyreállításában a HSP72 kulcsszereppel bír.

Bár a HSP72 szerepe egyre több hormonmediált patofiziológiai folyamatban felmerül, a nem és a nemi hormonok HSP72 expressziót befolyásoló hatásait igen kevesen vizsgálták. Ezek a tanulmányok is elsősorban leíró jellegűek, a vesét illetően nincs rendelkezésre álló adat. Az eddigi, különböző szöveteken végzett vizsgálatok szerint nőstényekben, illetve ösztrogén hatásra a HSP72 expresszió növekedése észlelhető, bár a nemi hormonok feltételezett hatásmechanizmusa továbbra is tisztázatlan.

Voss és mtsai hím és nőstény állatok szívizomsejtjein végzett kísérletei alapján fiziológiai körülmények között szignifikánsan nagyobb mennyiségű HSP72 fehérje expresszálódik nőstényekben, mint hím állatokban. Ovariektómia hatására megszűnik a különbség, de ösztrogén pótló kezelés ismét HSP72 expresszió növekedést eredményez (169). Kimutatták

továbbá, hogy hím patkányok esetében ösztrogén és progeszteron hatására megnő a HSP72 expressziót indukáló hősokk faktorok termelődése, és ezzel párhuzamosan emelkedik a HSP72 fehérje szintje, míg tesztoszteron kezelés nem eredményez változást a fehérjeszintekben (170).

Hasonló ösztrogén mediált hatásról számolnak be patkány uterusának vizsgálata kapcsán is. Ovariektomizált egerekben β -ösztradiol hatására a HSP72 mRNS expressziója növekedett. A növekedés hátterében az ösztrogén transzkripcióra/transzlációra kifejtett direkt vagy a hő sokk faktorok indukációján keresztül megvalósuló közvetett hatása feltételezhető (171).

A hormonális és környezeti hatások mellett egyes fehérjék expresszióját genetikai polimorfizmusok is nagymértékben befolyásolják. Alapjában véve a HSPk egy-két kivételtől eltekintve nem polimorf fehérjék. A HSP90 családban eddig nem írtak le polimorfizmust és mindössze egy tanulmány foglalkozik a HSP60 genetikai variációinak jelentőségével, a hirtelen bölcsőhalál kialakulásában (172). Sokkal többet vizsgálták azonban a HLA-kapcsolt, HSP70 fehérjecsalád genetikai polimorfizmusait.

A HSP70-s család három tagját (HSP72, HSP73 és HSP70-hom) kódoló gének a 6-os kromoszóma rövid karján, a 6p21 lokuszon találhatóak. Ez a terület felelős a HSP70 fehérjecsalád mellett az MHC II (HLA-DRB1, HLA-DQB1) valamint MHC III régiót alkotó (TNF- α , TNF- β) fehérjék kódolásáért is. A régió fehérjéinek fontos szerepe van az antigének felismerésében és a T-sejt mediált immunválasz beindításában is. A HSP70 család legfontosabb genetikai polimorfizmusait a 3. táblázat foglalja össze.

Számos tanulmányban elemezték HSP70 génpolimorfizmusok klinikai relevanciáját. Az eredmények nem egyértelműek. Favatier és mtsai szerint a HSP73 A110C promoter polimorfizmusa nem befolyásolja a hősokk transzkripció faktorok kötődését, sem a HSP73 mRNS szintézisét, illetve akkumulációját EBV-vel transzformált humán sejtvonalakban (173). Hasonló eredményt kaptak Schröder és mtsai, akik a HSP72 génpolimorfizmus és a mRNS közötti kapcsolatot elemezték, és azt találták, hogy a gén 1267G polimorfizmusa nem befolyásolja ex vivo a HSP72 mRNS expresszióját (174). Ezzel szemben Pociot és mtsai kísérletei alapján humán perifériás vérben hősokkot követően alacsonyabb a HSP72 mRNS expressziója az 1267GG genotípusú egyedekben, mint heterozigóta vagy 1267AA típusú társaikban (175).

Bár sem kísérletes, sem klinikai tanulmányok nem támasztották alá egyértelműen a genetikai polimorfizmusok HSP70 mRNS, illetve fehérje expresszióra kifejtett közvetlen szabályozó szerepét, a HSP70 gének polimorfizmusainak jelentőségét számos immunmediált folyamatban kimutatták. A HSP72 genetikai variációi számos esetben jelentősen befolyásolják egyes kórfolyamatok morbiditását és a kimenetelét. Az 1267G allélt hordozók gyakrabban betegszenek

meg asztmában, Basedow-Graves kórban, reumatoid artritiszben valamint SLE-ben (175). Kimutatták továbbá, hogy az 1267GG genotípust hordozó nők között szignifikánsan nagyobb az emlőrák és egyes nőgyógyászati daganatok előfordulásának rizikója (176).

gén	polimorfizmus	pozíció	funkció
HSP72 (HSPA1B)	A1267G	kódozó szakasz	G hordozás a HSP72 mRNS szint csökkenésével járhat
	G1538A	promoter régió	?
HSP73 (HSPA1A)	G190C	5' UT régió	silent mutáció, szerepe még ismeretlen
	A110C	promoter régió	szerepe még ismeretlen
HSP70-hom	T2437C	peptidkötő régió	Metionin –Threonin csere, szerepe még ismeretlen

3. táblázat. A humán HSP70 család génpolimorfizmusai

Több vizsgálat igazolta az 1267G allél hordozás káros hatását ischémiás károsodás során is. Akut miokardiális infarktust és agyi hipoxiát követően jelentős különbség mutatkozott a túlélésben és az ischémiás terület kiterjedésében az egyes HSP72 genotípusok hordozói között (165).

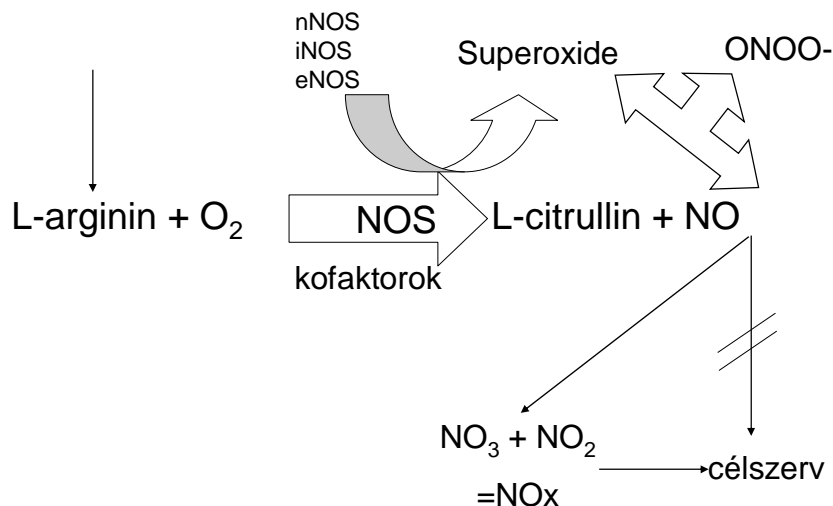
A HSP72-vel szemben a HSP73, illetve a HSP70-hom polimorfizmusai nem mutattak szignifikáns összefüggést a vizsgált betegségekkel (asztma, cöliákia, spondiloartropátia, SLE) (175).

A legfrissebb vizsgálatok alapján a HSP73, mint konstitutív forma a HSPA1A elnevezést kapta és G190C mutációja nem mutatott összefüggést sem az mRNS sem a fehérje expresszió változásával. Ezzel szemben a HSP72, amely a HSPA1B indukálható formának felel meg, az 1267-es pozícióban GG homozigócia esetén csökkent mRNS expresszióval jár.

Mindezek alapján a HSP gének genetikai variációi szerepet játszhatnak számos, így ischémiával szövődött kórfolyamat pathogenezisében és akár terápiás célpontként is szolgálhatnak a közeljövőben.

1.5.3. A nitrogén monoxid szintázok (NOS)

Az utóbbi évtizedben a kutatások középpontjába került az 1989-ben felfedezett nitrogén monoxid (NO). 1991-1994 között 3 enzimet azonosítottak, amelyek az NO képzésben központi szerepet töltenek be. Ezek közül kettő konstitutív forma és az első leírásuk alapján neuronális NO szintáz (nNOS) és endotéliális NO szintáz (eNOS) nevet kapták. A harmadik az úgynevezett indukálható forma (iNOS). A későbbiekben kiderült, hogy ezen enzimek nemcsak az agyban és endotéliumban, valamint a makrofágokban, hanem szinte valamennyi szervben, így a vesében is nagy mennyiségben megtalálhatóak (177). Az enzim kofaktorok segítségével L-Argininből L-Citrullint és NO-t állít elő (4. ábra).



4. ábra A NO képződése a szervezetben.

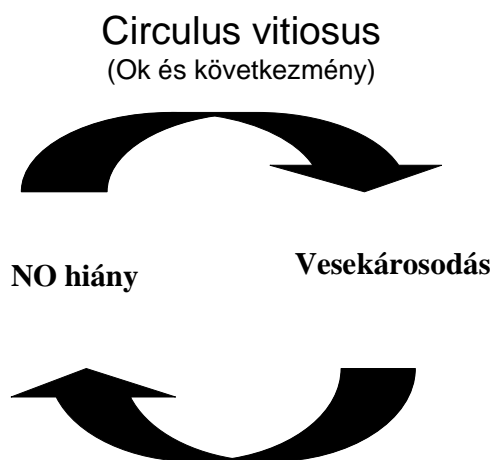
Az utóbbi években újabb vizsgálatok azt mutatják, hogy az enzim végtermékei az L-Citrullin mellett nemcsak a NO, hanem nitroxyl (NO⁻) ion és peroxynitrit (ONOO⁻) is lehetnek a mikrokoznyezettől függően (178). Így megfelelő antioxidáns jelenléte esetén NO képződik. Amennyiben az antioxidáns kapacitás csökken, vagy az oxidatív stressz felerősödik, mint az ischémia esetén is, a végtermék peroxynitrit és izoprosztán lesz, amelyek a szervezetben található legpotensebb vazokonstriktorok közé tartoznak (179).

A különféle NOS enzimek különböző folyamatokban játszanak szerepet.

Az ischémiában elsősorban az iNOS aktiválódása és termelődése figyelhető meg (180). Az ekkor nagy mennyiségben termelődő NO az oxidatív stressz hatására peroxynitritté és izoprosztánná alakul, amelyek az ischémiás károsodás súlyosbodását okozzák. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy az iNOS szelektív gátlásával csökkenthető a vesét ért ischémiás inzultus hatása (181). Ezzel párhuzamosan a többi NOS enzim termelődése lecsökken, mintegy kompenzálendő a folyamatot (180). Ling és munkatársai bizonyították, hogy az ischémiás vesekárosodás során az azonos végterméket produkáló NOS enzimek más-más szerepet játszanak. Míg az ischémiára legérzékenyebb proximális tubulusban az iNOS gátlása rezisztenssé tette a sejteket a hypoxiával szemben, addig ugyanezen sejtek eNOS és nNOS knock-out egerekből izolálva nem éltek túl a hypoxiás károsodást (182). A helyzetet tovább bonyolítja, hogy az ischémia során aktiválódó immunsejtek által termelt iNOS és ennek végterméke sokkal fontosabb lehet, mint a vesében, elsősorban a tubulusokban eleve jelenlevő iNOS és ennek aktiválódása. Még nem publikált adatok azt mutatják, hogy a vesében különböző helyen lévő iNOS enzimek különböző szerepet játszhatnak az ischémiás károsodásban. A fenti különbségek mellett a nemi hormonok is befolyásolják a különböző NOS enzimek termelődését. Neugarten és munkatársai kimutatták, hogy a vesében lipopolysaccharid (LPS) adását követően a medulláris részben nagyobb iNOS fehérje és mRNS expresszió figyelhető meg nőstény állatokban, mint hímeekben (183). Ez ellentmondani látszik annak a feltételezésnek, hogy a nőstények esetében megfigyelt ischémia és endotoxin elleni védelem részben az NO-rendszerben észlelhető különbségeknek lenne köszönhető.

A krónikus folyamatokban az iNOS-zal ellentétben inkább az eNOS és a nNOS játszhat szerepet. Az eNOS szerepe nem meglepő, hiszen az endotél sejtekben jelenlevő enzim hatására expresszálandó NO aktív vazodilatatív hatással rendelkezik és számos más faktoral pl. ET1 együtt a vazomodulációban játszik központi szerepet. A harmadik izoenzim, a nNOS vizsgálata az utóbbi években erősödött fel. Első lépésben sikerült igazolni, hogy a központi idegrendszer mellett más szervekben is megtalálható (184). A vesében is számos helyen sikerült kimutatni, de legnagyobb mennyiségben a macula denzában található, ahol az általa termelt NO a tubulo-glomeruláris feedback szabályozásában központi jelentőségű (184). A macula denza mellett a tubulus sejtek is nagy mennyiségben expresszálják. Itt a tubuláris Na⁺-transzport szabályozásában van szerepe. Az NO és különösen a renális nNOS fontosságára számos kísérletes és klinikai adat utal. Krónikus vesebetegség állatmodelljében NO hiányt lehetett kimutatni és az NO donor L-arginin hatására a betegség progresszióját lassítani (185, 186, 187). Baylis és mtsai klinikai vizsgálatokban is igazolták,

hogy dializált betegek NO termelése alacsonyabb (188). Kimutatták azt is, hogy alacsonyabb NO termeléssel rendelkező betegekben a vesebetegség progressziója gyorsabb a magasabb NO-termelő kapacitással rendelkező társaikhoz képest (189). Állatkísérletekkel sikerült azt is bizonyítani, hogy a renális NO és elsősorban nNOS rendszerben meglévő eltérések befolyásolják a vesét ért károsító hatásra adott választ, így alacsonyabb nNOS szinttel rendelkező állatokban a progresszió gyorsabb (185). Az NO rendszer fontosságát támasztja alá az a megfigyelés is, hogy egészséges állatokban a NOS enzimek krónikus gátlása hipertóniához és krónikus vesebetegséghez vezet (5. ábra).



5. ábra A NO hiány és a krónikus vesebetegség kapcsolata.

Az előbb ismertetett 3 NOS enzim közül az eNOS által termelt NO jelentős vazodilatatív hatással rendelkezik. Az elmúlt években vált ismerettté, hogy a 7. kromoszómán az eNOS-t kódoló génszakasz G894T polimorfizmusa, amely egy Glu298→Asp aminosav cserét jelent befolyásolhatja számos betegség kialakulását és lezajlását (190, 191). Leírták szerepét az arteriosclerosis kialakulásában, a hipertónia pathomechanizmusában és a II. típusú diabetes mellitus-szal kapcsolatban is (192, 193). Az eNOS G894T polimorfizmusának szerepét transzplantációban még nem vizsgálták.

A fentiek alapján felvetődik a kérdés, hogy a renális NO rendszer milyen szerepet játszik a KAN patomechanizmusában.

2. Célkitűzések

- 1. Hogyan változik a renális eNOS és nNOS a két nemben renális ischémia előtt, alatt és után?**
- 2. Kimutatható-e különbség renális IR-t megelőzően és azt követően a renális NKA és HSP72 expressziójában, valamint a NKA aktivitásában?**
- 3. Hogyan változik a renális nNOS expresszió krónikus vesebetegségben?**
- 4. Hogyan befolyásolja az eltérő immunszuppresszív terápia a KAN lezajlását a két nemben?**
- 5. Antiinflammatorikus-antioxidáns perfúziós oldat hatással van-e az átültetett vese hosszú távú túlélésére és a renális NOS rendszerre?**
- 6. Befolyásolják-e a graftok hosszú távú túlélését az eNOS és a HSP70-s család genetikai polimorfizmusai?**

3. Anyagok és módszerek

3.1. Nem és nemi hormonok hatásának vizsgálata a renális NOS rendszerre IR-s vesekárosodást követően.

3.1.1. Kísérleti állatok

IR vizsgálatainkat (4-5 hónapos), nőtény (N) ($280 \pm 30\text{g}$), és hím (H) ($370 \pm 35\text{g}$) Sprague-Dawley patkányokon végeztük (Charles-River, Budapest, Magyarország).

A patkányokat állandó, 21°C hőmérsékleten, 75% páratartalom és 12 óránként váltakozó megvilágítás mellett tartottuk. Az állatok szabadon fogyaszthattak standard rágcsáló tápot és csapvizet. A kísérleteket a Magyar Köztársaság (1998/XXVIII) állatvédelmi törvényei alapján az állatkísérletekkel kapcsolatos irányelveinek megfelelően végeztük.

3.1.2. Műtéti beavatkozás

A műtéti beavatkozást intraperitoneális nátrium-pentobarbitál (50 mg/ttkg, Nembutal, Abbott Laboratories, Budapest, Magyarország) anesztéziában végeztük. A műtét alatt az állatok rektális hőmérsékletét $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ -on tartottuk. Hőmérséklet szabályozott operációs padon az anesztéziát követően medián laparotomiát végeztünk. A bal vesét ellátó artériát és vénát kiperaráltuk, majd 55 percre atraumatikus, mikrovaskuláris klippel leszorítottuk (Biemeier, Aesculap, Németország). Az ischémiás periódus alatt a hasfalat ideiglenesen zártuk. Az ischémiás idő lejárta előtt az ellenoldali jobb vesét eltávolítottuk. A klip felengedése után a hasfalat véglegesen zártuk. Az állatokat 24 órával a beavatkozás után leöltük.

3.1.3. Vizsgálati csoportok

Hím és nőtény állatokat randomizált módon 3-3 csoportba osztottuk (N=7). Az első csoport nem kapott kezelést (IR), a második csoport L-arginin kezelést kapott (IR+L-arg) 7 napig az IR előtt, a harmadik csoport jobb oldali nefrektómia után kezelést nem kapott (kontroll, K).

3.1.4. Funkcionális mérések

Szérum urea nitrogén (BUN) és szérum kreatinin (S-crea) szinteket fotometriás úton hagyományosan alkalmazott kit segítségével (Diagnosticum Kft., Budapest, Magyarország) határoztuk meg Hitachi-712 spektrofotometer segítségével (Roche Magyarország Kft.).

3.1.5. Hisztológia

A vesék egy részét 4%-os formalinban fixáltuk. A paraffin metszeteket hematoxilin-eosin, illetve perjodsav-Schiff reagenssel festettük meg. A mintákat kódoltuk, hogy a vizsgáló az egyes minták csoportbeli hovatartozását ne ismerje. Tubuláris, glomeruláris és vaszkuláris elváltozásokat, valamint a leukocita infiltrációt vizsgáltuk egy szemikvantitatív skála segítségével (0=nincs elváltozás, 1=enyhe, 2=közepes, 3=súlyos).

3.1.6. Teljes RNS izoláció

A veséket cortex és medulla részre választottuk szét és 500 µl hideg lizáló oldatba helyeztük, amely 4 M guanidin isothiocyantot (Sigma), 25 mM natrium citrátot (pH 7,0), 0,1 M β-mercaptoethanolt és 0,5% sarcosylt tartalmazott, majd az oldattal együtt a szövetmintát folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. A teljes RNS kivonást a módosított guanidin-isothiocyant módszer segítségével végeztük (194). A lefagyasztott szövetmintákat 4 ml 4 mol/l guanidin isothiocyant pufferrel kevertük, szétroncsoltuk, majd phenol chloroform (pH 4,0; Sigma) segítségével homogenizáltuk, és 1500 g mellett 10 percig 20 °C-on centrifugáltuk. A felülúszót steril Falcon tubusba pipettáztuk és equivalentis mennyiségű isopropanolt adtunk hozzá. Az így kapott elegyből Rneasy Total RNA Isolations Kit (Qiagen GmbH, Németország) segítségével az RNS-t kimostuk, a koncentrációját és tisztaságát spektrofotometriás módszerrel megmértük, majd további felhasználásig –80 °C-on tartottuk.

3.1.7. Reverz-transzkripció

A szövetmintából kivont RNS-t oligo-(dT)₁₂₋₁₈ primer (Gibco/BRL) segítségével reverz transzkripcióval írtuk át complement DNS (cDNS) molekulává. 1 µg tRNS-hez 0,5 µg primert adtunk. A reakcióhoz szükséges elegy a következő anyagokat tartalmazta: puffer oldat (TRIS hydrochlorid 50 mM/l /pH 8,3/, kalium chlorid 75 mM/l, magnesium chlorid 5 mM/l, dithiotreitol 5 mM/l) (Gibco,BRL), adenosin triphosfat, thymidin triphosfat,

guanosin triphospat és cytosin triphospat 0,2 mM/l (Boehringer Mannheim GmbH), 0,5µl a 40 U/µl tartalmú recombináns ribonuclease inhibitorból (Promega) és 0,5 µl a 200 U/µl tartalmú M-MLV reverz transcriptase-ból (Gibco/BRL). Ehhez a reakció elegyet az 1µg tRNS-sel 36 °C-on 1 óráig inkubáltuk. A reakciót az elegy 95 °C-ra való melegítésével (5 percig) állítottuk le, majd a mintákat lefagyasztottuk.

3.1.8. PCR reakció

Az előállított cDNS-t iNOS, eNOS és nNOS specifikus primerek segítségével amplifikáltuk (4. táblázat). A cDNS tartalmú anyagból 1 µl-t használtunk a polimerase lánreakcióhoz, amelyet PCR puffer segítségével végeztünk. A puffer tartalma: 750 mM/l TRIS hydrochlorid /pH 9,0/, 200 mM/l (NH₄)₂SO₄ 0,1% (w/v) Tween, 20 mM/l magnesium dichlorid (Dianova), 0,2 mM/l mindegyik deoxynucleotidból, 1 µM/l mindegyik primerből (Eurogentec) és 2,5 U thermus Aquaticus (Taq) DNS polymerase (Dianova). Az amplifikációhoz Perkin-Elmer Thermal Cycler-t használtunk és a reakciót a következők szerint végeztük: kezdeti 3 perces 94 °C-on történt denaturáció után 37 ciklust futattunk, amelyben 94 °C-on 30 másodpercig (denaturálás), 55-56 °C-on 30 másodpercig (primer kötődés) és 72 °C-on 30 másodpercig tartó szakaszok szerepeltek. Az utolsó ciklus után 4 percig tartó 72 °C-os szakasz következett, majd a reakcióelegyet 4 °C-ra lehűtöttük.

	primer párok	Annealing hő (°C)	Termék hossz (bp)
nNOS	Forward: 5'-GAACCCCAAGACCATCC-3' Reverse: 5'-GGCTTTGCTCCCACAGTT-3'	56	308
iNOS	Forward: 5'-GGTTTCCCCCAGTTCCTCA-3' Reverse: 5'-TCTCCATTGCCCCAGTTTTT-3'	55	119
eNOS	Forward: 5'- -3' Reverse: 5'- -3'	55	
GAPDH	F: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' R: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'	56	498

4. táblázat. Primerek szekvenciája.

3.1.9. Gélelektroforézis

A PCR termékből 10 μ L-t, 2,5 %-os ethidium bromiddal (0,5 μ g/ml) festett agarose gélben futattunk. A végterméket UV lámpa megvilágításban tettük láthatóvá és számítógépes program segítségével (Gel-Pro Analyser 3.1 Software) analizáltuk. A próbák identifikálására minden gélben kontrollként 1 Kb oligonucleotid DNS kontrollt (Gibco/BRL) futattunk. A vizsgált faktorok cDNS mennyiségét denzitometriás méréssel és belső kontrollhoz viszonyítva hasonlítottuk össze.

3.1.10. Statisztikai analízis

Az adatok átlag \pm SEM formában szerepelnek. A parametrikus adatok összehasonlítása egyutas varianciaanalízissel, majd ezt követő Newman-Keuls teszttel történt. A hisztológiai adatokat Kruskal-Wallis, majd Mann-Whitney U teszt segítségével értékeltük ki. A $P < 0.05$ esetén tekintettük a különbséget szignifikánsnak (195).

3.2. A nem és a nemi hormonok hatásának vizsgálata a vese IR károsodására, a NAK és a HSP72 szerepe.

3.2.1. Kísérleti állatok

IR vizsgálatainkat (4-5 hónapos), nőstény (N) (240 ± 30 g) és hím (H) (300 ± 35 g) Wistar patkányokon végeztük (Charles-River, Budapest, Magyarország).

A patkányokat állandó, 21°C hőmérsékleten, 75% páratartalom és 12 óránként váltakozó megvilágítás mellett tartottuk. Az állatok szabadon fogyaszthattak standard rágcsáló tápot és csapvizet. A kísérleteket a Magyar Köztársaság (1998/XXVIII) állatvédelmi törvényei alapján az állatkísérletekkel kapcsolatos irányelveinek megfelelően végeztük.

3.2.2. Műtéti beavatkozás

A műtéti beavatkozást intraperitoneális nátrium-pentobarbitál (50 mg/ttkg, Nembutal, Abbott Laboratories, Budapest, Magyarország) anesztéziában végeztük. A műtét alatt az állatok rektális hőmérsékletét $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ -on tartottuk. Hőmérséklet szabályozott operációs padon az anesztéziát követően medián laparotomiát végeztünk. A bal vesét ellátó artériát és vénát kiperaráltuk, majd 55 percre atraumatikus, mikrovaszkuláris klippel leszorítottuk

(Biemeier, Aesculap, Németország). Az ischémiás periódus alatt a hasfalat ideiglenesen zártuk. Az ischémiás idő lejárta előtt az ellenoldali jobb vesét eltávolítottuk. A klip felengedése után a hasfalat véglegesen zártuk.

Kontrollként minden kísérletben uninefektomizált, áloperált, nem-ischemizált nőstény és hím állatok szolgáltak.

3.2.3. Kísérleti protokoll

A fenti műtéti beavatkozást követően az egyes posztischémiás időpontokban (2 óra, 16 óra, 24 óra) az állatokat újra elaltattuk. (5. táblázat).

Vizsgálati Csoportok	Nőstény	Hím
	N	
Ivarérett állatok		
Kontroll	6	6
Ischémia után 2 órával (T2)	6	6
Ischémia után 16 órával (T16)	6	6
Ischémia után 24 órával (T24)- csak a HSP72 vizsgálatokhoz	6	6

5. táblázat. Az IR károsodást követő hisztológiai és molekulárbiológiai változások vizsgálatához használt kísérleti csoportok.

A vérvételt követően szérumot izoláltunk és további vizsgálatokig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az eltávolított vesét egyenlő darabokra osztottuk és 4% pufferolt formalinban (pH=7,4) vagy folyékony nitrogénben történő gyorsfagyasztást követően $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

3.2.4. Funkcionális mérések

A kontrollokban, illetve a vizsgált posztischémiás időpontokban az aorta abdominalisból vett vérből, spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg a karbamid nitrogén, kreatinin, nátrium és kálium értékeket kereskedelmi forgalomban lévő kiték segítségével (Hitachi-712 automa, Diagnosticum Kft, Budapest, Magyarország).

3.2.5. Szövettani vizsgálatok

A hisztológiai feldolgozást a korábban ismertetett protokoll alapján végeztük. A glomeruláris és a tubuláris károsodások, illetve a leukocita infiltráció mértékét 0-4-ig terjedő skálán minősítettük a következők szerint: 0- nincs, 1-enyhe (a sejtek <25 %-ban), 2-közepesen súlyos (a sejtek 25-50%-ban), 3-súlyos (a sejtek 50-75%-ban), 4-nagyon súlyos (a sejtek > 75%-ban).

3.2.6. RNS izoláció és Reverz-transzkripció

A korábban részletezett protokollok alapján történt (lásd 3.1.6.)

3.2.7. Reverz-transzkripció

A korábban részletezett protokollok alapján történt (lásd 3.1.7.)

3.2.8. PCR reakció

A PCR reakciót a korábban leírtaknak megfelelően az alábbi primerekkel és hőmérsékleteken végeztük. A patkány specifikus NKA $\alpha 1$ és $\beta 1$, illetve HSP72 mRNS szekvenciákat az NCBI (National Center for Biotechnology Information, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nukleotid genetikai adatbázisa és Blast szolgáltatása segítségével választottuk ki (Accession numbers: Gen bank: NKA $\alpha 1$: NM 012504, NKA $\beta 1$: NM 013113, HSP72: NM 031971). A primerek tervezéséhez a Primer3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) (Steve Rozen, Helen J. Skaletsky (1998) Primer3, Whitehead Institute for Biomedical Research) illetve a DNASTar™ szoftvereket használtuk. A patkány GAPDH specifikus primereket Strehlau és mtsai-tól vettük át. A PCR-ek során alkalmazott primerek adatait táblázatban foglaltuk össze (6. táblázat).

A PCR reakciókat a primerekre jellemző annealing hőmérsékletek kivételével azonos módon vittük véghez. A kezdeti 5 perces 94 °C-on végzett denaturációt követően, a templátot 35 cikluson [94 °C, 15 sec (denaturáció), 58 °C (NKA $\alpha 1$, $\beta 1$), 66°C (HSP72), 55 °C (GAPDH) 30 sec (annealing), 72 °C 30 sec (extenzió)] keresztül amplifikáltuk, végül egy 7 percig tartó 72 °C-on történő inkubációval fejeztük be a PCR reakciót.

PCR vizsgálatainkat minden esetben kétszer megismételve, pozitív és negatív kontrollok felhasználásával végeztük.

3.2.9. Gélelektroforézis

A keletkezett terméket ethidium-bromiddal festett 2,5%-os agaróz gélen szeparálva tettük láthatóvá (Invitrogen, Frankfurt, Németország). A termékek várt hosszait 100 bp DNS marker mix (READY-LOAD™, Invitrogen, Frankfurt, Németország) párhuzamos futtatásával kontrolláltuk. A PCR reakciók eredményeit Gel-Pro™ szoftverrel denzitometráltuk és értékeltük.

Gén	Primerek	Annealing hő	Termék hossz
NKA α1	Sense: 5'- aga ttt gag ccg agg cct aac acc -3'	58°C	418 bp
	Antisense: 5'- tcc gcc ctt cac ctc cac cag at -3'		
NKA β1	Sense: 5'- gcc ccg cca gga ttg aca c -3'	58°C	444 bp
	Antisense: 5'- ctc atc gcg ctt gcc agt g -3'		
HSP72	Sense: 5'-cgc cgc tgt cgc tgg gtc tgg ag-3'	66°C	327 bp
	Antisense: 5'-ggc gcc cct tgt gtc tgg tga tgg-3'		
GAPDH	Sense: 5'- ggt gaa ggt cgg agt caa cg -3'	55°C	496 bp
	Antisense: 5'- caa agt tgt cat gga tga cc -3'		

6. táblázat. A szemikvantitatív PCR-ek során használt primerek adatai.

3.2.10. Western Blot

3.2.10.1. Minta előkészítés

A Western blot vizsgálatokhoz 100 mg veseszövetet hűtött (4°C) lizáló pufferben [10 mM TRIS-HCl (1 M) pH=8,0, 60 mM Hepes, 100 mM NaCl, 0,75 mg/l leupeptin, 1 mM/1 EDTA, 1 mM/1 EGTA (0,5 M), 0,5 mM PMSF, 0,1 mM dithiotreitol] (Sigma Chemical Co, MO, USA) Potter Elvehejm kézi homogenizálóval homogenizáltuk. A teljes szövethomogenizátumból a magfrakciót centrifugáltuk (680 g, 5 min, 4°C), az így nyert felülúszót (TOT) - 80°C-on tároltuk.

3.2.10.2. Triton X-100 extraktibilitás

Kísérletes körülmények között a NKA ischémia hatására bekövetkező kihelyeződése a Triton X-100 extraktibilitással jellemezhető. A detergens hozzáadását követően egyszerű centrifugálással elválasztható a Triton-inszolubilis citoszkeletális frakció, a sejt Triton-

szolubilis egyéb elemeitől. Ez a módszer elfogadott eszköz a posztischémiás redisztribúció megítéléséhez.

A citoszkeletális (pellet-PEL) és a non-citoszkeletális (szupernatáns-SUP) frakciók elkülönítésére a feljebb leírt extrakciós pufferhez 0,1% Triton X-100-at adtunk. 100 mg veseszövetet homogenizáltunk ebben az oldatban, majd 35 000 x g mellett centrifugáltuk 15 percig, 4°C-on. A keletkezett Triton-inszolubilis PEL frakciót az extrakciós pufferben reszuszpendáltuk, majd a Triton-szolubilis SUP frakcióval együtt -80°C-on tároltuk.

A minták összfehérje koncentrációját spektrofotometriás módszerrel, Bradford szerint határoztuk meg. A minták fehérjekoncentrációját 1 µg/µl-re állítottuk be.

3.2.10.3. Antitestek és kontrollok

Primer patkány ellenes anti-NAK $\alpha 1$ és $\beta 1$ ellenanyagként nyúl poliklonális ellenanyagot alkalmaztunk (UBI, Lake Placid, N.Y. USA). Az anti-HSP72 poliklonális antitesteket Dr. László Lajos (ELTE, Állatszervezettani Tanszék) bocsátotta rendelkezésünkre [97]. Másodlagos antitestként a NKA $\alpha 1$ és $\beta 1$ alegységének detektálásához torna-peroxidázzal konjugált anti-nyúl IgG antitestet (DAKO, Glostrup, Dánia), míg a HSP72 vizsgálatához torna-peroxidázzal konjugált anti-egér IgG antitestet (Sigma Chemical Co, MO, USA) használtunk. Technikai kontrollként az Upstate Biotechnology Western blot pozitív kontrollját (anti-Na,K-ATPase Immunoblotting kit with control, UBI, Lake Placid, N.Y. USA), illetve ismert NKA $\alpha 1$ és $\beta 1$, valamint HSP72 pozitív patkány (Wistar) agyszövetet használtunk.

3.2.10.4. SDS-PAGE

A mintákat 4x minta pufferben (12,5 mM TRIS-HCL, (pH 6,7), 4.0% SDS, 1 mM EDTA, 15% glicerol, 0,01% bromfenolkék) szolubilizáltuk. A mintákból 15-15 µg összfehérjének megfelelő mennyiséget vittünk fel a 12,5 % SDS-poliakrilamid géltre. Koncentráló gélként 4 %-os SDS-poliakrilamidot használtunk. Mintáink mellett párhuzamosan molekulásúly markert (BenchMark™, Gibco/BRL, Eggenstein, Németország) futtattunk. A gélelektroforézist 2 órán keresztül 120 V-on, 20 mA-rel végeztük hűtött rendszerben.

3.2.10.5. Blottolás

A fehérjét az SDS-poliakrilamid gélről nitrocellulóz membránra (Hybond™ ECL™, AP Biotech, Buckinghamshire, UK) elektroblottoltuk (70 V, 220 mA, 80 perc), TRIS-HCL,

glicin és metanol tartalmú standard transzfer pufferben, hűtött rendszerben. A fehérjetranszfer sikerességét 1% Ponceau S (Sigma Chemical Co, MO, USA), 25 % ecetsav (Reanal Rt, Budapest, Magyarország) tartalmú festékkeverékkel ellenőriztük.

3.2.10.6. Immunoblottolás

Az immunoblottoláshoz szükséges ellenanyag koncentrációkat előzetesen dot-blot technikával határoztuk meg.

A blottmembránt szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül blokkoló oldatban (5% zsírintes tejpör, 10% PBS puffer) inkubáltuk. Blokkolás után a membránt mosó oldatban (1% zsírintes tejpör, 0,1% TweenTM20 detergens, 10% PBS puffer) további 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk az első specifikus ellenanyaggal (NAK α 1 1:750, NAK β 1 1:2000, HSP72 1:10000 hígításban).

3 x 10 perc mosást követően a második, torma-peroxidázzal jelölt ellenanyaggal (1:2000 anti-rabbit IgG illetve 1:5000 anti-mouse IgG hígításban) a membránokat 30 percig inkubáltuk, majd további mosásokkal (3 x 20 perc) távolítottuk el a feleslegben kötött ellenanyagot.

3.2.10.7. Detektálás

Az immunoreaktív helyek kemolumineszcens szignálját Amersham Pharmacia protokoll szerint ECLplus reagenssel, Hyperfilm ECLTM-en filmen (AP Biotech, Buckinghamshire, UK) detektáltuk, majd Gel-ProTM szoftverrel denzitometráltuk.

3.2.11. Immunofluorescens vizsgálatok

A szövettani feldolgozáshoz használt beágyazott szövetmintákból 5 μ m-es szeleteket metszettünk és ethanol, valamint xylol segítségével deparaffinizáltuk. PBS oldatban történő öblítés után metanolos H₂O₂-vel kezeltük 30 percig. A mintákat 0,2% Triton X 100 PBS oldatban permeabilizáltuk, majd 0,5%-os zsírintes tejpör oldatban 30 percig szobahőmérsékleten blokkoltuk, majd 4°C-on 12 órán keresztül inkubáltuk a Western blot során alkalmazott elsődleges specifikus ellenanyagokkal (NAK α 1 1:100, HSP72 1:500 hígításban). Ezt követően PBS oldatban mostuk és a másodlagos antitestekkel inkubáltuk (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 /Invitrogen, Budapest, Magyarország/), szobahőmérsékleten 30 percig. A DNS-t Hoechst 33342 (Sigma Co, Budapest, Magyarország) szobahőmérsékleten 10 percig festettük. Kontroll festéseket végeztünk az elsődleges antitestek elhagyásával a festés specifikusságának bizonyítására.

3.2.12. Enzimaktivitás mérése kapcsolt reakcióval

A NKA enzim aktivitását kapcsolt reakcióval TOT fehérjehomogenizátumból határoztuk meg Hitachi-712 laboratóriumi spektrofotométeren. A különböző csoportokba tartozó mintákat randomizálva mértük le.

A készülék 25 μ l mintát mért 200 μ l reakcióelegyhez (100 mM NaCl, 20 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 50 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 1,0 mM ATP, 1,0 mM foszfoenolpiruvát, 0,16 mM NADH, 5 U/l piruvát-kináz, 12 U/l laktát-dehidrogenáz (Sigma Chemical Co., MO, USA). A NKA aktivitás specifikus gátlására 300 másodperc elteltével 5 μ l, 10mM ouabaint adtunk a reakciótérbe. Az abszorbancia változást 340 nm-en (referencia hullámhossz: 415 nm) monitorizáltuk 40 másodpercenként, 10 percen keresztül. A ouabain bemérése előtt, a reakció kezdete utáni 80-280 másodperc között a görbe meredeksége az össz-ATPáz aktivitást tükrözi; a két meredekség közötti különbség a NKA aktivitást reprezentálja. Rendszerünkben egy egység ATPáz megfelel 1 mg fehérjetartalmú minta által egy óra alatt lebontott 1 nmol NADH-nak.

3.2.13. Statisztikai analízis

Az adatokat átlag \pm SEM (átlag szórása) illetve átlagérték \pm SD (standard szórás) értéként adtuk meg. Statisztikailag szignifikánsnak a $P < 0.05$ értéket tekintettük. A statisztikai elemzést a STATISTICA.6 szoftverrel (StatSoft® Inc., USA) végeztük.

Az állatkísérletes vizsgálatok során az állatok túlélésének statisztikai elemzéséhez Kaplan-Mayer analízist (Log-rank test) használtunk. A hisztológiai eredményeket Kruskal-Wallis és Dunns féle post-hoc teszttel hasonlítottuk össze. Két csoport összehasonlítására kétmintás t-próbát alkalmaztunk. A különböző csoportok RT-PCR, Western blot és enzimaktivitás eredményeinek összehasonlításához ANOVA tesztet használtunk Newman-Keul post-hoc teszttel kiegészítve.

