A VESETRANSZPLANTÁCIÓ SORÁN JELENTKEZŐ ISZKÉMIA/REPERFÚZIÓS KÁROSODÁS CSÖKKENTÉSÉNEK ÚJ LEHETŐSÉGEI

Doktori értekezés

dr. Antal Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

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

Hivatalos bírálók: Dr. Dolgos Szilveszter, Ph.D, adjunktus
Dr. Piros László, Ph.D, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Nyirádi Péter, MTA doktor, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Szijártó Attila, MTA doktor, egyetemi docens
Dr. Kriván Gergely, Ph.D

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke……..…….5

Táblázatok jegyzéke……9

Ábrák jegyzéke……9

1. Bevezetés……...……..11

1.1 Akut vesekárosodás…….……..13

1.1.1 Definíció……..……13

1.1.2 Incidencia……..…….……..13

1.1.3 Etiológia……...…..…….…….14

1.1.4 Diagnózis……..…….…..15

1.1.5 Patofiziológia (iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodás)……...……..17

1.1.5.1 Vaszkuláris változások…….…….…….18

1.1.5.2 A tubulusok károsodása…….…..…18

1.1.5.3 Inflammatórikus folyamatok…….…….20

1.1.5.4 Regeneráció, védő faktorok…….....……..…….…..22

1.1.6 Terápia……..…….……..24

1.2 Vesetransplantáció…….…….…24

1.3 A hősokk fehérjék…….26

1.4 A sigma-1 receptor (S1R)…….…….……...29

1.5 Nemi különbségek az iszkémiára adott válaszban……33

1.5.1 Nemi különbségek a vesében……..…….……33

1.5.2 Nemi hormonok szerepe az I/R károsodásban……..35

1.5.3 Az S1R és a nemi hormonok…….……....40

2. Célkitűzések……...…41

3. Módszerek……...…42

3.1 *In vivo* kísérletek……..……..…….…..42

3.1.1 Állatok……...…….…….42

3.1.2 A vese I/R károsodásának modellje, vizsgálati csoportok……....42

3.1.3 A vese izograft autotranszplantációs modellje, vizsgálati csoportok……..45

3.2 *In vitro* kísérletek……..47
3.2.1 Sejtek tenyésztése……47
3.2.2 Vizsgálati csoportok…….……48
3.3 Funkcionális laboratóriumi vizsgálatok…….……48
3.4 Szövettani vizsgálatok…...……48
3.5 Western blot analízis……...…….….50
3.6 Immunhisztokémiai vizsgálat……...…….…52
3.7 Apoptózis vizsgálat TUNEL teszttel…….…52
3.8 Kvantitatív reverz transzkriptáz PCR…….…..53
3.9 Statisztikai elemzés…….…..53

4. Eredmények……...…….……55
4.1 Nemi különbségek a vese I/R károsodásában…….…...…55
4.1.1 Nőstényekben mérsékeltebb a vesefunkció romlása…….…...55
4.1.2 A strukturális károsodás enyhébb a nőstény állatok veséjében……...….56
4.1.3 Nemi különbségek az S1R, pAkt, hősokk fehérjék és NKA szintekben…....58
4.1.3.1 A S1R szintje nőstényekben gyorsan emelkedik……..…….58
4.1.3.2 Az alap- és a posztiszkémiás pAkt, hősokk fehérje és NKA szintek nőstényekben magasabbak……...…….59
4.2 Az S1R szerepe a vese I/R károsodásában……..……...…61
4.2.1 Az S1R agonista fluvoxamin (Flu) mérsékli a vesefunkció romlását……..61
4.2.2 Flu hatására enyhébb az I/R okozta strukturális károsodás…….….62
4.2.3 A Flu antiapoptotikus hatású……..…..62
4.2.4 Flu hatására emelkedik az S1R és a pAkt szintje……..……63
4.3 Az S1R szerepe a vese károsodásában transzplantációs modellen……...….64
4.3.1 Flu hatására mérséklődik a vesefunkció romlása……..…….…..64
4.3.2 Flu hatására enyhébb a transzplantáció okozta strukturális károsodás…….…65
4.3.3 A Flu prezervációs folyadékban adva antiapoptotikus hatású…….....67
4.4 A nemi hormonok szerepe az S1R mediált hősokk válasz kialakulásában……...68
4.4.1 Sejt viabilitás és proliferációs tesztek …….…….68
4.4.2 A 17β-ösztradiol hatása a sejtek S1R és HSF-1 szintjeire és lokalizációjára…69
4.4.3 A 17β-ösztradiol hatása a sejtek hősokk fehérje szintjeire…….…….….70

5. Megbeszélés……...…….73

6. Következtetések…….…….81

7. Összefoglalás…….……..82

8. Summary…….……...…….83

9. Irodalomjegyzék…..……...…….……..…….84

10. Saját publikációk jegyzéke…….…….97

11. Köszönetnyilvánítás…….……99

Rövidítések jegyzéke

ADP: adenozin-difoszfát

AIF: apoptózist indukáló faktor

AKI: acute kidney injury (akut vesekárosodás)

Akt: protein-kináz B

AMP: adenozin-monofoszfát

AST: aszpartát transzamináz

ATF6: aktiváló transzkripciós faktor 6

ATP: adenozin-trifoszfát

BAD: Bcl-XL/Bcl-2 associated death promoter

bax: bcl-2 associated X-protein

bcl-2: B-cell lymphoma-2

BiP: binding immunglobulin protein

BSA: bovine serum albumin (marha szérum albumin)

CN: karbamid-nitrogén

DAB: 3,3'-diaminobenzidin (festés)

DC: dendritic cell (dendritikus sejt)

DGF: delayed graft function (késlekedő graft funkció)

DHEA: dehidroepiandroszteron

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNAáz: dezoxiribonukleinsav bontó enzim

DNS: dezoxiribonukleinsav

EDTA: ethylene-diamine-tetraacetic acid (etilén-diamin-tetraecetsav)

EndoG: endonukleáz-G

eNOS: endoteliális nitrogén-monoxid szintáz

EPO: eritropoietin

ER: endoplazmatikus retikulum

ERK: extracellular regulated kinase

ESRD: end stage renal disease (végstádiumú veseelégtelenség)

FCS: fetal calf serum (magzati borjú szérum)

Flu: fluvoxamin

GFR: glomeruláris filtrációs ráta

GPCR: G-protein coupled receptor

H_2O_2: hidrogén peroxid

HE: hematoxilin-eozin

HIF-1: hypoxia inducible factor-1

HLA: humán leukocita antigén

HO: hem-oxigenáz

HRP: horseradish-peroxidase (torma-peroxidáz)

HSF-1: hősokk faktor-1

HSP: heat shock protein (hősokk fehérje)

HSPA-1A: heat shock protein A-1A

HSPB1: heat shock protein beta-1

HSP-25, -27, -28, -70, -72, -90: heat shock protein-25, -27, -28, -72, -90

HTK: hisztidin-triptofán-ketoglutarát

HK-2: human kidney-2

ICAM-1: intracelluláris adhéziós molekula-1

IGF-1: insulin-like growth factor-1

IGFBP-7: insulin-like growth factor binding protein-7

IL-1, -6, -8, -10, -18: interleukin-1,-6, -8, -10, -18

iNOS: indukálható nitrogén-monoxid szintáz

IOD: integrated optical density

ip.: intraperitoneális

IP3: inositol 1,4,5-trisphosphate (inozitol-trifoszfát)

I/R: iszkémia/reperfúziós

IRE-1: inositol requiring enzyme-1

JNK: c-Jun N-terminal kinase

kDa: kilodalton

KDIGO: Kidney Disease: Improving Global Outcomes

K_d: disszociációs konstans

K_i: inhibitor konstans

KIM-1: kidney injury molecule-1

Krea: szérum kreatinin

MAPK: mitogén aktivált protein kináz

MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1

MIP-2: macrophage inflammatory protein-2

mRNS: messenger (hírvivő) ribonukleinsav

MTT: methyl-thiazoletetrazolium

NE-100:N,N-dipropil-2-[4-methoxy-3-(2-fenilethoxy)-fenil]-thylamin-monohidroklorid

NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin

NKA: Na^+/K^+ATPáz (ioncsatorna)

nNOS: neuronális nitrogén-monoxid szintáz

NO: nitrogén-monoxid

NOS: nitrogén-monoxid szintáz

OVSZ: Országos Vérellátó Szolgálat

ovx: ovariektomizált

pAkt: foszforilált protein-kináz B

PAS: Periodic acid - Schiff (Perjódsav-Schiff)

rRNS: riboszomális ribonukleinsav

PKRK: protein kinase RNS-like endoplasmic reticulum kinase

RT-PCR: reverse transcriptase polimerase chain reaction (reverz transzkiptáz polimeráz láncreakció)

PLC: foszfolipáz-C

ROS: reactive oxygen species (reaktív oxigén gyök)

S1R: sigma-1 receptor

SBDL I, II: steroid binding domain like I, II

SDS: szódium dodecil szulfát

Src: signaling receptor complex

SSRI: selective serotonin reuptake inhibitor (szelektív szerotonin felvételt gátló)

TdT: terminal deoxynucleotidyl transferase

TGF-β: transforming growth factor-beta

TLR: toll-like receptor

TNF: tumor nekrózis faktor

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling

USRDS: United States Renal Data System

UW: University of Wisconsin

VCAM: vascular cell adhesion molecule

XBP-1: xbox binding protein-1

Táblázatok jegyzéke:

1. A sigma-1 receptor legismertebb ligandjai, receptor affinitásuk, hatásuk

2. A nemi hormonok és a sigma-1 receptor szerepe a sejt stresszválaszában

3. A polimeráz láncreakció (PCR) során használt primerek nukleotid szekvenciái

4. A vesekárosodás mértéke iszkémia/reperfúziós inzultust követően

5. Fluvoxamin (Flu) hatása az iszkémia/reperfúziós inzultust követő vesefunkcióra

6. A prezervációs folyadékhoz adott fluvoxamin vesefunkcióra gyakorolt hatása transzplantációs modellen

Ábrák jegyzéke:

1. A végstádiumú veseelégtelenség (ESRD) 1 millió lakosra jutó éves incidenciája az Amerikai Egyesült Államokban

2. Iszkémiás károsodás okozta változások a kapillárisokban és a tubulusokban

3. Vesetranszplantációk száma Magyarországon 1973-2017-ig

4. A hősokk fehérje-70 (HSP-70) szerkezete

5. A hősokk fehérje-27 (HSP-27) szerkezete

6. A hősokk fehérjék aktivációja és szerepe a sejt stressz reakciójában

7. A sigma-1 receptor aminosav szekvenciája

8. Célkitűzések

9. A vese iszkémia/reperfúziós patkánymodellje

10. Az első iszkémia/reperfúziós kísérletsorozat protokollja

11. A második iszkémia/reperfúziós kísérletsorozat protokollja

12. A transzplantáció lépései

13. A transzplantációs kísérletsorozat protokollja

14. A vesefunkció romlása iszkémia/reperfúziós inzultust követően

15. A vese iszkémia/reperfúziós inzultus következtében kialakult strukturális károsodása

16. Sigma-1-receptor, foszforilált protein kináz B, hősokk faktor-1, hősokk fehérje-72, hősokk fehérje-27 és Na^+/K^+ATPáz szintek változása iszkémia/reperfúziós károsodás hatására

17. A tubulus károsodás változása fluvoxamin (Flu) kezelés hatására

18. A fluvoxamin (Flu) kezelés hatása az antiapoptotikus *B-cell lymphoma-2 (bcl-2)* gén és az apoptotikus *bcl-2 associated X-protein (bax)* gén expressziójára

19. A fluvoxamin (Flu) kezelés hatása a sigma-1 receptor (S1R) és a protein kináz B (Akt) szintjeire

20. A fluvoxamin hatása a transzpantációt követő strukturális károsodásra

21. A fluvoxamin hatása az apoptózisra transzplantáció során

22. A sejtek viabilitási vizsgálata methyl-thiazoletetrazolium (MTT) teszttel a 17β-ösztradiol és az NE-100 nem toxikus koncentrációjának kiválasztásához

23. 17β-ösztradiol kezelés hatása a human kidney-2 sejtek sigma-1 receptor, hősokk faktor-1, hősokk fehérje-72 és hősokk fehérje-27 szintjeire

24. A 17β-ösztradiol a sigma-1 receptor (S1R) és a hősokk faktor-1 (HSF-1) transzlokációját váltja ki a proximális tubulus sejteken

„A vizsgálódás nélküli élet nem embernek való élet.”
Platón – Szókratész védőbeszéde

1. Bevezetés

Ahogy világszerte nő a várható élettartam, úgy emelkedik a krónikus betegségek előfordulása. Az akut valamint krónikus vesekárosodás kapcsán kialakuló végstádiumú veseelégtelenség (end stage renal disease, ESRD) prevalenciája is rohamosan nő, jelenleg világszerte 8-16% között van; az elmúlt negyven évben a betegek száma megtízszereződött (USRDS 2017). Magyarországon is hasonló tendencia tapasztalható, a betegség előfordulása évente 6-7%-kal emelkedik (Kulcsár 2014). A betegek vesepótló kezelést igényelnek, a definitív megoldást a vesetranszplantáció jelenti.

A donorhiány mellett komoly kihívást jelent a beültetett vese hosszútávú működésének javítása is. Az immunológiai és sebészeti technikák fejlődésének köszönhetően az első évben a graft túlélés közel 95%-os, de a késői graft diszfunkció továbbra is a hosszútávú túlélés limitáló tényezője (Legendre és mtsai 2014). A vese transzplantáció során elszenvedett iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodása az egyik legfontosabb akut és krónikus graft működést befolyásoló faktor (Legendre és mtsai 2014).

A vese I/R károsodása a transzplantáció mellett számos más esetben is előfordulhat, mint például sokk, szívelégtelenség valamint szuprarenális aorta műtét kapcsán. Az I/R károsodás okozta mortalitás magas, és a terápiás lehetőségek sem optimálisak (Legendre és mtsai 2014).

E probléma leküzdésével számos kutatás foglalkozik. Egy részük a különböző iszkémiás betegségekben (miokardiális infarktus, stroke) jól ismert nemi különbséget vizsgálja. A nők rizikója ezekben a kórképekben alacsonyabb a férfiakhoz képest, mely a menopauzát követően megszűnik (Knowlton és mtsai 2001). Ezt a nemi különbséget többek között munkacsoportunk is kimutatta a vese I/R károsodásában (Fekete és mtsai 2004, Müller és mtsai 2011) és transzplantáció kapcsán is (Müller és mtsai 1999, Aufhauser és mtsai 2016).

Munkacsoportunk érdeklődése a vese I/R károsodás mechanizmusában résztvevő folyamatok megismerésére, a károsodás mérséklésének lehetőségeire, valamint ezzel összefüggésben a nemi különbségek létrejöttének vizsgálatára irányul (Müller és mtsai 2002, Fekete és mtsai 2004, Fekete és mtsai 2006, Vannay és mtsai 2009, Prókai és mtsai 2011, Müller és mtsai 2011).

Korábban igazoltuk, hogy a nőstény patkányok posztiszkémiás vesekárosodása enyhébb mint a hímeké, továbbá, hogy a vérkeringésben második legnagyobb mennyiségben keringő szteroid hormon, a nemi hormonok prehormonja, a dehidroepiandroszteron (DHEA) javítja a hímek posztiszkémiás túlélését (Vannay és mtsai 2009).