3.3. Renális nNOS rendszer vizsgálata

3.3.1. Kísérleti állatok

A renális nNOS vizsgálatokor H Sprague-Dawley (SD) állatokat (380-400g) alkalmaztunk (Harlan, Indianapolis, USA). A patkányokat állandó, 21°C hőmérsékleten, 75% páratartalom és 12 óránként váltakozó megvilágítás mellett tartottuk. Az állatok szabadon

fogyaszthattak standard rágcsáló tápot és csapvizet. Az összes állatot a kísérlet kezdetén metabolikus ketrecbe helyeztük 24 órás vizeletgyűjtés céljából.

3.3.2. Műtéti beavatkozás

Az állatokat pentobarbitál nátrium (32.5 mg/tskg, SIGMA, St. Louis, MO, USA) és methohexital nátrium (Brevital sodium, 25 mg/tskg Eli Lilly and Co, Indianapolis, IN, USA) keverékével elaltattuk. Ezt követően medián laparotomiát végeztünk és a jobb vesét eltávolítottuk, majd a bal veséhez futó artéria renalist izoláltuk és a két pólust ellátó ágat lekötöttük abláció/infarceráció AI). A vese dekolorizációjával ellenőriztük, hogy a vesét ellátó artéria ágak 2/3-a lekötésre került (5/6 AI). Ezt követően a sebet zártuk, majd az állatokat megfigyelés és ébredés után ketrecükbe helyeztük. Kontrollként áloperált patkányokat használtunk.

3.3.3. Kísérleti protokoll

A következő csoportokat vizsgáltuk: I. csoport: áloperált állatok standard rágcsáló tápot (3,93kcal/g) és csapvizet kaptak 4 hétig (kontroll állatok a 3. és 6. csoport számára), II. csoport: áloperált állatok 40%-os fehérje (casein, 3,76kcal/g) tartalmú táp (magas fehérje tartalom-MF) és 0,225% NaCl-t tartalmazó víz (magas NaCl tartalom-MNaCl) 1 héttel az operációt bevezetve és 18-21 napig adva (konrollok a IV. és V. csoport számára), III. csoport: operált 5/6 AI állatok 14 napig standard rágcsáló táp és csapvíz (14 nap után leölés), IV. csoport: 5/6 AI állatok 1 héttel az operáció után 14 napos magas fehérje és magas NaCl táp és víz adása után leölve, V. csoport: 5/6 AI állatok 1 héttel az operáció után 18-21 napos magas fehérje és magas NaCl táp és víz adása után leölve, VI. csoport: 5/6 AI normál táp és csapvíz adása mellett 4-6 héttel az operáció után leölve, VII. csoport: 5/6 AI normál táp és csapvíz adása mellett 11 héttel az operáció után leölve, VIII. csoport: áloperált állatok normál táp és csapvíz adása mellett 11 héttel az operáció után leölve (7. táblázat).

Csoport	Kezelés	Diéta	Kezelési idő	N
I.	Áloperált	Normál	4 hét	6
II.	Áloperált	MF, MNaCl	18-21 nap	15
III.	5/6 AI	Normál	2 hét	5
IV.	5/6 AI	MF, MNaCl	2 hét	5
V.	5/6 AI	MF, MNaCl	18-21 nap	8
VI.	5/6 AI	Normál	6 hét	6
VII.	5/6 AI	Normál	11 hét	6
VIII.	Áloperált	Normál	11 hét	6

7. táblázat A krónikus vesebetegségben a renális nNOS szerepének vizsgálatához használt kísérleti csoportok.

5/6 AI=abláció/infarceráció, MF=magas protein tartalmú diéta, MNaCl=magas NaCl tartalmú ivóvíz

3.3.4. Funkcionális paraméterek

Az állatokat a kísérlet elején és a leölésük előtt 24 órára metabolikus ketrecbe helyeztük 24 órás vizeletgyűjtés céljából. A kísérlet végén az állatoktól vért vettünk és ebből a karbamid nitrogén és kreatinin értéket határoztuk meg (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA. Creatinine 1 Kit 555-A és Urea Nitrogén 640-A).

3.3.5. Szövettani vizsgálatok

A szövettani vizsgálatokat a korábban leírtaknak megfelelően végeztük (3.1.5.).

3.3.6. Western blot

3.3.6.1. Minta előkészítés és Triton-X 100 extraktibilitás

A veséből származó mintákat cortex és medulla állományra osztottuk és a mintákat külön vizsgáltuk. A mintákat a korábban leírtaknak megfelelően készítettük elő (lásd 3.2.10.1. és 3.2.10.2.). A kortexből 200µg, a medullából 100µg teljes fehérjemennyiséget használtunk.

3.3.6.2. Antitestek és kontrollok

A mérésekhez nNOS elsődleges nyúl poliklonális antitestet (1:5000 hígítás, 1 óra inkubáció) és másodlagos kecske, anti-nyúl IgG-tormaperoxidáz antitestet (1:3000 hígítás, 1 óra inkubáció) (BioRad, Hercules, CA, USA) alkalmaztunk. Az eNOS kimutatásához elsődleges egér monoklonális antitestet (1:250 hígítás, 1 óra inkubáció) (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA) és másodlagos kecske anti-egér IgG tormaperoxidáz antitestet (1:2000 hígítás, 1 óra inkubáció) (Transduction Laboratories) használtunk.

3.3.6.3. SDS-PAGE, blottolás, immunoblottolás, detektálás

A fentiek a korábban leírtaknak megfelelően történtek (lásd 3.2.10.4., 3.2.10.5, 3.2.10.6. és 3.2.10.7.)

3.3.7. NOS aktivitás mérése

A NOS aktivitást a II. és V. csoport mintáiból mértük a vese kortex és medulla állományának szolubilis frakciójában. A mintákat homogenizáltuk, ultracentrifugáltuk és a felülúszót szeparáltuk. Az endogén arginint Dowex gyanta segítségével a mintából eltávolítottuk és a mintákat nem-szelektív NOS gátló (L-NMA 10mmol/l és L-NAME 20mmol/l) jelenlétében futattuk. A mintákhoz jelzett exogén [³H]-L-arginint adtunk, inkubáltuk, majd a maradék jelzett L-arginint eltávolítottuk Dowex gyanta segítségével. Ezt követően vizsgáltuk a jelzett [³H]-L-citrullin mennyiségét. Az eredményeket (mennyi [³H]-L-arginin konvertálódott [³H]-L-citrulinná) pmol-ban adtuk meg mg proteinre számolva.

3.3.8. Statisztikai analízis

Az adatokat átlag ± SEM (átlag szórása) adtuk meg. Az eredményeket kétmintás t-próba, egyutas variancia analízis (ANOVA) és Newman-Keuls posthoc teszt, regressziós analízis és morfológiai adatokat a korreláció szempontjából Kruskal-Wallis valamint Pearson teszt segítségével analizáltuk. Statisztikailag szignifikánsnak a p<0,05 értéket tekintettük.

3.4. A nem és a nemi hormonok hatásának vizsgálata az immunszuppresszív kezelésre és a renális NOS rendszerre

3.4.1. Kísérleti állatok

A második, az immunszuppresszív szerek hatását és az NO rendszert vizsgáló kísérletben azonos nemű állatok között végeztünk vesetranszplantációt. A vesetranszplantációs kísérletekhez N és H ivarérett F344 (donor) és Lew (recipiens) állatokat (200-220g) használtunk (Harlan, Indianapolis, IN, USA). Az állatok a kísérlet során standard állateleséget (Ssniff, Soest, Németország) és ivóvizet kaptak ad libitum. A kísérletet, az állatkísérleteket felügyelő területileg illetékes etikai hatóság jóváhagyta.

3.4.2. Műtéti beavatkozás

Mind a donor, mind a recipiens állatot elaltattuk pentobarbitál nátriummal (50 mg/tskg i.p., Nembutal, Bayer, Leverkusen, Németország). A recipiensek bal véna, és artéria renálisát izoláltuk és lefoglaltuk, majd a vesét eltávolítottuk. A donor állatban a véna és artéria renális, valamint az ureter kireparálása után a vesét 4 C^o-os Ringer-Laktát oldattal perfundáltuk. Ezt követően a vesét eltávolítottuk és a recipiensbe helyeztük az eltávolított saját vese helyére. Az ereket és az uretert 10-0 prolene fonállal vég-a-véghez egyesítettük. Ezt követően a hasfalat rétegesen zártuk. A transzplantációt követő 10. napon a jobb oldali saját vesét eltávolítottuk.

3.4.3. Kísérleti protokoll

A nem és nemi hormonok hatásának vizsgálata az immunszuppresszív kezelésre és az NO rendszer szerepének felmérésekor a 8. táblázatban leírt csoportokat alkalmaztuk.

A kísérletben mindig azonos nemű állat volt a donor és a recipiens. Allograft (ALLO) esetén a F344 állat szerepelt donorként és a Lew recipiensként. Az izograftok (ISO) esetében mind a donor, mind a recipiens F344 állat volt. A kísérletben az összes állatot az első 10 posztoperatív napon immunszuppresszív kezelésben részesítettük. Egy részük alacsony dózisu CsA kezelést (1,5mg/kg/nap, kísérlet I. és II.), másik részük magasabb dózisu CsA kezelést (3mg/kg/nap, kísérlet III.), míg harmadik részük sirolimus (RAPA) kezelést (1,6mg/kg/nap, kísérlet IV.) kapott. A RAPA kezelést per os, a CsA-t subcutan formában alkalmaztuk. A III. és IV. kísérlet az állatok az opportunisták kivédésére

10mg/kg/nap adagban intramuscularisan ceftriaxon nátrium (Rocephin, Roche, Nutley, NJ, USA) kezelést is kaptak. A transzplantált állatok mellett egészséges, azonos korú állatokat követtünk 22 héten keresztül, hogy az öregedéssel járó eltéréseket az NO rendszerben kiküszöbölhessük (kísérlet V.) Tekintettel arra, hogy az I. kísérletben szinte minden nőstény allograft kilökődött, az ischémia időt csökkentettük 45-ről 30 percre (kísérlet II) és itt csak nőstény ALLO és ISO állatokat vizsgáltunk. Tekintettel az allograft működésének gyors beszűkülésére a II. kísérletben, az ALLO állatokat 7 héttel a transzplantáció után leöltük. Tekintettel a modellben szokottnál nagyobb dózisú CsA, illetve RAPA kezelésre, az infekciók kiküszöbölésére a III. és IV. kísérletben antibiotikus terápiát is használtunk.

Széria	ISO N (n)	ISO H (n)	ALLO N (n)	ALLO H (n)	Ischémia idő (perc)	Kezelés	Követési idő (hét)
I.	5	6	2*	6	45	CsA (1.5 mg/kg/nap)	22
II.	6	-	6	-	30	CsA (1.5 mg/kg/nap)	7
III. (CsA)	7	7	8	8	30	CsA (3 mg/kg/nap)	22
IV. (RAPA)	6	7	6	7	30	RAPA (1.6 mg/kg/nap)	22
V. (Kontrol)	F344 N (n=7)		F344 H (n=7)		-	-	22

8. táblázat Kísérleti csoportok a nem és nemi hormonok hatásának vizsgálatához az immunszuppresszív kezelésre és a renális NOS rendszerre.

*a 7-ből csak 2 állat élte túl a 22 hetes periódust. ISO= izograft, ALLO=allograft, N=nőstény, H=hím, CsA= Cyclosporin A, RAPA=sirolimusz

3.4.4. Funkcionális mérések

Az állatokat 24 órás alacsony NO₂ és NO₃ (NO_x) diéta (ICN, AIN 76) után anyagcsereketrebe helyeztük és a transzplantáció előtt, az ellenoldali nephrectomia idején, a 4, 8, 12, 16, 20 és 22 héten 24 órás vizeletet gyűjtöttünk. A vizeletből meghatároztuk a fehérje, NO_x és kreatinin ürítést. Az állatok leölése előtt általános anesztéziában a vérnyomást mértük az aortába vezetett mérőfej segítségével, majd vérmintát vettünk a karbamid nitrogén és kreatinin meghatározásra a korábbiakban leírt módszerrel.

3.4.5. Szövetteni vizsgálatok

A szövettani vizsgálatok az előzőekben leírt módon történtek (lásd 3.1.5.). A mintákat a Banff-klasszifikációnak megfelelően analizáltuk.

3.4.6. Western Blot

Az előzőekben leírtaknak megfelelően a kortikális és medulláris nNOS és eNOS fehérje expressziót mértük a magas dózisú CsA és a RAPA csoportokban (lásd 3.2.10.).

3.4.7. Statisztikai analízis

Az adatokat átlag \pm SEM (átlag szórása) adtuk meg. A parametrikus adatok összehasonlítása t-teszttel, illetve ANOVA analízissel, majd ezt követő Newman-Keuls teszttel történt. A nem parametrikus adatokat Mann-Whitney teszttel, illetve Kruskal-Wallis egy-utas teszttel és Dunns-féle post hoc teszttel értékeltük. $P < 0.05$ esetén tekintettük a különbséget szignifikánsnak

3.5 Antiinflammatorikus-antioxidáns perfúziós oldat hatása a KAN-ra.

3.5.1. Kísérleti állatok

Hím beltenyészett Fisher patkányokat használtunk donorként és recipienseként is (izograft, ISO, $n=24$). Kontrollként áloperált hím Fisher patkányok szolgáltak ($n=7$). A súlyos kilökődési reakcióval történő összehasonlításra allograft (ALLO) nőstény Fisher donor és Lewis recipiens állatokat alkalmaztunk. Az összes patkányt a Harlan Sprague-Dawley Indianapolis, Ind., USA-tól vásároltuk. Az állatok 9-14 hetesek voltak és 22 héttel a transzplantációt követően öltük le őket.

3.5.2. Műtéti beavatkozás

A 3.4.2 pontban leírtaknak megfelelően történt.

3.5.3. Kísérleti csoportok

A transzplantáción átesett ISO állatokat kezeléstől függően 2 csoportba osztottuk: nem kezelt (ISO-UN, $n=6$) és kezelt (ISO-EP, $n=6$) csoport. Az ISO-UN csoportban a donor

vesét a transzplantáció során Ringer oldattal mostuk át, míg az ISO-EP csoportban a donort és a donor vesét kezeltük. A donor 10 mg/kg dexamethasont kapott i.v. (APP, Los Angeles, Calif., USA) 30 perccel a vese eltávolítása előtt. A donor vesét 2ml/g vese mennyiségű oldattal Ringer oldattal perfundáltk, amely a következőket tartalmazta: 1 mM deferoxamine mesylate (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) és 3 mM 4-hydroxy-tempo (Sigma-Aldrich). A recipienseket ebben a csoportban szintén kezeltük 1%-os L-argininnel (Fresenius Kabi Clayton, Clayton, N.C., USA) és 1 mM 4-hydroxy-tempo-val az ivóvizükben 1 nappal a műtét előttől 10 nappal a műtét utánig. Hét normál állatot vizsgáltunk 22 héten keresztül, mint kontrollt (CON).

A NADPH oxidáz-függő superoxid vizsgálatokhoz pozitív kontrollként Fisher állatokból Lewis állatokba transzplantált ALLO veséket alkalmaztunk (30 perc ischémiás idő és 10 napos 1,5mg/kg/nap CsA kezelés). Ezeket az állatokat 7 héttel a transzplantáció után öltük le a súlyos kilökődési reakció miatt. A transzplantáció idején eltávolított saját veséjüket használtuk kontrollnak.

Az összes ISO állattól metabolikus ketrec segítségével 24 órás vizeletet gyűjtöttünk az induláskor, valamint a 4, 8, 12, 16, 20 és 22. héten. Az állatok a metabolikus ketrecbe helyezés előtt 48 órával standard nitrogén mennyiségű, úgynevezett alacsony NO_x diétát kaptak (AIN 76C, ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, Calif., USA). A vizeletből mértük a fehérje ürítést és a teljes NO produkciót (NO_x=NO₃+NO₂). A kontroll állatokat induláskor és a 22. héten vizsgáltuk. Az állatokat barbiturát anesztézia segítségével altattuk és öltük le. Az aortából vett vérmintából szérum kreatinin, urea nitrogén és NO_x mérések történtek és a veséket eltávolítottuk.

3.5.4. Funcionális mérések.

A korábban leírtaknak megfelelően végeztük (3.1.4.)

3.5.4. Szövetteni vizsgálatok.

A szövettani vizsgálatokat a 3.1.5. pontban leírtaknak megfelelően végeztük el.

3.5.6. Western-blot analízis

A 3.2.10. pontban leírtaknak megfelelően történt.

3.5.7. NOS aktivitás mérése.

A 3.3.7. pontban leírtaknak megfelelően történt.

3.5.8. NADPH-függő szuperxid produkció

A NADPH-függő szuperxid termelődést elektron spin rezonancia (ESR) segítségével mértük. A veséből a korábban leírtaknak megfelelően membrán frakciót szeparáltunk és hydroxylamin spin próba segítségével quantifikáltuk a szuperoxid-gyökök mennyiségét. Az ESR spektrumot EMX-ESR spektrométer (Bruker) és szuperszenzitív Q mikrohullám segítségével detektáltuk.

3.5.9. Statisztikai analízis

Az eredményeket átlag \pm SE adtuk meg. Statisztikai analízisre kétmintás student féle t-tesztet és a hisztológiai adatok értékelésére Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. A statisztikai szignifikanciát $p < 0,05$ esetén fogadtuk el.

3.6. Restriktív fragmenthossz polimorfizmus (PCR-RFLP) vizsgálatok

3.6.1. Betegek

A vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem, Budapest, Magyarország I. sz. Gyermekklinikáján folytattuk. A betegek az IKEM Prága, Nephrológiai Központ, Csehország és az Esseni Egyetem Transzplantációs Ambulanciáján, Németország kezelés és gondozás alatt álló vesetranszplantált páciensekből kerültek ki. A vizsgálatba bevont betegek mindegyike kaukázusi volt. A betegek egy csoportjának grafftunkciója legalább 15 évvel a transzplantáció után megtartott volt (hosszú távú túlélő Tx15). Egy másik csoportba az 1998-ban (eNOS vizsgálat), illetve az 1999-2000 között (HSP72 vizsgálat) vesetranszplantáción átesett betegek kerültek függetlenül grafftunkciójuktól (Tx). A HSP72 polimorfizmus vizsgálata során 2000-2004 között transzplantált és grafftjukat biopsziával igazolt akut rejeckió miatt elvesztett egyéneket is vizsgáltunk (AR). Egy további csoportot, kontrollként egészséges véradók jelentettek (K). Az eNOS vizsgálatához kontroll csoportnak a Tx betegeket használtuk. A vizsgálatokat a Helsinkai deklaráció értelmében, a résztvevők írásos tájékoztatása és beleegyezése után, a Prágai, az Esseni és a Semmelweis Egyetem etikai engedélyvel végeztük. A betegek adatait a 9. táblázat tartalmazza.

Csoportok	Kor (év)	Nem (férfi/nő)	N
Tx15	54,1±11	25/26	51 (eNOS)/48 (HSP)
Tx	54,8±12,6	73/32	98 (eNOS)/105 (HSP)
AR (HSP72 esetén)	45,6±12,5	12/9	21
K (HSP72 esetén)	58,5±11,3	71/60	131

9. táblázat Az egyes betegcsoportok kor és nem szerinti megoszlása.

3.6.2. Immunszuppresszív kezelés

A Tx15 csoportban mindegyik beteg cadaver graftot kapott. A Tx15 csoportban a betegek azatioprin+szteroid standard immunszuppressziót kaptak. A követés során 34 beteg maradt ezen a terápián. Tíz beteg kezelése cyclosporin+szteroidra, 4 betegé tacrolimus+szteroidra, 1 betegé cyclosporin+azatioprin+szteroidra, 1 betegé tacrolimus+azatioprin+szteroidra változott, míg 1 beteg azatioprin monoterápián maradt. Két beteg mycofenolát mofetil kezelést kapott az azatioprin helyett a transzplantációt követő 13. és 15. évben. Az akut rejeckiók terápiája methylprednisolon lökéskezelés és szteroid rezisztencia esetén T-sejt ellenes monoklonális vagy poliklonális antitest kezelés volt (OKT3 vagy ATG).

A Tx csoportban a betegek standard hármas terápiát kaptak, amely cyclosporin+azatioprin+szteroidot jelentett. A betegek közül 98 első, míg 7 második graftját kapta. Összesen 10 beteg kapott élődonortól vesét. Az akut rejeckiókat az előzőekben leírtaknak megfelelően kezelték. Egy évvel a transzplantációt követően mindegyik graft kielégítően működött (a szérum kreatinin <250µmol/l volt mindegyik betegnél).

AR csoportban 14 beteg első, 6 második, míg 1 harmadik graftját kapta. Két beteg kapott élő donortól vesét. Az immunszuppresszív terápia az előzőekben ismertetett hármas kombináció volt. Az akut rejeckiókat egyik kezelési protokollal sem sikerült megakadályozni.

3.6.3. Mintavétel és genotipizálás

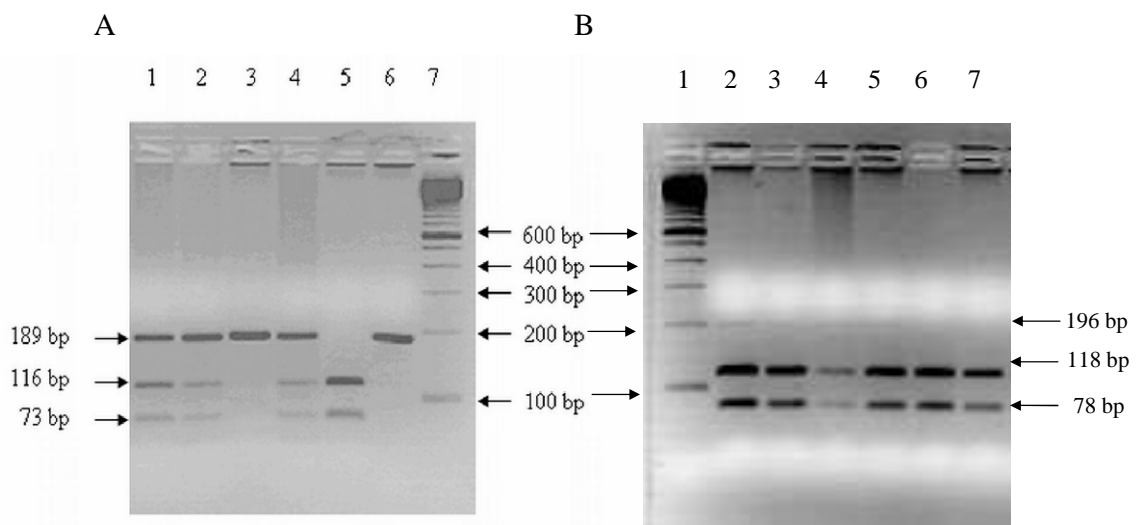
A vérmintákat a betegektől a reguláris kontroll vizsgálatok során, a betegek írásos beleegyezését követően vettük. A DNS-t teljes vérből QIAamp® blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével vontuk ki. A HSPA1B A(1267)G genetikai polimorfizmus detektálásához a DNS mintákat 61°C annealing hőmérsékleten (38 ciklus)

amplifikáltuk a következő primerekkel: sense 5'-acc ctg gag ccc gtg gag aa-3' és antisense: 5'-cac ccg ccc gcc ccg tag g-3', majd a keletkezett 189 bp nagyságú terméket *Pst I* (Sigma Chemical Co, USA) restrikciós endonukleáz enzimmal emésztettük. (5/A ábra)

A HSPA1A G(190)C genetikai polimorfizmus vizsgálatához sense: 5'-cga cct ggg cac cac cta ctc c-3' és antisense: 5'-aat cag gcg ctt cgc gtc aaa c-3' primereket használtunk, 61°C annealing hőmérsékleten (38 ciklus). A 196 bp nagyságú DNS terméket *BsrBI* (Sigma Chemical Co, USA) restrikciós endonukleáz enzimmal hasítottuk. (6. ábra)

Az eNOS G(894)T genetikai polimorfizmus detektálásához a DNS mintákat 63°C annealing hőmérsékleten (35 ciklus) amplifikáltuk a következő primerekkel: sense 5'-cat gag gct cag ccc cag aac-3' és antisense: 5'-agt caa tcc ctt tgg tgc tca c-3', majd a keletkezett 206 bp nagyságú terméket *Mbol* (New England Biolabs) restrikciós endonukleáz enzimmal emésztettük egy 119 és egy 87 bp nagyságú terméké a T894 (Asp298) jelenléte esetén.

A keletkezett termékeket ethidium bromiddal festett 3%-os agaróz gélen, 100 bp DNS marker mix READY-LOAD™ (Invitrogen, Frankfurt, Németország) párhuzamos futtatásával detektáltuk.



6. ábra A HSP72 (A) és HSP73 (B) gének PCR-RFLP analízise A DNS molsúlymarkert a 7 (A) ill. 1 (B) számú oszlop jelzi, az oszlop mellett jelöltük a marker fragmenseinek nagyságát. A hasítási termék hosszakat a bal (A) ill. jobb (B) oldalon ábrázoltuk. A HSP72 esetében a 3, 6 oszlop jelöli a homozigóta vad 1267AA, az 1, 2, 4 oszlop a heterozigóta 1267AG, míg az 5 oszlop a homozigóta mutáns 1267GG genotípust. A HSP73 gén esetében a 2 oszlop ábrázolja a heterozigóta 190GC genotípust, míg a többi oszlop a homozigóta mutáns 190GG genotípust jelöli.

3.6.4. Statisztikai analízis

Az allél és genotípus frekvenciákat χ^2 teszttel és Fisher exact teszttel, illetve bináris logisztikus regresszió analízissel értékeltük (Wolf és Holm's post hoc test). A haplotípus analíziseket, a linkage-disequilibrium tesztet, és a Hardy-Weinberg egyensúly vizsgálatát Arlequin™ (<http://anthropologie.unige.ch/arlequin/>) szoftverrel végeztük. A klinikai adatokat ANOVA és Mantel-Hanzel teszt segítségével végeztük. Szignifikáns eltérés esetén multivariancia analízist ANCOVA használtunk az egyéb faktorok hatásának kizárására. Az adatokat átlag \pm SD értékben adtuk meg. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikáns különbségnek.

4. Eredmények

4.1. Nem és nemi hormonok hatásának vizsgálata a renális NOS rendszerre IR-s vesekárosodást követően

4.1.1. Funkcionális mérése

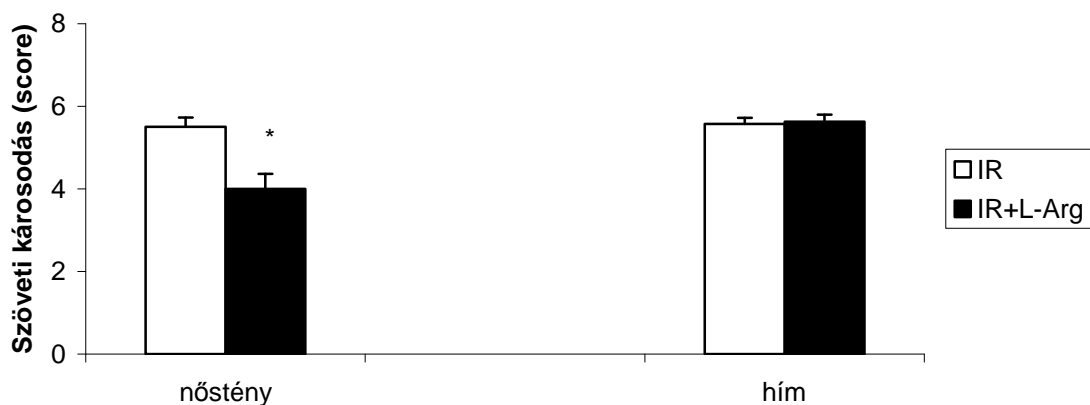
A szérum urea nirogén és kreatinin értékeket a 10. táblázat mutatja. Az egyes kísérleti csoportok között az értékekben szignifikáns különbség nem volt kimutatható. Az iR-t követőem minden csoportban szignifikánsan emelkedett a BUN és a kreatinin értéke a kontrollokhoz képest ($p < 0,001$).

	nőstény		hím	
	S-cr ($\mu\text{mol/l}$)	BUN (mmol/l)	S-cr ($\mu\text{mol/l}$)	BUN (mmol/l)
IR	669 \pm 32*	64 \pm 8*	552 \pm 23*	60 \pm 6*
IR+L-arg	613 \pm 23*	72 \pm 6*	603 \pm 23*	66 \pm 7*
Kontroll	106 \pm 17	8 \pm 1	136 \pm 29	16 \pm 1

10. táblázat. A szérum kreatinin és urea nitrogén értékek az egyes kísérleti csoportokban. * $p < 0,001$ vs kontroll.

4.1.2. Hisztológia

A hisztológiai eredményeket a 7. ábra mutatja. L-arginin előkezelés hatására a nőstényekben szignifikánsan csökkent a szöveti károsodás a szintén előkezelt hímekkel összehasonlítva ($p < 0,05$). A nem-kezelt hím és nőstény állatok, valamint a nem-kezelt hím és kezelt hím állatok között a szöveti károsodás mértékében eltérés nem volt kimutatható.



7. ábra. Hisztológiai eltérések L-arginin előkezelést követően. * $p < 0,05$ vs IR+L-arg hím

4.1.3. *iNOS*, *eNOS* és *nNOS* mRNS expresszió

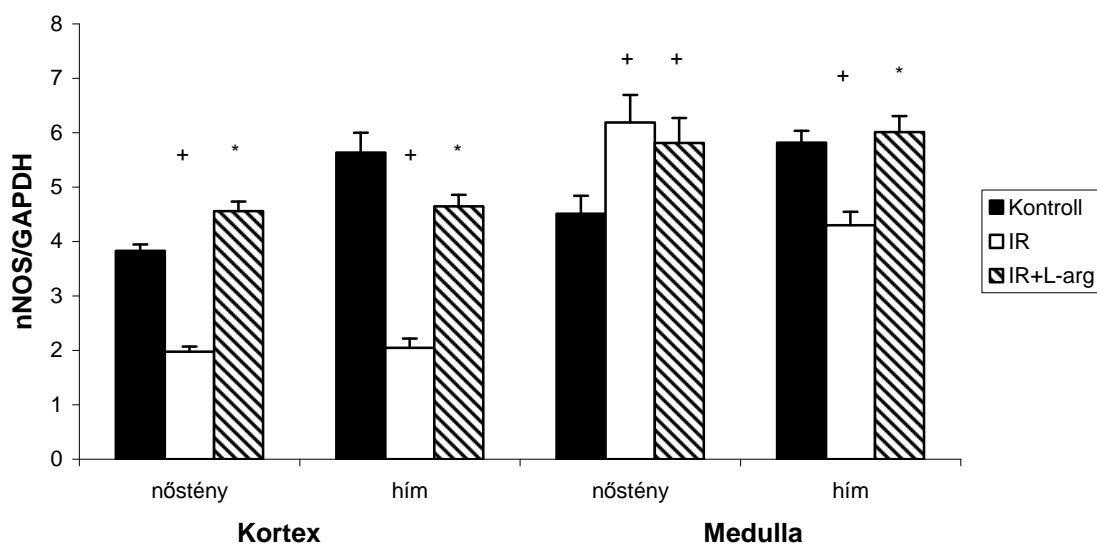
Az *iNOS*, *eNOS* és *nNOS* mRNS expresszióját RT-PCR segítségével mértük. Az eredményeket a 8., 9. és 10 ábra mutatja. Nőstényekben, alaphelyzetben szignifikánsan alacsonyabb mRNS szintet mértünk mindhárom izoforma esetén hímekkel összehasonlítva mind a kortexben, mind a medullában.

Az IR-t követően a *nNOS* mRNS expressziója szignifikánsan csökkent a kortexben mindkét nemben és a medullában hímekben. A medullában a nőstényekben szignifikánsan magasabb *nNOS* mRNS volt mérhető a kontroll nőstényekkel és hímekkel összehasonlítva.

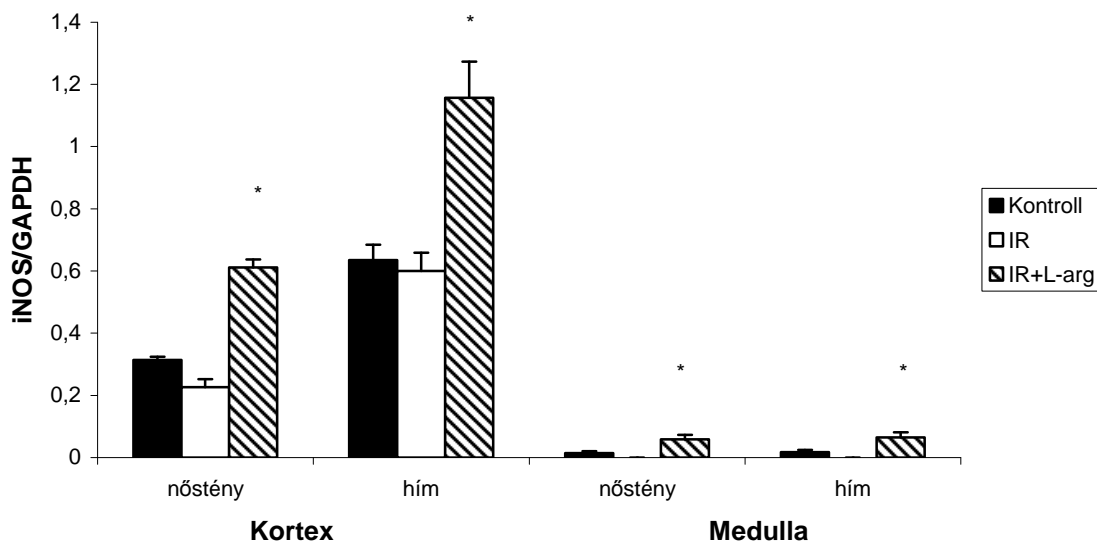
Az *iNOS* mRNS expresszió nem változott sem a kortexben, sem a medullában egyik nemben sem.

Az *eNOS* mRNS termelődés szignifikánsan csökkent nőstény és hím állatok kortexében IR-t követően, míg nem változott a medullában.

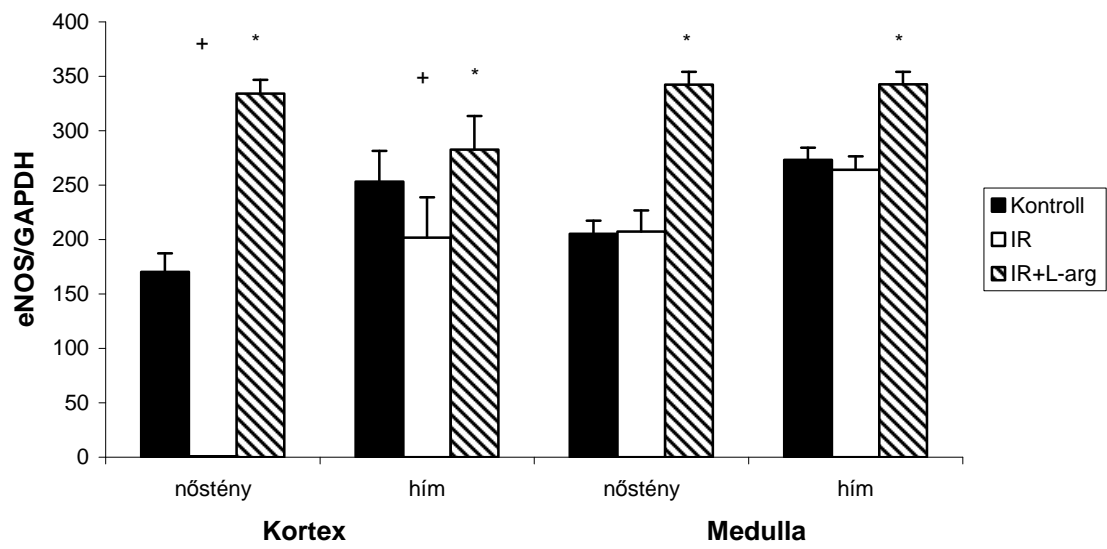
L-arginin kezelés szignifikánsan emelte mindhárom izoforma mRNS expresszióját mind a kortexben, mind a medullában mindkét nemben a kezeletlen IR-s csoportokhoz viszonyítva. Az egyetlen kivétel a nőstény állatok medullájában mért *nNOS* mRNS expresszió, ahol nem volt kimutatható különbség az IR-s csoporthoz képest. A legnagyobb változást (emelkedett expresszió) a nőstény állatok kortexében az *eNOS* esetében észleltük. Egy másik fontos megfigyelés, hogy az *iNOS* expresszió a L-arginin előkezelt nőstények kortexében szignifikánsan alacsonyabb volt a hímekkel összehasonlítva.



8. ábra. nNOS mRNS expresszió a kortexben és medullában hím és nőstény állatokban. +p<0,05 vs kontroll és IR, *p<0,05 vs IR.



9. ábra. iNOS mRNS expresszió a kortexben és medullában hím és nőstény állatokban. *p<0,05 vs kontroll és IR



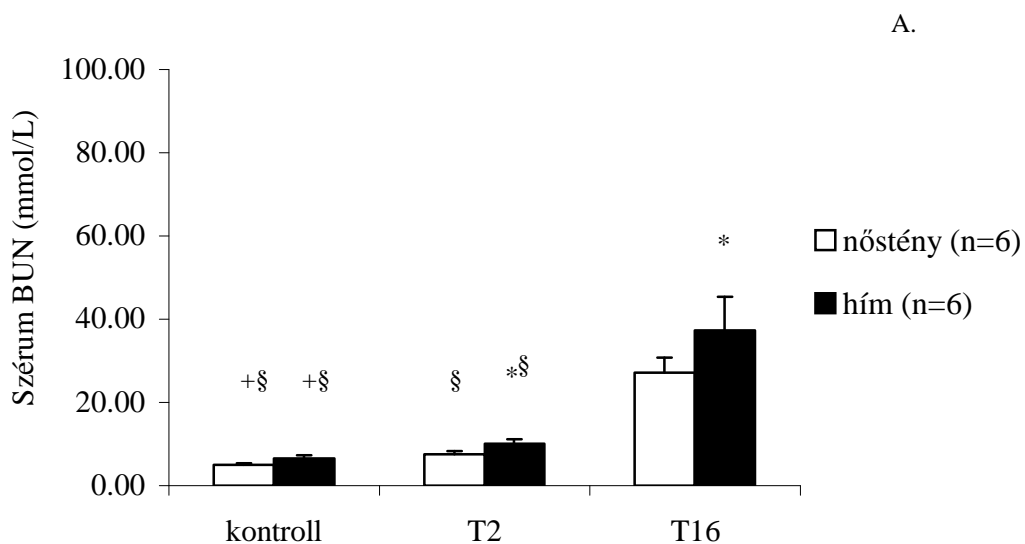
10. ábra. nNOS mRNS expresszió a kortexben és medullában hím és nőstény állatokban. + $p < 0,05$ vs kontroll, * $p < 0,05$ vs IR.

4.2. A nem és a nemi hormonok hatásának vizsgálata a vese IR károsodására. A NAK és a HSP72 szerepe.

4.2.1. Nemi különbségek a szérumban BUN, CN, nátrium és kálium értékekben renális IR károsodást követően

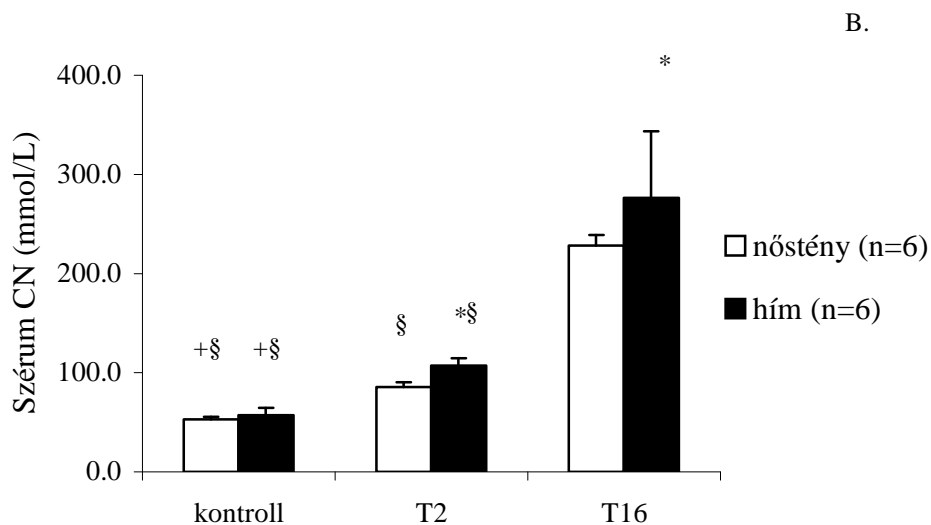
A kontroll nőstény és hím állatok BUN és szérumban CN értékei nem különböztek. Az ischémiás inzultust 2 órával és 16 órával követően nőstényekben szignifikánsan alacsonyabb BUN és CN értékeket detektáltunk, mint hímeinkben. (T2: BUN: $7,5 \pm 0,7$ vs. $10,2 \pm 1,0$, CN: 85 ± 5 vs. 107 ± 7 ; $P < 0,05$; T16: BUN: $27,2 \pm 3,6$ vs. $37,2 \pm 8,1$; CN: 228 ± 7 vs. 276 ± 8 ; $p < 0,05$), (11/A, B ábra). A kontroll állatokban nem találtunk különbséget a szérumban nátrium és kálium értékek között, de a posztischémiai időszakban T2 és T16 időpontokban a szérumban kálium szignifikánsan magasabb volt a hímeinkben, mint a nőstényekben ($p < 0,05$) (11. táblázat).

A renális erek 55 percre történő leztorítása mindkét nemből ARF kialakulásához vezetett, amit a szérumban BUN, CN és kálium értékeinek szignifikáns emelkedése is jelzett (kontroll vs. T2 és T2 vs. T16, $p < 0,01$).



11/A ábra Ivarérett nőstény és hím állatok szérumban urea nitrogén (BUN) értékeinek változása renális ischémia előtt (kontroll, n=6) valamint 2 (T2, n=6) és 16 órával (T16, n=6) az ischémia után.

* $p < 0,05$ vs. nőstények, + $P < 0,05$ vs. T2; § $P < 0,05$ vs. T16



11/B ábra Ivarérett nőstény és hím állatok szérum kreatinin (CN) értékeinek változása renális ischémia előtt (kontroll, n=6) valamint 2 (T2, n=6) és 16 órával (T16, n=6) az ischémia után.
 * $p < 0,05$ vs. nőstények, + $P < 0,05$ vs. T2; § $p < 0,05$ vs. T16

Csoportok		szérum nátrium (mmol/L)	szérum kálium (mmol/L)
kontroll	N	140 ± 4 §	4.1 ± 0.4 +§
	H	144 ± 2 §	4.7 ± 0.1 +§
T2	N	138 ± 1 §	5.1 ± 0.5
	H	141 ± 3 §	5.2 ± 0.6 * §
T16	N	133 ± 3	5.3 ± 0.4
	H	134 ± 4	7.0 ± 0.9 *

11. táblázat Ivarérett nőstény (N) és hím (H) állatok szérum nátrium és kálium értékeinek változása a renális ischémia előtt (kontroll, n=6) valamint 2 (T2, n=6) és 16 órával (T16, n=6) az ischémia után.
 * $p < 0,05$ vs. nőstények, + $p < 0,05$ vs. T2; § $p < 0,05$ vs. T16

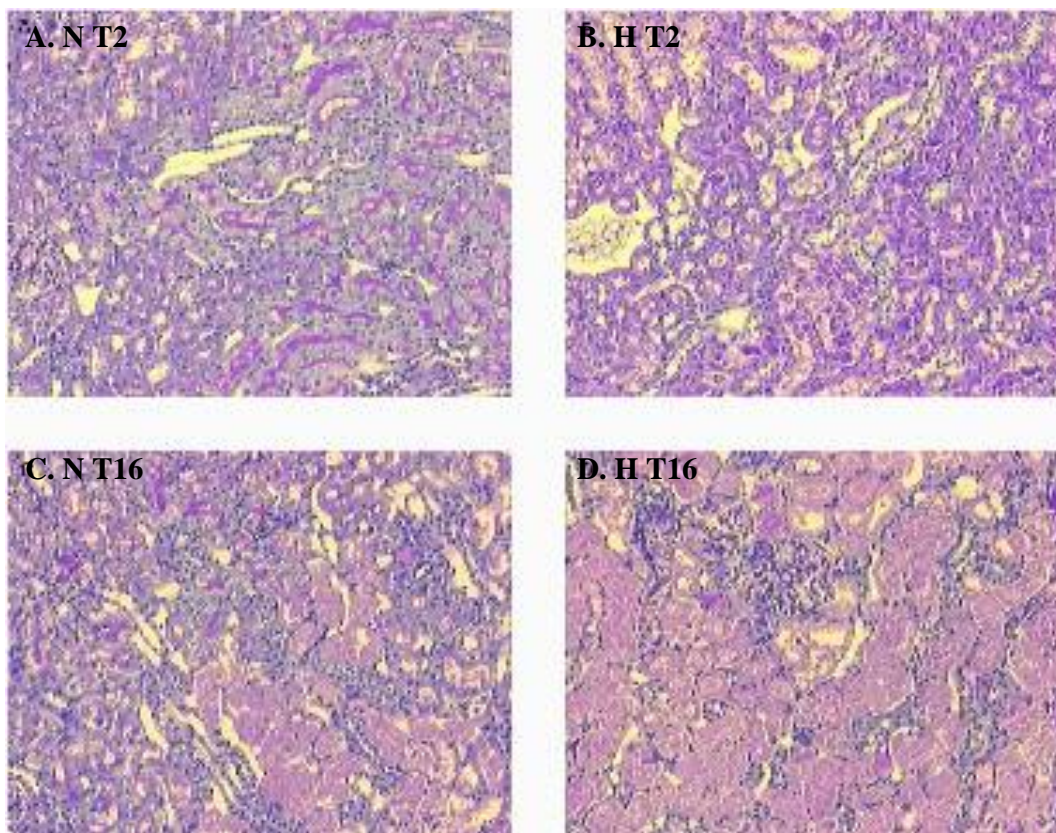
4.2.2. Nemi különbségek a NKA működésében renális IR károsodást követően

4.2.2.1. Nemi különbségek a szövettani károsodás mértékében renális IR károsodás előtt és 2 illetve 16 órával az ischémiázás után

A posztischémiás ARF súlyosságának megítélésére a PAS-sal festett veseminták hisztológiai változásait értékeltük. A szövettani vizsgálat az uninefrektomizált kontroll állatokban, nőstényekben és hímekben egyaránt egészséges vese struktúrát mutatott. T2 időpontban nem volt szignifikáns nemi különbség a vizsgált hisztológiai paraméterekben. T16-ban nőstényekben a tubuláris nekrozis és a tubulussejt feloldódás mértéke kevésbé volt kifejezett, mint hímekben (tubuláris nekrozis: nőstény: 2,5 (2-4) vs. hím: 4,0 (4-4); tubulussejt feloldódás nőstény: 3,0 (1-4) vs. hím: 4,0 (4-4); $p < 0.05$). A perivaszkuláris leukocita infiltrációban nem volt jelentős nemi különbség.

A renális erek 55 percig tartó lezorítása mindkét nemben a veseszövet szignifikáns károsodását eredményezte, melyet a hisztológiai paraméterek (tubuláris nekrozis, tubulussejt feloldódás, perivaszkuláris leukocita infiltráció) változása is tükröz (kontroll vs. T2, és T2 vs. T16; $p < 0,05$).

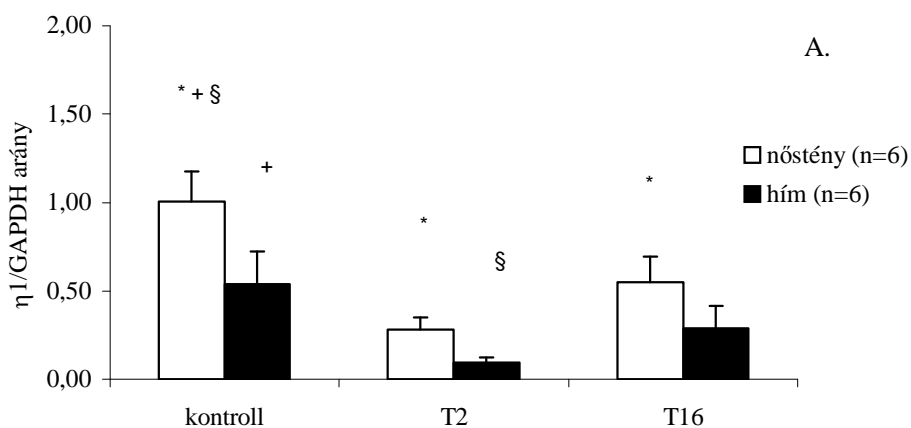
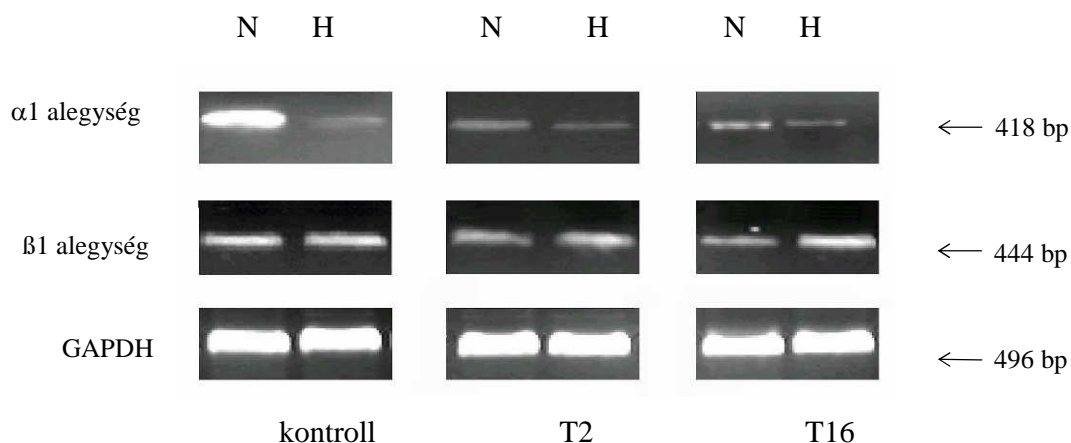
Glomeruláris károsodást, intersticiális ödémát, illetve intersticiális limfocita infiltrációt egyik csoport szövetmintáiban sem észleltünk (12.ábra).



12. ábra Ivarérett nőstény (N) és hím (H) állatok posztischémiás veséjének szövettani képe. Nőstény és hím állatok PAS-sal festett veséjének hisztopatológiai analízise renális ischémia után 2 (A, B) és 16 órával (C, D).

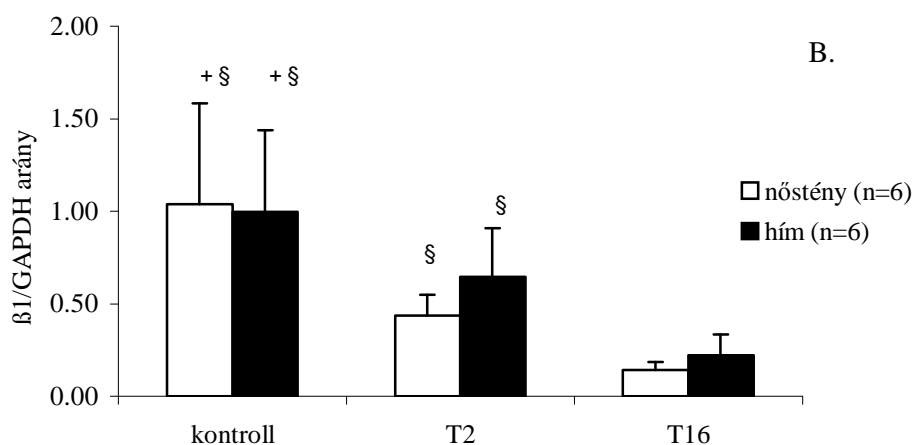
4.2.2.2. Nemi különbségek a NKA α_1 és β_1 alegységének mRNS expressziójában renális IR károsodást követően

A NKA α_1 alegységének mRNS expressziójában szignifikáns nemi különbséget észleltünk már a kontroll állatokban is. A kontroll nőstényekben az α_1 alegység mRNS expressziója közel kétszerese volt a hímekének (kontroll: nőstény vs. hím: $p < 0,05$). T2 időpontban a különbség még kifejezettebb volt, a nőstények NKA α_1 mRNS expressziója háromszorosa volt a hímekben mértnek és a szignifikáns nemi különbség még T16-ban is kimutatható maradt (T2 és T16: nőstény vs. hím: $p < 0,05$). Bár a T2 időpontban az α_1 alegység mRNS expressziója mindkét nemben jelentősen csökkent a kontroll állatokhoz képest, nőstényekben a csökkenés mértéke fele volt a hímekben észleltnek (nőstény vs. hím: $p < 0,05$; kontroll vs. T2: $p < 0,05$, nőstényben és hímben egyaránt). Az átmeneti csökkenést követően T16-ban mindkét nemben az α_1 alegység mRNS szintjének növekedését észleltük (T2 vs. T16 $p < 0,05$, nőstényben és hímben egyaránt) (13/A ábra).



13/A ábra A renális IR károsodás hatása a NKA $\alpha 1$ mRNS expresszióra patkány veseszövetében. A NKA $\alpha 1$ alegységének mRNS expresszióját nőstény (N □) és hím (H ■) állatokban renális ischémia előtt (kontroll, n=6), valamint 2 (T2, n=6) és 16 órával (T16, n=6) az ischémia után mértük. **Felső kép:** A NKA $\alpha 1$ és $\beta 1$ alegység illetve a GAPDH RT-PCR analízis reprezentatív képe. **Alsó kép:** A NKA $\alpha 1$, mRNS GAPDH mRNS-re vonatkoztatott relatív jelintenzitása. Az adatok átlag \pm SD értékeket jelölnek. * $p < 0,05$ vs. H; + $p < 0,05$ vs. T2; § $p < 0,05$ vs. T16.

A NKA $\beta 1$ alegység mRNS expressziójának változása az α alegységtől eltérő dinamikát mutatott. A $\beta 1$ mRNS expressziója az ischémiás inzultust követően folyamatosan csökkent a T16 időpontig és egyik időpontban sem észleltünk szignifikáns nemi különbséget (kontroll vs. T2: $P < 0,05$; T2 vs. T16: $P < 0,05$, nőstényekben és hímekben egyaránt) (13/B ábra).



13/B ábra A renális IR károsodás hatása a NKA β1 mRNS expresszióra patkány veseszövetében. A NKA β1 alegységének mRNS expresszióját nőstény (N □) és hím (H ■) állatokban renális ischémia előtt (kontroll, n=6), valamint 2 (T2, n=6) és 16 órával (T16, n =6) az ischémia után mértük. A NKA β1 alegység illetve a GAPDH RT-PCR analízis reprezentatív képe a 14/A felső ábrán látható. A NKA β1 mRNS GAPDH mRNS-re vonatkoztatott relatív jelintenzitása. Az adatok átlag ± SD értékeket jelölnek. * p < 0,05 vs. H; + p < 0,05 vs. T2; § p < 0,05 vs. T16.

4.2.2.3. Nemi különbségek a NKA α1 és β1 alegység fehérje expressziójában és lokalizációjában renális IR károsodást követően

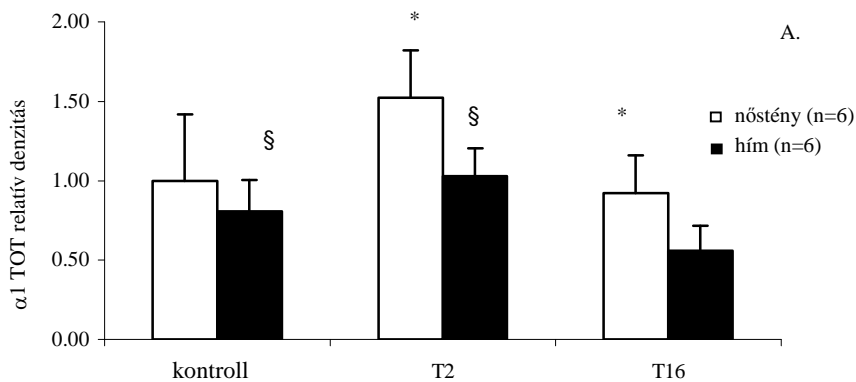
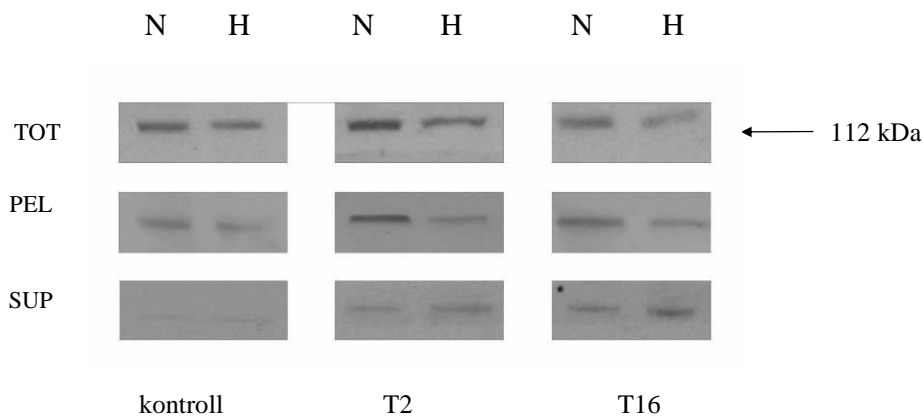
A NKA α1, illetve β1 alegységek protein szintjét TOT (totál veseszövet) veseszövet homogenizátumban határoztuk meg. A celluláris lokalizáció megítélésére a Triton X-100 extrakcióval elválasztott Triton-szolubilis (SUP) és Triton-inszolubilis (PEL) frakciókban mértük az egyes alegységek fehérjeszintjét.

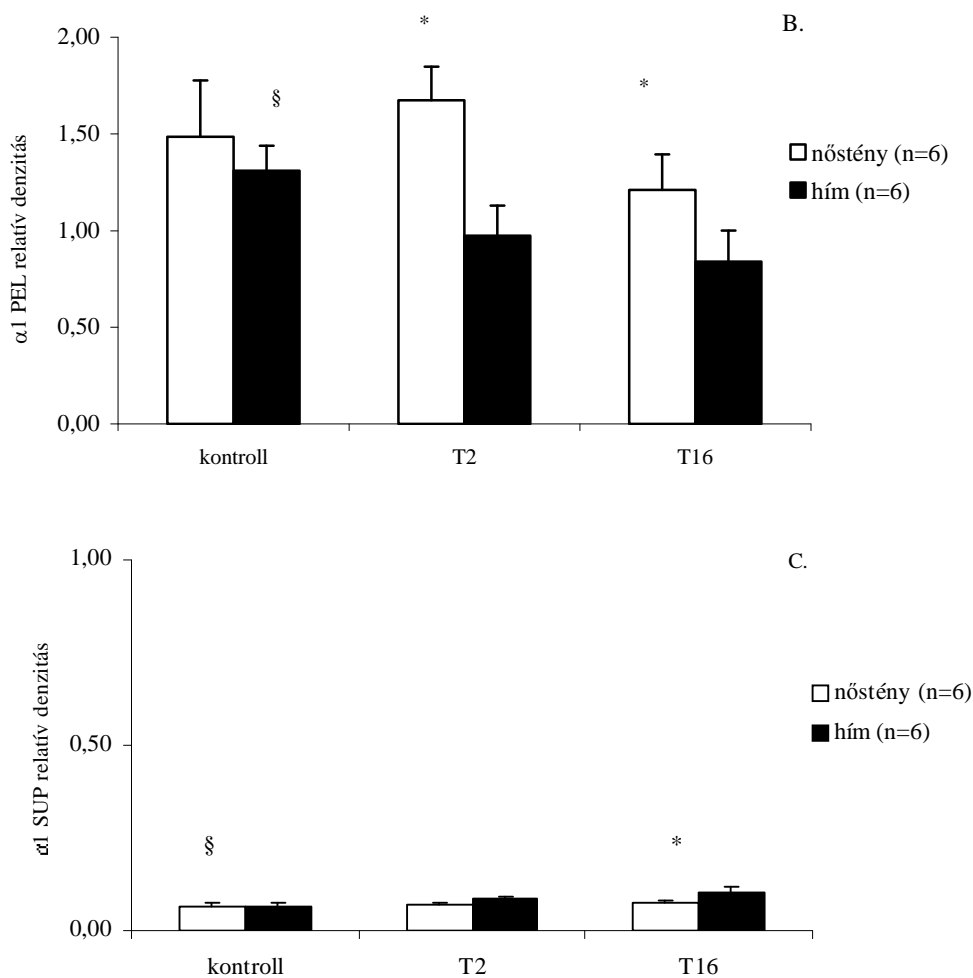
TOT-α1: A TOT veseszövet homogenizátumban a kontroll csoportok között nem volt nemi különbség NKA α1 alegység protein mennyiségében. T2 és T16 időpontban a NKA α1 fehérje szintje szignifikánsan magasabb volt nőstényekben, mint hímelekben (N vs. H: $p < 0,05$). A két nemből különböző volt a NKA α1 alegység fehérjeszint változás dinamikája a reperfüzió folyamata során. Míg nőstényekben a fehérjeszint lényegében változatlan maradt a vizsgált periódusban, addig hímelekben, T2 időponthoz képest, T16-ban jelentős csökkenést tapasztaltunk ($p < 0,05$ vs. T16) (14/A ábra).

Triton inszolubilis PEL- α1: A PEL frakcióban a TOT homogenizátumhoz hasonló változásokat észleltünk. A kontroll csoportok között nem volt nemi különbség a katalitikus aktivitásért felelős, bazális membránhoz kötött NKA α1 alegységének fehérje szintjében, de T2 és T16 időpontokban nőstényekben magasabb fehérjeszintet detektáltunk (N vs. H: $p < 0,05$). A TOT frakcióhoz hasonlóan a NKA α1 protein szintje nőstényekben nem változott a

vizsgált periódus során, míg hímekben szignifikánsan csökkent (T0 vs. T16, $p < 0,05$) (14/B. ábra).

Triton solubilis SUP- $\alpha 1$: A SUP frakcióban nem volt nemi különbség a kontroll és a T2 csoportok között. T16-ban azonban a NKA $\alpha 1$ alegység protein szintje alacsonyabb volt a nőstényekben, mint a hímekben. (N vs. H: $p < 0,05$). Míg nőstényekben a vizsgált periódusban nem változott számottevő mértékben az $\alpha 1$ alegység protein szintje, addíg hímeknél T16-ban szignifikáns emelkedést tapasztaltunk, vagyis több fehérje került szolubilis (inaktív) állapotba. (T2 vs. T16; $p < 0,05$) (14/C. ábra).

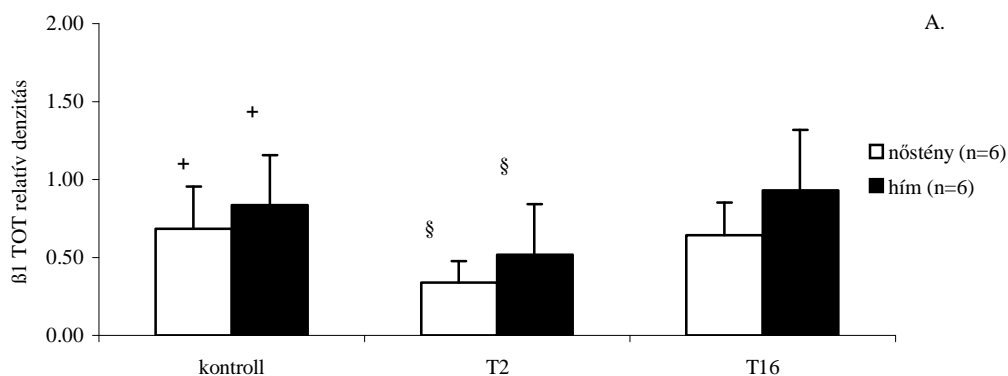
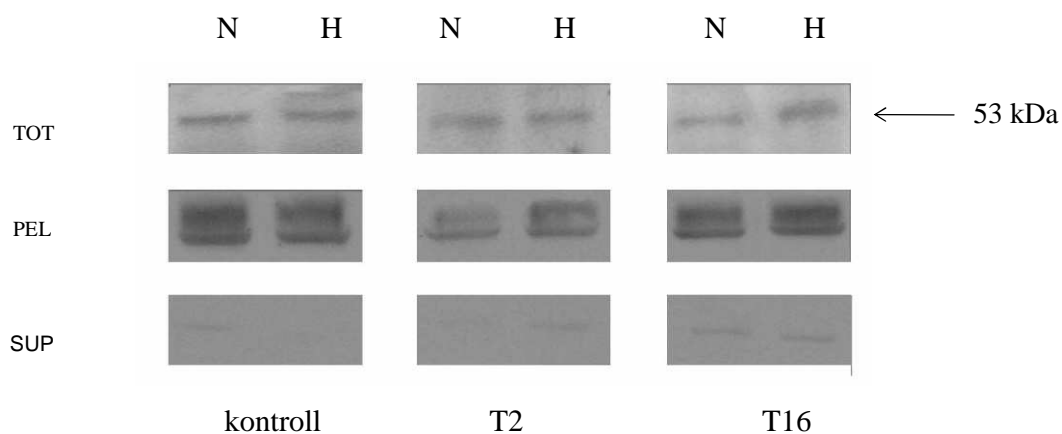


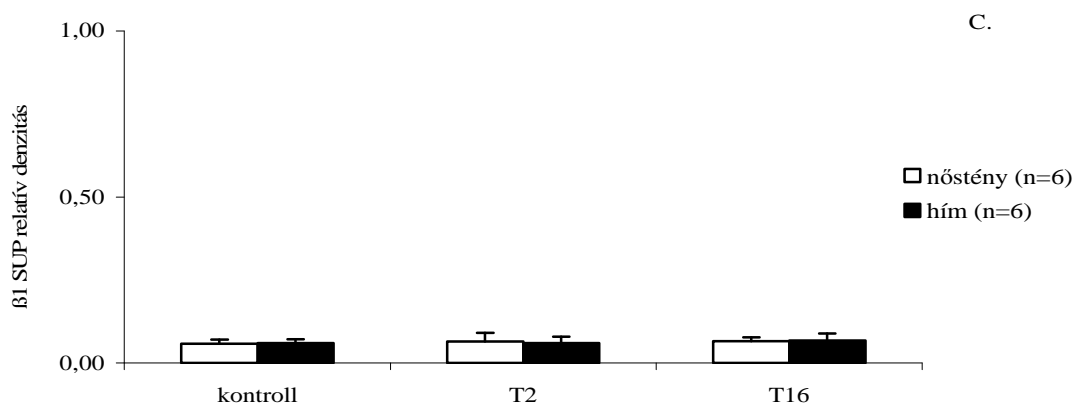
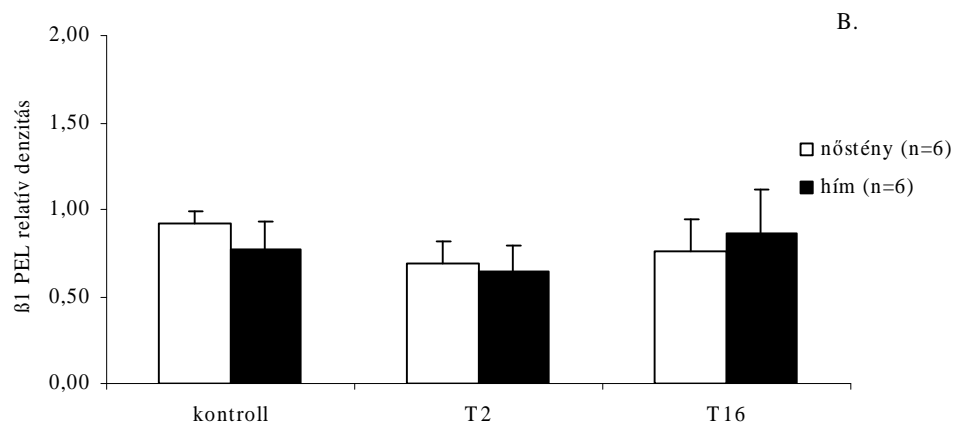


14.ábra A renális IR károsodás hatása a NKA $\alpha 1$ alegység fehérje expressziójára és celluláris megoszlására patkány veseszövetében. A NKA $\alpha 1$ alegységének expresszióját nőstény (N □) és hím (H ■) patkányok teljes veseszövet homogenizátumában (TOT), Triton-inszolubilis pellet (PEL) és Triton-szolubilis szupernatáns (SUP) frakciókban határoztuk meg kontroll állatokban (n=6) illetve 2 órával (T2, n=6) és 16 órával (T16, n=6) az ischémiát követően. **Felső kép:** A NKA $\alpha 1$ alegység Western blot vizsgálat reprezentatív képe a TOT (A), PEL (B) és SUP (C) frakciókban. **Alsó kép:** A Western blot képeket denzitometriásan belső standardra vonatkoztatva értékeltük. Az adatok átlag \pm SD értékeket jelölnek. * $p < 0.05$ vs. H; [§] $p < 0.05$ vs. T16.

4.2.2.4. Nemi különbségek a NKA β_1 alegység fehérje expressziójában és lokalizációjában renális IR károsodást követően

A NKA β_1 alegység protein expressziója az egyes frakciókban az α_1 -től eltérően változott. *TOT- β_1* : T2 időpontban a NAK β_1 protein szintje a kontroll csoportokhoz képest csökkent, nőstényekben és hímekben egyaránt (kontroll vs. T2: $p < 0,05$). Ezt követően T16-ban a β_1 alegység fehérje szintje visszatért a kiindulási szintre ($p < 0,05$ T2 vs. T16, mindkét nemben). Nemi különbséget a vizsgált időpontok egyikében sem láttunk (15/A ábra). *Triton inszolubilis PEL* és *Triton szolubilis SUP- β_1* : A β_1 protein szintjei nem változtak szignifikánsan a vizsgált periódusban, bár tendenciájukat tekintve korreláltak a TOT frakció változásaival. Nemi különbséget nem észleltünk egyik csoportban sem (15/B-C ábra).



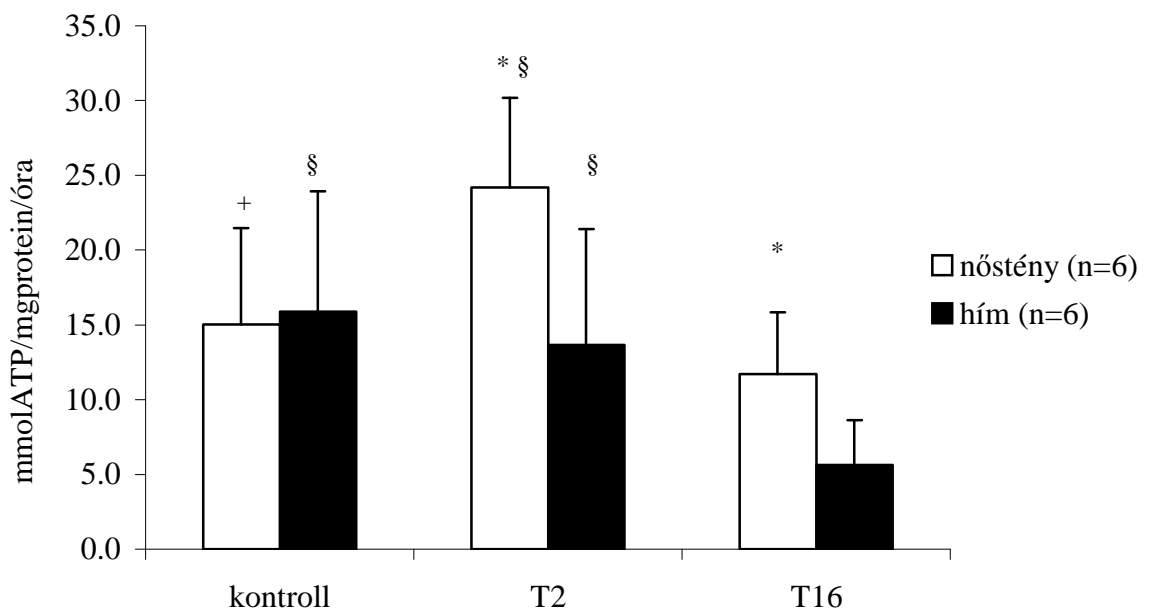


15.ábra A renális IR károsodás hatása a NKA $\beta 1$ alegység fehérje mennyiségére és celluláris megoszlására patkány veseszövetében. A NKA $\beta 1$ alegységének expresszióját nőstény (N □) és hím (H ■) patkányok teljes veseszövet homogenizátumában (TOT), Triton-inszolubilis pellet (PEL) és Triton-szolubilis szupernatáns (SUP) frakciókban határoztuk meg kontroll állatokban (n=6) illetve 2 órával (T2, n=6) és 16 órával (T16, n=6) az ischémiát követően. **Felső kép:** A NKA $\beta 1$ alegység Western blot vizsgálat reprezentatív képei a TOT (A), PEL (B) és SUP (C) frakciókban. **Alsó kép:** A Western blot képeket denzitometriásan belső standardra vonatkoztatva értékeltük. Az adatok átlag \pm SD értékeket jelölnek. * $p < 0,05$ vs. H; § $p < 0,05$ vs. T16.

4.2.2.5. Nemi különbségek a NKA enzimaktivitásában

A NKA enzimaktivitásának változása követte az $\alpha 1$ alegység TOT és PEL frakciókban észlelt fehérjeszint változásokat. A kontroll csoportok között nem volt nemi különbség az ionpumpa aktivitásában. T2 időpontban nőstényekben szignifikánsan nagyobb enzimaktivitást detektáltunk, mint hímekben (N vs. H: $14,9 \pm 2,3$ vs. $9,15 \pm 2,21$ U; $p < 0,05$). Az enzimaktivitásban észlelt nemi különbség T16 időpontban is fennállt (N vs. H: $11,7 \pm 4,1$ vs. $5,65 \pm 2,3$ U; $p < 0,05$).

A két nemben eltért az enzimaktivitás változásának dinamikája is: míg nőstényekben nem volt szignifikáns változás az ionpumpa aktivitásában, addig hímekben a vizsgált periódus alatt a pumpafunkció folyamatos csökkenését tapasztaltuk (kontroll vs. T2 vs. T16: $15,89 \pm 8,0$ vs. $9,15 \pm 2,21$ U vs. $5,65 \pm 3,0$ U; $p < 0,05$) (16. ábra).



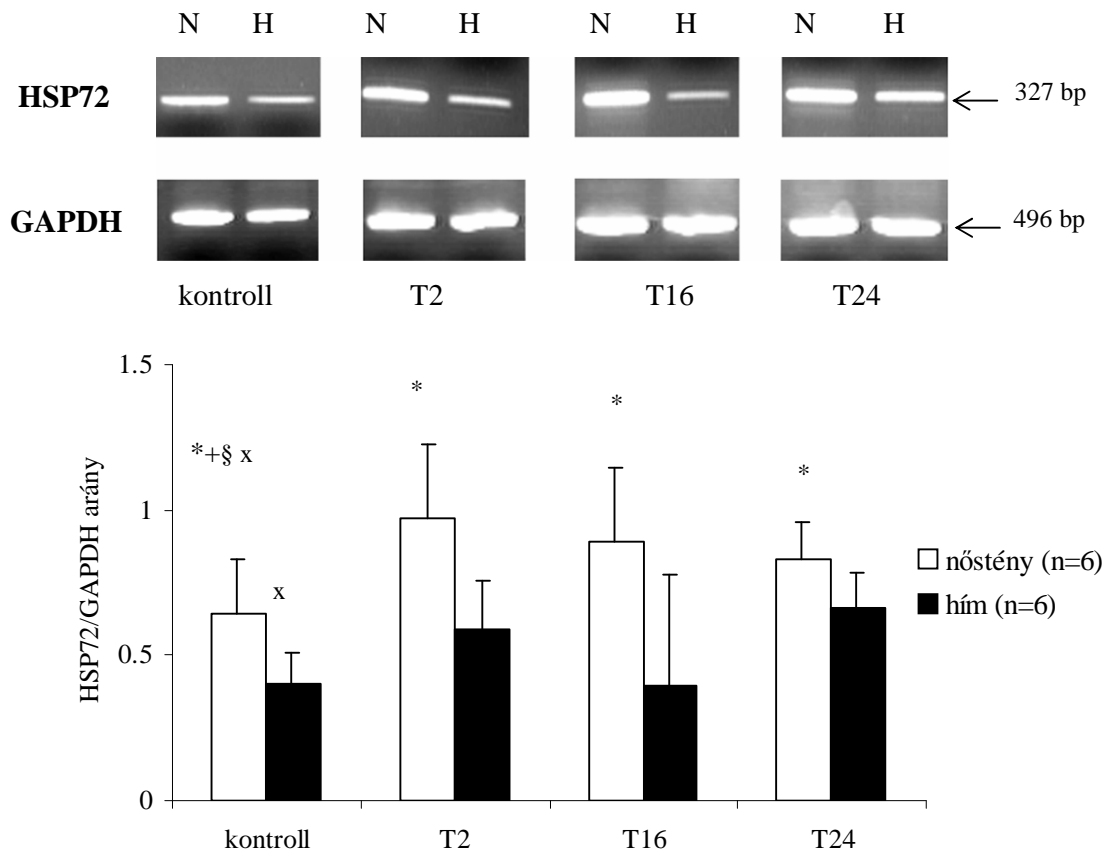
16.ábra A renális IR károsodás hatása a NKA enzimaktivására patkány teljes vesezövet homogenizátumában. A NKA aktivitást nőstény (N □) és hím (H ■) patkányok TOT vesezövet homogenizátumában határoztuk meg kontroll állatokban (n=6), illetve 2 órával (T2, n=6) és 16 órával (T16, n=6) az ischémiát követően. Az adatok átlag \pm SD értékeket jelölnek. * $p < 0,05$ vs. H; + $p < 0,05$ vs. T2; § $p < 0,05$ vs. T16.

4.2.3. Nemi különbségek a HSP72 expressziójában renális IR károsodást követően

4.2.3.1. Nemi különbségek a HSP72 mRNA expressziójában

A HSP72 és a GAPDH mRNA expressziójának arányát kontroll, illetve az ischémia után T2, T16, és T24 időpontban leölt nőstény és hím állatok vesemintáiban vizsgáltuk (17. ábra).