Mivel hormonhatásán túl ismert, hogy a DHEA a sigma-1 receptor (S1R) endogén agonistája, így a továbbiakban kísérleteink erre a még sok tekintetben ismeretlen receptorra irányultak. Az S1R többek között a szelektív szerotonin felvételt gátló (SSRI - selective serotonin reuptake inhibitor) gyógyszerek receptora, legnagyobb mennyiségben a központi idegrendszerben fordul elő. Vizsgáltuk az S1R lokalizációját, funkcióját, szerepét a vesében. Kimutattuk, hogy az S1R aktivációja protektív a vese I/R károsodásával szemben (Hosszu és mtsai 2017).

Mivel az ösztrogén szintén az S1R endogén agonista ligandja, felmerült az S1R szerepe a nemi különbség létrejöttében (Dhir és mtsai 2008).

A nemi különbség illetve az S1R protektív hatásának kialakulásában korábban több jelátviteli útvonal szerepét is vizsgáltuk, kimutattuk a hősokk válasz (hősokk fehérje-72 (HSP-72) fokozott aktiválódását és így protektív szerepét nőstény patkányokban (Fekete és mtsai 2006), valamint az S1R által aktivált protein kináz B (Akt) –endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) útvonal renoprotektív hatását (Hosszu és mtsai 2017).

Jelen értekezés témája a női nem, valamint az S1R védő funkciójának ismeretében az S1R-nek a nemi különbség létrejöttében betöltött szerepének, valamint a hősokk fehérjék aktiválásán keresztüli protektív hatásának kimutatása *in vivo* I/R és transzplantációs állatmodellen, és *in vitro* sejttenyészet vizsgálatával.

A folyamatok pontos megértése céljából a vizsgálataink és eredményeink bemutatása előtt részletes ismertetésre kerül az akut vesekárosodás és a vesetranszplantáció folyamata, valamint a vese I/R károsodásában eddig ismert nemi különbségek.

1.1 Akut vesekárosodás

1.1.1 Definíció

Definíció szerint a hirtelen - 48 órán belüli - vesefunkció romlást akut veseelégtelenségnek nevezzük, ha:
- a szérum kreatinin (Krea) szint több mint 0,3 mg/dl-rel (>26,5 μmol/l) emelkedik,
- a Krea 50%-kal emelkedik bizonyítottan 7 napon belül,
- több mint 6 órán át tartó oliguria (<0,5 ml/kg/óra vizelet mennyiség) áll fenn.

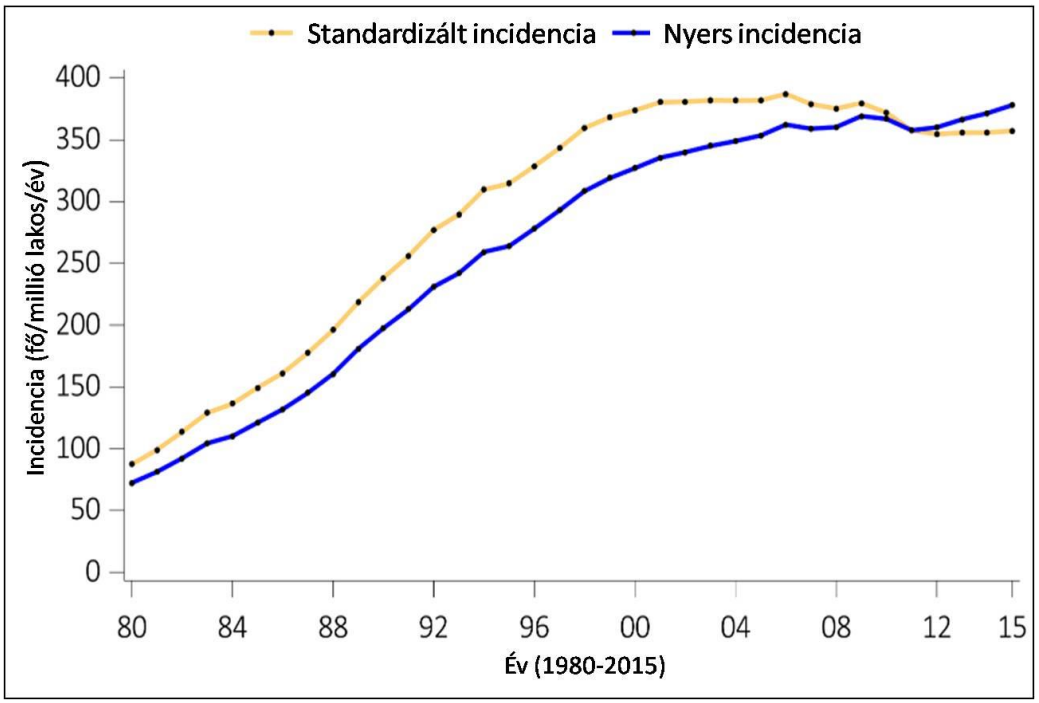
Ezt a veseműködés progresszív romlása okozza, melynek hatására beszűkül a glomeruláris filtrációs ráta (GFR), csökken az anyagcsere végtermékek, egyes ionok és a víz kiválasztása. Az utóbbi években megváltozott a nemzetközi terminológia, "akut veseelégtelenség" (acute renal failure) helyett "akut vesekárosodás" (acute kidney injury - AKI) használatos (Mehta és mtsai 2007, KDIGO 2012).

1.1.2 Incidencia

Az AKI a világon nagyjából 13,3 millió embert érint évente, mintegy 1,7 millió ember halálát okozva (Schrier és mtsai 2004, Zuk és mtsai 2016).

A *kórházon kívül kialakult vesekárosodás* egyes felmérések szerint a kórházba utalások kb. 1%-át teszi ki. *Kórházi betegek között* előfordulása mintegy 5%, míg a *súlyos beteg populációban* elérheti a 30%-ot is (KDIGO 2012, Basile és mtsai 2012). Bár a vesepótló kezelések egyre szélesebb körben elérhetőek, az AKI mortalitása megközelíti a súlyos betegcsoportban az 50-80%-ot is, és ez az elmúlt 50 évben érdemben nem változott. Vagyis továbbra sem áll rendelkezésünkre megfelelő eszköz a kivédésére illetve kezelésére (Xue és mtsai 2006, Munshi és mtsai 2011).

Gyakran többszervi elégtelenséggel vagy szepszissel társul, súlyosbítva a beteg állapotát. Emellett fontos szerepe van krónikus vesebetegségre rakódva az ESRD kialakulásában, melyek száma évről évre emelkedik. Ezt jól szemlélteti az Amerikai Egyesült Államok éves jelentésének (United States Renal Data System – USRDS) grafikonja, melyen az 1 millió lakosra jutó ESRD éves incidenciája látható 1980-2015-ig (**1. ábra**).



1. ábra A végstádiumú veseelégtelenség (ESRD) 1 millió lakosra jutó éves incidenciája az Amerikai Egyesült Államokban (United States Renal Data System 2017-es jelentése alapján)

1.1.3 Etiológia

Az AKI kialakulásában prerenális, renális és posztrenális okokat különíthetünk el.

Prerenális okok szisztémás vagy lokális keringészavarokból adódnak, lényegében a vese iszkémiás károsodását jelentik. Ezek teszik ki az AKI 25-60%-át (Basile és mtsai 2012). Okai:

- *az effektív extracelluláris folyadéktérfogat csökkenése*: extracelluláris folyadékvesztés (pl. vérzés, égés, hasmenés, hányás, sóvesztő vese), extracelluláris folyadék szekvesztráció (pl. pancreátitisz, malnutríció, májelégtelenség)
- *károsodott szívfunkció* (pl. miokardiális infarktus, hipertenzió, kardiomiopátia)
- *perifériás vazodilatáció* (pl. szepszis, antihipertenzív gyógyszerhatás)
- *fokozott renális érellenállás* (pl. sebészi beavatkozás, hepatorenális szindróma)
- *renális vaszkuláris obstrukció* (pl. trombózis, veseműtét, transzplantáció).

Renális okok az AKI 35-70%-ában fordulnak elő, ezek lehetnek a *glomerulusok betegségei* vagy a glomerulusokat károsító *szisztémás betegségek* (pl. hemolitikus urémiás szindróma, Schönlein-Henoch purpura, poliarteritisz nodoza), *intersticiális*

betegségek (pl. hiperkalcémia, szarkoidózis, infekciók) valamint *akut tubuláris nekrózist* okozó kórképek (szeptikus sokk, toxinok, stb.) (Basile és mtsai 2012).

Posztrenális vesekárosodást az *obstruktív uropátiák* válthatnak ki, ez az esetek mintegy 5-20%-át jelenti (Rosivall 1996, Basile és mtsai 2012).

Az Egyesült Államok regisztere szerint a felnőtt populációban a vesekárosodás hátterében 44%-ban diabétesz, 28%-ban magas vérnyomás, 7%-ban glomerulonefritisz, 3%-ban cisztás vesebetegség, 2%-ban urológiai eltérések állnak, míg a maradék 16% esetében egyéb vagy ismeretlen a kiváltó ok (USRDS 2017).

1.1.4 Diagnózis

A diagnosztikus eljárások tradicionális alapjait a definíciónál már ismertetett kritériumok, azaz az *oliguria* és az emelkedett Krea szint képezik, annak ellenére, hogy ezek nem vese-specifikus faktorok, valamint használatuk számos esetben limitált.

A *kreatinin* az izomban található kreatin májban, hasnyálmirigyben képződő metabolitja, mely a glomerulusokban szabadon filtrálódik, visszaszívása nincs. Így normál GFR mellett szérumszintje közel állandó: 55-103 μmol/l. A Krea a GFR csökkenését követő 24-36 óra múlva emelkedik, szintjét májbetegség, szepszis, hidráltsági állapot, gyógyszerek is befolyásolják (Ostermann és mtsai 2016).

A *kreatinin-clearance* 24 órás gyűjtött vizelet kreatinin koncentrációjának és a Krea szintjének ismeretében számítható ki, valamint kiszámítható belőle a *GFR*, így a vese működéséről ad pontosabb információt (Basile és mtsai 2012).

A *karbamid-nitrogén (CN)* a fehérjék bomlási végterméke, mely a májban termelődik, szintén a vesében filtrálódik, szérumban normál értéke: 3,6-7,2 mmol/l. A szérum CN emelkedése a Krea-hoz hasonlóan a GFR csökkenésére utal, de változását többek között szív-, májbetegség, kiszáradás, alultápláltság is befolyásolja.

Ezek az értékek azonban mind csak a vese kiválasztó funkciójáról adnak információt (Ostermann és mtsai 2016).

Az *aszpartát transzaminász (AST*) az aminosav metabolizmusban szerepet játszó enzim, mely megtalálható a májban, szívben, vesében, agyban, vörösvértestekben. Szérumban normál értéke 6-40 IU/l. Szérumszintjének emelkedése elsősorban májbetegségre utalhat. Azonban tekintettel arra, hogy a vese proximális tubulus sejteiben is jelen van, iszkémiás

károsodosás esetén az elhalt, széteső tubulus sejtekből felszabadulva a reperfúzió alatt jól kimutatható mennyiségben a szérumba kerül. Sok esetben, így a kísérleti modelljeinkben sem következik be májkárosodás, így az AST-t a vese I/R károsodásában nem-specifikus markernek is tekinthetjük (Thiemermann és mtsai 2003, Rong és mtsai 2011).

Kutatások alapját képezi újabb, vizeletből vagy szérumból kimutatható markerek azonosítása, melyek előbb és pontosabban jelzik a vesekárosodást, ill. annak mértékét, esetleg előrejelzik a veseelégtelenség kialakulását (biomarkerek) (Basile és mtsai 2012, Ostermann és mtsai 2016). A *kidney injury molecule-1 (KIM-1*) egy transzmembrán glikoprotein, mely a proximális tubulus sejtekben termelődik I/R hatást követően. Az elhalt sejtfragmentumokkal a tubulus lumenbe kerül, így a vizeletből már pár órával a károsodás után kimutatható, és specifikus az iszkémiás vesekárosodásra (Han és mtsai 2002, Bagshaw és mtsai 2008, Basile és mtsai 2012).

Ehhez hasonlóan a *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (*NGAL*) protein génje erősen indukálódik iszkémiás vagy toxikus inzultus hatására a disztális tubulus sejtekben, így a fehérje a károsodást követően hamar (2-6 óra múlva) kimutatható a vizeletben és a szérumban is (Devarajan és mtsai 2010).

További ígéretes biomarkerek még többek között a szérum cystatin-C (GFR-t mutatja), a vizelet interleukin-18 (IL-18; a gyulladásos folyamatokat jelzi), az insulin-like growth factor binding protein-7 (IGFBP-7; tubulus stresszt jelzi) (Bagshaw és mtsai 2008, Devarajan és mtsai 2010, Ostermann és mtsai 2016).

A *vizelet mikroszkópos vizsgálatával* az üledékben megjelenő vörösvértest cilinderek, tubulus epitél sejtek, Tamm-Horsfall fehérje (tubulus sejtekből származó fehérje fragmentumok) szintén vesekárosodásra utalnak (KDIGO 2012, Ostermann és mtsai 2016).

A *vese ultrahang* vizsgálatával az obstrukció, a vesestruktúra makroszkópos elváltozása, Doppler-ultrahanggal a keringés detektálható (KDIGO 2012, Ostermann és mtsai 2016).

Lehetőség van még *hisztológiai vizsgálat*ra vese biopszia elvégzésével, mely bár invazív eljárás, az egyes morfológiai elváltozások kimutatásával diagnosztikus, terápiás és prognosztikai jelentősége lehet. Kísérletek során a szövettani vizsgálat, akár speciális festési eljárások alkalmazásával, fontos része az értékelésnek.

1.1.5 Patofiziológia (iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodás)

Míg a humán vese tömege a testtömeg 2%-át teszi ki, a keringő vérmennyiség 25%-a áramlik keresztül rajta, így oxigén ellátottsága nagyon jó. Ez különösen a kéregre igaz, mert a vesén belül a vérellátottság nem egyenletes: a kéreg kapja a vérmennyiség 90%-át, míg a velő 10%-ot. Emellett az autoreguláció következtében a GFR a szisztémás vérnyomás széles tartományában (80-180 Hgmm) állandó marad, melyet a glomerulusok afferens és efferens arterioláinak kaliber szabályozása tart fenn. Ez azért fontos, mert a tubulusokban működő ioncsatornák adenozin-trifoszfát (ATP) igénye nagyon magas, a vese a hipoxiára különösen érzékeny. Különböző inzultusok (döntően iszkémia vagy toxinok) hatására az autoregulációs mechanizmusok károsodnak, a vese működése sérül (Abuelo és mtsai 2007, Munshi és mtsai 2011, Basile és mtsai 2012, Layton és mtsai 2015).

Iszkémia hatására lokálisan *oxigén hiány*, a mitokondriális raktárak kiürülésével a metabolikus folyamatokhoz szükséges *szubsztrátok* (cukor, ATP) *hiánya,* valamint *toxikus végtermékek* felszaporodása jön létre. Az ATP-igényes folyamatok (membrántranszport, protein szintézis, lipogenezis) csökkennek vagy teljesen leállnak, szervelégtelenség alakul ki.