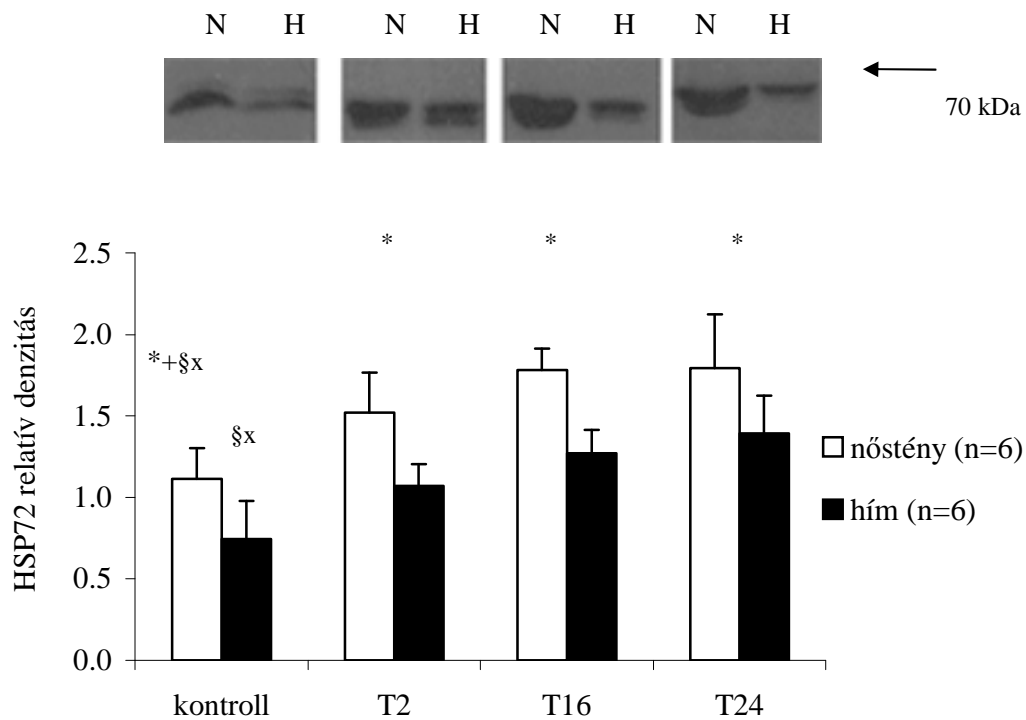
A HSP72 mRNA expressziója nőstényekben szignifikánsan magasabb volt már a kontroll csoportokban is ($p < 0,05$). A nemi különbség az ischémiát követő reperfúzió alatt is megmaradt. Míg nőstényekben az ischémiát követően a HSP72 mRNA expresszió szignifikáns mértékben növekedett (kontroll vs. T2: $p < 0,05$), addig hímeknél ez az expresszióváltozás kisebb mértékű volt. Hímekben a HSP72 mRNA szintje csak 24 órával az ischémia után érte el a kontroll nőstényekben mért szintet.



17. ábra A renális IR károsodás hatása a HSP72 mRNA expressziójára patkány veseszövetében. A HSP72 mRNA expresszióját nőstény (N □) és hím (H ■) állatokban a renális ischémia előtt (kontroll, n=6) valamint 2 (T2, n=6), 16 (T16, n=6) és 24 (T24, n=6) órával az ischémia után mértük. **Felső kép:** A HSP72 és a GAPDH RT-PCR eredményének reprezentatív képe. **Alsó kép:** A HSP72 mRNA GAPDH mRNShoz viszonyított relatív jelintenzitása. Az adatok átlag ± SD értékeket jelölnek. * $p < 0,05$ vs. H; + $p < 0,05$ vs. T2; § $p < 0,05$ vs. T16; x $p < 0,05$ vs. T24.

4.2.3.2. Nemi különbségek a HSP72 fehérje mennyiségében

A HSP72 fehérje mennyiségi változása hasonló volt az mRNA expresszióban észlelt változásokkal (18. ábra).

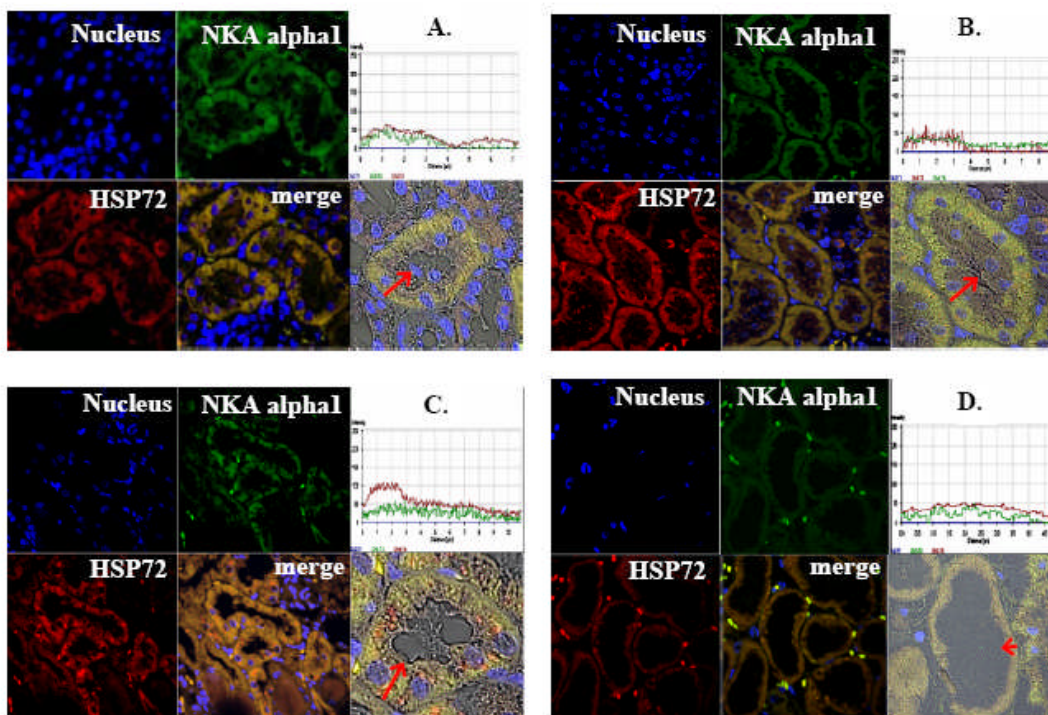


18. ábra A renális IR károsodás hatása HSP72 fehérje mennyiségére patkány veseszövetében. A HSP72 fehérje mennyiségét nőstény (N □) és hím (H ■) állatokban 55 perces ischémia előtt (kontroll) 2 (T2), 16 (T16) és 24 (T24) órával az ischémia után mértük. **Felső kép:** A HSP72 Western blot vizsgálat reprezentatív képe. **Alsó kép:** A Western blot képeket denzitometriásan belső standardra vonatkoztatva értékeltük. Az adatok átlag \pm SD értékeket jelölnek. * $p < 0,05$ vs. H; + $p < 0,05$ vs. T2, § $p < 0,05$ vs. T16; x $p < 0,05$ vs. T24.

A HSP72 protein mennyisége szignifikánsan magasabb volt nőstényekben, mint hímeekben már a kontroll állatokban és a vizsgált (T2, T16, T24) időpontok mindegyikében ($p < 0,05$ N vs. H). Az mRNA-hoz hasonlóan az ischémiás inzultust nőstényekben jelentős HSP72 szint emelkedés követte, mely már T2-ben elérte maximumát ($p < 0,05$ vs. kontroll). Hímeekben az emelkedés üteme lassabb volt és kisebb mértékű, csak T16-ra érte el a kontroll nőstényekben mért kiindulási értéket.

4.2.3.3. Immunfluorescens vizsgálatok

A HSP72 és a NKA $\alpha 1$ alegység között fennálló kapcsolat vizsgálatára immunfluorescens metodikát alkalmaztunk. Kontroll nőstény (19/A ábra) és kontroll hím (19/B ábra) állatokban a HSP72 és a NKA $\alpha 1$ alegység kolokalizálódott a tubulus sejtek bazolateralis membránján. A citoszolban és az apikális membránon csak igen kis mennyiségű fehérje volt detektálható. Kontroll állapotban a nemek között különbség nem volt megfigyelhető. Az ischémiát követően nőstényekben (19/C ábra) továbbra is jelentős mennyiségű HSP72 és NKA $\alpha 1$ alegység volt detektálható a bazolateralis membrán mentén, bár a NKA $\alpha 1$ alegység jelentősebb mértékben volt megfigyelhető a citoszolban és az apikális membrán régióban is. Ezzel szemben, hím állatokban (19/D ábra) mindkét fehérje transzlokálódott és szinte kizárólag a citoszolban és az apikális régióban volt megtalálható a tubulus sejtekben.



19. ábra A HSP72 és a NKA $\alpha 1$ alegység expressziójának és lokalizációjának változása ischémiát követően a vese tubulus sejtekben nőstény és hím állatokban. Kékkel jelölve a sejtmag, zölddel a NKA $\alpha 1$ alegység, pirossal a HSP72. A kolokalizációt narancssárga szín jelzi (zöld és piros egymásra vetülése). A: kontroll nőstény, B: kontroll hím, C: ischémiás (T24) nőstény, D: ischémiás (T24) hím.

4.3. A renális nNOS rendszer vizsgálata

4.3.1. Funkcionális paraméterek és szövettani elváltozások

A 24 órás fehérje ürítés nem különbözött a vizsgálat elején az egyes csoportok között ($24 \pm 1 \text{ mg}/24 \text{ óra}$). Szignifikáns emelkedést mutatott azonban az összes AI csoportban a követés során. Az áloperált állatokban (I, II, és VIII. csoport) egy minimális emelkedés volt csak észlelhető a kiindulási értékhez képest (12. táblázat). A szérum kreatinin mindegyik AI csoportban szignifikánsan emelkedett. A III. csoportban (14 nap AI, normál diéta) egy enyhe emelkedés volt látható, amely további progressziót mutatott só- és fehérjebevitel fokozása mellett (IV. csoport: AI 14 nap MF-MNaCl diéta és V. csoport: AI 18-21 nap MF-MNaCl diéta). A VI. és VII. csoportban (AI 6 hét és 11 hét normál diéta) további szérum kreatinin emelkedést láttunk a III. csoporttal összehasonlítva (AI 14 nap normál diéta). A várt eredménynek megfelelően az összes AI csoportban a kreatinin clearance csökkent az áloperáltakhoz viszonyítva és ezzel párhuzamosan az urea nitrogén is emelkedett (12. táblázat). Már 2 héttel az AI után enyhe-közepes glomeruláris elváltozások alakultak ki. Hosszabb postablációs periódus súlyosabb glomerulosclerosist okozott tubuláris károsodással és sejtes infiltrációval.

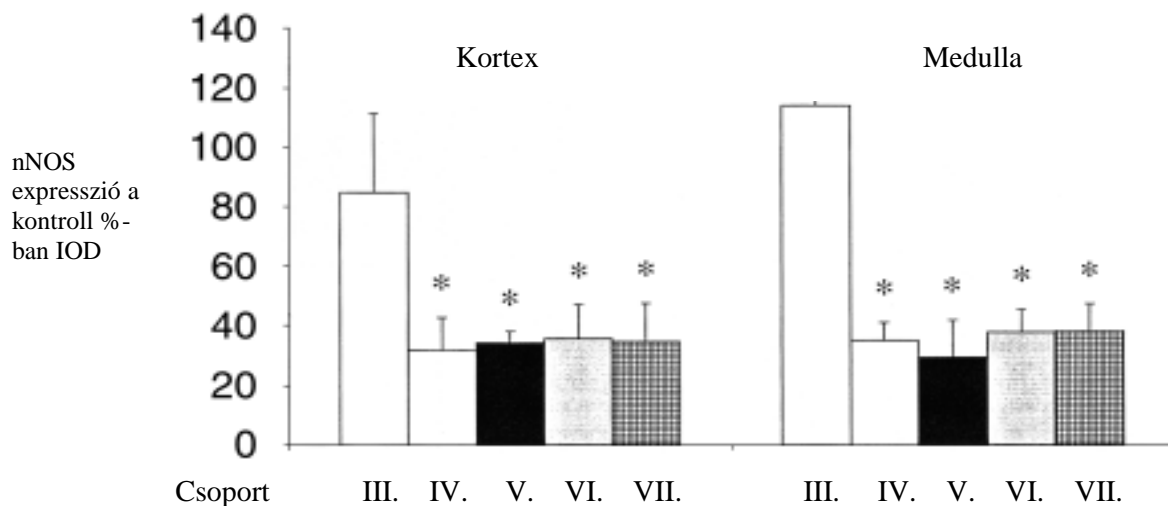
4.3.2. nNOS expresszió a vesében

A 20. ábra mutatja a kortikális és medulláris nNOS fehérje expressziót (a megfelelő kontroll /100%/ %-ban kifejezve). A kortexben a III. csoportban nem volt szignifikáns nNOS expresszió csökkenés, a többi AI csoportban azonban szignifikánsan alacsonyabb nNOS protein volt detektálható a megfelelő kontrollokhoz képest (65-70%-os csökkenés). A kortexhez hasonlóan a medullában sem találtunk különbséget az áloperált állatok és a III. csoport között. A többi AI állatban azonban a kortikális nNOS hasonló mértékű fehérje expresszió csökkenését észleltük. Az expressziók pontosabb összehasonlítására a Western blot során minden membránon együtt futattuk az AI és a megfelelő kontroll mintákat. A 21. ábrán látható egy reprezentatív membrán.

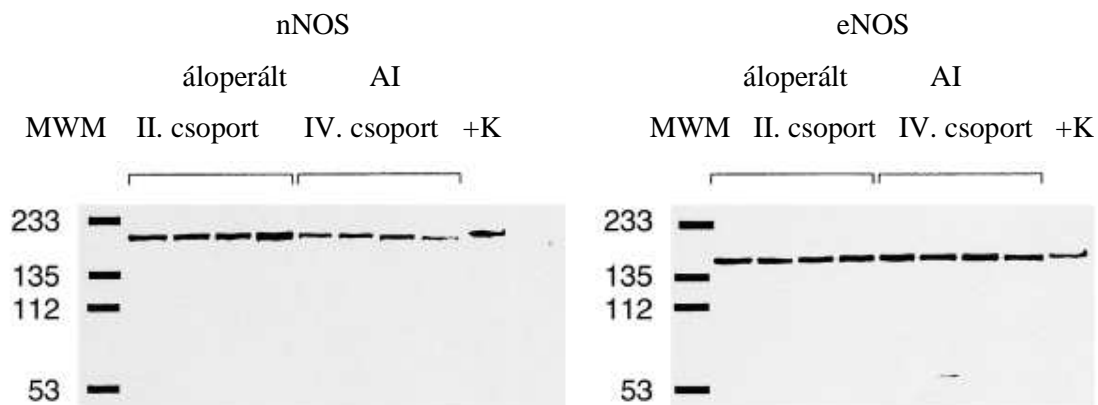
Csoport	Iniciális testsúly (g)	Végső testsúly (g)	UprotV (mg/24ó)	Se Crea (mg/dl)	Ccrea (ml/min/kg)	BUN (mg/dl)	GS%
I.	355±2	364±4	28±4	0,44±0,01	7,22±0,4	24,5±1,4	3,83±0,96
II.	415±5	424±7	25±3	0,57±0,03	NM	24,5±2	2,69±0,45
III.	351±3	305±16	119±32a	1,02±0,11d	3,19±0,33a,d,e	75,9±9,8c	23,6±3,03a,f
IV.	427±10	383±5	214±46b	1,21±0,09a,d	1,98±0,1c	72,8±5,4c	35,6±2,87b,c,d
V.	419±4	368±13	NM	1,36±0,10b,d	NM	135,9±15,4b	48,08±3,13b
VI.	419±6	380±21	220±42a	1,69±0,23a,d	1,96±0,37a,c	86,8±14,9c	39,67±6,11a,d
VII.	385±1	425±23	136±43a	2,6±0,70a	1,25±0,36a	121±34a	52,67±6,67a
VIII.	384±3	470±5	41±4a,d	0,39±0,03d	6,9±0,8d	17±1d	11±4a,d

12. táblázat Funkcionális és szövettani paraméterek AI után és kontroll állatokban.

I. áloperált normál 4 hét, II. áloperált MF, MNaCl 18-21 nap, III. AI normál 2 hét, IV. AI MF, MNaCl 2 hét, V. AI MF, MNaCl 18-21 nap, VI. AI normál 6 hét, VII. AI normál 11 hét, VIII. áloperált normál 11 hét. AI: abláció/infarcteráció, MF: magas fehérje tartalom, MNaCl: magas sótartalom, NM: nem mért
a p<0,01 vs. I. csoport, b p<0,05 vs. II. csoport, c p<0,05 vs. V. csoport, d p<0,05 vs. VII. csoport, e p<0,05 vs. IV., VI. és VII. csoport, f p<0,05 vs. IV., V., VI. és VII. csoport.



20. ábra Relatív nNOS fehérje expresszió a kortexben és a medullában a megfelelő kontrollok átlag integrált optikai denzitásának (IOD) %-ában kifejezve. *p<0,05 vs. megfelelő áloperált kontroll (100%)



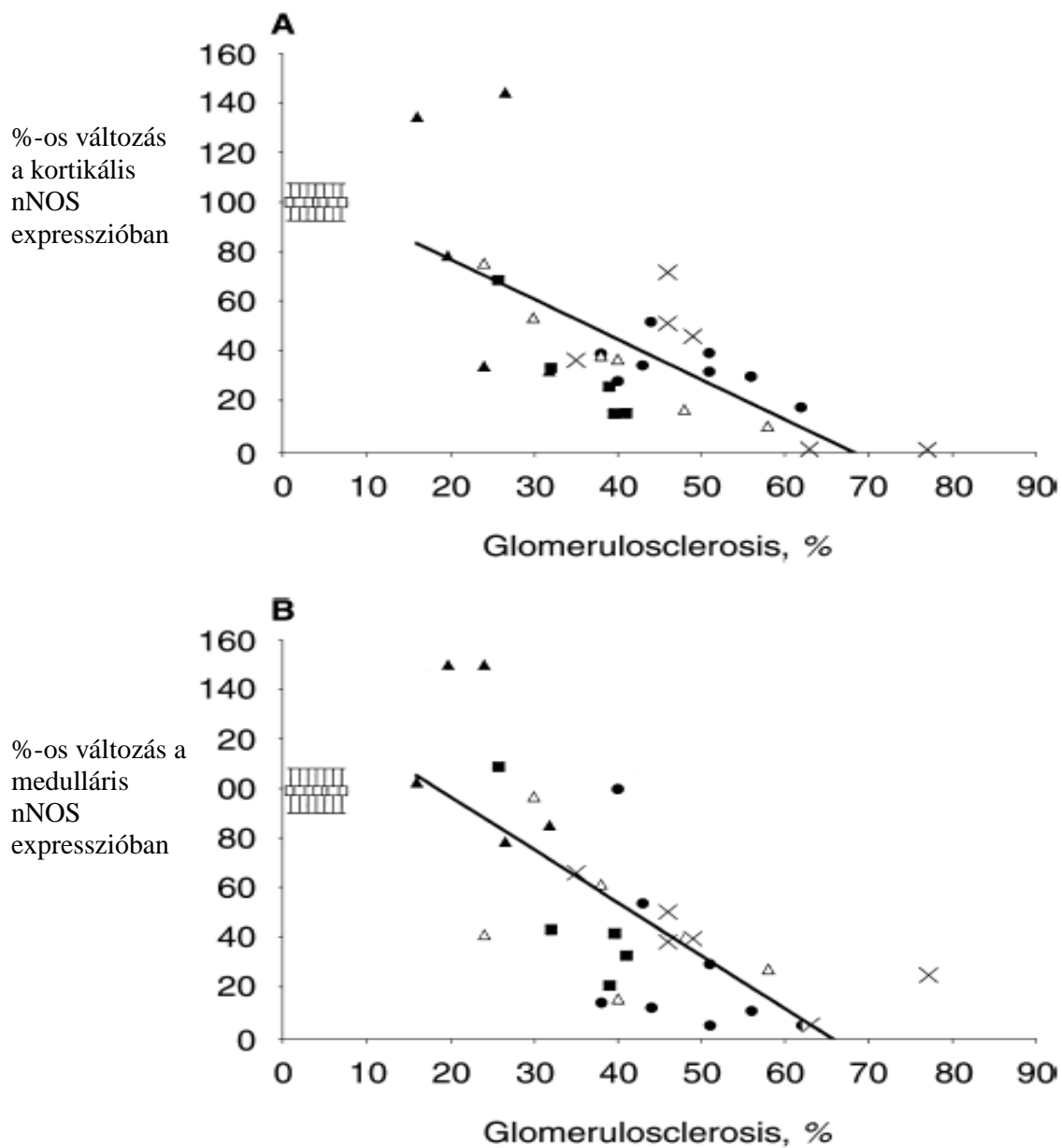
21. ábra Reprezentatív Western-blot membrán a medulláris nNOS és eNOS expresszióról. +K nNOS (1 μ g patkány kisagy homogenizátum), +K eNOS pozitív kontroll (10 μ g marha aorta endotél sejt lizátum). MWM: molekuláris súly marker.

Az egyes AI csoportokban a krónikus vesebetegség progressziója eltérő volt, ezért minden csoportban minden állatban összehasonlítottuk a szérum kreatinin és a renális nNOS fehérje expresszió értékét, és regresszió analízist végeztünk. A renális nNOS fehérje expresszió a veseműködés beszűkülésének egy határáig ~1mg/dl (88,4 μ mol/l), amely a vesefunkció kb. 60%-os beszűkülését jelenti ebben a modellben, viszonylag konstans maradt. A szérum kreatinin további emelkedésével egy hirtelen csökkenés volt észlelhető a medulláris nNOS expresszióban ($r=-0,501$, $p<0,005$). Hasonló korreláció, de valamivel nagyobb variabilitással, volt látható a vese kortexben mért nNOS expresszió és a vesefunkció között ($r=-0,362$, $p<0,05$). A következő lépésben a glomeruláris károsodás és a renális nNOS fehérje expresszió közötti korrelációt elemeztük. Amint a 22. ábra mutatja minél súlyosabb volt a glomerulosclerosis mértéke, annál alacsonyabb nNOS expresszió volt mérhető mind a kortex, mind a medulla állományában (kortex: $r=-0,678$, $p<0,001$; medulla: $r=-0,722$, $p<0,001$) (22. ábra).

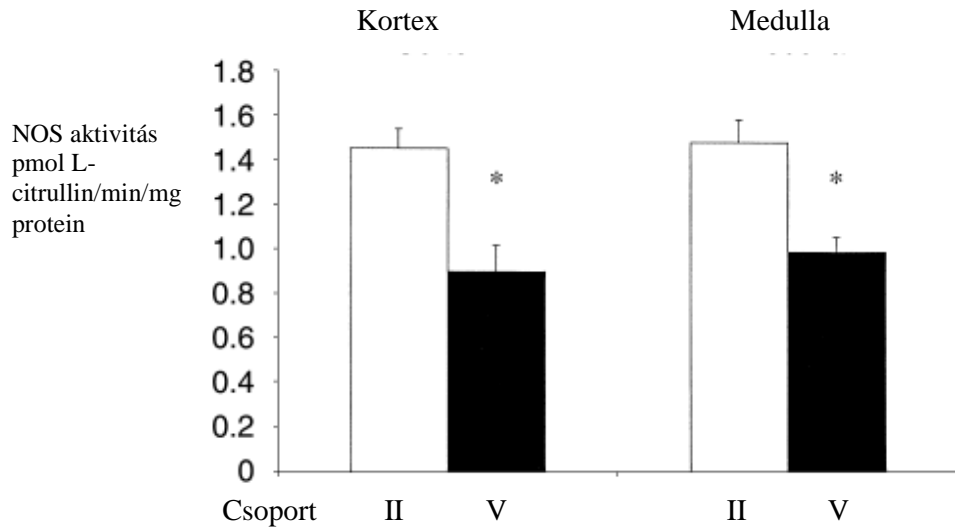
4.3.3. „In vitro” NOS-aktivitás mérése

A következőkben „in-vitro” mértük a NOS enzim aktivitását mind a kortex, mind a medulla szolubilis frakciójából a II. csoportban (áloperált, MF, MNaCl, 18-21 nap) és az V. csoportban (AI, MF, MNaCl, 18-21 nap). Amint azt a 23. ábra mutatja a NOS aktivitás mind a kortexben, mind a medullában szignifikánsan alacsonyabb volt az AI állatokban (krónikus vesebeteg csoport). Vizsgálatunkban a szolubilis frakciót mértük, amely megfelel a nNOS és

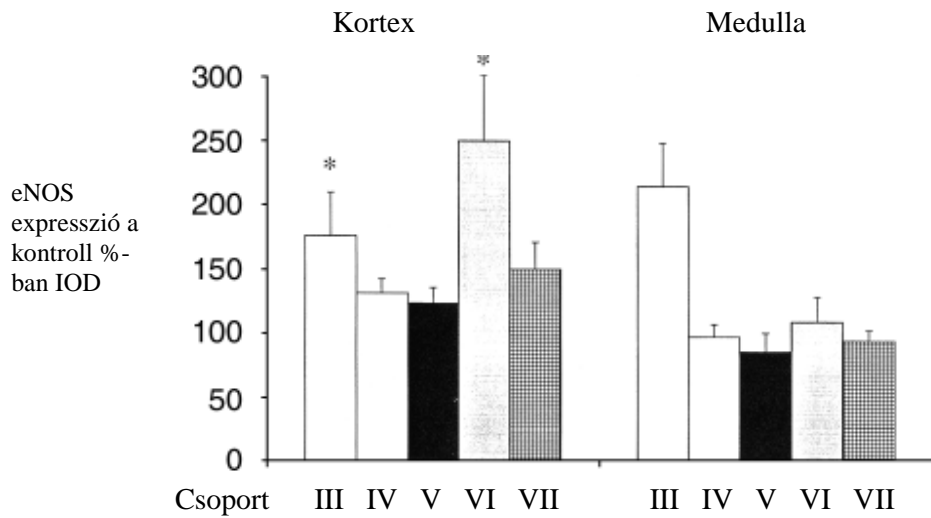
iNOS aktivitásnak. Így a teljes NOS aktivitás ennél magasabb, hiszen az eNOS a membránhoz kötött formában található. Ennek aktivitását vizsgálatunkban nem mértük. Az eNOS szerepének tisztázására azonban Western-blot analízist végeztünk, és megállapítottuk, hogy a nNOS-hoz képest sokkal nagyobb variabilitást mutat az egyes csoportok között. A 24. ábra mutatja, hogy az eNOS fehérje expressziója szignifikánsan emelkedett a III. és VI. csoportban az áloperált kontrollokhöz képest a kortexben. Ezzel szemben a IV., V: és VI. csoportban az expresszió nem különbözött a kontrolloktól. A medullában csak a III. csoportban emelkedett az eNOS a kontrollhoz képest, míg a többi csoportban nem volt detektálható különbség.



22. ábra Korreláció a glomerulosclerosis és a relatív nNOS fehérje expresszió között. A. A megfelelő kontroll %-ban a kortexben. □: az I., II. és VIII. csoportok nNOS expressziója (100%), ▲: III. csoport, ■: IV. csoport, ●: V. csoport, △: VI. csoport, X: VII. csoport. $R=-0,678$, $p<0,001$. B. A megfelelő kontroll %-ban a medullában. □: az I., II. és VIII. csoportok nNOS expressziója (100%), ▲: III. csoport, ■: IV. csoport, ●: V. csoport, △: VI. csoport, X: VII. csoport. $R=-0,722$, $p<0,001$.



23. ábra „In-vitro” NOS aktivitás (pmol L-arginin konvertálva L-citrulinná/perc/mg protein a cortex és a medulla szolubilis frakciójában. □: áloperált II. csoport, ■: AI V. csoport. * $p < 0,05$ vs II. csoport.



24. ábra Relatív eNOS fehérje expresszió a cortexben és a medullában a megfelelő kontrollok átlag integrált optikai denzitásának (IOD) (=100%) %-ban kifejezve. * $p < 0,05$ vs. megfelelő áloperált kontroll (100%).

4.4. A nem és a nemi hormonok hatásának vizsgálata az immunszuppresszív kezelésre és a renális NOS rendszerre

4.4.1. Grafttúlélés és funkcionális paraméterek

A kezelési csoportok és egyes szériák a metodikai részben találhatóak. Az I. szériában alacsonyabb CsA dózis és hosszabb ischémia idő (45 perc) mellett az operált 7 ALLO nőstényből csak 2 élte túl a transzplantációt követő 4-6 hetet és volt követhető 22 hétig. Ebből a csoportból így nincsenek értékelhető funkcionális és egyéb mérési paraméterek. Az I. széria többi csoportja, ISO nőstény, ALLO és ISO hím mindegyike túlélte a 22 hetes követési periódust. Ahogyan a 10. táblázat mutatja az ISO nőstényekben a kiindulási értékhez képest szignifikáns proteinuria alakult ki. Ennek mértéke azonban nem különbözött az ALLO és ISO hímelekben mért, a transzplantáció előtti helyzethez képest szintén szignifikánsan emelkedett értékektől (13. táblázat). Ezzel szemben a szövettani vizsgálat a krónikus allograft nephropatia súlyos jeleit mutatta az ALLO hím állatokban. Az ISO nőstény és hím csoportokban ezzel szemben csak enyhe szövettani elváltozások voltak megfigyelhetőek (13. táblázat).

A II. szériában, ahol csak nőstény állatokat transzplantáltunk csökkentett (30 perc) ischémia idővel, már 4 héttel a transzplantációt követően jelentős különbség alakult ki a proteinuria mértékében ISO és ALLO állatok között (ALLO: 10 ± 1 vs ISO: 5 ± 3 mg/nap, $p < 0,05$). Hat héttel a transzplantációt követően szignifikáns emelkedés volt látható a proteinuria mértékében ALLO állatokban, míg ISO csoportban változás nem volt (ALLO: 37 ± 14 vs ISO: 4 ± 1 mg/nap, $p < 0,05$). A 7. hétre az ALLO csoportban további progresszió volt megfigyelhető, amely miatt a kísérletet be kellett fejezni. Szövettani analízis az ALLO állatokban súlyos, akcelerált krónikus allograft nephropatia és kilökődés jeleit mutatta, míg az ISO csoportban csak enyhe szövettani elváltozások voltak megfigyelhetőek (14. táblázat)

A III. szériában az állatok 3 mg/kg/nap dózisban kaptak CsA kezelést, amely elégséges volt, hogy nőstény állatokban elnyomja a kezdeti akut, illetve akcelerált krónikus kilökődést és az összes transzplantált állat túlélte a 22 hetes követési időt. A funkcionális paraméterek (szérum kreatinin, szérum urea nitrogén s kreatinin clearance) ISO nőstényekben szignifikánsan jobb graftfunkciót mutattak ALLO nőstényekkel összehasonlítva. Ezzel szemben hím ALLO és ISO állatokban a vizsgált paraméterek csak kismértékben

különböztek egymástól (15/A. táblázat). Hasonló tendenciát látunk a IV. szériában, ahol az állatok RAPA kezelést kaptak (15/B. táblázat). Egyetlen különbség a kreatinin clearance-ben volt, amely nem mutatott különbséget ISO és ALLO nőstények között. A CsA és RAPA kezelt ISO nőstényekben a vizsgálat paraméterek nem különböztek az egészséges, korban illesztett kontrollokétól (15/C táblázat), míg szignifikánsabb rosszabbak voltak a RAPA kezelt ISO hím állatokban a korban illesztett kontrollokhoz viszonyítva.

A vérnyomás mind a CsA, mind a RAPA kezelt ISO nőstényekben hasonló volt a kontrollokéhoz, míg csökkenő tendenciát láttunk ALLO nőstény állatokban. Hímekben a transzplantált állatok vérnyomása alacsonyabb volt a kontrollokéhoz hasonlítva és ez kifejezettebb volt az ALLO csoportokban (az ALLO csoportban a recipiens Lew patkány volt!). A nemtől függetlenül, az összes transzplantált csoportban a graftok hipertrofiát mutattak az egészséges kontroll állatok veséjével összehasonlítva és ez független volt a nemtől vagy az immunuszuppresszív kezeléstől. A vesék nagyságában észlelhető és ismert nemi különbség (nagyobb hím vesék) mindegyik csoportban megmaradt.

	Proteinuria a Tx előtt (mg/nap)	Proteinuria 22 héttel a Tx után (mg/nap)	UNOxV a Tx előtt (μM/nap/100g ts)	UNOxV 22 héttel a Tx után (μM/day/100g ts)	Banff score (0-12)
ISO N	1,3 \pm 0,3*	44,8 \pm 24,1+	1,36 \pm 0,16	2,08 \pm 0,40	1,6 \pm 0,4
ISO H	10,2 \pm 1,9	67,5 \pm 11,1+	1,45 \pm 0,19	1,43 \pm 0,11	1,7 \pm 0,2
ALLO H	8,7 \pm 0,7	65,5 \pm 16,1+	1,82 \pm 0,16	1,15 \pm 0,25	7,7 \pm 0,9*

13. táblázat Proteinuria és szövettani elváltozások alacsony dóziszú (1,5 mg/kg/nap) CsA kezelt csoportban 45 perc ischémiát követően 22 héttel a Tx után (I. széria). ALLO N csoport kizárva, mert csak 2 állat élte túl a 7-ből a 22 hetes követési időt. *p<0,05 vs. ISO H, +p<0,05 vs. kiindulási érték.

	Proteinuria a Tx előtt (mg/nap)	Proteinuria 7 héttel a Tx után (mg/nap)	UNOxV a Tx előtt (μM/nap/100g ts)	UNOxV 7 héttel a Tx után (μM/day/100g ts)	Banff score (0-12)
ISO N	2,0 \pm 0,2	3,8 \pm 0,9	1,24 \pm 0,13	2,84 \pm 0,37+	2,7 \pm 1,0
ALLO N	2,7 \pm 0,3	76,2 \pm 33,0*+	1,37 \pm 0,10	2,37 \pm 0,49	8,7 \pm 0,3*

14. táblázat Proteinuria és szövettani elváltozások alacsony dóziszú (1,5 mg/kg/nap) CsA kezelt nőstényekben 30 perc ischémiát követően 7 héttel a Tx után (II. széria). *p<0,05 vs. ISO F, +p<0,05 vs. kiindulási érték.

CsA	Testsúly (g)	UprotV (mg/nap)	UNOxV (μ M/nap/ 100gts)	SeCrea (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Ccr (ml/min/ tskg)	BP (Hgmm)	Tx súly (g)
ISO N	202 \pm 2 \S #	3,8 \pm 0,5 \S	1,46 \pm 0,06 * \S	0,36 \pm 0,01	22 \pm 1 *	6,9 \pm 0,4	90 \pm 5	1,12 \pm 0,03 * \S
ISO H	418 \pm 6*#	43,7 \pm 7,2	0,93 \pm 0,08	0,40 \pm 0,01*	23 \pm 1 *	5,9 \pm 0,5	97 \pm 3*	2,37 \pm 0,12 *
ALLO N	218 \pm 2 \S	24,1 \pm 9,3*+	1,42 \pm 0,10 *	0,44 \pm 0,02*+	31 \pm 1 *+#	5,1 \pm 0,3*+	78 \pm 3*+ \S	1,31 \pm 0,05 * \S
ALLO H	451 \pm 12+	15,5 \pm 1,9*+	1,29 \pm 0,10 *+	0,45 \pm 0,04*	30 \pm 1 *+#	5,4 \pm 0,3*	63 \pm 3*+#	2,18 \pm 0,10 *

15/A táblázat Funkcionális paraméterek CsA kezelt állatokban 22 héttel a Tx után.

RAPA	Testsúly (g)	UprotV (mg/nap)	UNOxV (μ M/nap/ 100gts)	SeCrea (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Ccr (ml/min/ tskg)	BP (mmHg)	Tx súly (g)
ISO N	220 \pm 1 \S	6,7 \pm 2,4 \S	1,31 \pm 0,08 *	0,33 \pm 0,03 \S	21 \pm 1 *	6,0 \pm 0,7	91 \pm 3	1,24 \pm 0,11 * \S
ISO H	435 \pm 4	69,7 \pm 12,7	1,06 \pm 0,02	0,42 \pm 0,02 *	21 \pm 1	5,5 \pm 0,2 *	98 \pm 2 *	2,38 \pm 0,11 *
ALLO N	224 \pm 7 \S	26,2 \pm 17,7	1,28 \pm 0,06 *	0,42 \pm 0,02 *+	26 \pm 1 *+	4,4 \pm 0,3 *	81 \pm 9 *	1,29 \pm 0,05 * \S
ALLO H	436 \pm 9	37,4 \pm 16,6	1,45 \pm 0,17 *+	0,49 \pm 0,03 *	26 \pm 1 *+	5,0 \pm 0,3 *	79 \pm 5 *+	2,21 \pm 0,12 *

15/B táblázat Funkcionális paraméterek RAPA kezelt állatokban 22 héttel a Tx után.

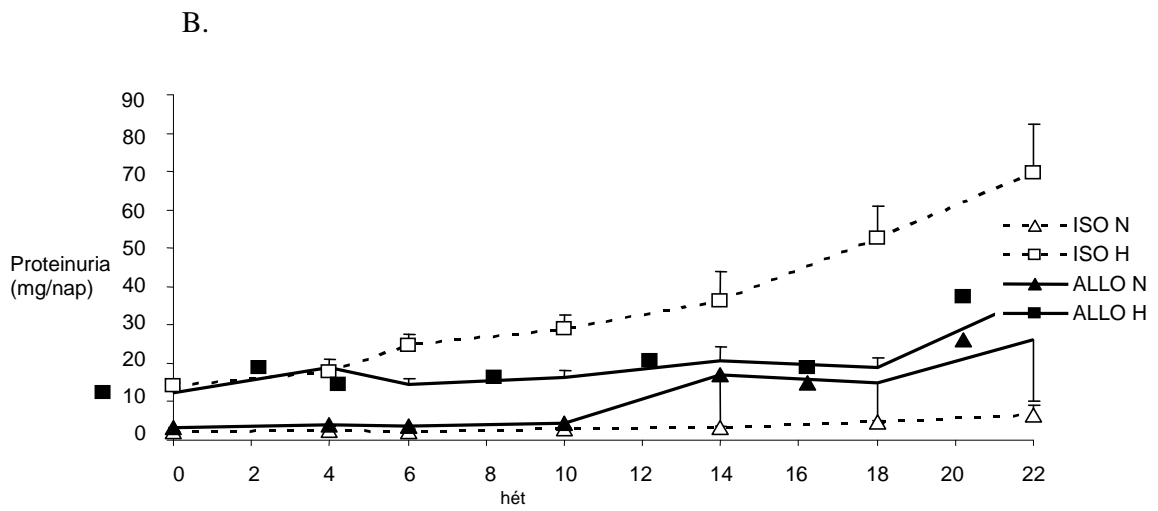
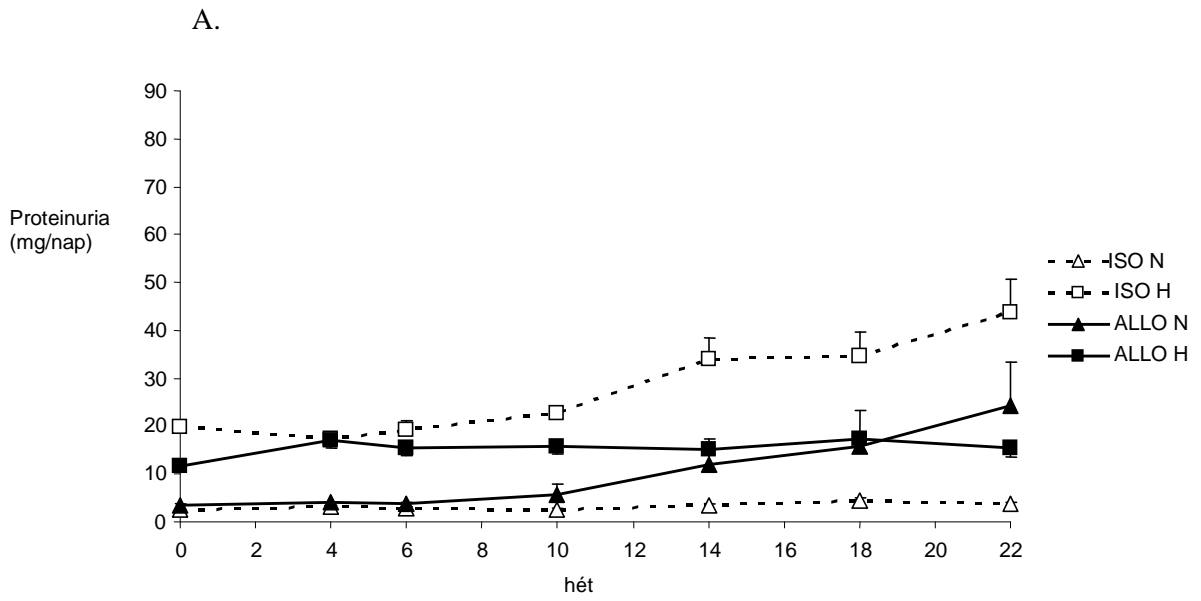
Kontrollok	Testssúly (g)	UprotV (mg/nap)	UNOxV (μM/nap/ 100g ts)	SeCrea (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Ccr (ml/min/ tskg)	BP (mmHg)	Bal vese súlya (g)
Kontroll N	222 \pm 4 §	3,3 \pm 0,2 §	0,97 \pm 0,04	0,29 \pm 0,01	16 \pm 1	6,8 \pm 0,5	99 \pm 2 §	0,81 \pm 0,02 §
Kontroll H	456 \pm 8	35,8 \pm 4,3	0,81 \pm 0,03	0,30 \pm 0,02	18 \pm 2	7,3 \pm 0,5	113 \pm 3	1,84 \pm 0,14

15/C táblázat Funkcionális paraméterek korban illesztett F344 nőtény és hím állatokban 22 hét követés után. * $p < 0,05$ vs kontroll F344 azonos nemhez viszonyítva, + $p < 0,05$ vs. azonos nemű ISO, § $p < 0,05$ vs. megfelelő hím csoport, # $p < 0,05$ vs. megfelelő RAPA kezelt csoport

Ahogy a 25. ábra mutatja mind a CsA, mind a RAPA kezelt ALLO nőtényekben szignifikáns proteinuria (UprotV) alakult ki, míg ISO nőtények fehérjeürítése nem emelkedett a kiindulási értékhez képest. Kontroll nőtényekben nem volt megfigyelhető a proteinuria fokozódása az idővel az egészséges kontroll állatokban (15/C táblázat). Hímekben a fehérje ürítés korrall emelkedő tendenciája volt megfigyelhető egészséges kontrollokban (15/C táblázat, V. széria) és ez nem különbözött a RAPA kezelt ALLO csoportban. Ezzel szemben CsA kezelés hatására ALLO hímekben a kontrollokhoz és RAPA kezeltékhez képest alacsonyabb proteinuria volt mérhető (25. ábra). ISO hímekben a proteinuria mértéke magasabb volt az ALLO hímekhez viszonyítva, ez azonban csak CsA kezelés mellett érte el a szignifikáns különbséget.

4.4.2. Szövettani elváltozások

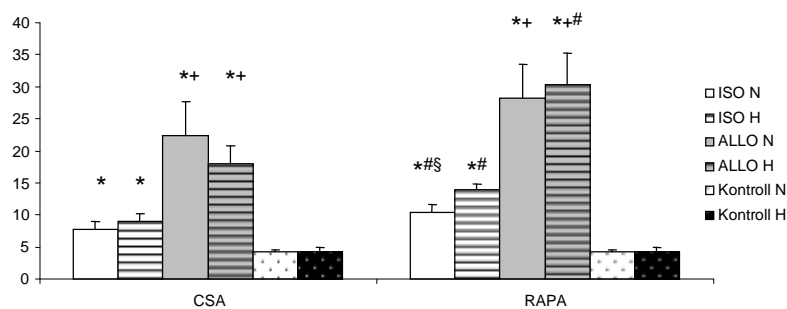
Közepes mértékű glomerulosclerosis alakult ki a magasabb dózisú CsA kezelés és RAPA terápia mellett is. Ennek mértéke szignifikánsan különbözött a kontrollokban megfigyelt korrall járó szövettani változásoktól (26/A ábra). A nemtől és kezeléstől függetlenül az ALLO állatokban a glomeruláris elváltozások szignifikánsabban kifejezettebbek voltak, mint a nekik megfelelő ISO csoportokban. A hím ALLO és ISO, valamint a nőtény ISO állatokban RAPA kezelés mellett szignifikánsabb súlyosabb glomeruláris elváltozások alakultak ki a CsA-nal kezeltékhez képest. Az ALLO nőtényekben is megfigyelhető volt a tendencia, de nem érte el a statisztikailag szignifikáns értéket ($p=0,06$). A Banff-score hasonlóan súlyosabb elváltozásokat igazolt a RAPA kezelt hím állatokban CsA kezeltékkel összehasonlítva és nőtényekben is ilyen tendencia volt megfigyelhető ($p=0,06$) (26/B ábra).



25. ábra Proteinuria változása CsA (A) és RAPA (B) kezelt állatokban. Statisztikát lásd a 20. táblázatban.

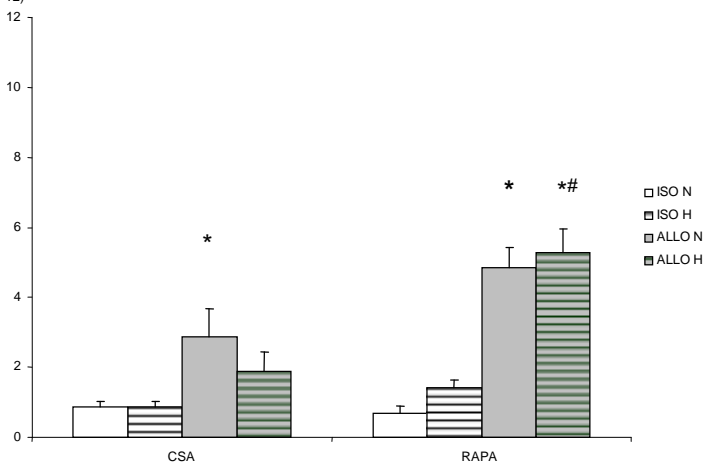
A.

Glomerulosclerosis (%)



B.

Banff score (0-12)



26. ábra A. Glomerulosclerosis ISO és ALLO állatokban CsA vagy RAPA kezelés mellett, valamint kontrollokban 22 hét után. * $p < 0,05$ vs. megfelelő kontroll; + $p < 0,05$ vs. megfelelő ISO csoport, # $p < 0,05$ vs. megfelelő CsA csoport, § $p < 0,05$ vs. megfelelő hím csoport. B. Banff-score ISO és ALLO állatokban 22 héttel a Tx után CsA vagy RAPA kezelés mellett. * $p < 0,05$ vs. megfelelő ISO, # $p < 0,05$ vs. megfelelő CsA csoport.

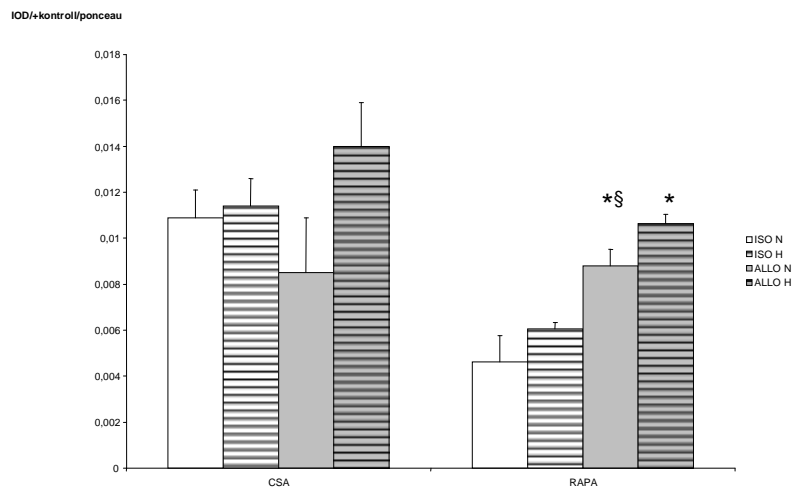
4.4.3. A vizelet NOx tartalma

A vizeletből meghatároztuk a NO-produkciót jellemző NO_x (NO₂+NO₃) kiválasztást. A vizelet NO_x szignifikánsabb magasabb volt a transzplantált állatokban a korban megfelelő egészséges kontrollokhoz képest. Ez alól kivételt csak a CsA és RAPA kezelt ISO hím állatok jelentettek (15. táblázat).

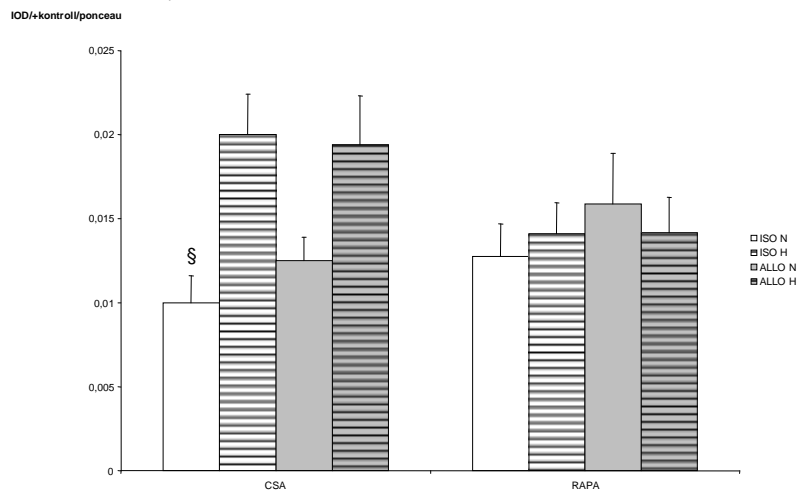
4.4.4. eNOS és nNOS fehérje expresszió a vesében

A III. és IV. szériából vizsgáltuk a renális konstitutív NOS fehérje expressziókat. A magasabb dózisu CsA kezeltékben a kortikális eNOS fehérje expresszió hasonló mértékű volt nőstény és hím ISO és ALLO csoportokban. A RAPA kezelt csoportoknál mindkét nemben magasabb eNOS értéket mértünk az ALLO csoportokban az ISO állatokkal összehasonlítva és hímekekben magasabb expressziót mint nőstényekben (27/A. ábra). A medullában mindkét CsA kezelt hím csoportban magasabb eNOS expresszió volt mérhető a nőstényekhez képest, az ALLO állatokban azonban ez a különbség nem érte el a statisztikailag szignifikáns értéket ($p=0,057$). Az azonos nemű ISO és ALLO csoportok között nem volt különbség megfigyelhető (27/B ábra). A RAPA kezelés mellett egyetlen csoportban sem különbözött a medulláris eNOS fehérje expressziója.

A.

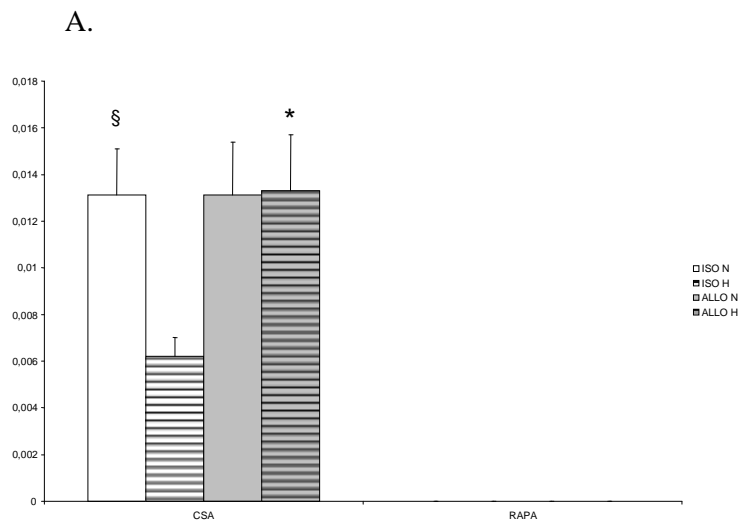


B.

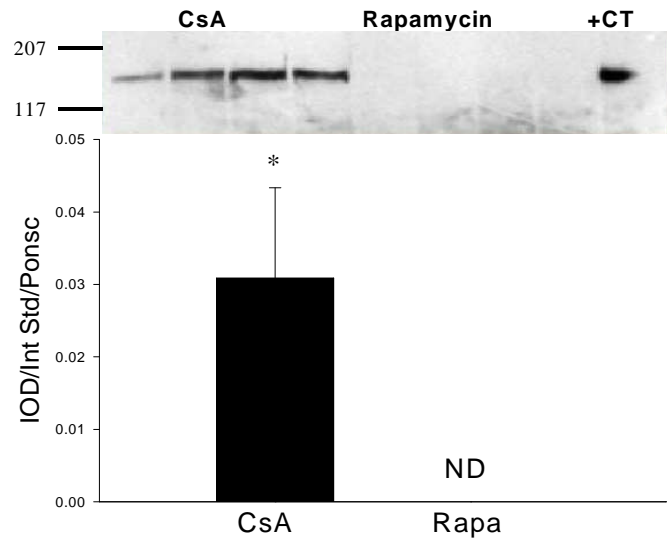


27. ábra A. kortikális és B. medulláris eNOS fehérje expresszió ISO és ALLO állatokban 22 héttel a transzplantáció után CsA vagy RAPA kezelés mellett. * $p < 0,05$ vs. megfelelő ISO, § $p < 0,05$ vs. megfelelő hím csoport.

A kortikális nNOS expresszió alacsonyabb volt ISO hím vesékben a többi CsA kezelt csoporttal összehasonlítva. Meglepő módon a kortexben RAPA kezelés mellett nNOS expresszió egyáltalán nem volt kimutatható (28/A ábra). A nem várt eredmény miatt a CsA és RAPA kezelt ALLO csoportból 4-4 mintát azonos membránon újra futattunk, és az előzőekhez hasonló eredményt kaptunk (28/B ábra). Továbbá sem az izomban, sem a cerebellumban nem találtunk különbséget a nNOS expressziójában CsA és RAPA kezelt állatok között (izom: 0.0076 ± 0.0005 vs. 0.0084 ± 0.0005 IOD/belső standard és Ponceau red; és cerebellum 0.0064 ± 0.0024 vs. 0.0088 ± 0.0006 IOD/belső standard és Ponceau red). A medullában CsA kezelés mellett a nNOS expresszió nem mutatott különbséget nőstény és hím állatokban (29/C ábra). Alacsonyabb medulláris nNOS fehérje expresszió volt mérhető RAPA kezelt ISO hím állatokban nőstényekkel összehasonlítva ($p=0,06$). A RAPA kezelt ALLO hímekekben a medullában alig volt nNOS fehérje detektálható.

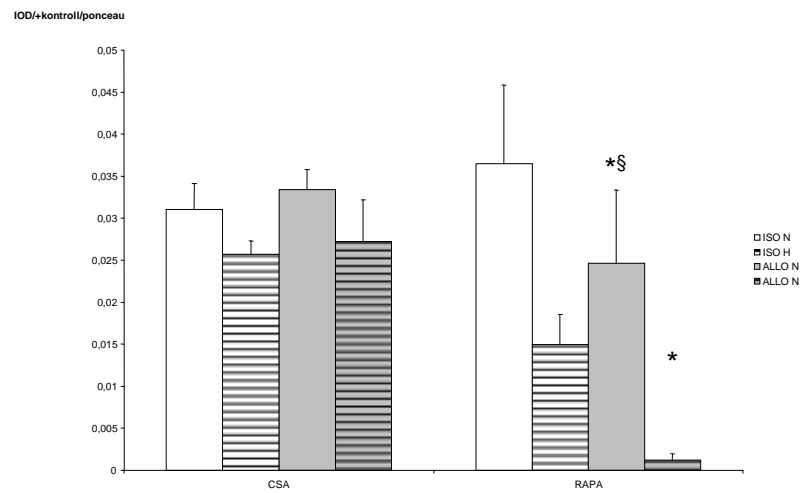


28. ábra A. kortikális nNOS fehérje expresszió ISO és ALLO graftokban 22 héttel a transzplantáció után CsA vagy RAPA kezelés mellett. * $p<0,05$ vs. megfelelő ISO, § $p<0,05$ vs. megfelelő H csoport.



B.

C.



28. ábra B. nNOS fehérje expresszió CsA vagy RAPA kezelt vese kortexben. C. medulláris nNOS fehérje expresszió ISO és ALLO graftokban 22 héttel a transzplantáció után CsA vagy RAPA kezelés mellett. * $p < 0,05$ vs. megfelelő ISO; § $p < 0,05$ vs. megfelelő H csoport.

4.5. Antiinflammatorikus-antioxidáns perfúziós oldat hatása a KAN-ra.

4.5.1. Funkcionális paraméterek

ISO-UN és ISO-EP Fisher patkányok nem különböztek a testsúlyban(TS), a vesesúlyban (VS) és a vesesúly/testsúly arányban. Ez utóbbi nagyobb volt, mint a normál kontroll állatoké a kompenzatorikus hipertrófia miatt (16. táblázat). Kreatinin clearance (CCr), szérumban kreatinin és urea nitrogén szintek hasonlóak voltak az ISO csoportokban (16. táblázat). A CCr alacsonyabb volt az ISO csoportokban a kontrollokhöz viszonyítva. Az ISO-UN állatokban enyhe proteinuria alakult ki, míg az ISO-EP csoportban a proteinuria mértéke a 22. héten sem különbözött a kontrolloktól (16. táblázat).

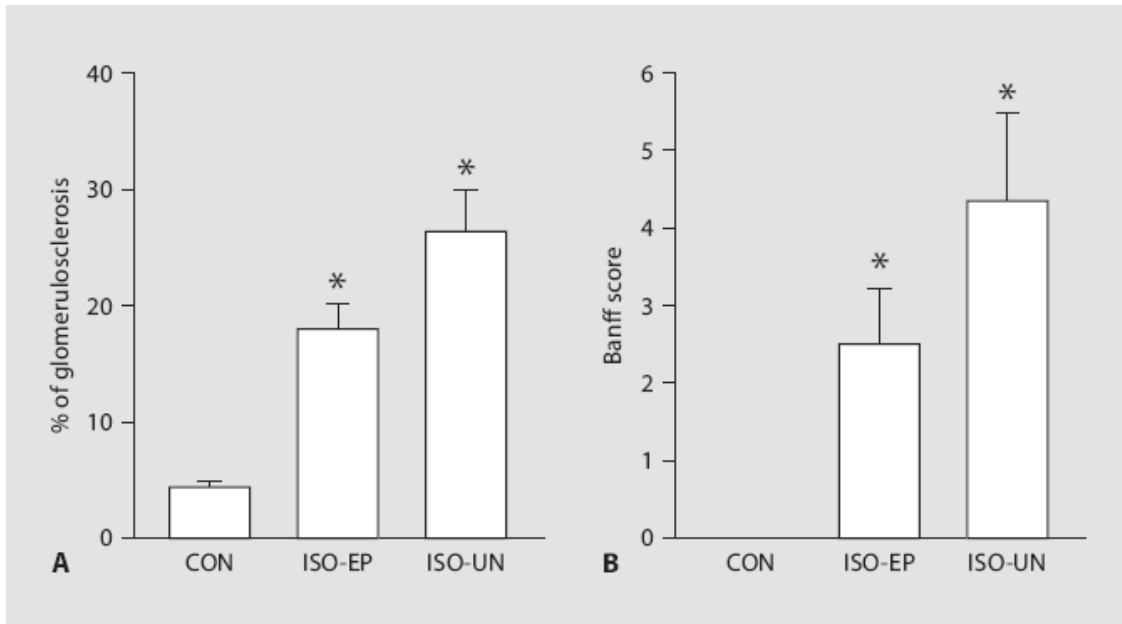
	ISO-UN	ISO-EP	CON
Testsúly (g)	408±15*	396±13*	456±8
Vesesúly (g)	2.20±0.14	2.36±0.16	1.84±0.14
Vesesúly/testsúly x1,000	5.36±0.02*	5.96±0.36*	4.07±0.35
Szérumban urea nitrogén (mg/dl)	23±1*	21±1	18±1
Szérumban kreatinin (mg/dl)	0.50±0.02*	0.44±0.02*	0.30±0.02
CCr/TS (ml/min/kg TS)	4.3±0.4*	4.6±0.1*	7.3±0.5
Vizelet fehérje (mg/24 óra)	50,7±9,4	30,7±4,2+	35,8±3,9

16. táblázat. Funkcionális adatok 22 héttel a transzplantációt követően. ISO-UN, isograft terápia nélkül; ISO-EP isograft endotél protektív terápiával; CON, kontroll CCr, 24hr kreatinin clearance; *, P<0,05 vs. KON, +p<0,05 vs ISO-UN

4.5.2. Hisztológia

Hisztológiai analízis nem mutatott különbséget az ISO-EP és ISO-UN csoport között. Mindkét csoportban, a vesékben közepes mértékű glomeruloszklerózis és tubulointersticiális elváltozás alakult ki, amely szignifikánsan különbözött a kontroll állatokban megfigyelttől

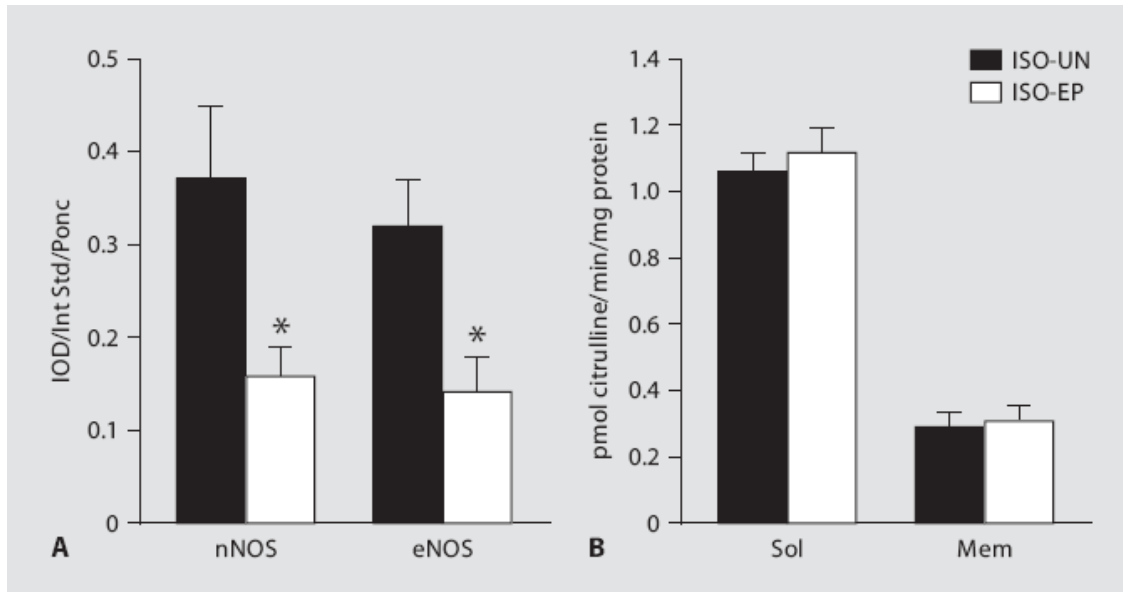
(29. ábra). Az endotél protektív kezelés ellenére az ISO-EP állatokban a strukturális károsodások ugyanúgy kialakultak, mint a nem kezelt csoportban.



29. ábra. Hisztológiai elváltozások a vesékben. * $p < 0,05$ vs kontroll (CON)

4.5.3. Western-blot analízis és enzimaktivitás

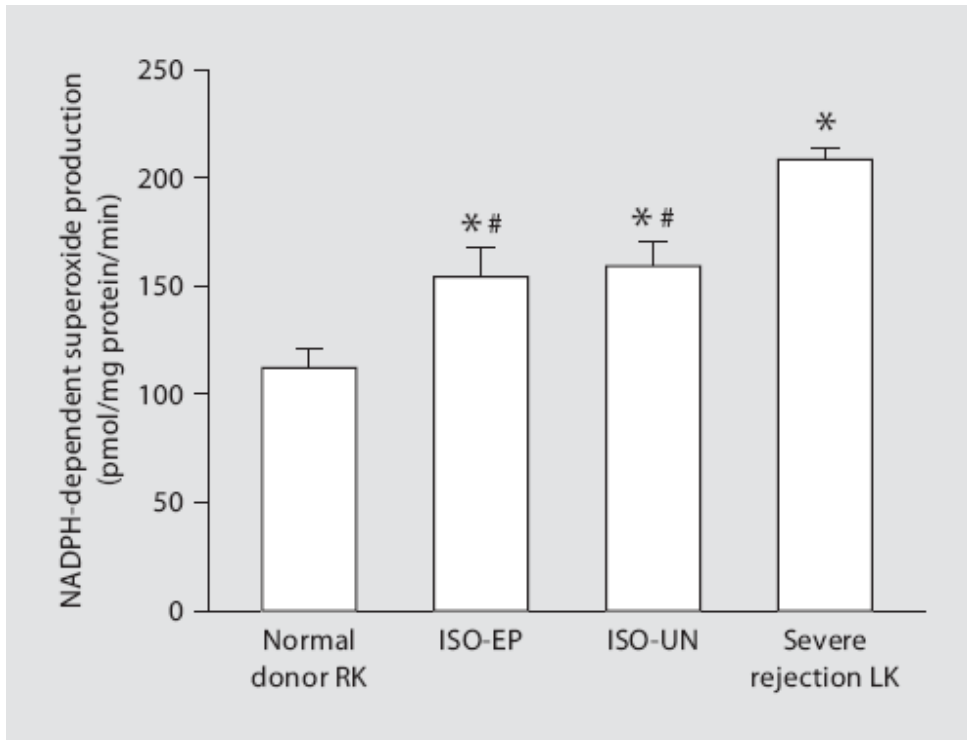
A fehérje vizsgálat során az ISO-EP állatok cortexében alacsonyabb nNOS és eNOS expressziót detektáltunk, mint az ISO-UN állatokban (30/A ábra). Ugyanakkor az enzimaktivitás a szolubilis frakcióban (elsősorban nNOS) és a membrán frakcióban (elsősorban eNOS) is hasonló volt a két csoportban (30/B ábra). A medullában a nNOS és az eNOS expresszió nem különbözött a két ISO csoportban.



30/a és 30/B ábra. nNOS és eNOS fehérje expresszió a vese cortexben (A). Enzimaktivitás a szolubilis (nNOS) és membrán (eNOS) frakcióban (B). * $p < 0,05$ vs ISO-UN

4.5.4. NADPH-függő szuperoxid produkció

Az általunk alkalmazott endotél protektív kezelés hatással lehet a transzplantáció során fellépő inflammációs és oxidatív folyamatokra. Ezek közül a legkifejezettebbek a transzplantáció során a graftot ért ischémiás károsodások és a korai posztoperatív periódusban a reperfüzió okozta elváltozások. Amint az a 31. ábra mutatja 22 héttel a transzplantációt követően nem sikerült eltérést kimutatni a NADPH-függő szuperoxid termelésben a két ISO csoport között. Ezzel szemben emelkedett szuperoxid produkciót mértünk mindkét csoportbn a kontrollokhöz képest és a további szignifikáns emelkedést láttunk a súlyosan rejektáló állatokban.



31. ábra. NADPH-függő szuperoxid produkció ISO-UN, ISO-EP, valamint normál donor vesében (normal donor RK) és súlyos rejeckiót mutató vesében (severe rejection LK).

* $p < 0,05$ vs RK, # $p < 0,05$ vs LK

4.6. Restriktációs fragmenthossz polimorfizmus (PCR-RFLP) vizsgálatok

4.6.1. eNOS gén polimorfizmus

Az eNOS genotípusa mind a kontroll, mind a Tx15 csoportban megfelelt a Hardy-Weinberg equilibriumnak. Az eNOS G894T gén polimorfizmusa sem allél-, sem géntípusban nem mutatott különbséget a vizsgált hosszú távú graft túlélő és a kontroll csoport között (17. táblázat). A T allél frekvenciája 31,7%, a G allélé 68,3% volt a Tx15 csoportban, míg a kontrollokban 33,2% és 66,8%. Az eNOS G894T gén polimorfizmusa nem mutatott összefüggést a nemmel, korrall, követési idővel, graft funkcióval, plazma lipidek szintjével, BMI- szel, hipertónia előfordulásával, a proteinuriával, az akut rejekeciók számával és a donor korával (18. táblázat).

Polimorfizmus	eNOS G894T					
	GG		GT		TT	
	N	%	N	%	N	%
Tx15	23	45,1	23	45,1	5	9,8
Kontroll	39	39,8	53	54,1	6	6,1

17. táblázat eNOS G894T genotípus eloszlása.

4.6.2. HSPA1A G190C polimorfizmus genotípus eloszlása és allél frekvenciája

A HSPA1A polimorfizmusának genotípus eloszlása és allél frekvenciája megfelelt a Hardy-Weinberg equilibriumnak és nem mutatott különbséget a vizsgált csoportok között (19. és 20. táblázat)

4.6.3. HSPA1B A1267G polimorfizmus genotípus eloszlása és allél frekvenciája

A HSPA1B 1267AA genotípusa szignifikánsan alacsonyabb számban volt detektálható a Tx csoportban összehasonlítva a kontroll (K) csoporttal ($p=0,004$; kockázati hányados /OR/: 3,4; konfidencia intervallum /CI/: 1,35-8,94) és a Tx15 betegekkel ($p=0,02$; OR: 0,29; CI: 0,09-0,89). Ezzel párhuzamosan a 1267GG genotípus szignifikánsan gyakoribb volt a Tx

csoportban a K (p=0,002; OR: 5,1; CI: 1,65-16) és a Tx15 csoporttal összehasonlítva (p=0,005; OR: 0,11; CI: 0,02-0,55).

A HSPA1B 1267G allél szignifikánsan gyakrabban fordult elő a Tx betegeknél mint a kontroll (p=0,024; OR: 1,46; CI: 1,01-2,11) és a Tx15 csoportban (p=0,03; OR: 1,61; CI: 0,99-2,63).

Genotípus	GG	GT	TT	Össz
N	23	23	5	51
Férfi/Nő	11/12	12/11	2/3	25/26
Kor (év)	53,9±12,6	54±9,7	60,6±7,7	54,6±10,9
Követési idő (év)	18±3,6	17,1±2,8	17,6±4,7	17,5±3,4
Se kreatinin (µmol/l)	156,6±87,4	138,4±66,6	150,1±72,2	146,9±76,3
Ccrea (ml/min)	57,6±22,2	55,8±20,4	54,6±16,2	57±18
Koleszterin (mmol/l)	5,82±0,95	6±1,87	6,18±0,62	5,92±1,58
TG (mmol/l)	1,87±0,87	1,89±0,88	2,42±0,56	1,91±0,86
BMI (kg/m ²)	25,1±3,6	24,1±3,5	26,3±3,6	24,9±3,7
Proteinuria (g/24 óra)	0,9±0,9	0,6±0,8	2,2±1,4	0,9±1
Hipertónia (%)	78,3	69,6	80	72
Akut rejeckció (%)	34,8	26,1	40	31,4
Donor kora (év)	29±10	27,9±14,9	28,3±2,9	28,5±12

18. táblázat eNOS G894T gén polimorfizmusa a hosszú távú graft túlélőkben (Tx15) a klinikai adatokkal összefüggésben. Ccrea: kreatinin clearance, TG: triglicerid, BMI: test tömeg index

Polimorfizmus	N	HSPA1A G190C (%)			HSPA1B A1267G (%)		
		GG	GC	CC	AA	AG	GG
Kontroll	131	2 (2)	8 (6)	121 (92)	24 (18)*	93 (70)	14 (12) †
Tx	105	0 (0)	5 (5)	100 (95)	6 (6)+	81 (77)	18 (17) §
Tx15	48	0 (0)	6 (12)	42 (88)	9 (18)	36 (76)	3 (6)
AR	21	0 (0)	3 (14)	18 (86)	3 (14)	13 (62)	5 (24)

19. táblázat A HSPA1A és HSPA1B polimorfizmusok genotípusának eloszlása a hosszú távú graft túlélők (Tx15), a transzplantált átlag populáció (Tx), a biopsziával igazolt akut rejekció miatt graftjukat elvesztett (AR) betegekben az egészséges kontrollokkal összehasonlítva. *p=0,004 vs. Tx, OR: 3,4, CI: 1,35-8,94; +p=0,02 vs. Tx15, OR: 0,29, CI: 0,09-0,89; †p=0,002 vs. Tx, OR: 5,1, CI: 1,65-16; §p=0,005 vs. Tx15, OR: 0,11, CI: 0,02-0,55.

Polimorfizmus	N	HSPA1A G190C (%)		HSPA1B A1267G (%)	
		G	C	A	G
Kontroll	131	12 (4,5)	250 (95,5)	141 (54)	121 (46)*
Tx	105	5 (2)	205 (98)	93 (44)	117 (56) §
Tx15	48	6 (6)	90 (94)	54 (56)	42 (43)
AR	21	2 (5)	42 (95)	19 (45)	23 (55)

20. táblázat A HSPA1A G190C és a HSPA1B A1267G polimorfizmusainak allélfrekvenciája a hosszú távú graft túlélők (Tx15), a transzplantált átlag populáció (Tx), a biopsziával igazolt akut rejekció miatt graftjukat elvesztett (AR) betegekben az egészséges kontrollokkal összehasonlítva. *p=0,024 vs. Tx, OR: 1,46, CI: 1,01-2,11; §p=0,03 vs. Tx15, OR: 1,61, CI: 0,99-2,63

4.5.4. Klinikai adatok

A betegek klinikai és demográfiai adatait a 21. és 22. táblázat tartalmazza.

HSPA1A G190C	GG			GC			CC		
Csoport	Tx	Tx15	AR	Tx	Tx15	AR	Tx	Tx15	AR
N	0	0	0	5	6	3	100	42	18
Férfi/Nő	-	-	-	3/2	3/3	2/1	70/30	19/23	11/7
Kor (év)	-	-	-	53 (22-56)	53 (32-65)	61 (59-63)	53±12	53±11	42±11
Kreatinin (µmol/l)	-	-	-	113 (103-168)	126 (97-181)	390 (370-570)	148±48	145±83	645±215
Proteinuria (g/24 óra)	-	-	-	1,6 (0,8-2,3)	0,7 (0,1-1,7)	2,2 (1,6-3,8)	1,1±0,4	1,3±0,7	2,9±2,2
Koleszterin (mmol/l)	-	-	-	5,2 (4,3-6,7)	4,9 (3,6-5,1)	NM	5,9±1,2	5,9±1,5	5±1,7
TG (mmol/l)	-	-	-	2 (1,7-3,4)	2,3 (0,8-5,1)	NM	2,5±1,3	1,9±0,8	2,3±0,9
BMI (kg/m ²)	-	-	-	26 (23-31)	23 (19-28)	23 (22-27)	27±4,7	24,7±3,6	24±1
Hipertónia (%)	-	-	-	20	83	100	41	61	72
Akut rejeckió (%)	-	-	-	19	16	100	31	28	100

21. táblázat A HSPA1A genotípus eloszlása és a klinikai adatok a a hosszú távú graft túlélőkben (Tx15), a transzplantált átlag populációban (Tx) és a biopsziával igazolt akut rejeckió miatt graftjukat elvesztett (AR) betegekben. A GC genotípus esetén a kis esetszámok miatt az értékek nem kezelhetők parametrikus adatokként, ezért itt medián és szélsőértékben adtuk meg az értékeket. NM: nem mért.

HSPA1B A1267G	AA			AG			GG		
	Tx	Tx15	AR	Tx	Tx15	AR	Tx	Tx15	AR
N	6	9	3	81	36	13	18	3	5
Férfi/Nő	3/3	6/3	2/1	58/23	16/20	5/7	12/6	0/3	3/2
Kor (év)	36 (25-62)	48 (38-78)	46 (37-59)	53±13	54±10	45±12	50 (24-63)	46 (37-62)	34 (22-63)
Kreatinin (µmol/l)	100 (87-132)	118 (79-241)	600 (501-700)	147±49	152±86	607±220	149 (104-253)	95 (88-164)	800 (650-1000)
Proteinuria (g/24 óra)	1,2 (0,9-2,3)	1,3 (1,1-1,7)	3,1 (1,7-4,7)	1,1±0,4	1,6±0,8	3,2±2,1	1,3 (0,5-1,7)	0,6 (0,3-3,2)	NM
Koleszterin (mmol/l)	6,2 (4,4-7,4)	6,3 (4,4-7,2)	3,8 (2,3-4,8)	6±1,3	5,9±1,6	6±1,7	5,3 (3,8-7,5)	5,1 (4,8-6,8)	5,6 (2,8-6,3)
TG (mmol/l)	1,3 (0,9-3,4)	2,3 (1,2-3,1)	NM	2,5±1,2	1,8±0,8	2,5±0,9	2 (1,1-4,2)	1,2 (1,1-1,3)	2,5 (1,6-3,5)
BMI (kg/m ²)	25 (19-31)	24 (20-27)	22 (20-29)	27,3±5,2	24,7±4	24±1	27 (20-33)	24 (24-27)	22 (18-23)
Hipertónia (%)	33,3	77	30	32,9	75	90	33	44	66
Akut rejekció (%)	16,7	33	100	24,7	27	100	39	0	100

22. táblázat A HSPA1B genotípus eloszlása és a klinikai adatok a hosszú távú graft túlélőkben (Tx15), a transzplantált átlag populációban (Tx) és a biopsziával igazolt akut rejekció miatt graftjukat elvesztett (AR) betegekben. Az AA és GG genotípusok esetén a kis esetszámok miatt az értékek nem kezelhetők parametrikus adatokként, ezért itt medián és szélsőértékben adtuk meg az értékeket. NM: nem mért.