Általánosságban erős *vazokonstriktor-* és *inflammatórikus* hatás érvényesül, mely jellemzően az endotél és epitél sejtek diszfunkciójával a GFR csökkenéséhez, valamint a *tubulusok sérülésé*hez vezet.

A károsodás mértéke függ az iszkémiás periódus hosszától és az azt követő reperfúziótól. A *reperfúzió* egyrészt elengedhetetlen az iszkémiás szövetek túléléséhez, másrészt ellenkező hatással mégis súlyosbítja a szöveti károsodást, ugyanis a reperfúzió során keletkező reaktív oxigéngyökök (reactive oxygen species, ROS) lipidperoxidációt, dezoxiribonukleinsav (DNS) degradációt, illetve a poliszacharid depolimerizáció növekedését okozzák. A kezdeti iszkémiás károsodást tehát a reperfúzió okozta károsodás követi (Weight és mtsai 1996).

A szívizommal és az agyszövettel ellentétben a vese bizonyos fokú *regenerációr*a is képes. A regenerálódó sejtek az életben maradt tubulussejtekből dedifferenciálódnak, migrálnak, proliferálnak, majd végül ismét differenciálódnak, így idővel helyreállhat a normális tubulus funkció (Rosivall 1996, Schrier és mtsai 2004, Abuelo és mtsai 2007, Bonventre 2008, Bonventre 2010, Munshi és mtsai 2011, Basile és mtsai 2012, Zuk és mtsai 2016).

1.1.5.1 Vaszkuláris változások

Elsődlegesen az iszkémia bekövetkeztekor intrarenális **vazokonstrikció** jellemző, melyet a szöveti *vazokonstriktor faktorok* (endothelin-1 (ET-1), angiotenzin-II, thromboxán A2, prosztaglandin H2, leukotrién C4 és D4, adenozin) megemelkedett szintje és a *veseidegek fokozott szimpatikus aktivitása* vált ki. Szerepüket a folyamatban bizonyítja, hogy például az endothelin receptor A típusának gátlása vagy endothelin antitest adása patkány modellben protektív hatásúnak bizonyult az iszkémiás károsodással szemben (Gellai és mtsai 1994, Müller és mtsai 2002, Kher és mtsai 2005). Továbbá leírták, hogy a vese denervációja enyhíti a GFR csökkenését az inzultust követően (Basile és mtsai 2012).

Ismert továbbá az erek *csökkent vazodilatátor érzékenysége* és a *vazodilatátor hatású molekulák csökkent produkciója* is (acetilkolin, bradykinin, nitrogén-monoxid (NO), prosztaglandin E2). Kimutatták a vese autoregulációjának hiányát I/R károsodást követően, mely még 1 héttel az inzultus után is észlelhető volt (Basile és mtsai 2012).

Az arteriolák valamint a peritubuláris kapillárisok **endotél membránjának sérülése** fokozza a *leukociták kitapadását* és a *leukocita-endotél interakció* hatására számos molekula felszabadulását. Így *aktiválódnak a vérlemezkék* és a *koagulációs útvonal*, mely a kiserek elzáródásához vezethet.

Az érfal permeábilitásának növekedése miatt *emelkedik az intersticiális folyadék* mennyisége, mely szintén az érlumen beszűkülését fokozza (Munshi és mtsai 2011, Basile és mtsai 2012, Zuk és mtsai 2016).

Az iszkémiát követő **reperfúzió** a külső velőt ellátó erekben késik, valamint az arteriolák fokozott vazokonstriktor és csökkent vazodilatátor érzékenysége még órákkal a reperfúzió után is megfigyelhető (Munshi és mtsai 2011, Basile és mtsai 2012, Zuk és mtsai 2016).

1.1.5.2 A tubulusok károsodása

Az iszkémia, valamint a következményes vazokonstrikció és érelzáródás az oxigenizáció csökkenésével a tubulussejtek károsodásához vezet. Az iszkémiára a vesekéregben és külső velőben található *proximális tubulus* és a *felszálló vastag szegmentum* a legérzékenyebbek, ugyanis normál körülmények között is itt a legalacsonyabb az oxigénellátottság, valamint az itt található, a tubulus működésében kulcsfontosságú ioncsatorna, a Na^+/K^+ATPáz (NKA) működése is igen energiaigényes.

Az **NKA** egy olyan transzmembrán fehérje, mely minden sejten megtalálható, a vese tubulus sejtjeiben kizárólag a bazolaterális membránon fordul elő. Az apikális membránon lévő egyéb transzportmolekulákkal együttműködve fontos szerepe van a vizelet mennyiségének és összetételének biztosításában. Az enzim 3 Na^+-iont juttat ki a sejtből az extracelluláris térbe és 2 K^+-iont pumpál be az intracelluláris térbe aktív módon, a koncentráció grádiens ellenében, egy ATP felhasználásával. Így az elektrokémiai grádienst is módosítja, létrehozva a nyugalmi membránpotenciált. A sejten belüli alacsony Na^+-koncentráció teszi lehetővé a hozzá kapcsolt, ún. másodlagos transzportfolyamatokat (pl. glükóz, aminosavak). Az ionkoncentráció befolyásolja a sejt volumenét is, így az NKA közvetetten a sejt méretére is hatással van (Fonyó 1997).

A károsodás miatt létrejött ATP-hiány, a bazolaterális membrán szétesése, a ROS toxikus hatása következtében az NKA működése leáll, az intracelluláris tér Na^+-koncentrációja emelkedik, melyet vízbeáramlás is követ, a *sejt megduzzad*. Emellett az emelkedett Na^+-szint a Na^+/Ca^{2+}-csatorna aktiválásához vezet, melynek következtében emelkedik az intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció is (Kher és mtsai 2005). Az NKA-hoz kapcsolt másodlagos transzportfolyamatok szintén leállnak, a tubulus funkciója károsodik.

Iszkémiás hatásra az NKA a bazolaterális membránról a citoplazmába történő áthelyeződését és ezáltal deaktiválódását többen, köztük munkacsoportunk is bizonyította (Alejandro és mtsai 1995, Fekete és mtsai 2004, Park és mtsai 2005, Kher és mtsai 2005).

A tubulussejtről eltűnik a kefeszegély, **a sejt sérült polaritása és integritása** következtében a többi *adhéziós molekula és membrán fehérje lokalizációja is megváltozik*.

Oxigén hiányában az ATP-ből keletkező adenozin-difoszfát (ADP) és adenozin-monofoszfát (AMP) molekulák felszaporodnak, további metabolizmusuk során adenin és hipoxantin keletkezik. Aktiválódik a xantin-oxidáz enzim, mely oxigén segítségével a hipoxantint xantinná alakítja, miközben **ROS** képződik, további károsodásokat előidézve. A reperfúzió alatt rendelkezésre álló nagy mennyiségű oxigén hatására az enzim működése fokozódik, így a ROS termelődése is nő (Devarajan és mtsai 2005).

A sejtek **csökkent ATP** tartalma miatt a Ca^{2+}-ATPáz enzim működése is csökken, így *emelkedik az intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció*. Ez elősegíti a Ca^{2+}-függő proteázok és foszfolipázok aktiválódását, mely a membránok széttöredezését fokozza.

A sérült sejtek fehérje fragmentumai összecsapzódva a tubulus lumenébe jutnak, ahol a **tubulus elzáródásá**t és így az *intratubuláris nyomás emelkedését*, a GFR csökkenését eredményezik. A fragmentumok a vizeletben is megjelennek (Tamm-Horsfall fehérje), így az AKI markerének tekinthetők.

Emellett a csökkent sóvisszaszívás a proximális tubulusban *emelkedett Cl^--koncentrációt* eredményez a felszálló vastag szegmentumban, mely a **tubuloglomeruláris feedback-hatás** következtében *fokozza a vazokonstrikciót* az afferens arteriolákban, így tovább csökkenti a GFR-t.

A károsodott tubulus sejtek egy része nekrózison illetve apoptózison megy keresztül. Az **apoptózis** előre programozott folyamat, több endonukleáz enzim vesz részt benne (dezoxiribonukleinsav bontó enzim (DNAáz), endonukleáz G (EndoG), caspase rendszer), melyek aktiválásában különböző jelátviteli útvonalak ismertek. Aktiválódik az apoptózist indukáló faktor (AIF), tumor nekrózis faktor (TNF) család, a mitokondriális bcl-2 associated X-protein *(bax*) gén, citokróm-C, de az apoptózist egyes inflammatórikus faktorok is beindíthatják (Basile és mtsai 2012).

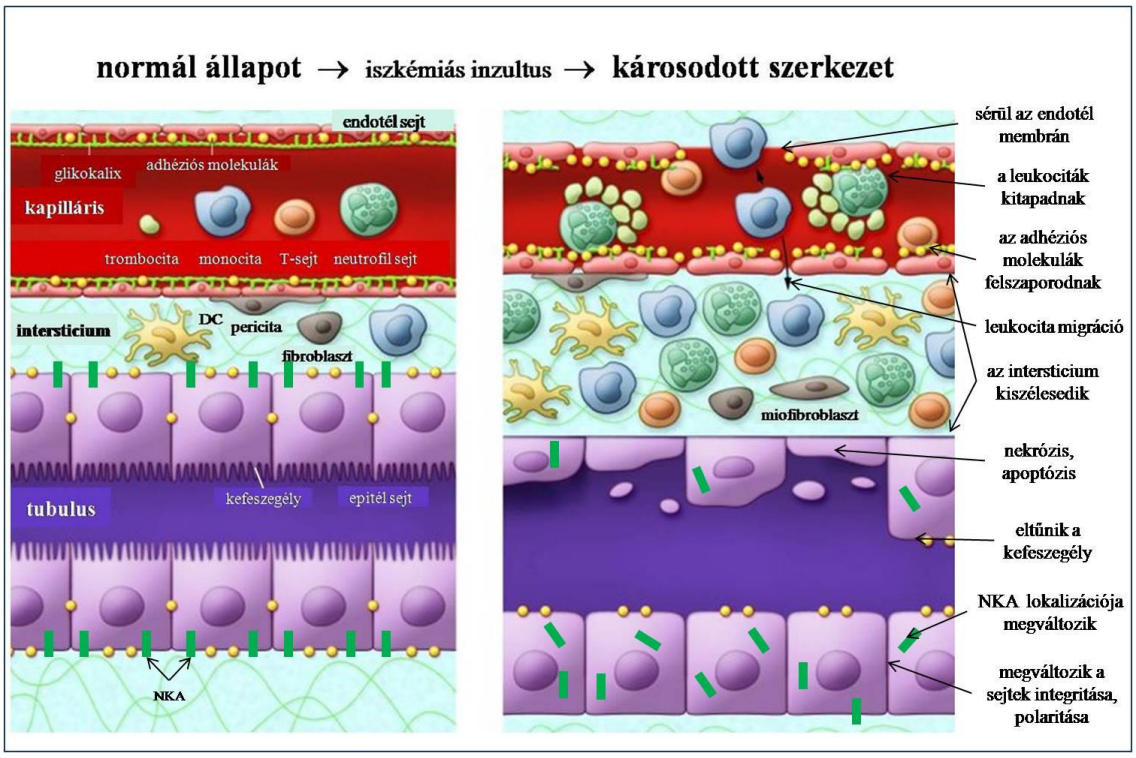
1.1.5.3 Inflammatórikus folyamatok

A szövetkárosodásban fontos szerepe van a gyulladásos folyamatoknak is. Az **erek**ben a leukocita-endotél interakció következtében elsőként a veleszületett immunválasz aktiválódik, számos proinflammatorikus citokin és vazoaktív mediátor (intracelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule (VCAM), interleukin-1 (IL-1), -18 (IL-18)) felszabadul, valamint eleinte neutrofil és makrofág, később T-limfocita infiltráció figyelhető meg. A leukociták kitapadnak az endotélhez, majd az intersticiumba migrálnak. A károsodott membránon sérülnek az ion- és víz transzport folyamatok is, az **intersticium** megduzzad, mely súlyosbítja a kapillárisok átmérőjének csökkenését. Az intersticiális térben található fibroblasztok egy része a károsodás következtében felszabadult egyes mediátorok (pl. interleukin-10 (IL-10) hatására miofibroblasztokká alakulnak át, mely a vesefibrózis, a krónikus károsodás kialakulásának része (Bonventre 2008, Bonventre és mtsai 2011).

Az aktivált leukocitákból és epiteliális sejtekből ROS szabadul fel, mely elősegíti a tubulus sejtek apoptózisát, nekrózisát.

Az érintett **tubulus sejtek** szintén proinflammatórikus és vazoaktív mediátorokat szabadítanak fel (TNF-α, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-8 (IL-8), interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), transforming growth factor-beta (TGF-β)), elősegítve a gyulladásos reakciót.

A károsodások folyamatát a kiserekben és a tubulusban a **2. ábra** foglalja össze.



2. ábra Iszkémiás károsodás okozta változások a kapillárisokban és a tubulusokban A normál epitél és endotél membránt keskeny intersticiális réteg választja el egymástól. Iszkémiás inzultusra az endotél sérül, adhéziós molekulák szaporodnak fel, melyek fokozzák a leukocita-endotél interakciót. A leukociták kitapadnak illetve az intersticiumba migrálnak. A károsodott membránon sérülnek az ion- és víz transzport folyamatok, az intersticium megduzzad. A fibroblasztok egy része miofibroblaszttá alakul át. A tubulussejtek károsodását a kefeszegély eltűnése, a sejtek polaritásának megváltozása, a Na^+/K^+-ATPáz enzim citoplazmába történő transzlokációja mutatja. A sejtek egy részén nekrózis/apoptózis megy végbe. (DC: dendritikus sejt, NKA: Na^+/K^+-ATPáz) (Bonventre és mtsai 2011 ábrája alapján módosítva)

1.1.5.4 Regeneráció, védő faktorok

A károsodás megállításában, a helyreállításban szintén számos tényező vesz részt, a pontos hatásmechanizmus azonban sok esetben még nem ismert. A hatások egy része az apoptózis gátlására, más részük a vazokonstrikció csökkentésére, a toxikus metabolitok közömbösítésére, míg továbbiak a károsodott fehérjék megkötésére, helyreállítására, végül némelyek a gyulladásos folyamatok csökkentésére irányulnak. Számos molekula több folyamatot is befolyásol, hatásuk szerteágazó. A továbbiakban csak néhány ismertebb faktor kerül rövid ismertetésre, melyek egy része az értekezés kutatási témájában szerepel.

Az **endoplazmatikus retikulum** (ER) fontos központja a sejt inzultusra adott válaszának. A stressz hatására beinduló fehérje stabilizáló és -bontó folyamatok („unfolded protein response") három fő útvonal aktiválásával jönnek létre. A *protein kinase RNS-like endoplasmic reticulum kinase* (*PKRK*) gyorsan aktiválódva megakadályozza további sérült fehérjék képződését. Az *inositol requiring enzyme 1* (*IRE1*) aktiválja az xbox binding protein 1 (XBP1) transzkripciós fehérjét, mely különböző stressz gének aktivációját végzi a sejtmagban. Az *aktiváló transzkripciós faktor 6* (*ATF6*) aktiválódását követően szintén egyes stressz gének transzkripciójáért felelős (Mori és mtsai 2013). Amennyiben a stressz túl nagy károsodást okozott, az ER-ben beinduló folyamatok a sejt apoptózisát készítik elő.