5. Megbeszélés

5.1. Nem és nemi hormonok hatásának vizsgálata a renális NOS rendszerre IR-s vesekárosodást követően

Munkánk során a renális NOS rendszert vizsgáltuk IR-s vesekárosodást követően, illetve elemeztük az L-arginin kezelés hatását a folyamatra. Bár az L-arginin kezelés széles körben kutatott, egymásnak igen ellentmondó publikációk láttak napvilágot hatásával kapcsolatban. Egyes kutatók szerint az L-arginin protektív a renális IR-s károsodással szemben (196), míg mások ilyen hatást nem írtak le (197). Ismereteink szerint a renális NOS rendszert IR-t követően és az L-arginin hatását a folyamatra a két nemből még senki nem hasonlította össze. A kérdés azért is érdekes, mert korábbi vizsgálataink során nekünk sikerült kimutatni, hogy a vesét ért IR-s károsodásban szignifikáns nemi különbség észlelhető és ebben az endothelin-1 igen fontos szerepet játszik (198). Tekintettel arra, hogy az endothelin vazokonstriktív hatásával ellentétes a NO vazodilatációt okozó hatással és a két molekula expressziója egymással összefügg, a nemi különbségek vizsgálata a renális NOS rendszerben érdekes lehet.

Vizsgálatunk során a funkcionális paraméterekben az igen súlyos IR-s károsodást követően különbséget kimutatni L-arginin kezelés hatására nem tudtunk. Mind a hím, mind a nőstény állatokban igen kifejezett akut veseelégtelenség alakult ki. A funkcionális paraméterekben észlelt hasonlóság ellenére a szövettani vizsgálat során L-arginin kezelést követően kisebb mértékű és kevésbé kifejezett szöveti károsodás alakult ki nőstényekben nem kezelt társaikhoz viszonyítva. Hím állatokban a L-arginin kezelésnek ilyen hatása nem volt megfigyelhető. Mind a kezelt, mind a kezeletlen csoportban súlyos szöveti elváltozások fejlődtek ki. Jerkic és munkatársai mutatták ki, hogy 4 hetes L-arginin előkezelés hatására 45 perces renális ischémiát követően javult a renális hemodinamika, víz reabszorpció és szöveti károsodás 24 órával a reperfüzió után (199). Más vizsgálatok során akut, 60 perccel az ischémiát megelőzően alkalmazott iv. L-arginin javította a GFR-ben bekövetkező csökkenést, illetve javította a vesefunkciót (200, 201, 202). Ezzel szemben intraperitoneálisan alkalmazva 45 perces renális ischémiát követően nem sikerült jótékony hatását kimutatni az L-arginin kezelésnek (197). Korábbi vizsgálatok során az L-arginin hatását IR-t követően az iNOS enzimre vizsgálták és a két másik izoenzim mérése nem történt. Bár az irodalmi közlések

alapján IR-s károsodás során az iNOS játszik döntő szerepet a NO termelésben, a másik két izoenzim szerepének tisztázása is fontos ismereteket közvetíthet. Munkánk során először vizsgáltuk, hogy milyen változások következnek be a 3 NOS enzim expressziójában a vesében IR-t követően L-arginin előkezelés hatására. Vizsgálatunkban sikerült kimutatni, hogy az L-arginin mindhárom izoforma expresszióját növeli mindkét nemből az IR-t követően az egyetlen nőstény medulla nNOS termelés kivételével. A legnagyobb hatást nőstény állatok cortexében sikerült kimutatni, ahol az eNOS expresszió majdnem 30x-ra emelkedett. Ez a növekedés hím állatokban csak 1,3x-szeres volt. Ismert, hogy májban ischémiát követően az eNOS expresszió emelkedése gátolta a posztischémiás májelégtelenség kialakulását (203). Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy eNOS KO egerekben sokkal súlyosabb posztischémiás károsodás alakul ki az agyban, mint vad társaikban (204). Vizsgálatunk során az eNOS expresszióban megfigyelhető nemi különbség volt az egyetlen amit találtunk. A korábban leírt protektív szerepe az eNOS-nak lehet az egyik magyarázata az L-arginin kezelés hatására megfigyelt kisebb szöveti károsodásnak nőstényekben. Ismert, hogy az eNOS hatására termelődő NO vazodilatációt okoz. Ez magyarázhatja korábbi megfigyelésünket, hogy nőstény állatokban az ischémiát követően szignifikánsan gyorsabban következik be a renális vazodilatáció, amely a szerv jobb vérellátását biztosítja.

Kosaka és munkatársai L-arginin kezelést követően csökkent iNOS expressziót írtak le 60 perc ischémiát és 7 óra reperfüziót követően mind a vese cortexben, mind a medullában (205). Az általunk megfigyelt emelkedett iNOS expresszió háttérben az eltérő reperfüziós idő és az eltérő IR-s modell állhat.

Alaphelyzetben a bazális NOS mRNS expressziót mindhárom izoforma esetén magasabbnak találtuk hímeinkben, mint nőstényekben. Ez ellentétes a korábban Neugarten és munkatársai által leírt megfigyeléssel az eNOS és iNOS tekintetében (122). A korábbi munkák során az nNOS mRNS expressziót a két nemből még nem vizsgálták. Az eNOS és iNOS termelésben megfigyelt különbség háttérben állhat az általunk végzett ál-operációs beavatkozás és a különböző patkány törzs, amelyeket a vizsgálatok használtak. Ez utóbbi megfigyelést saját korábbi munkánk is alátámasztja, amely szerint eltérő patkánytörzsek renális NOS expressziója különböző lehet.

Kísérletünk hátránya, hogy a NOS izoformák mRNS-ek mérésével mellett fehérje szinten nem végeztünk vizsgálatokat. Terveink között szerepel ennek az elvégzése is.

Összefoglalva: adataink alapján L-arginin kezelés nemtől függő módon hat súlyos renális IR-s károsodásra. L-arginin hatására a renális eNOS expresszió változik

szignifikánsan nőstény állatokban és ez hozzájárulhat az enyhébb szöveti károsodás kialakuláshoz.

5.2. A nem és a nemi hormonok hatásának vizsgálata a vese IR károsodására. A NKA és a HSP72 szerepe.

A posztischémiás vesekárosodás, az ARF egyik legfontosabb kiváltó oka és az intenzív terápia fejlődése ellenére mortalitása napjainkban is igen magas (206). Az ARF patofiziológiája rendkívül összetett folyamat, de a NKA - mint a szervezet homeosztázisának fenntartásában kulcsszerepet betöltő enzim – károsodása központi szereppel bír az ischémiás folyamat során. Korábbi vizsgálatok, melyeket kizárólag hím állatokon végeztek (207, 137, 138, 136) kimutatták, hogy ischémiát követően a NKA enzimaktivitása jelentős mértékben lecsökken.

A női nemi hormonok a NKA aktivitásának ismert, szövetspecifikus modulátorai (149, 208, 209), azonban renális hatásaikról kevés és igen ellentmondásos adat áll csak rendelkezésre (210, 211). Az androgének hatásait még kevésbé vizsgálták. Egyes adatok szerint a férfi nemi hormonok serkentik az ionpumpa aktivitását (212), míg mások szerint ezek a hormonok nem befolyásolják az enzim működését (151, 153).

Kísérleteinkben elsőként mutattuk ki, hogy a NKA enzim alegységeinek mRNS és fehérje expressziója, redistribúciója, illetve az ionpumpa aktivitása szignifikánsan eltér a nőstény és hím állatok között. Kísérleteinkben a nőstények NKA $\alpha 1$ alegységének mRNS expressziója már kontroll állatokban is mintegy kétszerese volt a hímelekben mértnek és ez a különbség a vizsgált periódus során mindvégig megmaradt. Két órával az ischémiát követően az $\alpha 1$ alegység mRNS expressziója mindkét nemben lecsökkent, de hímelekben jóval nagyobb mértékben, mint nőstényekben.

Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a nem és a nemi hormonok jelentősen befolyásolják a NKA $\alpha 1$ alegységének posztischémiás mRNS expresszióját. A különbséget magyarázhatja nőstények esetében az mRNS csökkent degradációja, illetve megnövekedett transzkripciója vagy stabilizációja. Ez utóbbi a legvalószínűbb, mivel korábbi vizsgálatok számos gén esetében, ischémiát követően az ösztrogének mRNS-t stabilizáló szerepéről számolnak be (213, 214). Az ösztrogének az mRNS 3'UT régióhoz kötődve megakadályozzák egyes endonukleázok kötődését és ezáltal az mRNS degradációját (215).

Figyelembe véve a NKA $\alpha 1$ alegységének 8 órás transzlációs idejét a mért mRNS és fehérje értékek vizsgálatinkban jól korreláltak egymással. A posztischémiás periódusban nőstényekben minden időpontban szignifikánsan magasabb NKA $\alpha 1$ protein szinteket

mértünk, mint hímekben. Míg hímekben az ischémiát követően az $\alpha 1$ protein szintje jelentősen lecsökkent, addig nőstényekben nem változott számottevően, ami felveti annak lehetőségét, hogy az ischémia hatására hímekben károsodik a NKA $\alpha 1$ alegységének fehérjeszintézise, de nőstényekben nem.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy az átmeneti ischémia a proteinszintézis hosszú távú gátlását okozza egyes transzlációs iniciációs faktorok foszforilálásán keresztül, bár a folyamat pontos mechanizmusa még részleteiben nem tisztázott (216). Akama és McEwen (217) vizsgálatai szerint az ösztrogének aktiválnak bizonyos szignál transzdukciós utakat, melyek az iniciációs faktorok foszforilálását megakadályozva, fokozzák a proteinek szintézist. Mindezek alapján feltételezhető, hogy posztischémiás periódusban nőstényekben az ösztrogén fent leírt hatásainak köszönhetően a NKA $\alpha 1$ protein szintézise kevésbé károsodik, míg hímekben jelentős csökkenés tapasztalható.

Másrésről az is elképzelhető, hogy a nőstény kontroll állatokban mért magasabb NKA $\alpha 1$ mRNS szint az ischémiát követően, mintegy a transzlációhoz szükséges mRNS készletként szolgál, és ezáltal meggyorsítja a protein szintézisét az IR károsodás során. Mindkét hipotézis lehetséges, de a folyamat pontos megismerése még további vizsgálatokat igényel.

A NKA fehérje szint csökkenése (melyet okozhat a szintézis csökkenése és a fokozott lebontás egyaránt) és az ionpumpa aktivitásának gátlása mellett, a NKA átmeneti apikális membránra történő redisztribúciója szintén jól ismert következménye a posztischémiás károsodásnak (134). Számos klinikai jelenség, mint a renális nátriumvesztés vagy a csökkent glomeruláris filtráció magyarázható ezzel az áthelyeződéssel. A NKA redisztribúciójához az enzimnek először el kell szakadnia az enzimet a bazális membránhoz horgonyzó citoskeletális struktúráktól, mely „szakadás” a Triton X-100 extraktibilitással jól jellemezhető (134, 141).

Korábbi, hím állatokon végzett vizsgálatok eredményeit kiegészítve kísérleteink során mi mindkét nemben kimutattuk, hogy ischémiát követően a NKA egy része átkerül a non-citoskeletális struktúrákat reprezentáló Triton-szolubilis felülúszó frakcióba. Az áthelyeződött, tehát eredeti fiziológiás helyéről elszakadt NKA fehérje mennyisége azonban nagyban különbözött a nőstény és hím állatok között. Míg hímeknél jelentős mennyiségű NKA $\alpha 1$ került át a citoszólba az ischémiás inzultust követően, addig nőstények esetében a fehérjemennyiség nagyobb része eredeti helyén, a bazálmembránhoz kötve maradt. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a homogenizátum NKA $\alpha 1$ protein szintjében észlelt nemi

különbségek elsősorban a citoszkéletális struktúrákat jellemző membrán frakció különbségeiből adódnak és a két nem közötti eltérő redisztribúcióra utalnak.

Kísérleteink szerint az enzim aktivitás értékei jól korreláltak a teljes szövethomogenizátum, illetve a membrán frakcióban mért NKA $\alpha 1$ protein szintekkel. Eredményeink arra utalnak, hogy az expresszált $\alpha 1$ alegységek funkcionálisan aktívak, mivel a NKA $\alpha 1$ protein szint növekedése, az ionpumpa aktivitásának emelkedésével együtt járt. A nőstényekben mért magasabb $\alpha 1$ protein szinttel párhuzamosan, az ionpumpa aktivitása is nagyobbnak bizonyult az ischémiát követő minden vizsgált időpontban a hímekkel összehasonlítva. Kajiwara (218) és Coux (140) korábbi hím állatokon végzett vizsgálataihoz hasonlóan, hím állatokban az ischémiát követően mi is a NKA aktivitás szignifikáns csökkenését tapasztaltuk, míg kísérleteinkben a nőstények ionpumpa aktivitása nem változott számottevően a vizsgált periódus során.

Az $\alpha 1$ alegység változásaival ellentétben, a $\beta 1$ alegység esetében nem találtunk eltérést a hím és nőstény csoportok között sem az alegység mRNS, sem protein expressziójában. A változások dinamikája is különbözik a két alegység esetében, míg az $\alpha 1$ mRNS szintje az ischémiás inzultus után két órával a legalacsonyabb, addig a $\beta 1$ alegységé csak 16 óra után éri el minimumát. Bertorello (219) és Pressley (220) korábbi vizsgálataik során kimutatták, hogy az $\alpha 1$ és a $\beta 1$ alegységek expressziója egymástól függetlenül szabályozott, ami magyarázhatja az egyes alegységek IR károsodásra adott különböző reakcióját.

A nem és a nemi hormonok szerepe a NKA $\alpha 1$ alegység IR károsodást követő változásaiban sokféle lehet. Korábbi vizsgálatainkkal egybehangzóan jelen kísérletünk során is igazoltuk, hogy IR károsodást követően nőstényekben kevésbé súlyos a vese strukturális károsodása, mint hímekben. Ez felveti annak lehetőségét, hogy nőstényekben az ischémia eleve enyhébb károsodáshoz vezet, mint hímekben és emiatt maga a NKA is kevésbé sérül. Feltételezhető, hogy nőstényekben a vese szöveti struktúrája megtartottabb marad, emiatt kisebb a tubulussejtek polaritásváltozása, ennek következtében a NKA redisztribúciója is kevésbé kifejezett. Mindezek a folyamatok összességükben, amint azt kísérleteinkben is kimutattuk, nőstényekben a NKA aktivitásának fennmaradását eredményezik.

Összefoglalva, kísérleteink ezen részében igazoltuk, hogy a NKA működése nőstényekben stabilabb, mint hímekben és nőstényekben az enzim védettebb a posztischémiás károsodással szemben. Kimutattuk, hogy IR károsodást követően nőstényekben magasabb a NKA $\alpha 1$ alegység mRNS és fehérje expressziója, valamint az ionpumpa aktivitása, mint hímekben. A NKA expressziójában és működésében észlelt

eltérések további fontos adatokkal szolgálnak a posztischémiás ARF-ben észlelt nemi különbségek patofiziológiájának tisztázásához.

Az IR károsodás során a NKA eredeti bazálmembránhoz kötött helyéről a citoszólba kerül ki, ezáltal átmenetileg gátlódik az enzim működése. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy nemi különbség van a NKA posztischémiás transzlokációjában, ami együttjár az ionpumpa aktivitásának különbségeivel és így közvetve hozzájárulhat a vese nemek között eltérő posztischémiás regenerációjához. Előzetes vizsgálatok alátámasztották, hogy HSP72 segít a sejtmembrán fehérjeszerkezetének megőrzése révén a NKA pumpafunkciójának fenntartásában (141). Kimutatták továbbá, hogy a denaturálódott proteinek nem csupán szubsztrátjai a HSPk-nek, de serkentik is a hő-sokk választ (141). Újabb vizsgálatok igazolták, hogy HSP72 stabilizálja a NKA kötődését a citoskeletonhoz (141, 142). In vitro vizsgálatok szerint a HSP72 emelkedett expressziója együttjár a NKA csökkent citoskeletonális destabilizációjával IR-t követően (221). Mindezek alapján kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a NKA expressziójában és működésében megfigyelt nemi különbségek hátterében állhat-e a HSP72 hímekben és nőstényekben különböző mértékű expressziója.

Elsőként igazoltuk, hogy nemi különbség van a vese posztischémiás HSP72 mRNS és fehérje expressziójában. Kimutattuk, hogy már intakt körülmények között is a kontroll nőstény állatok HSP72 mRNS és fehérje szintje mintegy másfélszerese a hím állatokénak. Korábbi vizsgálatok alapján ismert, hogy azok a szervek, illetve szövetek, melyek nagyobb mértékben expresszálják a HSP72-t celluláris stresszel szemben ellenállóbbak, továbbá, hogy intakt szervek/szövetek megnövekedett HSP72 expressziója fokozott stresszrezisztenciát jelez (222). Vizsgálati eredményeink megfelelnek Voss és mtsai adatainak, akik 40%-kal magasabb HSP72 fehérje szintet mértek nőstény állatokban, a szívben és a vesében ischémiát követően (169). Az ő vizsgálataikban azonban mRNS és immunhiszokémiai mérések nem történtek.

Újabb kísérletek igazolták, hogy ovariectomia csökkenti, 17- β ösztradiol vagy progeszteron kezelés növeli (170), míg 5- α dihydrotesztoszteron nincs hatással a HSP72 szintjére a különböző szervekben (223).

Mindezek és saját eredményeink alapján feltételezhető, hogy a kontroll nőstényekben észlelt magasabb HSP72 mRNS szint az ischémiás károsodással szembeni nagyobb toleranciára utal.

Az ischémiás inzultus után 2 órával nőstényekben a HSP72 mRNA szintje mintegy duplájára nőtt, míg hímekben jóval kisebb mértékű expressziónövekedést észleltünk. Az ischémia hatására nőstényekben bekövetkező expressziónövekedés mértéke megegyezett a más kísérletekben etanol, mint a HSP72 specifikus induktorának beadását követő HSP72 szint emelkedésével (160). Az expresszált HSP72 mRNA mennyiségében észlelt különbség mellett, nemi különbséget észleltünk az expresszió dinamikájában is. Míg nőstények esetében már 2 órával az ischémiás inzultus után a kontrollokhöz képest szignifikánsan magasabb mRNA értékeket detektáltunk, hímek esetében a HSP72 mRNA szintje kevésbé emelkedett maximumát később, 16 óra elteltével érte csak el. A HSP72 protein értékek változásai jól korreláltak az mRNA szintekben észlelt eltérésekkel. A HSP72 fehérje mennyisége nőstényekben a vizsgált periódus során végig magasabb volt, mint hímekben.

Ischémiás inzultust követően a legtöbb fehérje expressziója gátlódik, kivétel ez alól a HSP72, amelynek mRNA és fehérje szintézise mérhetően (15-25%-kal) és gyorsan emelkedik (163). A HSP72 szintézisét a hő stressz faktor (HSF)-1 szabályozza, amely stressz szituációban foszforilálódik és a HSP72 gén promoter régiójához kötődve indítja el a HSP72 elválasztást (224). Kimutatták, hogy a 17- β ösztadiol és a progeszteron aktiválja a HSF-1-t és így növeli a HSP72 expresszióját szívizom sejtekben (170).

Feltételezhetjük tehát, hogy nőstényekben az ischémiás inzultust követően gyorsabb és nagyobb mennyiségű HSP72 expressziónak köszönhetően hamarabb indul be a károsodott proteinek helyreállítása, illetve a membránstruktúrák regenerációja.

A vesében a tubulussejtek energiaigényes folyamataik miatt elsődleges célpontjai az IR károsodásnak. Az IR szövettani jelei a vesében elsősorban a tubulus nekrozis és apoptózis, az extracelluláris matrix degradációja és a sejtes (monocita, makrofág, neutrofil) infiltráció. Immunhisztokémiai vizsgálatok igazolták, hogy a vesében a tubuláris epiteliális sejtek központi forrásai a HSP72-nek IR-t követően. Egyre több indirekt in vivo és in vitro adat támasztja alá azt a feltételezést, hogy a HSP72 és a NKA között interakció lép fel az IR-t követően. Van Why és mtsai már 1992-ben leírták és megfigyelték a HSP72 és a NKA α 1-alegység hasonló lokalizációját és granulációs mintázatát posztischémiás vesében (225). További adat, hogy ischémiás prekondicionálás HSP72 túlprodukciónak eredményez és megakadályozza a NKA α 1-alegység disszociációját az ismételt ischémiás inzultust követően (141). Riordan és mtsai közelmúltban megjelent munkájában direkt interakciót igazoltak a HSP72 és a NKA α 1-alegysége között vese ischémia in vitro modelljében (221). Mindezek arra utalnak, hogy a HSP72 chaperone funkciója révén részt vesz a NKA molekulák

visszarendezésében, és ezáltal az enzim funkciójának helyreállításában, bár a folyamat mechanizmusa részleteiben még tisztázatlan.

Jelen vizsgálatunkban egy markáns különbséget sikerült kimutatni a HSP72 és NKA α 1-alegység mintázatában ischémiát követően a vesében a két nem között. Igazoltuk, hogy kontroll (nem ischémiás) helyzetben mind a hímek, mind a nőstények esetén a HSP72 és a NKA α 1-alegység a proximális tubulus sejtek basolaterális membránján ko-lokalizálódik. Ischémiát követően nőstényekben a basolaterális festődés továbbra is kifejezett maradt, míg hímekben mindkét fehérje a citoszolban és az apikális régióban volt kimutatható. Az általunk megfigyelt ko-lokalizációja a két fehérjének további in vivo adatot szolgáltat a HSP72 és NKA között fennálló interakcióra. A megfigyelt jelenség magyarázhatja, hogy nőstény állatokban a NKA jelentős része membránhoz kötött formában (aktív) marad az ischémiás károsodást követően is. Ezzel szemben a csökkent basolaterális HSP72 expresszió a NKA redistribúciójához és inaktiválódásához vezet hímekben.

Kísérletsorozatunkban kimutattuk, hogy az ischémiás inzultust követően nőstényekben kevésbé károsodik a NKA működése, mint hímekben. Nőstényekben az ischémiát követően nincs számottevő csökkenés a NKA α 1 alegységének fehérjeexpressziójában, illetve az enzimaktivitásban. Az irodalmi adatok és saját eredményeink alapján feltételezhető, hogy a nőstényekben eleve magasabb, majd gyorsabban expresszálódó HSP72 protektív hatású a NKA posztischémiás károsodásával szemben.

5.3. A renális nNOS rendszer vizsgálata

Vizsgálataink új eredménye, hogy az AI indukálta krónikus vesebetegségben (CRF) mind a kortexben, mind a medullában a nNOS expressziója a szövettani elváltozások súlyosságával és a vesefunkciós paraméterek emelkedésével párhuzamosan csökken. Az nNOS szintézise a glomeruláris károsodás kb. 30% fölé emelkedése és a szérum kreatinin szint 1mg/dl-t elérő értéke esetén kezd progresszívan csökkenni.

A krónikus vesebetegség állatmodelljei közül az egyik leggyakrabban használt az 5/6 ablációs modell, amely esetén az egyik vese eltávolítását követően a másik vese alsó és felső pólusát eltávolítjuk (abláció-A) vagy a megmaradt veséhez futó artéria renális oszlását felkeresve az alsó és felső pólust ellátó ágakat lekötjük (abláció/infarceráció-AI). A két modell közti különbség, hogy az AI esetén a korai szakban hipertónia is kialakul, amely gyorsabb progressziót eredményez (226). Ismert az is, hogy nemcsak a metodika és az egyes beavatkozások közötti egyéni eltérések, hanem az alkalmazott patkány törzs is erősen befolyásolja a CRF progresszióját (186, 227). A fenti problémák miatt mindegyik állatnál az AI modellt alkalmaztuk, azonos patkány törzset használva és különböző időpontokat összehasonlítva, hogy tanulmányozhassuk a CRF progresszióját és a renális NOS rendszert.

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a CRF kialakulása együtt jár a renális „in vitro” NOS aktivitás csökkenésével (228). Jelen kísérletünk bizonyította, hogy a CRF korai szakaszában, illetve felgyorsult progresszió esetén is csökken a NOS aktivitás. Tekintettel arra, hogy az „in vitro” NOS aktivitás mérés esetén szubsztrát és kofaktorok bőséggel állnak rendelkezésre, az eredmények értékelésénél figyelembe kell venni, hogy CRF esetén ezek is csökkenhetnek. További tényező, hogy a vizsgálatok a szolubilis frakcióból történtek, amelyek a nNOS és iNOS aktivitását tükrözik, és nem adnak felvilágosítást a membránhoz kötött eNOS működéséről. Az már korábban is ismert volt, hogy AI modellben csökken a NOS fehérjék expressziója (228), továbbá vimentin knock out (KO) egérben $\frac{3}{4}$ nefrektómiát követően akut veseelégtelenség alakul ki, amely az endotelin-NO rendszerben bekövetkező változásokkal áll összefüggésben (229). Számos kutatócsoport tudósított a renális iNOS fehérje expressziójának csökkenéséről mind az A, mind az AI modellben patkányban (228, 230, 231). A fenti megfigyelések azért érdekesek, mert az immunológiailag nem érintett, egészséges vesében az iNOS expressziója igen alacsony és ezért kérdéses a megfigyelt csökkenés szerepe a NO produkcióban. A vesében a legnagyobb mennyiségben termelődő

NOS izoforma a nNOS, amely megtalálható az epithel sejtekben, nagy mennyiségben a macula densában és a gyűjtő csatorna sejteiben (232, 233). Az eddigi eredmények a nNOS expresszióját illetően CRF-ben eltérőek. Egyes vizsgálatok már 2 héttel az abláció után csökkenését írták le (234), míg mások 6 héttel a beavatkozást követően emelkedett szintézist detektáltak (230). Jelen vizsgálatunkban egyértelműen, az összes vizsgált AI csoportban az időtől függetlenül a nNOS fehérje expressziójának csökkenését tapasztaltuk, amennyiben a szérum kreatinin érték 1mg/dl fölé emelkedett (patkányban a normál érték: 0,4-0,5mg/dl). Két héttel az AI után normál diétán és ivóvizzen tartva az állatokat a szérum kreatinin érték $1,02 \pm 0,1$ mg/dl volt, amely mellett a nNOS csökkenését még nem észleltük. Amennyiben magas protein és NaCl tartalmú diétával akceleráltuk a progressziót, a vesefunkció beszűkülésével a nNOS alacsonyabb termelődését is ki tudtuk mutatni a rövid, mindössze 2 hetes követési periódus ellenére. A további csoportokban igazoltuk, hogy a vesefunkció további beszűkülésével párhuzamosan, progresszíven csökken a detektálható nNOS fehérje mennyisége is. Az egyes csoportokon belül megfigyelt „csoporton belüli” variabilitás elrejtheti a szoros korrelációt, amelyek az individuális adatok regresszió analízisével válnak láthatóvá. Összességében az individuális kortikális és medulláris nNOS fehérje expresszió kiváló prognosztikai markere a vesefunkció hanyatlásának CRF-ben.

Megfigyelésünket támasztja alá Rocznia és mtsai korábbi vizsgálata (234), akik a CRF ablációs modelljében már 2 hét után a renális nNOS csökkenését észlelték. A mi vizsgálatunkban ez csak az akcelerált CRF modellben volt 2 hét után kimutatható, a későbbi időpontokban azonban mi is hasonló csökkenést találtunk. A 2 hétnél észlelt különbséget az eltérő CRF modell magyarázhatja. Ezzel szemben Vaziri és mtsai egyedülként (230) 6 héttel az abláció után mind a vesében, mind az agyban a nNOS termelés emelkedését írták le. A különbséget magyarázhatná az általunk használt eltérő elsődleges antitest, amely egy nyúl poliklonális antitest az N-terminális 1-231 aminosavjainak felismerésére. Az előbb ismertetett két kísérletben a C-terminális elleni antitestet használták. Tekintve azonban, hogy mind Rocznia, mind Vaziri azonos antitesttel dolgozott a metodikában leírt különbség nem magyarázza az eltérő eredményeket. A mi eredményeinket támasztja alá az a tény is, hogy a NOS aktivitást egy gátló fehérje (protein inhibitor nNOS-PIN) is szabályozza (235). Az eddigi ismereteink szerint a PIN és a nNOS kolokalizálódik a medullában és itt már 2 héttel az ablációt követően nagy mennyiségben expresszálódik (236). Összegezve az eddigi irodalmi adatokat a CRF-ben a nNOS expresszió és aktivitás csökkenése a valószínű, amelyet számos vizsgálati eredmény támaszt alá.

Mi lehet tehát a szerepe a renális nNOS aktivitás csökkenésének? A macula densában termelődő NO egy féket jelent a tubulo glomeruláris feedback (TGF) indukálta afferens arteriola vazokonstriktóra (237). Ezt a hatást akut lokális nNOS gátlással lehet demonstrálni (237). Ezzel szemben nNOS KO egérben (238, 239) és patkányban 4 hetes krónikus nNOS gátlás után (240) a TGF válasz normális, amely feltételezi egy kompenzációs mechanizmus jelenlétét. A krónikus 4 hetes nNOS gátlás bár a TGF érzékenységet nem befolyásolja, de hipertónia kialakulásához vezet a GFR csökkenése nélkül (240). Hasonló módon lokális, krónikus nNOS gátlás a medullában só-dependens hipertóniát okoz (232). Így elsősorban a medulláris nNOS aktivitás csökkenése és/vagy elvesztése központi szerepet játszhat a CRF progressziójában, részben a CRF-t kísérő hipertónia fenntartása útján.

A vesében a nNOS fehérje expresszió szabályozása összetett (241) és jelenleg sem tisztázott, hogy milyen szignálok játszanak szerepet a termelés csökkenésében az A és AI modellben. A szignál mechanizmus valószínűleg összefügg a progresszióval kapcsolatos központi folyamatokkal, hiszen nemcsak az A és AI-ban, hanem az öregedéssel járó vesefunkció beszűkülésben (242), a krónikus glomerulonephritisben (243) és a II. típusú diabetes mellitussal társuló nephropatiában (244) is megfigyelhető. Valószínűleg az ún. urémiás toxinok közül az urea nitrogén szerepe kizárható, hiszen 7 napig tartó, urémiás állapotnak megfelelő urea nitrogén szint nem befolyásolta a NOS aktivitást és a nNOS expressziót patkányban (245). A CRF progressziójában az angiotenzin II fontos szerepet játszik. Korábbi vizsgálatok során angiotenzin gátlása nem volt hatással a medulláris nNOS termelésre 2 héttel az ablációt követően, azonban a kortexben részlegesen javult a nNOS fehérje expressziója (234). Más vizsgálatok szerint akut és krónikus angiotenzin II infúzió nem befolyásolta, vagy éppen növelte a nNOS fehérje mennyiségét (246, 247) és a nNOS és renin egymással párhuzamosan változott (248), amely valószínűtlenné teszi a direkt angiotenzin mediálta gátló hatást vizsgálatunkban. A fentiek alapján a pontos gátló mechanizmus a CRF progressziója során egyelőre nem ismert.

A vesebetegségek progressziójának hatása a renális eNOS termelésre még kevesbé tisztázott. Néhányan csökkent eNOS expressziót írtak le a CRF különböző modelljeiben (228, 231, 249). Vizsgálatunkban mi emelkedett vagy változatlan eNOS fehérje termelődést találtunk. Más kísérletekben, a krónikus glomerulonephritis állatmodelljében sem észleltük az eNOS változását (243). Kétségtelen, hogy a Western-blottal történő fehérje meghatározás nem ad felvilágosítást az eNOS lokális, intrarenális eloszlásáról és a mikrovaszkuláris endothelium integritásáról. A változatlan mennyiségű eNOS expressziót magyarázhatja, hogy a rapidan

progreáló CRF-ben (5/6 abláció+krónikus NOS gátlás), a peritubuáris és glomeruláris endotélium megkevesbedik, míg a preglomeruláris endotélium inkább hipertrophizál (250). Így az elsősorban endotél sejtekben jelenlévő eNOS mennyisége változatlan maradhat.

A vizsgálat során megfigyelt NOS aktivitás csökkenésért azonban nemcsak a fehérje expressziójának csökkenése, hanem a betegség progressziója során megnövekedett reaktív oxigén gyökök és az ezzel párhuzamosan jelenlévő oxidatív stressz is felelős (251, 252).

Összefoglalva, vizsgálatunk igazolta, hogy a krónikus vesebetegség progressziója során észlelt szövettani elváltozásokkal és vesefunkciós értékek emelkedésével fordítottan arányos módon változik a NOS aktivitás és nNOS fehérje expresszió. Bár a pontos mechanizmus továbbra sem ismert, úgy tűnik, létezik egy küszöbértéke a vesefunkció csökkenésének, amelytől elindul a nNOS expresszió csökkenése. Eredményeinkből azonban nem mondható meg, hogy a renális nNOS fehérje termelődés csökkenése mennyiben a vesekárosodást passzívan követő folyamat, és mennyiben járul hozzá a vesebetegség progressziójához.

5.4. A nem és a nemi hormonok hatásának vizsgálata az immunszuppresszív kezelésre és a renális NOS rendszerre

Vizsgálatunk fő eredménye, hogy igazoltuk nőstény állatokban alacsony dózisú (hímekben elégséges) CsA kezelés nem gátolja meg az akut-, illetve az akcelerált krónikus rejekció kialakulását. Nőstény állatoknak magasabb dózisú immunszuppresszív terápia szükséges. Szintén új eredmény, hogy RAPA monoterápia nem elégséges hím állatokban az allograftban kialakuló KAN kivédésére és a RAPA kezelés teljesen és szelektíven gátolja a renális kortikális nNOS fehérje expressziót, amely mint korábban láttuk, prognosztikai faktora a krónikus vesebetegség lezajlásának.

A KAN vizsgálatára szinte kizárólagosan hím állatokat használnak. Korábbi munkáink során az elsők között voltunk, akik nőstény állatok transzplantációját végeztük. A modellben hím állatokban az iniciális akut rejekciók kivédésére az eddig használt 1,5mg/kg/nap adagú CsA kezelés elégségesnek bizonyult. Nőstény állatokban azonban ilyen dózisú immunszuppresszió nem képes a kilökődési reakció teljes kivédésére. Bár az ischémia idő csökkentése javította a kezdeti graftfunkciót, az alacsonyabb dózisú CsA terápia mellett így is kialakult az akcelerált krónikus rejekció. A graftokat a kilökődéstől csak a dózis megduplázása mentette meg. Újabb klinikai vizsgálatok igazolták, hogy az akut rejekciók kialakulásának valószínűsége nőkben 10%-kal nagyobb mint férfiakban, míg a KAN 10%-kal ritkábban fordul elő. Ez utóbbi megfigyelés alátámasztja a disszertációban korábban bemutatott kísérletes munkánkat (253). Az akut rejekciók nőkben való gyakoribb előfordulását magyarázhatja a nőkben megfigyelt agresszívabb immunválasz a szervezetet ért hatásokra (253). Ezt támasztja alá a nőkben gyakrabban észlelt autoimmun betegségek kialakulása is. Tekintettel arra, hogy az akut rejekció a KAN egyik fontos rizikó tényezője, így a nem és a nemi hormonok az akut rejekción keresztül is befolyásolják a graft hosszú távú túlélését és csak megfelelő immunszuppresszív kezelés mellett várható a KAN kialakulásában megfigyelt lassabb progresszió. Megfelelő immunszuppresszív kezelés esetén (3mg/kg/nsp CsA) nem alakult ki súlyos graft károsodás a nőstényekben és az elváltozások megfeleltek, vagy kisebbek voltak a hím ISO csoportban találtaknál. Ez alátámasztja a korábbi megfigyelésünket, hogy nőstény állatok ischémiával szemben rezisztensebbek.

A CsA ismert nephrotoxikus szer, a CsA kezelt ISO hím és nőstény állatokban megfigyelt hasonló és minimális elváltozások nem támasztják alá a CsA nemtől függő nephrotoxikus

hatásának hipotézisét. Ellene szól az is, hogy magasabb dózisú CsA kezelés mellett javult a graftok túlélése nőstény állatokban. Összegezve az adatokat, azt mondhatjuk, hogy az I. és II. szériában észlelt graftvesztés háttérében az elégtelen immunszuppresszív kezelés állhat.

A RAPA hatásának vizsgálatokor (IV. széria) a hím állatok vesetranszplantációjakor általában használt dózisonál nagyobb adagot alkalmaztunk, hogy elkerüljük a korábban részletezett inadekvát immunszuppressziót a nőstény ALLO állatokban. Így a hím és nőstény ALLO állatok graftja hasonlóan működést mutatott 22 héttel a transzplantáció után. Korábbi vizsgálatok már igazolták, hogy alacsonyabb dózisú RAPA monoterápia elégséges az akut rejekciók kivédésére hím állatokban (254). A mi vizsgálatunk volt azonban az első, ahol nőstény donor és recipiens állatokat alkalmaztunk és kezeltünk RAPA terpiával. A III. és IV. széria eredményei igazolták, hogy nagyobb dózisú immunszuppresszív terápia effektíven gátolja az akut kilökődést nőstényekben. Nem várt megfigyelés volt azonban, hogy RAPA terápia mellett a graft károsodása súlyosabb, mint magasabb dózisú CsA alkalmazása esetén. RAPA esetén eddig nem igazoltak nephrotoxicitást és csak igen enyhe vazokonstriktor hatását mutatták ki a renális mikrocirkulációban (255). Tény, hogy egy összehasonlító vizsgálatban RAPA kezelés mellett IR károsodást követően 14 nappal a vesefunkció jobb volt, mint CsA kezelés esetén és a RAPA kezelt vesékben strukturális károsodást nem tudtak kimutatni, míg CsA terapiánál enyhe akut tubuláris nekrozis jelei voltak láthatóak (255). Ezzel szemben akut (2 napos) RAPA-mediálta funkcióromlás és károsodás volt észlelhető izograftokban különböző ischémia idők (24-48 óra) esetén (256). Ennek háttérében a RAPA antiproliferatív hatása állhat, amely lassítja a regenerációt és így elhúzódozóbb felépüléshez vezet a graft működésének késleltetett indulása esetén (256).

Ahogy a korábbiakban láttuk experimentális és klinikai adatok is alátámasztják a CRF-ben megfigyelt csökkent NO szintézist (122). Kísérletes NOS gátlás gyorsítja, míg L-arginin adása lassítja a vesebetegség progresszióját (257, 243). A korábban részletezett vizsgálatunk alapján ismert, hogy az eNOS változása eltérő, a nNOS azonban csökken krónikus vesebetegségben a kiváltó tényezőtől függetlenül (122).

Jelen vizsgálatunkban a KAN hatását vizsgáltuk a renális eNOS és nNOS expresszióra. A CsA kezelt állatokban csak kis különbségek voltak megfigyelhetők mind a kortexben, mind a medullában. Egyedül a hím ISO csoportban észleltük a nNOS alacsonyabb expresszióját. RAPA kezelt állatokban meglepő, nem várt eredmény volt, hogy a kezelt csoportok egyikében sem volt nNOS fehérje kimutatható a kortexben. Ezzel szemben a medullában a III. és IV. csoportban sikerült nNOS expressziót detektálni. Metodikai hiba kizárására a

mintákat CsA kezelt állatokéval együtt újra feldolgoztuk, és azonos membránon futattuk. Az nNOS expresszió így sem volt látható a RAPA terápiát kapott állatokban. Ezzel párhuzamosan a RAPA és CsA kezelt állatok harántcsíkolt izom és kisagyi mintáiból is elvégeztük a mérést és nem találtunk különbséget a kezelés függvényében. Így eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a vizsgált modellben 10 napos RAPA kezelés szelektíven gátolta a kortikális nNOS fehérje szintézisét. Megfigyelésünket részben alátámasztja az a jelenlegi vizsgálat, amelyben harántcsíkolt izomzatban 10 napos RAPA kezelés hatására nem észleltek változást a nNOS expresszióban (258). Egyéb vizsgálati eredmény nem ismert a RAPA hatásáról a nNOS-ra és a többi NOS izoenzim esetén az adatok egymásnak ellentmondóak. RAPA mediálta eNOS protein expresszió és foszforiláció emelkedéséről számoltak be Apo E KO egerek aortájában, bár ezzel párhuzamosan megnövekedett oxidatív stressz is észlelhető volt, amely hatással lehetett a szintézisre (186). Ezzel szemben mások RAPA kezelés mellett disznó koronáriában NO-agonista kezelés indukálta NO termelés gátlását írták le (185). Számos kísérletben a RAPA mediálta iNOS által termelt NO produkció csökkenéséről számoltak be (242). A konstitutív NOS izoenzimek expressziójában leírt eltérő változások ellenére vizsgálatunkban a szervezet teljes NO termelése emelkedett, amelyet a 24 órás vizelet NO_x kiválasztás igazolt. Ez független volt az immunszuppressívum fajtájától és attól, hogy ISO vagy ALLO transzplantáció történt-e. Ennek a megnövekedett NO termelésnek a háttere pontosan nem ismert, de valószínűtlen, hogy a konstitutív NOS izoenzimek lennének érte felelősek, hiszen ezek szintézisében inkább csökkenő tendenciát láttunk. Ezzel szemben a jelenleg nem vizsgált iNOS expressziója transzplantációt követően emelkedik. Ezzel az akut rejekció kialakulását és lezajlását rontja, míg a KAN-ban inkább protektív szerepet tölt be (28, **Hiba! A könyvjelző nem létezik.**). Vizsgálataink során számos protokolt kipróbálva sem sikerült megbízhatóan detektálni az iNOS expressziót a vesében, ezért ilyen irányú méréseket nem végeztünk.

Összefoglalva, vizsgálatunk igazolta, hogy a női nem rizikót jelent az akut rejekció kialakulására és az akcelerált krónikus rejekcióra. Nőstény állatokban csak magasabb dózisu CsA és/vagy RAPA kezeléssel védhető ki a kezdeti immunreakció. A CsA terápia a renális nNOS és eNOS expresszióra nincs komolyabb hatással. Ezzel szemben RAPA kezelés párhuzamosan a kortikális nNOS fehérje expresszió teljes gátlásával, hosszú távon rosszabb graft funkciót eredményezett mindkét nembn. Összességében eredményeink alátámasztják egy nemtől és hormonális státusztól is függő immunszuppressív protokoll kidolgozásának szükségességét.

5.5. Antiinflammatorikus-antioxidáns perfúziós oldat hatása a KAN-ra.

Vizsgálatunk legfontosabb eredménye, hogy rövidtávú, (10 napos) intenzív endotél protektív kezelés antiinflammatorikus és antioxidáns kezeléssel kombinálva a transzplantáció idején nem védi ki a hosszú távú funkcionális és strukturális károsodásokat Fisher patkány isograftban. Tudjuk, hogy a graftot ért károsodásban számos tényező szerepet játszik. Ezek egy része mint korábban láttuk alloantigén függő, míg mások alloantigéntől függetlenek. A donor és a donor vese kondíciója igen fontos alloantigéntől független faktor, amely hatással van a transzplantátum hosszú távú működésére. Vizsgálatunkban egészséges donor veséket használtunk, minimális hideg- és meleg ischémia idővel. Az optimális donor és donor vese, valamint a rövid ischémias periódus és az alloantigéntől függő faktorok hiánya ellenére szignifikáns strukturális változások alakultak ki a graftban. Ezt mutatta, hogy az ISO-UN állatokban emelkedett Banff score-t és glomeruloszklerózist detektáltunk a kontrollokkal összehasonlítva. Tekintettel arra, hogy uninefrektómiát követően a megmaradó egy vese szövettanilag nem különbözik az egészséges, 2 vesével élő állatokétól, az isograftokban észlelt strukturális változások hátterében az ischémia-reperfúziós károsodás állhat. A kialakuló eltérések azonban függenek az alkalmazott állat törzstől is, hiszen Brown-Norway patkányokban isotranszplantációt követően 1 évvel sem tudtak kimutatni szignifikáns szövettani elváltozásokat⁽²⁵⁹⁾.

Vizsgálatunk fő célja volt annak megállapítása, hogy 10 napos endotél protektív kezelés javítja-e a funkcionális/strukturális elváltozásokat az „optimális” isograftban? Eredményeink azt mutatták, hogy sem a funkcionális/strukturális eltérésekben, sem az emelkedett NADPH-függő szuperoxid termelésben nem védett a kezelés. Ez ellentétben áll az allograftokban megfigyelt protektív hatással⁽²⁶⁰⁾. Ebben a vizsgálatban használt kezelés rövid távon renoprotektívnek bizonyult (órától 9 napig), amely az IR-ra kifejtett védő hatás eredménye lehet, hosszú távú adatok ebben a modellben sem állnak rendelkezésre. Eredményünk, amely a protekció hiányát mutatta, összevetve az irodalmi adatokkal, arra enged következtetni, hogy az endotél protektív kezelésnek jótékony hatása allotranszplantáció és különösen marginális donorok esetén lehet. Bár vizsgálatunk negatív eredménnyel zárult és szignifikáns változásokat a kezelés nem okozott, meg kell azonban állapítanunk, hogy egy trend a kisebb strukturális károsodás és a jobb funkció irányában megfigyelhető volt. Ez azt támasztja alá,

hogy nem „optimális” donor és talán hosszabb követési periódus esetén a kezelés hasznos lehet.

A hasonló eltérések elelnére a renális nNOS és eNOS fehérje expresszió alacsonyabb volt az ISO-EP csoportban összehasonlítva az ISO-UN állatokkal. Ezzel párhuzamosan azonban az enzimaktivitás nem különbözött a csoportok között. Ez az eredmény alátámasztja a NOS izoenzimek komplex szabályozását. Az egyik fő szabályozója ezen enzimeknek az oxidatív stressz. Mint láttuk kísérletünkben nem találtunk különbséget a NADPH-függő szuperoxid termelésben a kezelt és nem kezelt csoport között. Ez arra enged következtetni, hogy az endotél protektív kezelés részlegesen javítja az NO szintézist és endotél funkciót, úgy hogy kisebb mennyiségű nNOS és eNOS is elégséges az enzimaktivitás fenntartásában.

Összefoglalva: rövidtávú endotél protektív kezelés nem védi az „optimális” graftot isotranszplantáció esetén az enyhe-közepes hosszú távú károsodások ellen.

5.6. Restriktációs fragmenthossz polimorfizmus (PCR-RFLP) vizsgálatok

A genetikai háttér vitathatatlanul fontos szerepet játszik a transzplantátumok hosszú távú túlélésében. Jelen vizsgálatunkban az eNOS G894T és a HSP72 két (HSPA1A G190C9 és A1267G) polimorfizmusát vizsgáltuk a gratok hosszú távú túlélésével összefüggésben.

Az eNOS G894T polimorfizmus esetén nem találtunk sem az allél frekvenciában, sem a genotípus eloszlásában különbséget a vizsgált csoportok között. A G894T eNOS polimorfizmus összefüggését írták le megnövekedett miokardiális infarktus rizikóval és angiografiával igazolt koronária betegséggel (261, 262, 263). Hipertóniás betegekben történt vizsgálatok egymásnak ellentmondó eredményekre vezettek (264, 265). A vörösvértestek deformálhatósága fontos tényező a mikrocirkuláció szempontjából. Fatini és mtsai publikálták, hogy az eNOS G894T polimorfizmusa befolyásolja a vörösvértestek deformálhatóságát és ezzel a mikrocirkulációt (266). Senthil és mtsai igazolták, hogy a vizsgált polimorfizmus befolyásolja az eNOS mRNS expresszióját (267). Tekintettel arra, hogy a transzplantátumokban hosszú távon érelváltozások alakulnak ki (akcelerált arterioszklerózis) és ezek befolyásolják a graft hosszú távú működését és túlélését, vizsgálatunk egyik célpontja az eNOS G894T polimorfizmusa volt. Klinikai vizsgálatunkig nem volt ismert adat ennek a polimorfizmusnak a szerepéről a transzplantációban. Kísérletes munkában kimutatták, hogy az eNOS véd az aorta graftban kialakuló arterioszklerózis ellen (268) és gén transzferrel a graftba juttatott eNOS protektív hatású a szívben kialakuló krónikus rejekcióval szemben (269). Ezeknek az adatoknak az ismeretében feltételeztük, hogy az eNOS G894T polimorfizmusa, elsősorban a T allél jelenléte befolyásolhatja a graft működését vesetranszplantációt követően. A vizsgálati eredmények nem támasztották alá hipotézisünket, a T allél frekvenciája megegyezett a vizsgált két csoportban. További adat, hogy a kapott genotípus eloszlás és allél frekvencia megfelelt az azonos földrajzi régióból származó, egészséges egyéneken végzett mérések adatainak (270) és hasonló eredményekről számoltak be egészséges populációban az Egyesült Királyságban is (271). A klinikai adatokat elemezve sem találtunk összefüggést az egyes paraméterek és a genotípus vagy allél megoszlás között.

Eredményeink alapján úgy tűnik az eNOS G894T polimorfizmusa nem játszik szerepet a graftok hosszú távú túlélésében.

Vizsgálatunk következő részében a HSP70 család polimorfizmusait vizsgáltuk. Ezek a gének és az általuk kódolt fehérjék központi szerepet játszanak az IR okozta szervkárosodásban, az infekciók elleni védelemben és az immunrendszer szabályozásában. A transzplantáció során a sebészi beavatkozás a meleg, valamint a hideg ischémia is a HSP72 fokozott expressziójához vezet (272). A vesét ért ischémias inzultus hatására növekszik a HSP72 szintézise a proximalis tubulus sejtekben, amely gyorsítja a sejtek és a szerv integritásának helyreállítását (273). Ezzel szemben alacsony HSP72 szint esetén lassul a folyamat (273). A vesetranszplantáció modelljében a graftok túlélése korrelált a HSP72 expresszióval megnyúlt meleg ischémias idő esetén (274). Redaelli és mtsai a HSP72 indukálhatósága és a sejt protekció, valamint a graft túlélés között írtak le pozitív korrelációt (275). Az utóbbi években azonban a HSP72 szerepét ellentétes hatással is leírták, amelynek hátterében az immunrendszert stimuláló hatása állhat (276). Ez utóbbi megfigyelés azonban bőr transzplantátumokon született, ahol az immunreakció jóval erősebben jelentkezik, mint vesetranszplantátumok esetén.

Bár korábbi munkákban már vizsgálták a HSP70-s család polimorfizmusai és ischémiával összefüggő betegségek kapcsolatát (277, 278, 279), a mi vizsgálatunk az első ahol összefüggést kerestünk a graftok hosszú távú túlélése és a HSP70 család génpolimorfizmusai között.

Eredményeink azt mutatják, hogy a HSPA1B 1267AA hordozók nagyobb arányban fordulnak elő a hosszú távú grafttúlélő és az egészséges egyének csoportjában, mint az átlag vesetranszplantált populációban. Másrészt, a HSPA1B 1267GG genotípus, amelyet korábban a HSP72 indukálhatóságának csökkenésével kapcsolatban írtak le (175), gyakrabban fordult elő az átlag transzplantált populációban és az akutan rejektálók között. A fentiek alapján feltételezhető, hogy nemcsak a kisebb számban előforduló 1267AA genotípus, hanem a nagyobb gyakoriságban előforduló 1267GG genotípus is hatással van a transzplantátum elvesztésére. Az akut rejecciónak miatt graftjukat elvesztett betegekben észlelt gyakoribb 1267GG genotípus is alátámasztja ezt a feltételezést. Az adatok alapján azonban feltételezhető, hogy a G allél önmagában is fontos szerepet játszhat, hiszen előfordulás a Tx csoportban és az akutan rejektálók között sokkal gyakoribb.

Eredményeink alapján a HSPA1B A1267G genotípus eloszlása hosszú távú grafttúlélőkben és egészséges egyékekben azonos, amely azt sugallja, hogy a Tx15 betegeknek a transzplantáció rizikó faktorai irányában az érzékenységük hasonló (normál) mint az egészséges populációnak, szemben az akutan rejektáló és az átlag Tx betegekkel.

A klinikai adatok közül a proteinuria mértéke és a szérum kreatinin volt szignifikánsan magasabb az akut kilökődést mutatók között, tekintettel arra, hogy ezek a paraméterek a graftfunkcióra jellemzőek. Hipertónia a Tx15 csoportban szignifikánsan nagyobb arányban volt kimutatható, amely összefüggést mutat az évek óta szedett immunszuppresszív szerekkel. Az egyéb vizsgált értékekben eltérést nem tudtunk kimutatni.

Összefoglalva, a nagyobb gyakorisággal előforduló HSPA1B 1267GG variáns, amely csökkent mRNS expresszióval és megváltozott stressz faktorok elleni védelemmel jár együtt a Tx és AR csoportban csökkent citoprotekciót okozhat és hozzájárulhat a graft gyorsabb elvesztéséhez. Vizsgálatunk alátámasztja az eddigi megfigyeléseket, hogy transzplantációban a csökkent HSP72 elválasztás jelentősen befolyásolhatja (csökkentheti) a graft funkcióját és túlélését.

6. Eredmények összefoglalása

1. Hogyan változik a renális eNOS és nNOS a két nemben renális ischémia előtt, alatt és után?

L-arginin kezelés nemtől függő módon hat súlyos renális IR-s károsodásra. L-arginin hatására a renális eNOS expresszió változik szignifikánsan nőstény állatokban, és ez hozzájárulhat az enyhébb szöveti károsodás kialakuláshoz.

2. Kimutatható-e különbség renális IR-t megelőzően és azt követően a renális NKA és HSP72 expressziójában, valamint a NKA aktivitásában?

Az ischémiában központi szerepet játszó NKA $\alpha 1$ alegységek mRNS expressziója mindkét nemben csökken a posztischémiás időszakban. Az mRNS csökkenés azonban csak hím patkányok esetében tükröződik a fehérje mennyiségének és az enzim aktivitásának változásaiban. Nőstényekben nem változik számottevően a NKA $\alpha 1$ alegység fehérje szintje, illetve az ionpumpa aktivitása. Ischémia hatására nőstényekben a NKA kisebb mértékben transzlokálódik eredeti, bazálmembránhoz kötött helyéről, mint hímeknél.

Nőstényekben már fiziológiás körülmények között is nagyobb mennyiségű HSP72 expresszálódik, mint hímekben. Megállapítottuk, hogy a renális ischémiás károsodás után nőstények esetében nagyobb mértékű HSP72 expresszió figyelhető meg, ami a fokozott chaperonhatás révén nőstényekben a denaturálódott proteinek és membránstruktúrák gyorsabb helyreállítását teszi lehetővé. A HSP72 és NKA $\alpha 1$ alegység kolokalizálódik a proximális tubulus sejtek basolaterális membránján és nőstényekben nagyobb mennyiségben maradt membránhoz kötve ischémiát követően, mint hímekben.

3. Hogyan változik a renális nNOS expresszió krónikus vesebetegségben?

A krónikus vesebetegség progressziója során észlelt szövettani elváltozásokkal és vesefunkciós értékek emelkedésével fordítottan arányos módon változik a NOS aktivitás és nNOS fehérje expresszió a vesében.

4. Hogyan befolyásolja az eltérő immunszuppresszív terápia a KAN lezajlását a két nemben?

A női nem rizikót jelent az akut rejeckió kialakulására és az akcelerált krónikus rejeckióra. Nőstény állatokban csak magasabb dózisu CsA és/vagy RAPA kezeléssel védhető ki a kezdeti immunreakció. Megfelelő immunszuppresszió esetén a KAN progressziója nőstényekben lassúbb.

5. Antiinflammatorikus-antioxidáns perfúziós oldat hatással van-e az átültetett vese hosszú távú túlélésére és a renális NOS rendszerre?

Rövidtávú endotél protektív kezelés nem védi az „optimális” graftot isotranszplantáció esetén az enyhe-közepes hosszú távú károsodások ellen.

6. Befolyásolják-e a graftok hosszú távú túlélését az eNOS és a HSP70-s család genetikai polimorfizmusai?

Az eNOS G894T polimorfizmusa nem játszik szerepet a graftok hosszú távú túlélésében.

A nagyobb frekvenciával előforduló HSPA1B 1267GG variáns, amely csökkent mRNS expresszióval és megváltozott stressz faktorok elleni védelemmel jár együtt a Tx és AR csoportban csökkent citoprotekciót okozhat és hozzájárulhat a graft gyorsabb elvesztéséhez. Vizsgálatunk alátámasztja az eddigi megfigyeléseket, hogy transzplantációban a csökkent HSP72 elválasztás jelentősen befolyásolhatja (csökkentheti) a graft funkcióját és túlélését.

7. Megjelent saját közlemények bibliográfiai adatai

7.1. Az OTKA témához szorosan kapcsolódó közlemények

1. **Szabo AJ**, L Wagner A Erdely K, Lau C, Baylis C. Renal neuronal nitric oxide synthase protein expression as a marker of renal injury. *Kidney Int* 2003, 64(5): 1765-1771
IF: 5,302 Független idézettség: 1
2. Fekete A, Vannay A, Ver A, Vasarhelyi B, Muller V, Ouyang N, Reusz G, Tulassay T, **Szabo AJ**. Sex differences in the alterations of Na⁺/K⁺-ATPase following ischemia/reperfusion injury in the rat kidney. *J Physiol (London.)* 2004; 555(2): 471-80
IF: 4,346 Független idézettség: 9
3. Müller V, **Szabó A**. Nemi különbségek a vesebetegségek progressziójában. *Lege Artis Medicinae* 2004; 14(1): 26-31
Független idézettség: 1
4. Vannay A, Fekete A, Müller V, Strehlau J, Viklicky O, Veres T, Reusz G, Tulassay T, **Szabo AJ**. The effects of histamine and the H₂ receptor antagonist ranitidine on ischemia induced acute renal failure: involvement of IL-6 and vascular endothelial growth factor. *Kidney Blood Press R* 2004; 27: 105-113
IF: 1,067 Független idézettség: 2
5. Fekete A, Viklicky O, Hubáček JA, Rusai K, Erdei G, Treszl A, Vitko S, Tulassay T, Heemann U, Reusz G, **Szabo AJ**. Association between Heat Shock Protein (HSP) 70s and Toll like Receptor Polymorphisms with Long-Term Renal Allograft Survival. *Transplant Int* 2006; 19: 190–196
IF: 1,797
6. Fekete A, Vannay A, Ver A, Rusai K, Muller V, Reusz G, Tulassay T, **Szabo AJ**. Sex differences in heat shock protein 72 expression and localization in rats following renal ischaemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 291(4): F806-F811
IF: 4,263 Független idézettség: 1
7. Erdely A, Wagner L, Müller V, **Szabo A**, Baylis C. Protection of Wistar Furth rat from renal disease is associated with maintained renal nitric oxide. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(10):2526-33
IF: 7,499 Független idézettség: 7
8. Rajnoch J, Lodererova A, **Szabo A**, Honsova E, Vannay A, Bloudickova S, Matl I, Viklicky O. Regulators of angiogenesis in renal ischemia/reperfusion injury in

- normotensive and hypertensive rats: Effect of tacrolimus. *Transplant P* 2005; 37(1): 352-354
IF: 0,799 Független idézettség: 1
9. Tain YL, Muller V, **Szabo A**, Dikalova A, Griendling K, Baylis C. Lack of Long-Term Protective Effect of Antioxidant/Anti-Inflammatory Therapy in Transplant-Induced Ischemia/Reperfusion Injury. *Am J Nephrol*. 2006; 26(3): 213-217
IF: 2,459
10. Reusz György, **Szabó Attila**, Rempört Ádám, Szabó József, Járay Jenő. Veseátültetés gyermekkorban. *Gyermekgyógyászati szemle* 2006; 11(3-4): 99-108

7.2. Az OTKA témához szorosan nem kapcsolódó közlemények

11. Molnar Z, Farkas V, Nemes L, Reusz GS, **Szabo AJ**. Hyponatraemic seizures resulting from inadequate post-operative fluid intake following a single dose of desmopressin. *Nephrol Dial Transpl* 2005; 20: 2265-2267
IF: 2,976 Független idézettség: 1
12. Tory K, Horváth E, Süveges Z, Fekete A, Sallay P, Berta K, Szabó T, **Szabo AJ**, Tulassay T, Reusz GS. Effect of propranolol on heart rate variability in patients with end-stage renal disease: a double-blind, placebo-controlled, randomized crossover pilot trial. *Clin Nephrol* 2004; 61(5): 316-323
IF: 1,316
13. Reusz György, **Szabó Attila**, Fekete Andrea. Idiopathiás nephrosis szindróma gyermekkorban. *Orvosi Hetilap* 2006; 147(47): 2251-2260
14. Karoly E, Fekete A, Banki NF, Szebeni B, Vannay A, **Szabo AJ**, Tulassay T, Reusz GS. Heat Shock Protein 72 (HSPA1B) Gene Polymorphism and Toll-Like Receptor (TRL) 4 Mutation are Associated with Increased Risk of Urinary Tract Infection in Children. *Ped Res* 2007 (közlésre elfogadva)
IF: 2,875

Össz impakt faktor: 8,854
Független idézettség: 9

8. Irodalomjegyzék:

- ¹ Cecka JM: The UNOS scientific renal transplant registry. In *Clinical Transplants*. Ed: Cecka JM, Terasaki PI., Los Angeles Ca., UCLA Tissue Typing Laboratory, 1995; 1
- ² Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D: Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342: 605-608
- ³ Thorogood J, van Houwelingen JC, van Rood JJ, Zantvoort FA, Schreuder GM, Persijn GG: Factors contributing to long-term kidney graft survival in Eurotransplant. *Transplantation* 1992; 54: 152-155
- ⁴ Hamar P, Liu S, Viklicky O, Szabo A, Muller V, Heemann U: Cyclosporine A and azathioprine are equipotent in chronic kidney allograft rejection. *Transplantation* 2000; 69: 1290-1295
- ⁵ Kalo Z, Jaray J, Nagy J: Economic evaluation of kidney transplantation versus hemodialysis in patients with end-stage renal disease in Hungary. *Prog Transplant*. 2001; 11(3): 188-193
- ⁶ Perner F, Jaray J, Alföldy F, Hidvegi M, Darvas K, Gorog D, Toth A, Gondos T, Toronyi E, Petranyi G: The results of 1009 kidney transplantations performed in Hungary. *Surg Today*. 1996;2 6(7): 561-567
- ⁷ Kreis HA, Ponticelli C: Causes of late renal allograft loss: chronic allograft dysfunction, death, and other factors. *Transplantation* 2001; 71: S5-9
- ⁸ Modena FM, Hostetter TH, Salahudeen AK, Najarian JS, Matas AJ, Rosenberg ME: Progression of kidney disease in chronic renal transplant rejection. *Transplantation* 1991; 52: 239-244
- ⁹ Kasiske BL, Heim-Duthoy KL, Tortorice KL, Rao KV: The variable nature of chronic declines in renal allograft function. *Transplantation* 1991; 51: 330-334
- ¹⁰ Hostetter TH: Chronic transplant rejection. *Kidney Int* 1994; 46: 266-279
- ¹¹ Serón D, Fulladosa X, Moreso F: Risk factors associated with the deterioration of renal function after kidney transplantation. *Kidney Int* 2005; 68 (S99): 113-117
- ¹² First MR, Vaidya PN, Maryniak RK, Weiss MA, Munda R, Fidler JP, Penn I, Alexander JW: Proteinuria following transplantation. *Transplantation* 1999; 67: 690-696-28
- ¹³ Kasiske BL, Kalil RS, Lee HS, Rao KV: Histopathologic findings associated with chronic decline in renal allograft function. *Kidney Int* 1991; 40: 514-524
- ¹⁴ El-Amm JM, Haririan A, Crook ED: The effects of blood pressure and lipid control on kidney allograft outcome. *Am J Cardivasc Drugs* 2006; 6(1): 1-7
- ¹⁵ Paul LC: Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney Int* 1999; 56: 783-793
- ¹⁶ Morales JM: Immunosuppressive treatment and progression of histologic lesions in kidney allografts. *Kidney Int* 2005; 99: 124-130
- ¹⁷ Luo H, Nishioka T, Eigler NL, Forrester JS, Fishbein MC, Berglund H, Siegel RJ: Coronary artery restenosis after balloon angioplasty in humans is associated with circumferential coronary constriction. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 1996; 16: 1393-1398
- ¹⁸ Barrientos A, Portoles J, Herrero JA, Torralbo A, Prats D, Gutierrez-Millet V, Blanco J: Glomerular hyperfiltration as a nonimmunologic mechanism of progression of chronic renal rejection. *Transplantation* 1994; 57: 753-756
- ¹⁹ Cheigh JS, Mouradian J, Soliman M, Tapia L, Riggio RR, Stenzel KH, Rubin AL: Focal segmental glomerulosclerosis in renal transplants. *Am J Kidney Dis* 1983; 2: 449-455
- ²⁰ Habib R, Antignac C, Hinglais N, Gagnadoux MF, Broyer M: Glomerular lesions in transplanted kidney in children. *Am J Kidney Dis* 1987; 10: 198-207
- ²¹ Koukoulis GK, Gould VE, Bhattacharyya A, Gould JE, Howedy AA, Virtanen I: Tenascin in normal, reactive, hyperplastic and neoplastic tissues: biologic and pathologic implications. *Hum Pathol* 1991; 22: 636-643
- ²² Iványi B: Transplant capillaropathy and transplant glomerulopathy: ultrastructural markers of chronic renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18(4): 655-60
- ²³ Liptak P, Kemeny E, Morvay Z, Szederkenyi E, Szenohradszky P, Marofka F, Toldi J, Exner M, Ivanyi B: Peritubular capillary damage in acute humoral rejection: an ultrastructural study on human renal allografts. *Am J Transplant*. 2005;5(12):2870-2876
- ²⁴ Joosten SA, Sijpkens YWJ, van Knooten C, Paul LC: Chronic renal allograft rejection: Pathophysiologic considerations. *Kidney Int* 2005; 68: 1-13

- ²⁵ Regele H, Bohmig GA, Habicht A, Gollowitzer D, Schillinger M, Rockenschaub S, Watschinger B, Kerjaschki D, Exner M: Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: A contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2371-2380
- ²⁶ Bohmig GA, Exner M, Habicht A, Schillinger M, Lang U, Kletzmayer J, Saemann MD, Horl WH, Watschinger B, Regele H: Capillary C4d deposition in kidney allografts: A specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1091-1099
- ²⁷ Lorenz E, Regele H, Schillinger M, Exner M, Rasoul-Rockenschaub S, Wahrmann M, Kletzmayer J, Silberhumer G, Horl WH, Bohmig GA: Risk factors for capillary C4d deposition in kidney allografts: Evaluation of a large study cohort. *Transplantation* 2004; 78: 447-452
- ²⁸ Racusen LC, Halloran PF, Solez K: Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant* 2004; 4(10): 1562-1566.
- ²⁹ Colvin RB: The renal allograft biopsy. *Kidney Int* 1996; 50: 1069-1082
- ³⁰ Häyry P, Yilmaz S: Chronic allograft rejection: an update. *Transplant Proc* 1994; 26: 3159-3160
- ³¹ Yilmaz S, Tomlanovich S, Mathew T, Taskinen E, Paavonen T, Navarro M, Ramos E, Hooftman L, Häyry P: Protocol core needle biopsy and histologic Chronic Allograft Damage Index (CADI) as surrogate end point for long-term graft survival in multicenter studies. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(3): 773-779
- ³² Davies DR, Bittmann I, Pardo J: Histopathology of calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity. *Transplantation* 2000; 69: S11-23
- ³³ Fellström BG, Larsson E: Pathogenesis and treatment perspectives of chronic graft rejection. *Immunol Rev* 1993; 134: 83-98
- ³⁴ Legendre C, Therivet E, Skhiri H, Mamzer-Bruneel MF, Cantarovich F, Noel LH, Kreis H: Histologic features of chronic allograft nephropathy revealed by protocol biopsies in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1998; 65: 1506-1509
- ³⁵ Krensky AM: The HLA system, antigen processing and presentation. *Kidney Int* 1997; 51 (S58): 2-7
- ³⁶ Davenport A, Younie ME, Parsons JE, Klouda PT: Development of cytotoxic antibodies following renal allograft transplantation is associated with reduced graft survival due to chronic vascular rejection. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9: 1315-1319
- ³⁷ Matas AJ: Acute rejection is a major risk factor for chronic rejection. *Transplant Proc* 1998; 30: 1766-1768
- ³⁸ Soosay A, O'Neill D, Counihan A, Hickey D, Keogan M: Causes of sensitisation in patients awaiting renal transplantation in Ireland. *Ir Med J* 2003; 96(4): 109-112
- ³⁹ Takemoto SK, Choo YW, Gjertson DW: Transplant Risks, in *Clinical Transplants 1999*, edited by Terasaki PI, Cecka JM, Los Angeles, Tissue Typing Laboratory, 1999, pp325
- ⁴⁰ McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI: Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation*. 2000; 69(3): 319-326
- ⁴¹ Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK: All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 2002; 74(8): 1192-1194
- ⁴² Halloran PF, Aprile MA, Farewell V, Ludwin D, Smith EK, Tsai SY, Bear RA, Cole EH, Fenton SS, Cattran DC: Early function as the principal correlate of graft survival. *Transplantation* 1988; 46: 223-228
- ⁴³ Szabo A, Heemann U: Ischemia/reperfusion and chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 1998; 30: 4281-4284
- ⁴⁴ Brezis M, Rosen SN, Epstein FH: The pathophysiological implications of medullary hypoxia. *Am J Kid Dis* 1989; 13: 253-258
- ⁴⁵ Sutton TA, Molitoris BA: Mechanism of cellular injury in acute renal failure. *Semin Nephrol* 1998; 18: 490-497
- ⁴⁶ Weight SC, Bell PRF, Nicholson ML: Renal ischemia-reperfusion injury *Br J Surg* 1996; 83: 162-170
- ⁴⁷ Okusa MD: The inflammatory cascade in acute ischemic renal failure. *Nephron* 2002; 90: 133-138
- ⁴⁸ Nath KA, Norby SM: Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* 2000; 109: 655-678
- ⁴⁹ Turi S, Nemeth I, Torkos A, Saghy L, Varga I, Matkovic B, Nagy J.: Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in glomerular diseases. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22(1-2): 161-168
- ⁵⁰ Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Basker M, Cooper DK, Hancock WW, Tilney NL: Brain death and its influence on donor organ quality and outcome after transplantation. *Transplantation* 1999; 67: 343-348

- ⁵¹ Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, Kusaka M, Beato F, Tullius SG, Neuhaus P, Hancock WW, Tilney NL: Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2474-2481
- ⁵² Bittar AE, Keitel E, Garcia CD: Patient non-compliance as a cause of late kidney graft failure. *Transplant Proc* 1992; 24: 2720
- ⁵³ Remuzzi G, Perico N: Cyclosporine-induced renal dysfunction in experimental animals and humans. *Kidney Int* 1995; 48 (S52): 70-74
- ⁵⁴ Bing P, Maode L, Li F, Sheng H: Comparison of expression of TGF-beta1, its receptors TGFbeta1R-I and TGFbeta1R-II in rat kidneys during chronic nephropathy induced by cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc.* 2006; 38(7): 2180-2182
- ⁵⁵ Dimény E, Wahlberg J, Lithell H: Risk factor for long-term graft outcome. In: *Metabolic factors and outcome of organ transplantation*. Ed by Dimény E, Academic thesis, Uppsala University, Sweden, 1994
- ⁵⁶ Guijarro C, Massy Z, Kasiske B: Clinical correlation between renal allograft failure and hiperlipidemia. *Kidney Int* 1995; 48 (S52): 56-59
- ⁵⁷ Paragh G, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Locsey L, Karpati I, Matyus J, Katona E, Harangi M, Kakuk G: Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney-transplanted patients. *Nephron.* 1999; 83(2): 126-31
- ⁵⁸ Arnadottir M, Berg AL: Treatment of hiperlipidemia in renal transplant recipients. *Transplantation* 1997; 63: 339-345
- ⁵⁹ Kobashigawa JA, Kasiske BL: Hiperlipidemia in solid organ transplantation. *Transplantation* 1997; 63: 331-338
- ⁶⁰ Hamar P, Müller V, Kohnle M, Witzke O, Albrecht KH, Philipp T, Heemann U: Metabolic factors have a major impact on kidney allograft survival. *Transplantation* 1997; 64: 1135-1139
- ⁶¹ Kobashigawa JA, Katznelson S, Laks H: Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 1995; 333: 621-648
- ⁶² Loboda A, Jazwa A, Jozkowicz A, Dorosz J, Balla J, Molema G, Dulak J: Atorvastatin prevents hypoxia-induced inhibition of endothelial nitric oxide synthase expression but does not affect heme oxygenase-1 in human microvascular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2006; 187(1): 26-30
- ⁶³ Szabo AJ, Tulassay T, Melegh B, Szabo T, Szabo A, Vannay A, Fekete A, Suveges Z, Reusz GS: Hyperhomocysteinemia and MTHFR C677T gene polymorphism in renal transplant patients. *Archives of Disease in Childhood* 2001; 85: 47-49
- ⁶⁴ Sonkodi S, Mogyorosi A: Treatment of diabetic nephropathy with angiotensin II blockers. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18 Suppl 5: v21-23
- ⁶⁵ Fellstrom B, Backman U, Larsson E, Wahlberg J: Accelerated arteriosclerosis in the transplant recipient: role of hypertension. *J Hum Hypertens* 1998; 12: 851-854
- ⁶⁶ Kasiske BL: Possible causes and consequences of hypertension in stable renal transplant patients. *Transplantation* 1987; 44: 639-643
- ⁶⁷ Luke RG: Hypertension in renal transplant recipients. *Kidney Int* 1987; 31: 1024-1037
- ⁶⁸ Rettig R, Stauss H, Folberth C, Ganten D, Waldherr B, Unger T: Hypertension transmitted from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1989; 257: F197-F203
- ⁶⁹ Paul LC, Benediktson H: Post-transplant hypertension and chronic renal allograft failure. *Kidney Int* 1995; 48 (S52): 34-37
- ⁷⁰ Brazy PC, Pirsch JD, Belzer FO: Factors affecting renal allograft function in long-term recipients. *Am J Kidney Dis* 1992; 19: 558-566
- ⁷¹ Opelz G, Dohler B; Collaborative Transplant Study: Improved long-term outcomes after renal transplantation associated with blood pressure control. *Am J Transplant* 2005; 5(11): 2725-2731
- ⁷² Barna I, Foldes K, Szathmari M, Gero L, de Chatel R: Decreased diurnal blood pressure variability and low dehydroepiandrosterone sulfate levels in patients with renal hypertension, and after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14 Suppl 4: 30-31
- ⁷³ Bia MJ: Nonimmunologic causes of late renal graft loss. *Kidney Int* 1995; 47: 1470-1480
- ⁷⁴ Szabo A, Patschan O, Kuttler B, Muller V, Philipp T, Rettig R, Heemann U: Hypertension accelerates the pace of chronic graft dysfunction in the rat. *Transplant Int* 1998; 11(S1): 10-14
- ⁷⁵ Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ: Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1993; 91: 2268-2274

- ⁷⁶ Hilgers KF, Mann JFE: Role of angiotensin II in glomerular injury: Lessons from experimental and clinical studies. *Kidney Blood Pressure* 1996;19: 254-262
- ⁷⁷ Premasathian NC, Muehrer R, Brazy PC, Pirsch JD, Becker BN: Blood pressure control in kidney transplantation: therapeutic implications. *J Hum Hypertens* 2004;18(12): 871-877
- ⁷⁸ Opsahl JA, Abraham PA, Keane WF: Angiotensin converting enzyme inhibitors in chronic renal failure. *Drugs* 1990; 39 (S2): 23
- ⁷⁹ Schweitzer EJ, Matas AJ, Gillingham KJ: Causes of renal allograft loss. Progress in the 1980s., challenges for the 1990s. *Ann Surg* 1991; 214: 679-684
- ⁸⁰ Brunner FP, Thiel G, Hermle M, Bock HA, Mihatsch MJ: Long-term enalapril and verapamil in rats with reduced renal mass. *Kidney Int* 1989; 36: 969-977
- ⁸¹ Remuzzi A, Puntorieri S, Battaglia C, Bertani T, Remuzzi G: Angiotensin converting enzyme inhibition ameliorates glomerular filtration of macromolecules and water and lessens glomerular injury in the rat. *J Clin Invest* 1990; 85: 541-549
- ⁸² Anderson S, Jung FF, Ingelfinger JR: Renal renin-angiotensin system in diabetes: Functional, immunohistochemical, and molecular biological correlations. *Am J Physiol* 1993; 265: F477-F486
- ⁸³ Curtis JJ, Luke RG, Whelchel JD, Diethelm AG, Jones P, Dustan HP: Inhibition of angiotensin converting enzyme in renal transplant recipients with hypertension. *N Eng J Med* 1983; 308: 377-378
- ⁸⁴ Szabo A, Lutz J, Schleimer K, Antus B, Hamar P, Philipp T, Heemann U: Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on growth factor mRNA in chronic renal allograft rejection in the rat. *Kidney Int* 2000; 57: 982-991
- ⁸⁵ Almond PS, Matas A, Gillingham KJ, Dunn DL, Payne WD, Gores P, Gruessner R, Najarian JS: Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993; 55: 122-127
- ⁸⁶ von Muller L, Schliep C, Storck M, Hampl W, Schmid T, Abendroth D, Mertens T: Severe graft rejection, increased immunosuppression, and active CMV infection in renal transplantation. *J Med Virol*. 2006;78(3): 394-399
- ⁸⁷ Kalil AC, Levitsky J, Lyden E, Stoner J, Freifeld AG: Meta-analysis: the efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Ann Intern Med*. 2005; 143(12): 870-880
- ⁸⁸ Raasveld MH, Bloemena E, Wilmink JM, Surachno S, Schellekens PT, ten Berge RJ: Serum neopterin/creatinine values correlate with severity of symptoms caused by cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Transplant Int* 1993; 6: 42-44
- ⁸⁹ Campino A: Gancyclovir prophylaxis in high risk patients. *Transplant Proc* 2005;37(10): 4311-4312
- ⁹⁰ Chen JH, Mao YY, He Q, Wu JY, Lv R: The impact of pretransplant cytomegalovirus infection on acute renal allograft rejection. *Transplant Proc* 2005; 37(10): 4203-4207
- ⁹¹ Agrawal V, Gupta RK, Jain M: Invasive fungal infections in renal allograft recipients. *Indian J Pathol Microbiol* 2005; 48(4): 448-452.
- ⁹² Fishman JA, Rubin RH: Infection in organ transplant recipients. *N Engl J Med* 1998; 338: 1741-1751
- ⁹³ Sachdeva MU, Nada R, Jha V, Joshi K: Viral infections of renal allografts--an immunohistochemical and ultrastructural study. *Indian J Pathol Microbiol* 2004; 47(2): 189-194
- ⁹⁴ Nিকেleit V, Mihatsch MJ: Polyomavirus nephropathy in native kidneys and renal allografts: an update on an escalating threat. *Transpl Int*. 2006; 19(12): 960-973
- ⁹⁵ Manga Sahin G, Sahin S, Kantarci G, Ergin H: Impact of hepatitis C virus infection on patient and graft survival in kidney transplantation. *Transplant Proc* 2006; 38(2): 499-501
- ⁹⁶ Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Kanwal F, Dulai G: HBsAg seropositive status and survival after renal transplantation: meta-analysis of observational studies. *Am J Transplant* 2005; 5(12): 2913-2921
- ⁹⁷ Müller V, Becker G, Delfs M, Albrecht KH, Philipp T, Heemann U: Do urinary tract infections trigger chronic rejection in man? *J Urol* 1998; 159: 1826-1829
- ⁹⁸ Lee LS, Aversvald LA, Claud EB, Bia MJ, Friedman AL, Lorber MI, Basadonna GP: Body size mismatch between donor and recipient and the development of chronic rejection in renal transplantation. *Transplant Proc* 1997; 29: 111
- ⁹⁹ Brenner BM, Cohen RA, Milford EL: In renal transplantation, one size may not fit all. *J Am Soc Nephrol* 1992; 3: 162-169
- ¹⁰⁰ Nyengaard JR, Bendtsen TF: Glomerular number at size in relation to age, kidney weight, and body surface area in normal man. *Anat Res* 1992; 232: 194-201