Inzultus hatására a szerin/treonin kináz családba tartozó mitogén aktivált protein kináz (**MAPK**) család indukciója figyelhető meg. Ide tartozik az extracellular regulated kinase (ERK), a c-Jun N-terminal kinase (JNK) és a p38. Ezek a vesén belül is eltérő mennyiségben fordulnak elő, számos hatás befolyásolja aktivációjukat. Expressziójuk egyensúlya határozza meg az apoptózis kialakulását. Feltehetően az ERK aktiválása antiapoptotikus, míg a JNK aktiválása inkább apoptotikus hatásokat vált ki.

Szintén a szerin/treonin kináz családba tartozik az **Akt**, melynek aktiválódását I/R inzultusra többen kimutatták. Foszforiláció révén aktiválódik, melyben az inozitol-trifoszfát (IP3) jelátviteli útvonal központi szerepet játszik. Aktiválódva a citoplazmából a sejtmagba kerül, ahol több fehérje foszforilációjával aktiválja azokat (Kher és mtsai 2005). Egyik legfontosabb eddig ismert szerepe a sejt apoptózisának gátlása, többek között a caspase-9 valamint a Bcl-XL/Bcl-2 associated death promoter (BAD) foszforilációja révén (Kher és mtsai 2005, Basile és mtsai 2012).

Munkacsoportunk kimutatta, hogy az Akt aktivációját a sejt különböző stressz faktorain kívül az IP3 foszforilációja révén az eritropoietin (**EPO**) is fokozza, többek között e módon váltva ki ismert antiapoptotikus hatását (Rusai és mtsai 2010). Emellett az EPO fokozta a HSP-72 és az NKA szintézisét, valamint az NKA stabilitását is (Prokai és mtsai 2011).

Az **NO** vazodilatátor hatású, valamint gátolja a leukocita-endotél adhéziót, trombocita aggregációt (Basile és mtsai 2012, Förstermann és mtsai 2012, Zuk és mtsai 2016). A renin szekréció gátlásán keresztül csökkenti a vérnyomást, fokozza a Na^+-kiválasztást és a diurézist (Zou és mtsai 1999). Keletkezéséhez az NO szintáz (NOS) aktiválása szükséges, melynek három izoformája ismert: eNOS, neuronális (nNOS) és indukálható (iNOS) formák. Az eNOS és nNOS Ca^{2+}-függő, míg az iNOS Ca^{2+}-független. A vesében mindhárom NOS izoforma expresszálódik, eltérő mennyiségben és lokalizációval (Sharma és mtsai 2004). A NOS inaktív állapotban a hősokk fehérje-90-hez (HSP-90) kötve van jelen a citoplazmában. A NOS aktiválásában az Akt jelátviteli útvonalnak fontos szerepe van, melynek hatására a HSP-90-ről leválik, foszforilálódik (Chambliss és mtsai 2002, Kher és mtsai 2005).

Az **adenozin** hipoxia, iszkémia vagy gyulladás hatására termelődik, és számos különböző folyamatot indukál az adenozin receptorokon keresztül. Ezek a sejt túlélését segítik, így pl. a mitokondriális K^+-csatorna serkentésével csökkenti az intracelluláris Ca^{2+}-szintet, gátolja a neutrofil sejtek aktiválódását és a citokin termelést, valamint vazodilatátor hatású (Kher és mtsai 2005).

A sejt károsodására a sejten belül egyes transzkripciós faktorok gyors aktivációja figyelhető meg, melyek a sejt helyreállító folyamatait indítják el. Ilyen faktorok a hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) valamint a hősokk faktor-1 (HSF-1). A **HIF-1** felelős az angiogenezis, eritropoezis és az anaerob energiametabolizmus beindulását segítő gének aktiválásáért, míg a **HSF-1** a hősokk válasz aktiválását végzi (részletesen lásd *1.3 fejezet*). A HIF-1 aktivációját inkább a sejt hipoxiája, míg a HSF-1 aktiválását az ATP hiánya váltja ki (Eickelberg és mtsai 2002, Munshi és mtsai 2011, Basile és mtsai 2012).

A **szuperoxid dizmutáz** szintén a ROS által képződött lipid peroxidok és hidrogén-peroxid bontásával védi a sejtet a károsodástól (Kim és mtsai 2006).

Az **NGAL** egy intracelluláris vaskötő fehérje, elsőként neutrofil sejteken azonosították. Szerepet játszik a bakteriális fertőzésekkel szembeni védelemben. Számos egyéb sejtben is kimutatták, termelődése egyes daganatsejtekben fokozott. Szintézise az epitél sejtekben

iszkémiás vagy toxikus inzultust követően jelentősen emelkedik, fontos szerepe van a regenerációban a proliferáció serkentése, valamint az apoptózis gátlása révén. Egyúttal a vesekárosodás szenzitív és specifikus biomarkere (lásd *1.1.4 fejezet*) (Devarajan és mtsai 2010).

1.1.6 Terápia

Az AKI mielőbbi felismerését követően a károsodás minimalizálása érdekében legfontosabb tényező a *hemodinamikai státusz* valamint a vérnyomás stabilizálása, mely az autoregulációját vesztett vese keringését egyensúlyban tartja. Ez vazoaktív gyógyszerek és folyadék körültekintő adását teszi szükségessé. Emellett a károsodott vesefunkció miatt kialakuló *hiperkalémia és metabolikus acidózis* kivédése, kezelése szükséges. A beteg *energiabevitel*ét szintén optimalizálni kell, a csökkentett fehérjebevitellel kitolható a vesepótló kezelés szükségessé válásának ideje. Nagy hangsúlyt kell fektetni az *infekció* kivédésére, a *gyulladásos reakciók* csökkentésére is, mert ezek a mortalitás vezető okai (Schrier és mtsai 2004).

Számos, a károsodás patofiziológiai történéseiben résztvevő faktor terápiás használata felmerült, melyek alkalmazásával folyamatosan zajlanak kutatások. Így például a regeneráció elősegítésére növekedési faktorok (pl. insulin-like growth factor-1 (IGF-1)) valamint EPO adása jön szóba. Az adenozin receptor antagonista teofillin a tubuloglomeruláris feedback hatás gátlásán keresztül fejti ki hatását (KDIGO 2012).

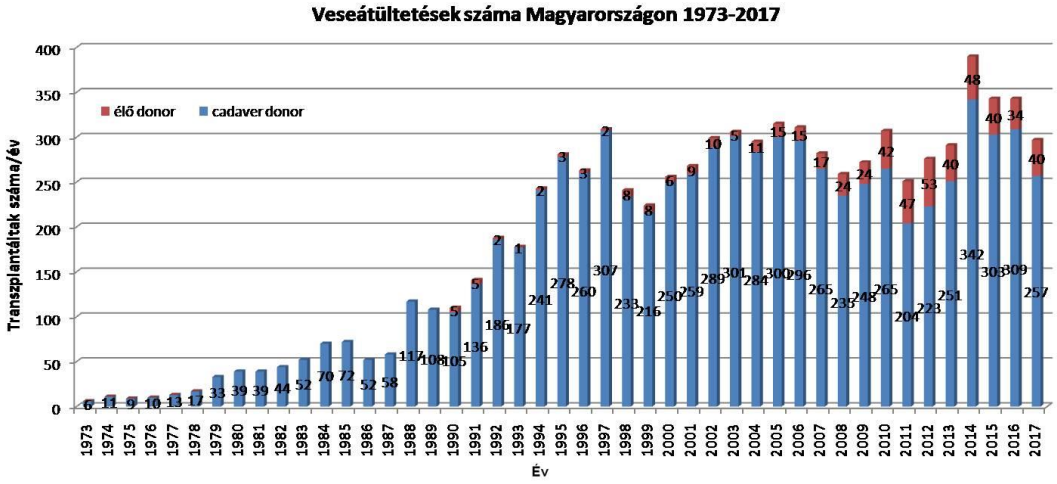
1.2 Vesetranszplantáció

A veseelégtelenség kialakulása, tartós fennállása esetén átmenetileg vagy végleg *vesepótló kezelés* bevezetése szükséges. Jelenleg a világon körülbelül 3 millió ember részesül vesepótló kezelésben, de ez 2030-ra várhatóan 5 és 10 millió közé emelkedik (Peters és mtsai 2018).

A vesepótló kezelés a dialízis különböző formáit valamint a vesetranszplantációt jelenti. Bár a dialízis valamely formája a betegek többségénél használható, vesetranszplantációra csak mintegy 15-20%-uk alkalmas (Kulcsár 2014).

Mivel az ESRD-ben szenvedők száma rohamosan emelkedik, érthető, hogy a *vesetranszplantáció* igény is folyamatosan nő. A donorok száma azonban lényegesen nem változott az elmúlt években, így a transzplantációk száma csak mérsékeltebb növekedést mutat (kb. évi 3%) (USRDS 2017).

Magyarországon a vesetranszplantációk száma évente 300-400 között van, alakulását az elmúlt évtizedekben a **3. ábra** mutatja (OVSZ 2018).



3. ábra Vesetranszplantációk száma Magyarországon 1973-2017-ig (az Országos Vérellátó Szolgálat (OVSZ), Szervkoordinációs Iroda adatai alapján (www.ovsz.hu/oco))

Az átültetett vese hosszútávú túlélése és funkciója több faktoron múlik, melyeket alloantigén-függő (pl. humán leukocita antigén (HLA) kompatibilitás) és alloantigén-független (pl. donor vese állapota, átültetés sebészi kivitelezése) csoportokra oszthatunk (Cavaillé és mtsai 2013, Legendre és mtsai 2014). Az alloantigén-független okok között jelentős a vese szállítás alatti (hideg-iszkémiás) valamint az átültetéskor elszenvedett (meleg-iszkémiás) I/R károsodása. A transzplantáció után közvetlenül a graft késlekedő funkciója (delayed graft function, DGF) az átültetések 10-50%-ában jelen van, mely döntően az I/R károsodásnak tudható be és befolyásolja a vese hosszútávú túlélését is (Mehta és mtsai 2002, Schrier és mtsai 2004, Legendre és mtsai 2014, Aufhauser és mtsai 2016). Számos kutatás tárgya ennek az előre látható károsodásnak a kivédése akár a donor, a recipiens vagy a szerv kezelésével.

Az *élődonoros transzplantáció*val, annak számos előnye mellett a hideg iszkémiás idő is minimálisra csökkenthető. Jótékony hatását tükrözi, hogy a DGF előfordulása élő donor

esetén 10% körül van, míg egyes kadaver donorok esetében eléri az 50%-ot (Legendre és mtsai 2014). Minden országban törekednek az élődonoros átültetések arányának növelésére, ez az USA-ban eléri az összes átültetés kb. 1/3-át, Magyarországon 12% körül van (USRDS 2017, OVSZ 2017).

A graft szállítás alatti túlélése speciális összetételű *prezervációs folyadék*kal javítható, mellyel a szervet a donorból való eltávolításkor perfundálják. Emellett jótékony hatású a szerv *alacsony hőmérsékleten,* 4 ˚C-on tartása, mivel így a sejtmetabolizmus 58%-kal csökken (Catena és mtsai 2013). Ilyen módon a vese a beültetés előtt 24-35 órán át életképes maradhat. Többféle prezervációs folyadék van használatban a világon, a legelterjedtebb a University of Wisconsin (UW) és a hisztidin-triptophan-ketoglutarát (HTK), az újabbak ezek előnyeit kombinálják. A két oldat eddig ismert összehasonlító vizsgálataival nem találtak lényeges különbséget a vese túlélése szempontjából (Cavaillé és mtsai 2013).

Folyamatosan jelennek meg újabb közlemények különböző támadáspontú *szerek* prezervációs folyadékba adásáról (pl. cyclosporin, anti-ICAM-1, thymoglobulin, IGF-1, EPO-beta), melyek a graft I/R károsodását csökkentik (Cavaillé és mtsai 2013).

Szintén ígéretes lehetőség a *perfúziós pumpa* használata, mellyel a szállítás alatt a grafton folyamatosan áramlik keresztül a hideg perfúziós oldat, így a sejtekben keletkező toxikus metabolikus termékek kimosódnak (Catena és mtsai 2013).

Összességében a vesetranszplantáció utáni 5 illetve 10 éves graft-túlélés Európában 67% illetve 43%, így bármely befolyásoló tényező kutatása, befolyásolása, mellyel a túlélés javítható, hasznos lehet (Legendre és mtsai 2014).

1.3 A hősokk fehérjék

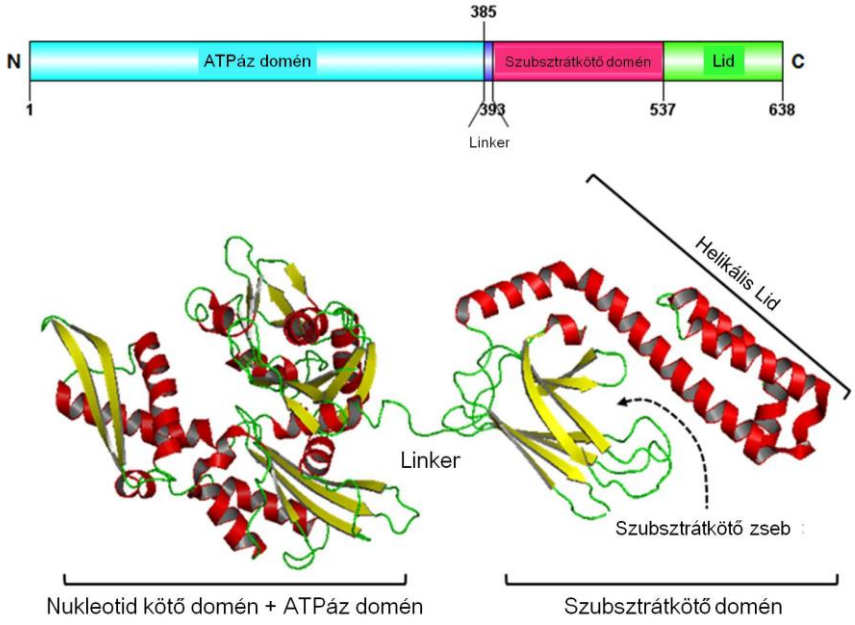
Jelen értekezés egyik fő témája a hősokk fehérjék (heat shock protein, HSP) vese I/R károsodásában, valamint a nemi különbségek kialakulásában betöltött szerepének vizsgálata, ezért szerkezetük, működésük részletesebben bemutatásra kerül.

A HSP-k az összes fajban univerzálisan előfordulnak, a chaperon (gardedám) fehérjék családjába tartoznak. Egyes csoportjaik a sejt normál állapotában is jelen vannak az ER-ben, azonban sokuk stressz hatására termelődik/aktiválódik, védelmet nyújtva ezzel a sejt működésében, struktúrájában fontos szerepet játszó molekuláknak. Működésük szinte

minden esetben ATP-hez kötött, szabályozásuk is sokszor az ATP-n keresztül valósul meg (Smoyer és mtsai 2000, Mayer és mtsai 2005).

A hősokk válasz központi regulátora a **HSF-1**, mely alaphelyzetben a citoszolban van jelen HSP-90-hez kötve. Stressz hatására a sejtmagba vándorol és beindítja a HSP-k transzkripcióját (Eickelberg és mtsai 2002, Basile és mtsai 2012). A HSF-1 aktivációjában az Akt is szerepet játszik (Carpenter és mtsai 2015).