- ¹⁰¹ Brenner BM, Milford EL: Nephron underdosing: a programmed cause of chronic renal allograft failure. *Am J Kidney Dis* 1993; 21(S2): 66-72
- ¹⁰² Chertow GM, Brenner BM, Mackenzie HS, Milford EL: Non-immunologic predictors of chronic renal allograft failure: Data from the United Network of Organ Sharing. *Kidney Int* 1995; 48 (S52): 48-51
- ¹⁰³ Brenner BM: Hemodynamically mediated glomerular injury and the progressive nature of glomerular disease. *Kidney Int* 1983; 23: 647-655
- ¹⁰⁴ Heemann UW, Azuma H, Tullius SG, Mackenzie H, Brenner BM, Tilney NL: The contribution of reduced functioning mass to chronic kidney allograft dysfunction in rats. *Transplantation* 1994; 58: 1317-1322
- ¹⁰⁵ Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM: Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 1981; 241: F85-F93
- ¹⁰⁶ Häyry P: Molecular pathology of acute and chronic rejection. *Transplant Proc* 1994; 26: 3280
- ¹⁰⁷ Malyszko J, Malyszko JS, Brzosko S, Wolczynski S, Mysliwiec M: Markers of endothelial cell activation/injury: CD146 and thrombomodulin are related to adiponectin in kidney allograft recipients. *Am J Nephrol*. 2005; 25(3): 203-10
- ¹⁰⁸ Berg H: Question of age in children renal transplant recipients. *Transplantation* 1997; 64: 1423-1427
- ¹⁰⁹ Foss A, Tuvin D, Leivestad T, Oyen O, Bentdal O: Should kidneys from older cadaveric donors be age-matched to the recipient? *Transplant Proc* 2005; 37(8): 3280-3282
- ¹¹⁰ Rodriguez-Puyol D: The aging kidney. *Kidney Int* 1998; 54: 2247-2265
- ¹¹¹ Alexander JW, Bennett LF, Breen RJ: Effect of donor age on outcome of kidney transplantation. *Transplantation* 1994; 57: 871-876
- ¹¹² Halloran PF, Melk A, Barth C: Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 167-181
- ¹¹³ Vegso G, Mathe Z, Peter A, Perner F, Jaray J, Langer RM: Improving results of renal transplantation with the use of elderly donors: the Budapest experience. *Transplant Proc*. 2005; 37(10): 4225-4227
- ¹¹⁴ Arbus GS, Rochon J, Thompson D: Survival of cadaveric renal transplant grafts from young donors and in young recipients. 1991; 5: 152-155
- ¹¹⁵ Pape L, Hoppe J, Becker T, Ehrlich JH, Neipp M, Ahlenstiel T, Offner G: Superior long-term graft function and better growth of grafts in children receiving kidneys from paediatric compared with adult donors. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(9): 2596-600
- ¹¹⁶ Scornik JC, Cecka JM: Immune responsiveness and renal transplantation. *Clin Transpl* 1996; 1: 373-9.
- ¹¹⁷ Pascher A, Pratschke J, Neuhaus P, Tullius SG: Modifications of immune regulations with increasing donor & recipient age. *Ann Transplant* 2004; 9(1): 72-73
- ¹¹⁸ Pascher A, Reutzel-Selke A, Jurisch A, Bachmann U, Heidenhain C, Nickel P, Reinke P, Brandt C, Pratschke J, Frei U, Neuhaus P, Volk HD, Tullius SG: Alterations of the immune response with increasing recipient age are associated with reduced long-term organ graft function of rat kidney allografts. *Transplantation* 2003; 76(11): 1560-1568
- ¹¹⁹ Reutzel-Selke A, Filatenkov A, Jurisch A, Denecke C, Martins PN, Pascher A, Jonas S, Pratschke J, Neuhaus P, Tullius SG: Grafts from elderly donors elicit a stronger immune response in the early period posttransplantation: a study in a rat model. *Transplant Proc* 2005; 37(1): 382-383
- ¹²⁰ Neugarten J, Kasiske B, Silbiger SR, Nyengaard JR: Effects of sex on renal structure. *Nephron* 2002; 90(2): 139-144
- ¹²¹ Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Leavey SF, Hanson JA, Leichtman AB, Magee JC, Cibrik DM, Kaplan B: Gender differences in the risk for chronic renal allograft failure. *Transplantation* 2001; 71: 429-432
- ¹²² Neugarten J, Silbiger SR: The impact of gender on renal transplantation. *Transplantation* 1994; 58: 1145-1152
- ¹²³ United States Renal Data System: 1993 Annual Data Report. Bethesda, MD, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 1993, p xvi
- ¹²⁴ Silbiger SR, Neugarten J: The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1995; 25: 515-530
- ¹²⁵ Hannedouche T, Chauveau P, Kalou F, Albouze G, Lacour B, Jungers P: Factors affecting progression in advanced chronic renal failure. *Clin Nephrol* 1993; 39: 312-320
- ¹²⁶ Gilboa N, Magro AM, Han Y, Rudofsky UH: Contrasting effects of early and late orchietomy on hypertension and renal disease in Fawn-hooded rats. *Life Sci* 1987; 41: 1629-1634

- ¹²⁷ Hale SL, Birnbaum Y, Kloner RA: β -estradiol, but not α -estradiol, reduces myocardial necrosis in rabbits after ischemia and reperfusion. *Am Heart J* 1996; 132: 258-262
- ¹²⁸ Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Arlotta M, Arcoraci V, Minutoli L, Saitta A, Caputi AP: The involvement of tumor necrosis factor- α in the protective effects of 17β oestradiol in splanchnic ischemia-reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 1782-1788
- ¹²⁹ Simpkins JW, Rajakumar G, Zhang YQ, Simpkins CE, Greenwald D, Yu CJ, Bodor N, Day AL: Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *J Neurosurg* 1997; 87: 724-730
- ¹³⁰ Lingrel JB, Van Huysse J, O'Brien W, Jewell-Motz E, Askew R, Schultheis P: Structure-function studies of the Na,K-ATPase. *Kidney Int Suppl* 1994; 44: 32-39
- ¹³¹ Sweadner KJ: Isoenzymes of Na^+/K^+ ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1989; 988: 185-220
- ¹³² Rose, Valderris RJ: Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clin Chem* 1994; 39: 1674-1685
- ¹³³ al-Awqati Q: Cellular and molecular mechanisms of renal development and tubulogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1992; 1(1): 53-58
- ¹³⁴ Mollitoris BA, Nelson WJ: Alterations in the establishment and maintenance of epithelial cell polarity as a basis for disease processes. *J Clin Invest* 1990; 85: 3-9
- ¹³⁵ Woroniecki R, Ferdinand JR, Morrow JS, Devarajan P: Dissociation of spectrin-ankyrin complex as a basis for loss of Na-K-ATPase polarity after ischemia. *Am J Physiol* 2002; 284: F358-F364
- ¹³⁶ Van Why SK, Mann AS, Ardito T, Siegel NJ, Kashgarian M: Expression and molecular regulation of Na-K-ATPase after renal ischemia. *Am J Physiol* 1994; 270: F75-F85
- ¹³⁷ Kim YK, Woo JS, Kim YH, Jung JS, Kim BS, Lee SH: Effect of renal ischemia on organic compound transport in rabbit kidney proximal tubule. *Pharmacol Toxicol* 1995; 77: 121-129
- ¹³⁸ Kwon TH, Frokiaer J, Han JS, Knepper A, Nielsen S: Decreased abundance of major Na^+ transporters in kidneys of rats with ischemia-induced acute renal failure. *Am J Physiol* 2000; 278: F925-F939
- ¹³⁹ Molinas SM, Trumper L, Serra E, Elias MM: Evolution of renal function and Na^+ , K^+ -ATPase expression during ischaemia-reperfusion injury in rat kidney. *Mol Cell Biochem.* 2006; 287(1-2): 33-42
- ¹⁴⁰ Coux G, Trumper L, Elias MM: Renal function and cortical Na-K-ATPase activity, abundance and distribution after ischemia/reperfusion in rats. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1586: 71-80
- ¹⁴¹ Aufricht C, Bidmon B, Ruffingshofer D, Regele H, Herkner K, Siegel NJ, Kashgarian M, Van Why SK: Ischemic conditioning prevents Na,K-ATPase dissociation from cytoskeletal cellular fraction after repeat renal ischemia in rats. *Pediatr Res* 2002; 51: 722-727
- ¹⁴² Bidmon B, Endemann M, Mueller T, Arbeiter K, Herkner K, Aufricht C: HSP-70 repairs tubule cell structure after renal ischemia. *Kidney Int* 2000; 58: 2400-2407
- ¹⁴³ Sugishita K, Li F, Su Z, Barry WH: Anti-oxidant effects of estrogen reduce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during metabolic inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 331-336
- ¹⁴⁴ Golden GA, Mason RP, Tulenko TN, Zubenko GS, Rubin RT: Rapid and opposite effects of cortisol and estradiol on human erythrocyte Na^+ , K^+ -ATPase activity: relationship to steroid intercalation into the cell membrane. *Life Sci* 1999; 65: 1247-1255
- ¹⁴⁵ Bellini T, Degani D, Matteuzzi M, Dallochio F: Effect of 17β estradiol on calcium response to phytohaemagglutinin in human lymphocytes. *Biosci Rep* 1990; 10: 73-78
- ¹⁴⁶ Blanco G, Diaz H, Carrer HF, Beauge L: Differentiation of rat hippocampal neurons induced by estrogen in vitro: effects on neuriteogenesis and Na, K-ATPase activity. *J Neurosci Res* 1990; 27: 47-54
- ¹⁴⁷ Azzarolo AM, Mircheff AK, Kaswan RL, Stanczyk FZ, Gentschein E, Becker L, Nassir B, Warren DW: Androgen support of lacrimal gland function. *Endocrine* 1997; 6: 39-45
- ¹⁴⁸ Lee KH, Finnigan-Bunick C, Bahr J, Bunick D: Estrogen regulation of ion transporter messenger RNA levels in mouse efferent ductules are mediated differentially through estrogen receptor (ER) alpha and ER beta. *Biol Reprod* 2001; 65: 1534-1541
- ¹⁴⁹ Dzurba A, Ziegelhoffer A, Vrbjar N, Styk J, Slezak J: Estradiol modulates the sodium pump in the heart sarcolemma. *Mol Cell Biochem* 1997; 176: 113-118
- ¹⁵⁰ Sieber FE, Hurn P, Alkayed NJ, Traystman RJ: Gender-based differences in Na^+ - K^+ adenosine triphosphatase activity occur in the microcirculation of the diabetic rat brain. *Anaesthesiology* 2001; 94: 372-375
- ¹⁵¹ Kurihara K, Maruyama S, Hosoi K: Regulation of Na^+ , K^+ -ATPase in submandibular glands of hypophysectomized male mice by steroid and thyroid hormones. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 703-711

- ¹⁵² QUINTAS LE, LOPEZ LB, SOUCCAR C, NOEL F: Na⁺/K⁺-ATPase density is sexually dimorphic in the adult rat kidney. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 834: 552-554
- ¹⁵³ SANDHU S, SILBINGER SR, LEI J, NEUGARTEN J: Effects of sex hormones on fluid and solute transport in Madin-Darby canine kidney cells. *Kidney Int* 1997; 51: 1535-1539
- ¹⁵⁴ VOELLMY R, BOELLMANN F: Chaperone regulation of the heat shock protein response. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 594: 89-99
- ¹⁵⁵ HARTL FU, HAYER-HARTL M: Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002; 295: 1852-1858
- ¹⁵⁶ FINK AL: Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 1999; 79: 425-449
- ¹⁵⁷ NETZER WJ, HARTL FU: Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* 1997; 388: 329-331
- ¹⁵⁸ BECK FX, NEUHOFFER W, MÜLLER E: Molecular chaperones in the kidney: distribution, putative roles and regulation. *Am J Physiol* 2000; 279: F203-F215
- ¹⁵⁹ HAYES SA, DICE JF: Roles of molecular chaperones in protein degradation. *J Cell Biol* 1996; 132: 255-258
- ¹⁶⁰ LAPPAS GD, KARL IE, HOTCHKISS RS: Effect of ethanol and sodium arsenite on HSP70 formation and on survival in a murine endotoxin model. *Shock* 1994; 2: 34-39
- ¹⁶¹ MILNER CM, CAMPELL RD: Structure and function of the tree MHX-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1990; 32: 242-251
- ¹⁶² SCHOBER A, MÜLLER E, THURAU K, BECK FX: The response of heat shock proteins 25 and 72 to ischaemia in different kidney zones. *Eur J Physiol* 1997; 434: 292-299
- ¹⁶³ VAN WHY SK, SIEGEL NJ: Heat shock proteins in renal injury and recovery. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7: 407-412
- ¹⁶⁴ BROWN, CR, MARTIN RL, HANSEN WJ, BECKMANN RP, WELCH BJ: The constitutive and stress inducible forms of hsp-70 exhibits functional similarities and interact with one another in an ATP-dependent fashion. *J Cell Biol* 1993; 120: 1101-1112
- ¹⁶⁵ PLUMIER JC, CURRIE RW: Heat shock-induced myocardial protection against ischemic injury: a role for Hsp70? *Cell Stress Chaperones* 1996; 1: 13-17
- ¹⁶⁶ YENARI MA, DUMAS TC, SAPOLSKY RM, STEINBERG GK: Gene therapy for treatment of cerebral ischemia using defective herpes simplex viral vectors. *Ann NY Acad Sci* 2001; 939: 340-357
- ¹⁶⁷ SHARP SR, MASSA SM, SWANSON RA: Heat shock protein protection. *Trends Neurosci* 1999; 22: 97-99
- ¹⁶⁸ MUELLER T, BIDMON B, PICHLER P, ARBEITER K, RUFFINGSHOFER D, VAN WHY SK, AUFRICHT C: Urinary heat shock protein-72 excretion in clinical and experimental renal ischemia. *Pediatr Nephrol* 2003; 18: 97-99
- ¹⁶⁹ VOSS MR, STALLONE JN, LI M, CORNELUSSEN RN, KNUEFERMAN P, KNOWLTON AA: Gender differences in the expression of heat shock proteins: the effect of estrogen. *Am J Physiol* 2003; 285: H687-692
- ¹⁷⁰ KNOWLTON AA, SUN L: Heat-shock factor-1, steroid hormones, and regulation of heat-shock protein expression in the heart. *Am J Physiol* 2001; 280: H455-H464
- ¹⁷¹ PAPAconstantinou AD, GOERING PL, UMBREIT TH, BROWN KM: Regulation of uterine hsp90alpha, hsp72 and HSF-1 transcription in B6C3F1 mice by beta-estradiol and bisphenol A: involvement of the estrogen receptor and protein kinase C. *Toxicol Lett* 2003; 144: 257-270
- ¹⁷² ZIHIM RA, BOYD PA, AINSLIE PATRICK WJ, BURDON RH: Human heat shock protein gene polymorphisms and sudden infant death syndrome. *Arch Dis Child* 1996; 75: 451-452
- ¹⁷³ FAVATIER F, JACQUIER-SARLIN MR, SWIERCZEWSKI E, POLLA BS: Polymorphism in the regulatory sequence of the human hsp70-1 gene does not affect heat shock factor binding or heat shock protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56: 701-708
- ¹⁷⁴ SCHRODER O, SCHULTE KM, OSTERMANN P, ROHER HD, EKKERNKAMP A, LAUN RA: Heat shock protein 70 genotypes HSPA1B and HSPA1L influence cytokine concentrations and interfere with outcome after major injury. *Crit Care Med* 2003; 31: 73-79
- ¹⁷⁵ POCIOT F, RONINGEN KS, NERUP J: Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-Hom genes in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Scand J Immunol* 1994; 38: 491-495
- ¹⁷⁶ MESTIRI S, BOUAOUINA N, AHMED SB, KHEDHAIER A, JRAD BB, REMADI S, CHOUCHANE L: Genetic variation in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the stress protein hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 672-678

- ¹⁷⁷ Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001, 357: 593-615
- ¹⁷⁸ Schmidt H, Hofmann H, Schindler U, Shulenko ZS, Cunningham DD, Feelisch M: No NO from NO synthase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1996, 93: 14492-14497
- ¹⁷⁹ Lieberthal W: Biology of ischemic and toxic renal tubular injury: Role of nitric oxide and the inflammatory response. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998, 7: 289-295
- ¹⁸⁰ Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E: Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney Int* 2002, 61: 855-861
- ¹⁸¹ Chatterjee PK, Patel NSA, Kvale EO, Cuzzocrea S, Brown PAJ, Stewart KN, Mota-Filipe H, Thiemermann C: Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 2002, 61: 862-871
- ¹⁸² Ling H, Gengaro PE, Edelstein CL: Effect of hypoxia on proximal tubules isolated from nitric oxide synthase knockout mice. *Kidney Int* 1998, 53: 1642-1646
- ¹⁸³ Neugarten J, Ding Q, Friedman A, Lei J, Silbiger S: Sex hormones and renal nitric oxide synthases. *J Am Soc Nephrol* 1997, 8: 1240-1246
- ¹⁸⁴ Baylis C, Harton P, Engels K: Endothelial derived relaxing factor controls renal hemodynamics in the normal rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 1990; 1: 875-881
- ¹⁸⁵ Szabo AJ, Wagner L, Erdely A, Lau K, Baylis C: Renal neuronal nitric oxide synthase protein expression as a marker of renal injury. *Kidney Int* 2003; 64(5): 1765-1771
- ¹⁸⁶ Erdely A, Wagner L, Müller V, Szabo A, Baylis C: Protection of Wistar Furth rat from renal disease is associated with maintained renal nitric oxide. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(10): 2526-2533
- ¹⁸⁷ Juckett MB, Weber M, Balla J, Jacob HS, Vercellotti GM: Nitric oxide donors modulate ferritin and protect endothelium from oxidative injury. *Free Radic Biol Med* 1996; 20(1): 63-73
- ¹⁸⁸ Schmidt RJ, Domico J, Samsell LS, Yokota S, Tracy TS, Sorkin MI, Engels K, Baylis C: Indices of activity of the nitric oxide system in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 1999; 34(2): 228-2234.
- ¹⁸⁹ Xiao S, Wagner L, Schmidt RJ, Baylis C: Circulating endothelial nitric oxide synthase inhibitory factor in some patients with chronic renal disease. *Kidney Int.* 2001; 59(4): 1466-1472
- ¹⁹⁰ Dengel DR, Brown MD, Ferrell RE, Reynolds TH, Supiano MA: A preliminary study on T-786C endothelial nitric oxide synthase gene and renal hemodynamic and blood pressure responses to dietary sodium. *Physiol Res.* 2006 Aug 22 (e-pub ahead)
- ¹⁹¹ Liakopoulos OJ, Dorge H, Popov AF, Schmitto JD, Cattaruzza M, Schoendube FA: Influence of eNOS gene polymorphisms (894G/T; - 786C/T) on postoperative hemodynamics after cardiac surgery. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2006; 54(4): 233-238
- ¹⁹² Spoto B, Benedetto FA, Testa A, Tripepi G, Mallamaci F, Maas R, Boeger RH, Zoccali C, Parlongo RM, Pisano A: Atherosclerosis and the Glu298Asp polymorphism of the eNOS gene in white patients with end-stage renal disease. *Am J Hypertens.* 2005; 18(12 Pt 1): 1549-1555
- ¹⁹³ Sandrim VC, de Syllos RW, Lisboa HR, Tres GS, Tanus-Santos JE: Endothelial nitric oxide synthase haplotypes affect the susceptibility to hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2006; 189(1): 241-246
- ¹⁹⁴ Chomczynsky P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem* 1987; 162: 156-161
- ¹⁹⁵ Hartung J: *Lehr und Handbuch der angewandten Statistik.* R. Oldenburg Verlag, München, Wien. 6. Edition, 1987
- ¹⁹⁶ Chander V, Chopra K: Renal protective effect of molsidomine and L-arginine in ischemia-reperfusion induced injury in rats. *J Surg Res.* 2005 Sep;128(1):132-139
- ¹⁹⁷ Raff U, Schneider R, Gambaryan S, Seibold S, Reber M, Vornberger N, Freund R, Schramm L, Wanner C, Galle J: L-Arginine does not affect renal morphology and cell survival in ischemic acute renal failure in rats. *Nephron Physiol.* 2005;101(3):p39-50
- ¹⁹⁸ Muller V, Losonczy G, Heemann U, Vannay A, Fekete A, Reusz G, Tulassay T, Szabo AJ: Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: possible role of endothelin. *Kidney Int.* 2002 Oct;62(4):1364-1371
- ¹⁹⁹ Jerkic M, Varagic J, Jovovic D, Radujkovic-Kuburovic G, Nastic-Miric D, Adanja-Grujic G, Markovic-Lipkovski J, Dimitrijevic J, Miloradovic Z, Vojvodic SB: L-arginine reduces tubular cell injury in acute post-ischaemic renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 1999 Jun;14(6):1398-407

- ²⁰⁰ Ogawa T, Nussler AK, Tuzuner E, Neuhaus P, Kaminishi M, Mimura Y, Beger HG. Contribution of nitric oxide to the protective effects of ischemic preconditioning in ischemia-reperfused rat kidneys. *J Lab Clin Med*. 2001 Jul;138(1):50-58
- ²⁰¹ Vos IH, Rabelink TJ, Dorland B, Loos R, Van Middelaar B, Grone HJ, Joles JA. L-arginine supplementation improves function and reduces inflammation in renal allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Feb;12(2):361-367
- ²⁰² Schramm L, Heidbreder E, Schmitt A, Kartenbender K, Zimmermann J, Ling H, Heidland A. Role of L-arginine-derived NO in ischemic acute renal failure in the rat. *Ren Fail*. 1994;16(5):555-569
- ²⁰³ Hines IN, Harada H, Flores S, Gao B, McCord JM, Grisham MB. Endothelial nitric oxide synthase protects the post-ischemic liver: potential interactions with superoxide. *Biomed Pharmacother*. 2005 May;59(4):183-189
- ²⁰⁴ Chen J, Zacharek A, Zhang C, Jiang H, Li Y, Roberts C, Lu M, Kapke A, Chopp M. Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *J Neurosci*. 2005 Mar 2;25(9):2366-2375
- ²⁰⁵ Kosaka H, Yoneyama H, Zhang L, Fujii S, Yamamoto A, Igarashi J. Induction of LOX-1 and iNOS expressions by ischemia-reperfusion of rat kidney and the opposing effect of L-arginine. *FASEB J*. 2003 Apr;17(6):636-643
- ²⁰⁶ Lameire N, Vanholder R: Pathophysiologic features and prevention of human and experimental acute tubular necrosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: S20-S32
- ²⁰⁷ Coux G, Trumper L, Elias MM: Cortical Na⁺, K⁺-ATPase activity, abundance, and distribution after in vivo renal ischemia without reperfusion in rats. *Nephron* 2001; 89: 82-89
- ²⁰⁸ Keller JN, Germeyer A, Begley JG, Mattson MP: 17Beta-estradiol attenuates oxidative impairment of synaptic Na⁺/K⁺-ATPase activity, glucose transport, and glutamate transport induced by amyloid beta-peptide and iron. *J Neurosci Res* 1997; 50(4): 522-530
- ²⁰⁹ Labombarda F, Gonzalez SL, Gonzalez DM, Guennoun R, Schumacher M, de Nicola AF: Cellular basis for progesterone neuroprotection in the injured spinal cord. *J Neurotrauma* 2002; 19: 343-355
- ²¹⁰ Rafestin-Oblin ME, Couette B, Barlet-Bas C, Cheval L, Viger A, Doucet A: Renal action of progesterone and 18-substituted derivatives. *Am J Physiol* 1991; 260: F828-832
- ²¹¹ Mujais SK, Nora NA, Chen Y: Regulation of the renal Na,K pump: role of progesterone. *J Am Soc Nephrol* 1993; 3:1488-1495
- ²¹² Shima S: Effects of androgen treatment on adenylate cyclase system in rat hepatic membranes. *Pharmacol Toxicol* 1992; 70: 429-433
- ²¹³ Ruohola JK, Valve EM, Karkkainen MJ, Joukov V, Alitalo K, Harkonen PL: Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 149: 29-40
- ²¹⁴ Sasaki R: Pleiotropic functions of erythropoietin. *Intern Med* 2003; 42: 142-149
- ²¹⁵ Arai Y, Kikuchi A, Ikeda K, Nomoto S, Horiguchi H, Kayama F: A+U-rich-element RNA-binding factor 1/heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D gene expression is regulated by oestrogen in the rat uterus. *Biochem J* 2002; 361: 125-132
- ²¹⁶ Martin de la Vega C, Burda J, Nemethova M, Quevedo C, Alcazar A, Martin ME, Danielisova V, Fando JL, Salinas M: Possible mechanisms involved in the down-regulation of translation during transient global ischaemia in the rat brain. *Biochem J* 2001; 357: 819-826
- ²¹⁷ Akama KT, McEwen BS: Estrogen stimulates postsynaptic density-95 rapid protein synthesis via the Akt/protein kinase B pathway. *J Neurosci* 2003; 23: 2333-2339
- ²¹⁸ Kajiwara I, Kawamura K, Hiratsuka Y, Takebayashi S: The influence of oxygen free radical scavengers on the reduction of membrane-bound Na(+)-K(+)-ATPase activity induced by ischemia/reperfusion injury in the canine kidney. *Nephron* 1996; 72: 637-643
- ²¹⁹ Bertorello AM, Ridge KM, Chibalin AV, Katz AI, Sznajder JI: Isoproterenol increases Na⁺-K⁺-ATPase activity by membrane insertion of alpha-subunits in lung alveolar cells. *Am J Physiol* 1999; 276: L20-27
- ²²⁰ Pressley TA: Ion concentration-dependent regulation of Na,K-pump abundance. *J Membr Biol* 1988; 105: 187-195
- ²²¹ Riordan M, Sreedharan R, Wang S, Thulin G, Mann A, Stankewich M, Van Why S, Kashgarian M, Siegel NJ: HSP70 binding modulates detachment of Na-K-ATPase following energy deprivation in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288(6): F1236-1242

- ²²² Ziemienowicz A, Zylicz M, Floth C, Hubscher U: Calf thymus Hsc 70 protein protects and reactivates prokaryotic and eukaryotic enzymes. *J Biol Chem* 1995; 270: 15479-5484
- ²²³ Park KM, Cho HJ, Bonventre JV: Orchiectomy reduces susceptibility to renal ischemic injury: a role for heat shock proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328(1): 312-7
- ²²⁴ Sun L, Chang J, Kirchhoff SR, Knowlton AA: Activation of HSF and selective increase in heat-shock proteins by acute dexamethasone treatment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278(4): H1091-1097
- ²²⁵ Van Why SK, Hildebrandt F, Ardito T, Mann AS, Siegel NJ, Kashgarian M: Induction and intracellular localization of HSP-72 after renal ischemia *Am J Physiol* 1992; 263(5 Pt 2): F769-775
- ²²⁶ Griffin KA, Picken MM, Churchill M, Churchill P, Bidani AK: Functional and structural correlates of glomerulosclerosis after renal mass reduction in the rat. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(3): 497-506
- ²²⁷ Fitzgibbon WR, Greene EL, Grewal JS, Hutchison FN, Self SE, Latten SY, Ullian ME: Resistance to remnant nephropathy in the Wistar-Furth rat. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(4): 814-821
- ²²⁸ Aiello S, Noris M, Todeschini M, Zappella S, Foglieni C, Benigni A, Corna D, Zoja C, Cavallotti D, Remuzzi G: Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction. *Kidney Int* 1997; 52(1): 171-181
- ²²⁹ Terzi F, Henrion D, Colucci-Guyon E, Federici P, Babinet C, Levy BI, Briand P, Friedlander G: Reduction of renal mass is lethal in mice lacking vimentin. Role of endothelin-nitric oxide imbalance. *J Clin Invest* 1997; 100(6): 1520-1528
- ²³⁰ Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Liang K, Pandian R: Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. *Hypertension* 2002; 39(1): 135-141.
- ²³¹ Kim SW, Lee J, Paek YW, Kang DG, Choi KC: Decreased nitric oxide synthesis in rats with chronic renal failure. *J Korean Med Sci* 2000; 15(4): 425-30
- ²³² Mattson DL, Bellehumeur TG: Neuronal nitric oxide synthase in the renal medulla and blood pressure regulation. *Hypertension* 1996; 28: 297-303
- ²³³ Star RA: Intrarenal localization of nitric oxide synthase isoforms and soluble guanylyl cyclase. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24: 607-610
- ²³⁴ Rocznik A, Fryer JN, Levine DZ, Burns KD: Downregulation of neuronal nitric oxide synthase in rat remnant kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 704-713
- ²³⁵ Fan JS, Zhang Q, Li M, Tochio H, Yamazaki T, Shimizu M, Zhang M: Protein inhibitor of neuronal nitric-oxide synthase, PIN, binds to a 17-amino acid residue fragment of the enzyme. *J Biol Chem* 1998; 273(50): 33472-33481
- ²³⁶ Rocznik A, Levine DZ, Burns KD: Localization of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in rat kidney. *Am J Physiol* 2000; 278: F702-F707
- ²³⁷ Welch WJ, Wilcox CS, Thomson SC: Nitric oxide and tubuloglomerular feedback. *Semin Nephrol* 1999; 19: 251-262
- ²³⁸ Vallon V, Traynor T, Barajas L, Huang YG, Briggs JP, Schnermann J: Feedback control of glomerular vascular tone in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 2001: 1599-606
- ²³⁹ Ren YL, Garvin JL, Ito S, Carretero OA: Role of neuronal nitric oxide synthase in the macula densa. *Kidney Int* 2001; 60(5): 1676-1683
- ²⁴⁰ Ollerstam A, Pittner J, Persson AE, Thorup C: Increased blood pressure in rats after long-term inhibition of the neuronal isoform of nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1997; 99(9): 2212-2218.
- ²⁴¹ Wang Y, Newton DC, Marsden PA: Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. *Crit Rev Neurobiol* 1999; 13(1): 21-43
- ²⁴² Erdely A, Greenfeld Z, Wagner L, Baylis C: Sexual dimorphism in the aging kidney: Effects on injury and nitric oxide system. *Kidney Int* 2003; 63(3): 1021-1026
- ²⁴³ Wagner L, Riggelman A, Erdely A, Couser W, Baylis C: Reduced nitric oxide synthase activity in rats with chronic renal disease due to glomerulonephritis. *Kidney Int* 2002; 62(2): 532-536
- ²⁴⁴ Erdely A, Freshour G, Maddox DA, Olson JL, Samsell L, Baylis C: Renal disease in rats with type 2 diabetes is associated with decreased renal nitric oxide production. *Diabetologia* 2004; 47(10): 1672-1676
- ²⁴⁵ Xiao S, Erdely A, Wagner L, Baylis C: Uremic levels of BUN do not cause nitric oxide deficiency in rats with normal renal function. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(6): F996-F1000
- ²⁴⁶ Chin SY, Pandey KN, Shi SJ, Kobori H, Moreno C, Navar LG: Increased activity and expression of Ca(2+)-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. *Am J Physiol* 1999; 277(5 Pt 2): F797-F804

- ²⁴⁷ Moreno C, Lopez A, Llinas MT, Rodriguez F, Lopez-Farre A, Nava E, Salazar FJ: Changes in NOS activity and protein expression during acute and prolonged ANG II administration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282(1): R31-R37
- ²⁴⁸ Bosse HM, Bohm R, Resch S, Bachmann S: Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli. *Am J Physiol* 1995; 269(6 Pt 2): F793-F805
- ²⁴⁹ Vaziri ND, Ni Z, Wang XQ, Oveisi F, Zhou XJ: Downregulation of nitric oxide synthase in chronic renal insufficiency: role of excess PTH. *Am J Physiol* 1998; 274(4 Pt 2): F642-F649
- ²⁵⁰ Kang DH, Nakagawa T, Feng L, Johnson RJ: Nitric oxide modulates vascular disease in the remnant kidney model. *Am J Pathol* 2002; 161(1): 239-248.
- ²⁵¹ Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL: Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(13): 6770-6774
- ²⁵² Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL: Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem* 1998; 273(40): 25804-25808
- ²⁵³ Muller V, Szabo A, Viklicky O, Gaul I, Portl S, Philipp T, Heemann UW: Sex hormones and gender-related differences: their influence on chronic renal allograft rejection. *Kidney Int* 1999; 55(5): 2011-2020
- ²⁵⁴ Schmidt RJ, Yokota S, Tracy TS: Nitric oxide production is low in end stage renal disease patients on peritoneal dialysis. *Am J Physiol (Renal Physiol)* 1999; 276: F794-F797
- ²⁵⁵ Dumont Y, D'Amours M, Lebel M, Lariviere R: Supplementation with a low dose of L-arginine reduces blood pressure and endothelin-1 production in hypertensive uremic rats. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(4): 746-754
- ²⁵⁶ Zatz R, Baylis C: Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*. 1998; 32: 958-964
- ²⁵⁷ Klahr S, Morrissey J. L-arginine as a therapeutic tool in kidney disease. *Semin Nephrol*. 2004; 24: 389-394
- ²⁵⁸ Aoki MS, Miyabara EH, Soares AG, Saito ET, Moriscot AS: mTOR pathway inhibition attenuates skeletal muscle growth induced by stretching. *Cell Tissue Res* 2006; 324(1): 149-156
- ²⁵⁹ Kouwenhoven EA, de Bruin RW, Heemann UW, Marquet RL, Ijzermans JN. Late graft dysfunction after prolonged cold ischemia of the donor kidney: inhibition by cyclosporine. *Transplantation*. 1999 Oct 15;68(7):1004-1010
- ²⁶⁰ Reutzel-Selke A, Zschockelt T, Denecke C, Bachmann U, Jurisch A, Pratschke J, Schmidbauer G, Volk HD, Neuhaus P, Tullius SG. Short-term immunosuppressive treatment of the donor ameliorates consequences of ischemia/ reperfusion injury and long-term graft function in renal allografts from older donors. *Transplantation*. 2003 Jun 15;75(11):1786-1792
- ²⁶¹ Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD: Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 2004; 109(11): 1359-1365
- ²⁶² Fatini C, Sofi F, Sticchi E, Gensini F, Gori AM, Fedi S, Lapini I, Rostagno C, Comeglio M, Brogi D, Gensini G, Abbate R: Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2004; 147(3): 516-521
- ²⁶³ Antoniadou C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Pitsavos C, Chrysochoou C, Panagiotakos D, Tentolouris C, Marinou K, Koumallos N, Stefanadis C: Genetic polymorphism on endothelial nitric oxide synthase affects endothelial activation and inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(6): 1101-1109
- ²⁶⁴ Chen W, Srinivasan SR, Elkasabany A, Ellsworth DL, Boerwinkle E, Berenson GS: Combined effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) and insulin resistance status on blood pressure and familial risk of hypertension in young adults: the Bogalusa Heart Study. *Am J Hypertens* 2001; 14(10): 1046-1052
- ²⁶⁵ Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y: Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension* 1999; 33(4): 933-936
- ²⁶⁶ Fatini C, Mannini L, Sticchi E, Cecchi E, Bruschettoni A, Leprini E, Pagnini P, Gensini GF, Prisco D, Abbate R: eNOS gene affects red cell deformability: role of T-786C, G894T, and 4a/4b polymorphisms. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005; 11(4): 481-488

- ²⁶⁷ Senthil D, Raveendran M, Shen YH, Utama B, Dudley D, Wang J, Wang XL: Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. *DNA Cell Biol* 2005; 24(4): 218-224
- ²⁶⁸ Lee PC, Wang ZL, Qian S, Watkins SC, Lizonova A, Kovesdi I, Tzeng E, Simmons RL, Billiar TR, Shears LL 2nd: Endothelial nitric oxide synthase protects aortic allografts from the development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* 2000; 69(6): 1186-1192
- ²⁶⁹ Iwata A, Sai S, Moore M, Nyhuis J, de Fries-Hallstrand R, Quetingco GC, Allen MD: Gene therapy of transplant arteriopathy by liposome-mediated transfection of endothelial nitric oxide synthase. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19(11): 1017-1028
- ²⁷⁰ Jachymova M, Horky K, Bultas J, Kozich V, Jindra A, Peleska J, Martasek P: Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284(2): 426-430
- ²⁷¹ Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ: A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 1999; 100(14): 1515-1520
- ²⁷² Trieb K, Dirnhofer S, Krumbock N, Blahovec H, Sgonc R, Margreiter R, Feichtinger H: Heat shock protein expression in the transplanted human kidney. *Transpl Int* 2001; 14(5): 281-286
- ²⁷³ Kelly KJ, Baird NR, Greene AL: Induction of stress response proteins and experimental renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 2001; 59(5): 1798-1802.
- ²⁷⁴ Perdrietz GA, Kaneko H, Buckley TM, Fishman MS, Pleau M, Bow L, Schweizer RT: Heat shock and recovery protects renal allografts from warm ischemic injury and enhances HSP72 production. *Transplant Proc* 1993; 25(1 Pt 2): 1670-1673
- ²⁷⁵ Redaelli CA, Wagner M, Kulli C, Tian YH, Kubulus D, Mazzucchelli L, Wagner AC, Schilling MK: Hyperthermia-induced HSP expression correlates with improved rat renal isograft viability and survival in kidneys harvested from non-heart-beating donors. *Transpl Int* 2001; 14(6): 351-360
- ²⁷⁶ Oh KH, Kim JY, Kim D, Lee EM, Oh HY, Seo JS, Han JS, Kim S, Lee JS, Ahn C: Targeted gene disruption of the heat shock protein 72 gene (hsp70.1) in the donor tissue is associated with a prolonged rejection-free survival in the murine skin allograft model. *Transpl Immunol* 2004; 13(4): 273-281
- ²⁷⁷ Fekete A, Treszl A, Toth-Heyn P, Vannay A, Tordai A, Tulassay T, Vasarhelyi B: Association between heat shock protein 72 gene polymorphism and acute renal failure in premature neonates. *Pediatr Res* 2003; 54(4): 452-455
- ²⁷⁸ Bolla MK, Miller GJ, Yellon DM, Evans A, Luc G, Cambou JP, Arveiler D, Cambien F, Latchman DS, Humphries SE, Day IN: Analysis of the association of a heat shock protein70-1 gene promoter polymorphism with myocardial infarction and coronary risk traits. *Dis Markers* 1998; 13(4): 227-235
- ²⁷⁹ Zee RY, Bates D, Ridker PM: A prospective evaluation of the heat shock protein 70 gene polymorphisms and the risk of stroke. *Thromb Haemost* 2002; 87(4): 622-625