A 70 kDa molekulasúlyú HSP-k közé tartozik a HSPA család, melynek ismert tagja a hősokk fehérje A-1A (HSPA-1A), másnéven a hősokk fehérje-70 (HSP-70) (humán) vagy **HSP-72** (rágcsáló). Hatását az I/R károsodás mérséklésében többen bizonyították (Marber és mtsai 1995, Prokai és mtsai 2011). Fontos szerepe az aggregált fehérjékhez való kötődés, majd funkciójuk és fiziológiás lokalizációjuk, így a sejtstruktúra és -polaritás visszaállítása (Mayer és mtsai 2005, Basile és mtsai 2012). A plazmamembránban és a citoszolban is megtalálható, egyes fehérjék transzmembrán transzportját is segíti. Szerkezetét a **4. ábra** mutatja be.



4. ábra A hősokk fehérje-70 (HSP-70) szerkezete (Molecular Chaperone Lab, Heat Shock Protein Information Resource módosított ábrája (http://pdslab.biochem.iisc.ernet.in))

Az egyik legfontosabb szerepe vese I/R károsodást követően az NKA-hoz való kötődés, melyet többen kimutattak (Aufricht és mtsai 1998, VanWhy és mtsai 1998, Bidmon és mtsai 2002, Riordan és mtsai 2005, Basile és mtsai 2012), kolokalizációját NKA-val a bazális membránban

munkacsoportunk is igazolta (Fekete és mtsai 2006). A HSP-70 családnak emellett antioxidáns szerepe is ismert a glutation-peroxidáz és a glutation-reduktáz aktivitásának fokozása révén (Basile és mtsai 2012).

A hősokk fehérje-27 **(HSP-27)** a kis molekulasúlyú HSP-k családjába tartozik, újabb terminológia szerint HSP-béta-1 (HSPB1) megnevezése használatos, mely fajtól függően a hősokk fehérje-25 (HSP-25) (rágcsáló), HSP-27 (humán) ill. hősokk fehérje-28 (HSP-28) proteineket foglalja magába. Szerkezete nagyon hasonló az elsőként a szemlencsében kimutatott α-crystallinhoz (**5. ábra**).

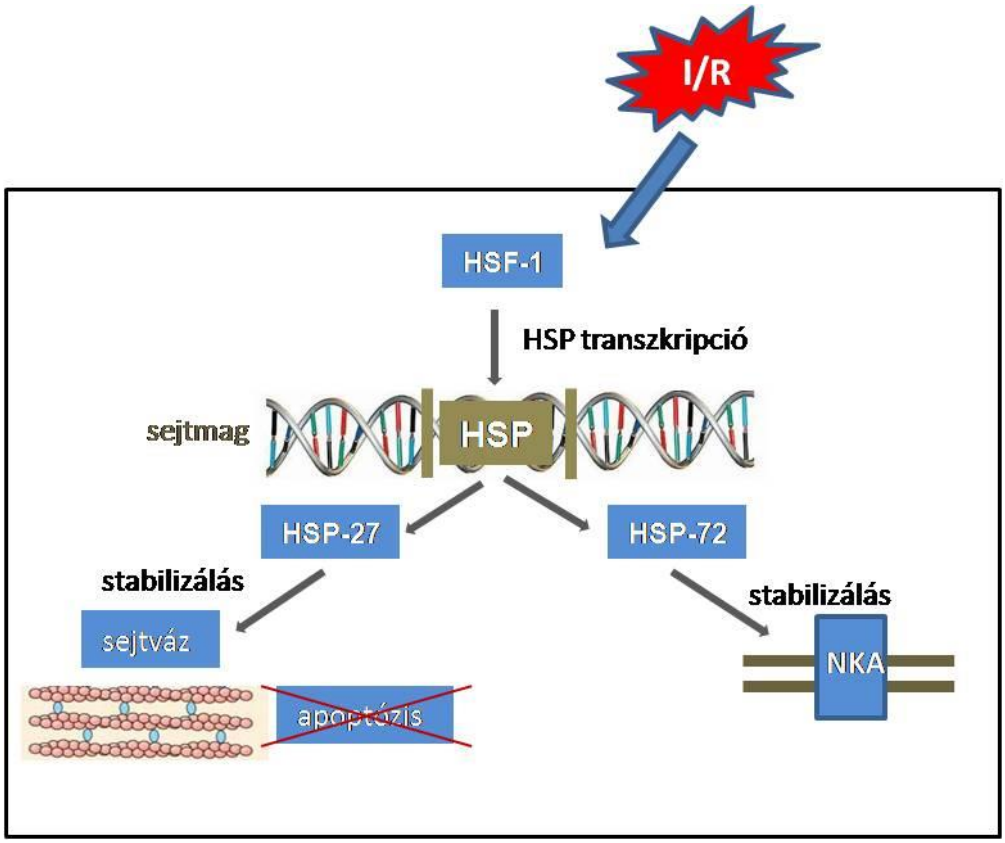
5. ábra A hősokk fehérje-27 (HSP-27) szerkezete (Acunso és mtsai 2012 módosított ábrája alapján)

Lényegében egy aktin-specifikus chaperon, melynek szerepe van a sejt felépítésében, migrációjában, növekedésében, differenciálódásában, túlélésében, a messenger (hírvivő) ribonukleinsav (mRNS) stabilizálásában és a tumor progresszióban. A szervezet szinte minden sejtjében detektálható, de legmagasabb koncentrációban az izmokban (váz-, szív- és simaizom) fordul elő. Egyes kórállapotokban, mint a szívbetegségek, vese I/R károsodása vagy a 2-es típusú diabétesz magasabb szintje mérhető. Számos stimulus befolyásolja expresszálódását, oligo-dimer átalakulását és foszforilációját.

Normál állapotban a vese kortexben és a medullában is egyaránt kimutatható, azonban I/R stressz hatására egy vizsgálatban jelentősen emelkedett mennyiségét mérték a külső velőben és a kéregben, immunfluoreszcens mikroszkópos vizsgálattal döntően a proximális tubulusokban expresszálódott (Smoyer és mtsai 2000). Elsősorban a ROS-sal, hipoxiával és ozmotikus stresszel szemben bizonyult protektív hatásúnak. Stabilizálja a mikrofilamentumokat és csökkenti a membránlipid szétesését, így a tubulus sejtekben stabilizálja az NKA-t. A caspase rendszer gátlása révén elsődleges szerepe van az apoptózis megelőzésében is (Mymrikov és mtsai 2011, Mahgoub és mtsai 2017). Kimutatták

továbbá, hogy gátolja egyes proinflammatórikus faktorok (TNF-α, macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)) felszabadulását is, és így csökkenti a neutrofil granulocita infiltrációt (Park és mtsai 2009, Kim és mtsai 2010).

Az általunk vizsgált két hősokk fehérje aktiválódását és a vesében betöltött, általunk vizsgált szerepét szemlélteti az **6. ábra**.



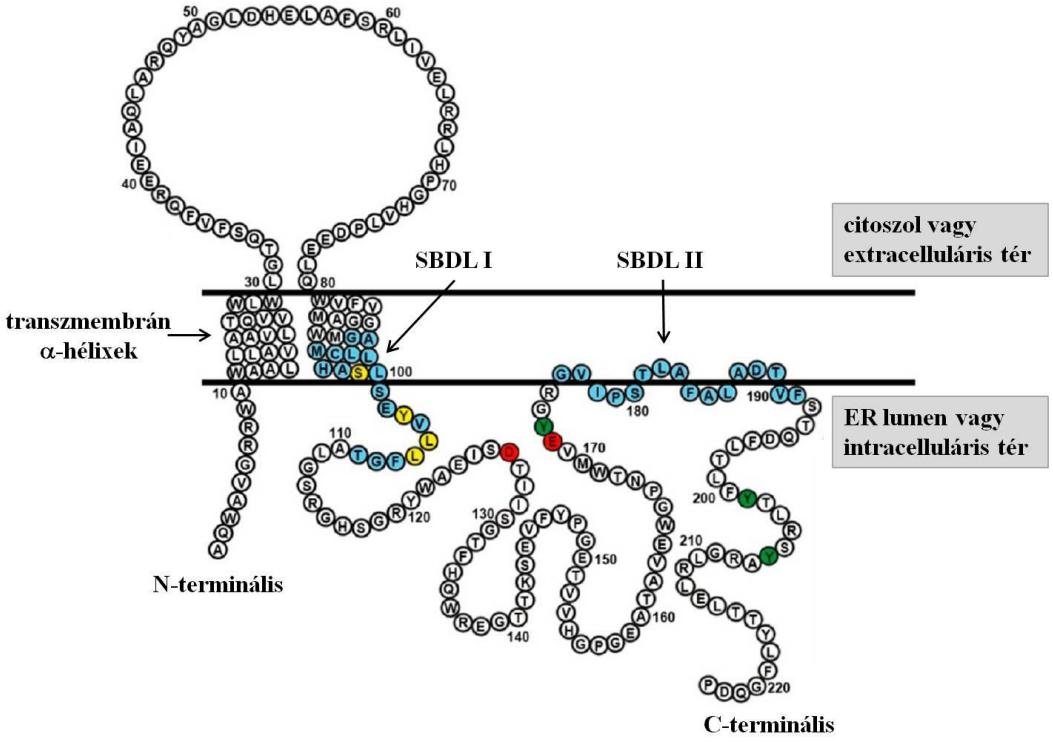
6. ábra A hősokk fehérjék aktivációja és szerepe a sejt stressz reakciójában (I/R: iszkémia/reperfúziós hatás, HSF-1: hősokk faktor-1, HSP: hősokk fehérje, NKA: Na^+-K^+-ATPáz)

1.4 A sigma-1 receptor (S1R)

A sigma receptor a kis molekulasúlyú (24 kDa) chaperon transzmembrán fehérjékhez tartozó, 223 aminosavból álló polipeptid, mely az utóbbi években több kutatás központjába került, újabb vélemények szerint a HSP-k csoportjába tartozik (Hayashi és mtsai 2011, Ortega-Rodlan és mtsai 2015, Chu és mtsai 2016). Két altípusa ismert, 1-es és 2-es,

melyek szöveti specificitása, ligandkötő profilja eltérő (Hayashi és mtsai 2011, Brune és mtsai 2013).

A továbbiakban csak a kutatásunkban résztvevő **S1R** kerül részletesebben ismertetésre. **Szerkezet**ében két hidrofób α-hélix alkotja a transzmembrán részt, és mind az N-, mind a C-terminális vég az ER-ben van. A C-terminálishoz kötik a chaperon funkciót (Ortega-Rodlan és mtsai 2015). Döntően az ER-ben helyezkedik el, stimulus hatására helyeződik át a citoszolba vagy a sejtmembránra, sejtmagba (Hayashi és mtsai 2003, Hayashi és mtsai 2011). Szoros kapcsolata a mitokondriummal annak befolyásolását is feltételezi (Hayashi és mtsai 2011). A S1R szerkezetét a **7. ábra** mutatja be.



7. ábra A sigma-1 receptor aminosav szekvenciája A színek a különböző ligandkötő helyeket jelölik *(kék*: szteroid kötő domének (steroid binding domain like (SBDL I és II), *zöld*: koleszterol, *piros*: haloperidol - antagonista, *sárga*: N,N-dipropil-2-[4-methoxy-3-(2-fenilethoxy)-fenil]-thylamin-monohidroklorid (NE-100) - antagonista) (ER: endoplazmatikus retikulum) (Brune és mtsai 2013 módosított ábrája)

Számos endogén és exogén, agonista és antgonista hatású ligandja ismert, melyek feltehetően a receptor eltérő pontjaihoz kötődnek, így eltérő útvonalakat befolyásolnak, hatása szerteágazó (Wilbert-Lampen és mtsai 2005, Ortega-Roldan és mtsai 2015, Chu és mtsai 2016). Legismertebb agonista és antagonista hatású ligandjait az **1. táblázat** foglalja össze.

1. táblázat A sigma-1 receptor legismertebb ligandjai, receptor affinitásuk, hatásuk (Ki/Kd értékek: +++ <50 nM; ++ <500 nM; + <10 μM; Ki: inhibitor konstans, Kd: disszociációs konstans, NE-100: N,N-dipropil-2-[4-methoxy-3-(2-fenilethoxy)-fenil]-thylamin-monohidroklorid, DHEA: dehidroepiandroszteron) (Cobos és mtsai 2008 alapján módosítva)

Ligand	Affinitás erőssége	Hatás
Benzomorfanok:		
Pentazocin	+++	Agonista
Antipszichotikumok:		
Chlorpromazin	++	?
Haloperidol	+++	Antagonista
Nemonaprid	+++	?
Köhögés csillapítók:		
Carbetapentán	+++	Agonista
Dextromethorfan	++	Agonista
Alzheimer kór/Parkinson kór gyógyszerei:		
Amantadin	+	Agonista
Donepezil	+++	Agonista
Antikonvulzív szerek:		
Phenytoin	-	Modulátor
Ropizin	-	Modulátor

Ligand	Affinitás erőssége	Hatás
Antidepresszánsok:		
Clorgylin	+++	Agonista
Fluoxetin	+	Agonista
Fluvoxamin	+++	Agonista
Imipramin	++	Agonista
Sertralin	++	Agonista
Drogok:		
Kokain	+	Agonista
Metamphetamin	+	?
Endogén szteroidok:		
DHEA	+	Agonista
Progeszteron	+	Antagonista
Egyéb:		
NE-100	+++	Antagonista
SA-4503	+++	Agonista

Előfordulása több szervben ismert. Legnagyobb mennyiségben a *központi idegrendszer*ben található meg (Mavlyutov és mtsai 2010), így számos vizsgálat foglalkozott már szerepével a drog- és alkohol addikcióban (Martin-Fardon és mtsai 2007), a tanulásban, a memóriában (Maurice és mtsai 2001), a skizofréniában (Hayashi és mtsai 2011, Chu és mtsai 2016) és a depresszióban (Narita és mtsai 1996, Rogoz és mtsai 2002, Lucas és mtsai 2008). Az SSRI típusú antidepresszánsok egy része (fluvoxamin (Flu), sertralin) nagy affinitással kötődik

az S1R-hez is, így szerepét feltételezik a gyógyszerek antidepresszáns hatásának kifejtésében is (Narita és mtsai 1996).

Szabályozása több módon is megvalósulhat. Inaktív állapotban egy másik chaperonhoz, a binding immunglobulin proteinhez (BiP) (HSP70-5) kötve van, agonistái a BiP-ről leválasztva aktiválják. Az ER-ben található Ca^{2+} erősíti az S1R-BiP kapcsolatot, míg IP3 hatására a Ca^{2+}-szint csökken, az S1R leválik a BiP-ről és aktiválódik. (Hayashi és mtsai 2007, Hayashi és mtsai 2011, Ortega-Rodlan és mtsai 2015). Többféle oligomer formában is jelen lehet, feltehetően a monomer vagy dimer alak az aktív, míg a tetramer, oktamer az inaktív formák (Chu és mtsai 2016).

Hatásai elsősorban a sejt károsodásának csökkentésére irányulnak. Protektív szerepét iszkémiás károsodásban már kimutatták agyban (Mavlyutov és mtsai 2010, Ajmo és mtsai 2006, Deplanque és mtsai 2011), retinában (Mavlyutov és mtsai 2015), szívben (Ela és mtsai 1994, Bhuiyan és mtsai 2011), májban (Hellewell és mtsai 1994, Klouz és mtsai 2008), petefészekben (Hayashi és mtsai 2011), valamint munkacsoportunk elsőként igazolta ezt a protektív hatást a *vesé*ben (Hosszu és mtsai 2017). Flu kezelés hatására *in vivo* jobb túlélést és mérsékeltebb vesekárosodást találtunk, továbbá megfigyeltük az S1R transzlokációját az ER-ből a citoszolba és a sejtmagba, valamint kimutattuk az NO-szint emelkedését feltehetően az S1R-Akt-NOS jelátviteli útvonal aktivációján keresztül (Hosszu és mtsai 2017).

Molekuláris hatásairól ismereteink még közel sem teljesek. Közvetlen vagy közvetett hatása van számos proteinre (pl. G-protein coupled receptor (GPCR)), ioncsatornára (Ca^{2+}-, Na^{+}-, K^{+}- és Cl^{-}-csatornákra (Soriani és mtsai 1999, Cheng és mtsai 2008, Cobos és mtsai 2008, Maurice és mtsai 2009, Ortega-Roldan és mtsai 2015, Chu és mtsai 2016)), lipidre. Segíti a sejt túlélését a mitokondriális Ca^{2+}-transzport helyreállításán és így az *ATP-termelés fokozásán* keresztül (Tagashira és mtsai 2014).

Szerepe van a *sejt túlélésé*ben az ER-ben található antiapoptotikus B-cell lymphoma-2 (*bcl-2*) gén stabilizálása (Yang és mtsai 2007, Meunier és mtsai 2010), és az apoptotikus hatású *bax* gén és caspase-3 proteinek gátlása (Tchedre és mtsai 2008) révén.

Javítja a sejt oxigén ellátottságát az *ET-1 gátlásán* (Wilbert-Lampen és mtsai 2005), valamint az *NO termelődés fokozásán* keresztül. Több vizsgálat igazolta, hogy hatását protein-kináz A-n, -C-n (Hayashi és mtsai 2011) valamint -B-n (Akt) keresztül is kifejtheti (Nakamo és mtsai 2010, Bhuiyan és mtsai 2010, Hosszu és mtsai 2017). Az Akt-eNOS jelátviteli útvonal aktiválásával serkenti az NO szintézist (Bhuiyan és mtsai 2010, Hosszu és mtsai 2017).

Szintén kimutatták, hogy az ER protein egyensúlyában szerepet játszó enzimek közül az IRE1 stabilizálásával részt vesz az IP3-Akt útvonal aktiválásában (Mori és mtsai 2013).
Részt vesz a *ROS képződés gátlásá*ban is, mely szintén beindíthat több jelátviteli útvonalat, valamint közvetlenül csökkenti a sejt károsodását (Yang és mtsai 2007, Tchedre és mtsai 2008, Meunier és mtsai 2010, Hayashi és mtsai 2011).
A T-sejtek proliferációjának gátlásával, immunmodulációval, valamint a proinflammatórikus citokinek szintjének csökkentése révén *gyulladásgátló* hatású (Ajmo és mtsai 2006, Taler és mtsai 2007).
A **2. táblázat harmadik oszlopa** (lásd az *1.5.2 fejezetben*) foglalja össze az S1R eddig megismert sejt stresszválaszt befolyásoló támadáspontjait a nemi hormonokkal párhuzamosan.

1.5 Nemi különbségek az iszkémiára adott válaszban

Számos iszkémiás kórképben, mint a szívinfarktus vagy a stroke a férfiak gyakrabban érintettek mint a nők, és ez a védelem a nőkben a menopauzát követően megszűnik.
A *szívizom* I/R károsodásában már számos vizsgálat kimutatta az ösztrogén és a progeszteron protektív szerepét (Zhai és mtsai 2000, Knowlton és mtsai 2001, Wang és mtsai 2008).
A férfiaknál a *stroke* előfordulása gyakoribb időskorig, de 65 év felett a nőknél emelkedik a gyakorisága. Állatmodellben az ovariektómia megszüntette a nőstények védelmét, feltételezve a női hormonok szerepét a különbség hátterében (Manwani és mtsai 2011). *Máj* I/R inzultusában szintén ösztrogénfüggő protektív hatást mutattak ki (Harada és mtsai 2003).
A *lép* I/R károsodásakor is megfigyelték az ösztrogén védő szerepét (Squadrito és mtsai 1997). A nemi különbség a *vese* vonatkozásában is észlelhető.

1.5.1 Nemi különbségek a vesében

A vese *anatómiai felépítése* a két nemben eltérő. A nők veséjében több glomerulus van, magasabb a renovaszkuláris ellenállás, alacsonyabb az abszolút GFR és a vese plazmaáramlása. Sejtszinten is észlelhető differencia: a férfiak proximális tubulus sejtjeiben nagyobbak a mitokondriumok, több a lizoszóma és a riboszóma. Ösztrogén- és androgén receptor mindkét nemben megtalálható a sejtekben. Állatmodellben ezek az

eltérések ovariektómiát/kasztrációt követően részben megváltoznak, feltételezve a nemi horomonok hatását a kialakulásukban (Hutchens és mtsai 2008).

A női nem számos *vesebetegség*ben védő faktornak számít, mely protektív hatás a menopauzát követően megszűnik. Az AKI kimenetele is jobb nőkben (Mehta és mtsai 2002, Kher és mtsai 2005). A kor előrehaladtával egészségesekben is megfigyelhető vesefunkció beszűkülés kisebb mértékű nőkben a férfiakhoz képest (Berg és mtsai 2006). Számos krónikus veseelégtelenséghez vezető kórállapot, így a membranózus glomerulonefritisz, a fokális-szegmentális glomeruloszklerózis, a szisztémás lupusz valamint az 1-es típusú diabétesz veseszövődménye kapcsán lassabb progressziót írtak le nőkben a férfiakhoz viszonyítva (Kher és mtsai 2005, Kummer és mtsai 2012).

A *transzplantáció*t követő graft túlélés nemi különbsége ellentmondásos, mely feltehetően számos faktor együttes hatása miatt jön létre. Gyermek transzplantáltak vizsgálatakor a lányok hosszútávú graft túlélését rosszabbnak találták (Keith és mtsai 2006, Foster és mtsai 2011), míg mások az életkort nem vizsgálva nem találtak különbséget (Meier-Kriesche és mtsai 2001). Gratwohl *és mtsai* a nők transzplantációt követő kimenetelét valamivel jobbnak írták le (Gratwohl és mtsai 2008), valamint munkacsoportunk is a krónikus allograft rejekció ritkább előfordulását figyelte meg nők veseátültetése esetén (Müller és mtsai 1999, Zeier és mtsai 2002, Hutchens és mtsai 2008). A legfontosabb faktorok, melyek a graft *hosszútávú* túlélésének a nemi különbségében szerepet játszhatnak:

- a nők erősebb immunreakciója,
- az Y-kromoszómán lévő minor hisztokompatibilitási antigénekre (H-Y antigének) adott reakció férfi donor - női recipiens esetén,
- a nők kisebb testméretéből adódó relatív csökkent metabolikus graft terhelés,
- férfi donor esetén a nagyobb graft méretből adódó magasabb nefronszám, valamint
- az immunszupresszív gyógyszerek nem-függő eltérő adhéziója (Lepeytre és mtsai 2017).

Ezen faktorok adott életkorban különböző mértékben vannak jelen, így a transzplantáció utáni hosszútávú kimenetel is kortól függően eltérő lehet a nemek között (Lepeytre és mtsai 2017). Ezzel szemben *a korai* kimenetel, melyet a DGF előfordulása jelez, a vesét a beültetés során érő I/R károsodást mutatja meg, mely nőkben egyértelműen ritkábban fordul elő (Aufhauser és mtsai 2016). Jelentőségét a rejekcióra valamint graft túlélésére gyakorolt hosszútávú hatása adja (Siedlecki és mtsai 2011).

1.5.2 Nemi hormonok szerepe az I/R károsodásban

Szintén számos vizsgálat bizonyította már a vese I/R károsodásában tapasztalható nemi különbséget (Hu és mtsai 2009). Egy részük a *női hormonok* (17β-ösztradiol, progeszteron) szerepét feltételezi a protektív hatás kialakításában (Satake és mtsai 2007, Hutchens és mtsai 2012, Tanaka és mtsai 2012, Hutchens és mtsai 2014, Aufhauser és mtsai 2016), míg mások a *tesztoszteron* negatív hatását helyezik előtérbe. Park *és mtsai* tesztoszteron adására nőstényben, ovariektomizált (ovx) nőstényben és kasztrált hímben súlyosabb vesekárosodást találtak (Park és mtsai 2004). Aufhauser *és mtsai* nőstény egerek jobb I/R toleranciáját mutatták ki, melyet az ovariektómia csökkentett, a hímek kasztrációja javított. Emellett transzplantációs modellen a hím recipiensek súlyosabb I/R okozta károsodását találták nőstény donor esetén is, mely a hormonális környezet hatását bizonyítja a vesén található eltérésekkel szemben. Ösztrogén receptor hiányos nőstények toleranciája a hímekkel megegyező volt, mely az ösztrogén receptor szerepét bizonyítja a nemi különbség létrejöttében (Aufhauser és mtsai 2016).

Felmerült a *két hormon arányá*nak szerepe is a különbség kialakulásában (Robert és mtsai 2011). Ezt igazolta korábban munkacsoportunk is: a nőstény patkányok jobb túlélést és vesefunkciót mutattak a hímekkel szemben, de míg a hímek kasztrációja/éretlensége csökkentette a különbséget, az ovariektómia/éretlenség nőstényeknél nem rontotta le szignifikánsan az egy hetes túlélést. Emellett, Park *és mtsai* vizsgálatával ellentétben, a nőstények tesztoszteron kezelése nem változtatott a túlélésen, míg a hímek 17β-ösztradiol kezelése javította a túlélést (Müller és mtsai 2002).

Feltehetően mind a női hormonok védő funkciója, mind a tesztoszteron negatív hatása érvényesül, a vizsgálatok eredményét befolyásolja a mintavétel időpontja, a vesefunkció, túlélés vizsgálati módszerei és a szupplementált hormon adásának időtartama is.

A nemi különbség hátterében feltételezett ösztrogén/tesztoszteron arány szerepe miatt a *dehidroepiandroszteron (DHEA)* is a figyelem központjába került, mint a szteroid hormonok prekurzora. A DHEA egy "prohormon", mely a szérumban a második legnagyobb koncentrációban keringő szteroid, belőle közvetlenül a célsejtben ösztrogén és androgén hormonok is képződnek. Így direkt hatását feltehetően *ösztrogén*- valamint *androgén receptoron* keresztül is kifejti (Labrie és mtsai 2001, Labrie és mtsai 2005, Chen és mtsai 2009).

A nőkben a menopauza idejére a DHEA szérumszintje 60%-kal csökken, mely számos posztmenopauzális eltérés oka lehet. Ismert pozitív hatása van adásának obezitásban, csontritkulásban, diabéteszben, kardiovaszkuláris prevencióban és depresszióban (Labrie és mtsai 2001, Buvat és mtsai 2003, Maninger és mtsai 2009). Több szervben (agy (Li és mtsai 2001), izom (Ayhan és mtsai 2003), bél (Pelissier és mtsai 2004)) kimutatták a DHEA védő szerepét I/R károsodásban is. Szintén többen, köztük munkacsoportunk is kimutatta a DHEA renoprotektív hatását I/R inzultusban (Aragno és mtsai 2003, Vannay és mtsai 2009, Hosszu és mtsai 2017). Egyes vizsgálatok ösztrogén-szerű hatását bizonyították az NO szintézis fokozásán keresztül (Hayashi és mtsai 2000), míg mások egyéb, direkt hatásait is kimutatták, melyeket sem ösztrogén receptor-, sem androgén receptor antagonista adása nem függesztett fel, így feltehetően *egyéb receptorok*on keresztül jöttek létre (Simoncini és mtsai 2003, Liu és mtsai 2002, Liu és mtsai 2004, Maninger és mtsai 2009). Hormon tulajdonságán túl ismert antiapoptotikus, antioxidáns és antiinflammatórikus hatása is (Aragno és mtsai 2003, Maninger és mtsai 2009, Vannay és mtsai 2009).

Abban minden vizsgálat egyetért, hogy a különbségek kialakulásáért a nemi szteroid hormonok a felelősek, de hogy pontosan milyen **mechanizmusokk**al, az még számos részletében nem tisztázott. A továbbiakban a korábban bemutatott regenerációs és védő faktorokat (lásd az *1.1.5.4 fejezetben*) végigvéve kerülnek bemutatásra az eddig ismert nemi hormon hatások.

A **MAPK** eltérő aktiválása a nemeknél szerepet játszhat a különbségben. Ismert, hogy a 17β-ösztradiol az ösztrogén receptoron keresztül aktiválja az ERK útvonalat, és csökkenti a JNK aktivációját, míg a tesztoszeron fokozza a JNK és p38 aktivitását, így az ösztrogén antiapoptotikus, míg a tesztoszteron inkább apoptotikus irányban hat (Kher és mtsai 2005). A tesztoszteron szintén fokozza a *bax* és csökkenti a *bcl-2* expressziót, aktiválva így a caspase rendszert és végül az apoptózist (Kher és mtsai 2005).

Az **Akt** számos jelátviteli útvonal központi molekulája. Kimutatták az Akt magasabb szintjét nőstényekben, valamint emelkedését hímekben kasztráció vagy 17β-ösztradiol adás hatására, illetve csökkenését nőstényekben ovariektómia után vagy tesztoszteron adásakor. I/R hatására az Akt nőstényekben, illetve ösztrogén adásakor tovább emelkedett, míg tesztoszteron hatására csökkent (Park és mtsai 2004, Kher és mtsai 2005, Hutchens és mtsai 2008). Hasonló eredményre jutottak szívizomsejtekben is, ahol a foszforilált Akt (pAkt) magasabb szintjét és sejtmagbeli lokalizációját találták nőkben és

in vitro ösztrogén adására is (Camper-Kirby és mtsai 2001). Mások *in vitro* mutatták ki az Akt aktiválódását ösztrogén receptoron keresztül, az IP3 jelátvitel aktiválásával (Simoncini és mtsai 2000, Patten és mtsai 2004).

Az **NO szintézis** modulálása szintén befolyásolja a károsodás mértékét. Ismert, hogy a NOS szintje különbözik hím és nőstény patkányokban (Erdely és mtsai 2003, Hutchens és mtsai 2008). Az ösztrogén az ERK serkentésével fokozza az eNOS transzkripcióját, másrészt az IP3-Akt-NOS útvonal aktiválásával közvetlenül is serkenti az NO szintézist (Simoncini és mtsai 2000, Chambliss és mtsai 2002, Kher és mtsai 2005, Satake és mtsai 2007). Park *és mtsai* a NOS aktivitás csökkenését észlelték tesztoszteron hatására (Park és mtsai 2004), melyhez hasonlóan munkacsoportunk csökkent iNOS szintet mutatott ki hím állatokban nőstényekhez képest (Rusai és mtsai 2011).

A vazokonstriktor **ET-1** szerepe a nemi különbség kialakításában szintén felmerült. Munkacsoportunk magasabb pp-endothelin mRNS szintet mutatott ki hím patkányokban I/R hatást követően (Müller és mtsai 2002). Emellett kimutatták a 17β-ösztradiol ET-1 képződést csökkentő hatását, melynek hátterében az intracelluláris Ca^{2+}-szintet csökkentő vagy NO-szintet növelő hatását feltételezik, mivel mindkettő hat az ET-1 szintézisére (Takaoka és mtsai 2002, Kher és mtsai 2005). Wilbert-Lampen *és mtsai* endotél sejteken az ösztrogén ET-1 szintet csökkentő, míg a tesztoszteron ET-1 szintet emelő hatását mutatták ki (Wilbert-Lampen és mtsai 2005).

Az **adenozin** ösztrogén mediált aktiválása szintén ismert, mely a mitokondriális K^+-csatorna serkentésén keresztül protektív hatású I/R károsodásban. Emellett a tesztoszteron adenozin blokkoló hatását is igazolták (Kher és mtsai 2005).

Kimutatták az ösztrogén Akt aktivációján keresztüli **HSF-1** szintézist serkentő hatását is (Carpenter és mtsai 2015).

Ismert, hogy a **HSP-72** az NKA-hoz kötődve stabilizálja azt a bazális membránban (részletesen lásd az *1.3 fejezetben*). A HSP-72 szintje nőstény szívizomsejtben magasabb, ovariektómia hatására csökken, de ösztrogén adásával hímekben is emelkedik (Voss és mtsai 2003). Munkacsoportunk is kimutatta, hogy a HSP-72 mRNS és protein szintje is magasabb a nőstények veséjében, mely I/R károsodást követően tovább emelkedik a hímekhez képest, valamint lokalizációja az NKA-hoz kötötten nőstényekben döntően a bazális membránon marad, míg hímekben a citoszolba kerül (Fekete és mtsai 2006).

Az **NKA** aktivitása, lokalizációja szintén nemi különbséget mutat. Munkacsoportunk kimutatta, hogy az NKAα1 alegység mRNS és protein szintje, valamint az enzim aktivitása is magasabb nőstényekben, és ez a különbség I/R hatást követően is megmarad. Emellett nőstényekben több NKA mutatható ki aktív lokalizációban, a bazális membránban (Fekete és mtsai 2004). A különbség kialakulásában egyrészt közvetlenül az ösztrogén NKA stimuláló hatása állhat, melyet szívizomsejtekben mutattak ki (Kher és mtsai 2005). Másrészt az ösztrogén antioxidáns szerepét is feltételezik közvetett módon, a membránstabilizáció révén, az NKA-t védő mechanizmus hátterében (Kher és mtsai 2005).

Park *és mtsai* kasztrációt követően a **HSP-27** szint emelkedését mérték hím egerekben mind bazálisan, mind iszkémiás hatást követően, míg a HSP-72 szint nem változott. Ezt a hatást a kasztrált hímek tesztoszteron kezelésével meg lehetett szüntetni, vagyis a tesztoszteron tehető felelőssé a HSP-27 szint csökkenéséért (Park és mtsai 2005).

A mitokondriális **szuperoxid dizmutáz** enzim a ROS bontásával protektív hatású a tubulussejtekben. A kasztráció fokozta az enzim aktivitását intakt hímekhez képest (Kim és mtsai 2006).

A nemek között eltérő a **gyulladásos- és immunválasz** erőssége is. Munkacsoportunk korábban patkány transzplantációs modellen a tesztoszteronnal kezelt recipiensek veséjében emelkedett monocita infiltrációt, és magasabb adhéziós molekula (ICAM, fibronektin, laminin, TGF-β) mennyiséget mutatott ki a vehikulummal kezeltekkel szemben, míg az ösztrogénnel kezeltekben a fehérjeszintek alacsonyabbak voltak (Muller és mtsai 1999).

A nemi hormonoknak a sejt stresszválaszában betöltött szerepét a **2. táblázat első két oszlopa** foglalja össze.

2. táblázat A nemi hormonok és a sigma-1 receptor szerepe a sejt stresszválaszában (S1R: sigma-1 receptor, MAPK: mitogén aktivált protein kináz, ERK: extracellular regulated kinase, JNK: c-Jun N-terminal kinase, BAD:Bcl-XL/Bcl-2 associated death promoter, bcl-2: B-cell lymphoma-2, bax: bcl-2 associated X-protein, Akt: protein-kináz B, eNOS: endoteliális nitrogén-monoxid szintáz, ET-1: endothelin-1, NKA: Na^+/K^+ATPáz, HSP-27, -72: hősokk fehérje-27, -72, HSF-1: hősokk faktor-1, ROS: reaktív oxigén gyökök, ICAM: intercelluláris adhéziós molekula, ↑: növekedés, serkentés, ↓: csökkentés, gátlás, *: Kher *és mtsai* 2005 táblázata alapján, a többi adatnál az irodalmi hivatkozás jelölve van.) Sötétebb zölddel van kiemelve az a terület, mely az értekezés egyik fő témája.

Mechanizmus	Ösztrogén	Tesztoszteron	S1R
MAPK	**ERK aktiválása ***	**JNK, p38 aktiválása ***	**?**
apoptózis	**BAD aktiválás ***	***bcl-2*↓, *bax*↑ ***	***bcl-2*↑, *bax*↓** (Tchedre és mtsai 2008, Meunier és mtsai2010)
Akt	**aktivitás ↑** *(Park és mtsai 2004)	**aktivitás ↓** *(Park és mtsai 2004)	**aktivitás ↑** (Nakamo és mtsai 2010)
eNOS	**aktivitás ↑** *(Simoncini és mtsai 2000, Chambliss és mtsai 2002, Satake és mtsai 2007)	**aktivitás ↓** *(Park és mtsai 2004)	**aktivitás ↑** (Bhuiyan és mtsai2010, Hosszu és mtsai 2017)
ET-1	**termelődés ↓** *(Takaoka és mtsai 2002, Wilbert-Lampen és mtsai 2005)	**termelődés ↑** *(Muller és mtsai 2002, Wilbert-Lampen és mtsai 2005)	**termelődés ↓** (Wilbert-Lampen és mtsai 2005)
adenozin	**K^+-csatorna ↑ ***	**K^+-csatorna ↓ (?) ***	**?**
HSP	**HSF-1, HSP-72 ↑** *(Voss és mtsai 2003, Carpenter és mtsai 2015)	**HSP-27 ↓** *(Park és mtsai 2005)	**?**
ROS	**szuperoxid dizmutáz ↑***	**szuperoxid dizmutáz ↓** *(Kim és mtsai 2006)	**szuperoxid dizmutáz ↑** (Hayashi és mtsai 2011)
immunválasz	**↑ (monocyta infiltráció, T-, B-sejt aktiváció, ICAM, fibronektin** (Muller és mtsai 1999, Bouman és mtsai 2005, Klein és mtsai 2015, Lepeytre és mtsai 2017)	**↓ (monocyta infiltráció, T-, B-sejt aktiváció, ICAM, fibronektin** (Muller és mtsai 1999, Bouman és mtsai 2005, Klein és mtsai 2015, Lepeytre és mtsai 2017)	**↓ (T-sejt infiltráció, proinflammatórikus citokinek)** (Ajmo és mtsai 2006 Hosszú és mtsai 2017)

1.5.3 Az S1R és a nemi hormonok

Számos, a nemi különbség létrejöttének mechanizmusát kutató vizsgálatban felmerült, hogy a nemi hormonok a protektív hatásaik egy részét specifikus, nem nemi hormon receptoron keresztül fejtik ki.

Mivel az S1R több szerv, így a vese I/R inzultusában is protektív hatásúnak bizonyult (részletesen lásd az *1.4 fejezetben*), felmerült, hogy a vesekárosodásban mutatkozó nemi különbségek közvetítésében is szerepet játszhat.

Ismert a *DHEA* S1R agonista hatása (Cobos és mtsai 2008). A DHEA szerepét többen vizsgálták már elsősorban az idegrendszerben (Maninger és mtsai 2009) és a szívben (Tagashira és mtsai 2011), de közvetlenül S1R-hez köthető renoprotektív hatását is már kimutatták (Bhuiyan és mtsai 2010).

A *17β-ösztradiol* S1R-en keresztül kifejtett hatását is leírták agyban (Dhir és mtsai 2008), retinális gliasejten (Vogler és mtsai 2016), és felmerült S1R-en keresztül kifejtett ET-1 szintet csökkentő hatása endotélsejten is (Wilbert-Lampen és mtsai 2005).

Pontos S1R agonista hatása, a receptoron való kötődés helye, valamint e kapcsolat szerepe a nemi különbség léterjöttében azonban még nem ismert.

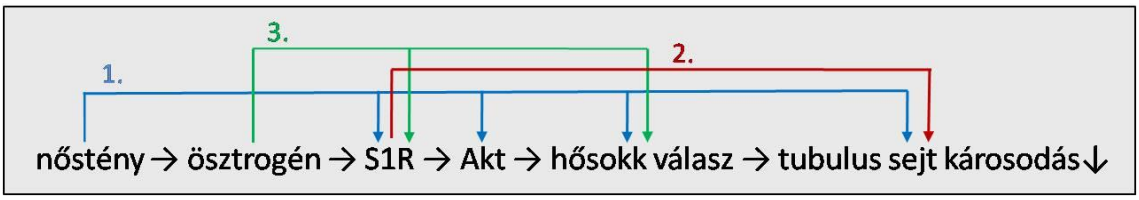
A *tesztoszteron* szerepe még kevésbé tisztázott, S1R-hez való kötődése - az ösztrogéntől eltérő helyen - azonban feltételezett (Wilbert-Lampen és mtsai 2005).

2. Célkitűzések

A nemi különbség a vese I/R károsodásában, valamint az S1R renoprotektív hatása már ismert. Munkánk során vizsgáltuk az S1R szerepét a vesekárosodás nemi különbségében, és tanulmányoztuk a hősokk fehérjék aktiválása révén kifejtett potenciális protektív hatását.

A következő kérdésekre kerestük a választ (**8. ábra**):

1. Kimutatható-e a *nemi különbség* az S1R aktiválódásában és a hősokk válaszban a vese I/R károsodása során?
2. Szerepet játszik-e az *S1R* aktiválása a vese I/R károsodásában?
3. A *17β-ösztradiol* közvetlenül szerepet játszik-e az S1R és a hősokk válasz aktivációjában?
4. Az S1R agonista Flu hatásos-e vesetransplantáció során a *prezervációs folyadékba* adva a károsodás mérséklésére?



8. ábra Célkitűzések (S1R: sigma-1 receptor, Akt: protein kináz B)

3. Módszerek

3.1 *In vivo* kísérletek

3.1.1 Állatok

A kísérleteket ivarérett hím és nőstény (200 ± 25 g) Wistar patkányokon (Toxi-Coop Kft, Dunakeszi, Magyarország) végeztük. Tekintettel arra, hogy a nőstények ciklussal változó hormonszintjei befolyásolhatják számos fehérje szintjét, hüvelykenet fénymikroszkópos vizsgálatával állapítottuk meg, hogy az állatok a proösztrusz fázisban vannak, amikor a szérum ösztrogén szintjük magas. Az állatokat állandó hőmérsékleten (22 ± 2 °C), 75% páratartalom, 12 óránként váltakozó megvilágítás mellett tartottuk, korlátlanul elérhető standard rágcsálótápot és csapvizet biztosítva.
Kísérleteinket a Magyar Köztársaság állatvédelmi és állatkísérletekkel kapcsolatos törvényeinek (1998/XXVIII.) betartásával és a Semmelweis Egyetem állatkísérletekre vonatkozó irányelvei alapján hajtottuk végre (PEI/001/380-4/2013).

3.1.2 A vese I/R károsodásának modellje, vizsgálati csoportok

A műtéteket 50 mg/ttkg intraperitoneális (*ip.*) pentobarbital (Nembutal, Abbott Laboratories Kft., Budapest, Magyarország) általános érzéstelenítésben végeztük. A műtét alatt az állat testhőmérsékletét fűtőpad segítségével tartottuk 37°C-on.
Az *ovariektómiá*t a nemzetközi gyakorlatnak és saját tapasztalatainknak megfelelően 7 nappal az iszkémiás inzultus előtt végeztük el medián laparotómiából, általános érzéstelenítésben (Idris és mtsai 2012, Muller és mtsai 2002), így biztosítva az állat felépülését és ösztrogén szintjének biztos lecsökkenését. Mivel az irodalmi adatok szerint az ovariektómia után 1 héttel az állatok 17β-ösztradiol szintje a kimutatható minimális mennyiség alá csökken, szérum hormonszint méréseket nem végeztünk (Sandweiss és mtsai 2017).
A *vese iszkémiá*jának létrehozásához medián laparotomiát végeztünk, majd a bal vese hilust (artéria és véna) atraumatikus vaszkuláris klip segítségével zártuk le 50 percre. A klip felhelyezésekor a vese homogénen kifehéredett, majd az iszkémiás idő végére

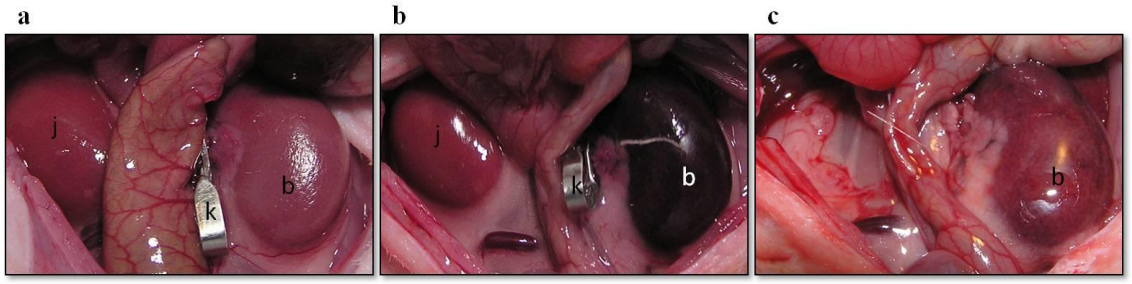
elfeketedett. Közvetlenül az iszkémiás idő lejárta előtt az ellenoldali (jobb) vesét eltávolítottuk. A klip levétele után a bal vese reperfúziója jól látható volt. Az iszkémia/reperfúzió kivitelezését a **9. ábra** mutatja be. A műtétet követően a hasfalat és a bőrt rétegesen zártuk, a patkányokat felébresztettük.

*Áloperáció*kat (Sham) is végeztünk, melyben a laparotómiát követően a vesére klipet nem helyeztünk fel. Ezek az állatok szolgáltak kontroll csoportként.

Az állatokat 2 illetve 24 órával a reperfúziót követően ismét elaltattuk (50 mg/ttkg pentobarbital *ip*.) a *mintavétel*hez.

Eltávolítottuk a vesét, valamint vérmintát vettünk a hasi aortából. A *vér* egy részét vérkép vizsgálatra etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) tartalmú vércsőben 4°C-ra raktuk, másik részéből szérumot izoláltunk, és további vizsgálatokig -80°C-on tároltuk. Az eltávolított *vesé*t egyenlő darabokra osztottuk, és 4% pufferolt formalinban (pH=7,4) szobahőmérsékleten illetve szárazjégen történő gyorsfagyasztást követően -80°C-on tároltuk.

Az egyik kísérletsorozatban az állatok 30 perccel az iszkémia előtt S1R agonista valamint antagonista szerrel *ip. előkezelés*ben részesültek.



9. ábra A vese iszkémia/reperfúziós patkánymodellje

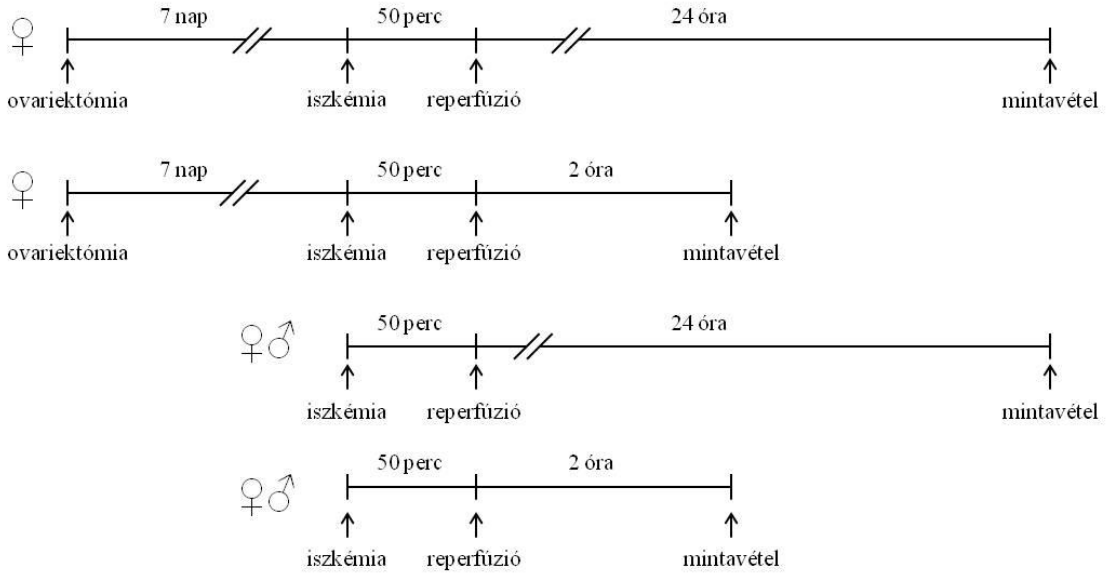
a: Balra látható az ép jobb vese (j) és jobbra a *klippel* (k) lezárt hilusú, elhalványodott bal vese (b)

b: *50 perc iszkémia* elteltével a bal vese sötét színű

c: A jobb vese eltávolítása és a klip levétele után jól látható a bal vese *reperfúzió*ja, melyet élénk színe mutat.

Vizsgálati csoportok:

1. Az első kísérletsorozatban *hím*, *nőstény* és *ovx* nőstény patkányokat vizsgáltunk vese I/R inzultust követően. Mintavételt 2 (*T2*) illetve 24 órával (*T24*) a reperfúzió után végeztünk (n=8/csoport). Áloperált állatok képezték a *kontroll (K)* csoportot (n=8/csoport). Az első vizsgálat protokollját a **10. ábra** foglalja össze.



10. ábra Az első iszkémia/reperfúziós kísérletsorozat protokollja (♂: hím, ♀: nőstény)

2. A második sorozatban szintén I/R modellen, *hím* patkányokon vizsgáltuk az S1R szerepét a vesekárosodás létrejöttében. Ehhez az állatok 30 perccel az iszkémia előtt *ip.*

(i) 20 mg/ttkg S1R agonista fluvoxamin (*Flu*) (Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország),

(ii) 20 mg/ttkg Flu és 1 mg/ttkg S1R antagonista N,N-dipropil-2-[4-methoxy-3-(2-fenilethoxy)-fenil]-thylamin-monohidroklorid (*NE-100*) (Tocris Bioscience, Bristol, Egyesült Királyság),

(iii) izotóniás sóoldat (vehikulum - *veh*) kezelésben részesültek.

Mintavételt 24 órával a reperfúziót követően végeztünk (n=6-8/csoport).

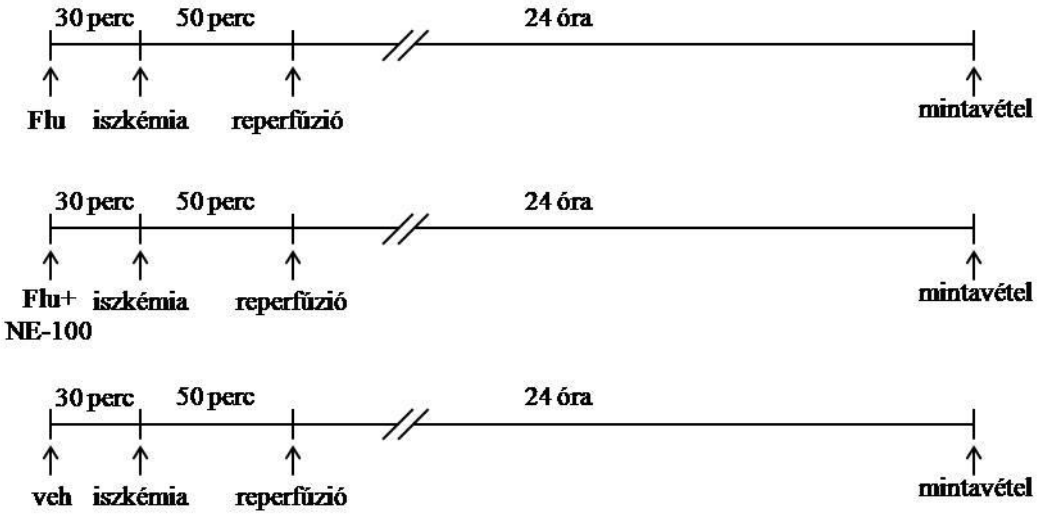
A Flu hatásos dózisát előkísérletekben határoztuk meg a vesefunkció (Krea, CN) és a tubulus károsodás hisztológiai vizsgálatával. A 2 mg/ttkg-os dózis a tubulusok károsodásának kivédésében még nem bizonyult elég hatásosnak, a 40 mg/ttkg-os dózis pedig már nem fokozta a hatást, így a továbbiakban a 20 mg/ttkg-os dózist alkalmaztuk. Humán alkalmazásban a Flu-t a betegek 50-150 mg-os dózisban kapják tartósan, *per os*

(3 mg/ttkg). A humán dózis 6,2-szerese felel meg a patkány dózisnak (3x6,2=18,6 mg/ttkg), így az adagok összevethetők.

Az NE-100 dózisait irodalmi adatok alapján választottuk ki (Bhuiyan és mtsai 2011, Tagashira és mtsai 2011) és a Flu-val egy időben, azzal ellentétes oldalon *ip*. alkalmaztuk.

Az előkezelés idejét az intraperitoneális felszívódási idő ismertében határoztuk meg 30 percre, hogy az inzultus idejére elérjék maximális szérumszintjüket. Előkísérletben a renoprotekció egyértelműen kimutatható volt, így ezzel az alkalmazási idővel dolgoztunk tovább.

A második vizsgálat protokollját a **11. ábra** foglalja össze.



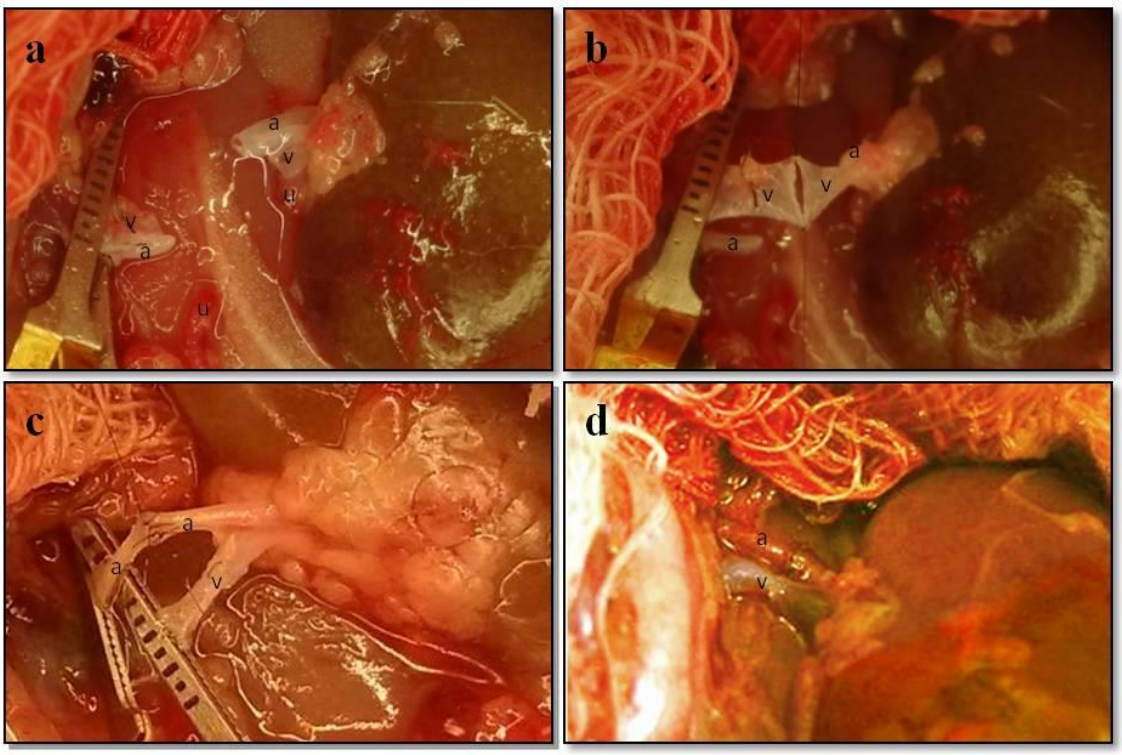
11. ábra A második iszkémia/reperfúziós kísérletsorozat protokollja (Flu: fluvoxamin, veh: vehikulum)

3.1.3 A vese izograft autotranszplantációs modellje, vizsgálati csoportok

A műtéteket 3%-os isofluran (Eickemeyer Veterinary Equipment Ltd., Twickenham, Egyesült Királyság) (1 l/perc) inhalációs narkózisban végeztük. Az állatok testhőmérsékletét a műtét alatt rektális hőmérséklet-kontrollált fűtőpad segítségével tartottuk egyenletesen 37°C-on. A műtétet HUND Wetzlar SM33 operációs mikroszkóp segítségével, 7-10-szeres nagyítás alatt végeztük. A bal vese hilus (artéria, véna) és az ureter kipreparálását követően az ereket szeparáltan atraumatikus vaszkuláris klipekkel lezártuk, a képleteket átvágtuk. Az artérián keresztül hideg Custodiol (HTK oldat: Na^+: 15 mM, K^+: 9 mM, Mg^{2+}: 4 mM, Ca^{2+}: 0,015 mM, hisztidin: 198 mM, triptophan: 2 mM,

ketoglutarát: 1 mM, mannitol: 30 mM; Franz Kohler Chemie GMBH, Bensheim, Németország) prezervációs folyadékkal átmostuk a vesét, amíg teljesen el nem halványult, majd eltávolítottuk, és 2 órára a hideg prezervációs folyadékba tettük (*hideg iszkémiás idő*). A 2 óra elteltével az állatot újra elaltattuk, és az artéria és véna end-to-end anasztomózisával a vesét visszatranszplantáltuk. A klipek felengedésével ellenőriztük az anasztomózisok jó működését és a vese reperfúzióját. A teljes *meleg iszkémiás idő* minden esetben 35 perc volt. A transzplantáció lépéseit a **12. ábra** mutatja be. Ezután az ureteren is end-to-end anasztomózist varrtunk, eltávolítottuk az ellenoldali (jobb) vesét, majd a hasfal és bőrvarrat után az állatot felébresztettük.

Az állatokat 24 órával (T24) a reperfúziót követően ismét elaltattuk a *mintavétel*hez. A mintavétel az I/R modellben ismertetettek szerint zajlott.



12. ábra A transzplantáció lépései

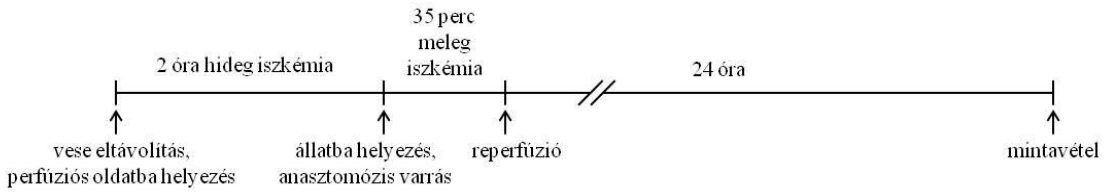
a: A hideg iszkémiás idő leteltével a vese visszahelyezése az állatba. Láthatók a szeparáltan leklippelt artéria (a) és véna (v) csonkok valamint az átvágott ureter (u).

b: A véna anasztomózis varrása: a csonkvégek fent és lent egy-egy varrattal összeöltve, kifeszítve.

c: Az artéria anasztomózis varrása: csomós öltések.

d: Az anasztomózisok megvarrása után a klipek eltávolítása. Látható az artéria és véna telődése, a vese reperfúziója.

Vizsgálati csoportok:
A transzplantációs kísérletsorozatban szintén a Flu hatását vizsgáltuk a vese I/R károsodására. A Flu-t a *prezervációs folyadékba* oldva alkalmaztuk, így a következő csoportokat hoztuk létre (n=8/csoport):
(i) Custodiol prezervációs folyadék (*Tx+veh*)
(ii) Custodiol+0,003 mg/ml Flu (*Tx+Flu*)
(iii) Áloperált kontroll állatok (*K*).
A Flu dózisát a korábbi *in vitro* kísérleteink során elvégzett methyl-thiazoletetrazolium (MTT) viabilitási teszt alapján határoztuk meg, melyben a sejtek életképességét nem befolyásoló, de hatásos koncentráció 10 µM volt. Így a veséket 10 µM-os Flu-s perfúziós oldatba helyeztük (0,003 mg Flu/prezervációs folyadék ml, a Flu molsúlya: 318,3 g/mol). A vizsgálati protokollt a **13. ábra** foglalja össze.



13. ábra A transzplantációs kísérletsorozat protokollja

3.2 *In vitro* kísérletek

3.2.1 Sejtek tenyésztése

Kísérletünkben immortalizált human kidney 2 (HK2) proximális tubulussejteket (Gibco, Life Technologies Corporation, Budapest, Magyarország) tenyésztettünk Dulbeco's Modified Eagle Médiumban (DMEM), melyhez 10% magzati borjú szérumot (fetal calf serum – FCS; Gibco, Life Technologies Corporation, Budapest, Magyarország), 1% glutamint és 1% antibiotikum-antimikotikum (100x; 10000 IU/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, 5 µg/mL Amphotericin B) keveréket adtunk (Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország). A sejteket vízzel telített 95% levegő és 5% CO_2 keverékében 37°C-on inkubáltuk, majd a kísérletek előtt 24 órára szérum-mentes médiumban 6-well plate-re helyeztük ($5x10^5$ sejt/well).

3.2.2 Vizsgálati csoportok

A sejteken a nemi hormonok S1R-en kifejtett hatásait vizsgáltuk. Ehhez a sejteket 24 óráig kezeltük az alábbiak szerint (n=2-5/csoport):
(i) 10 nM 17β-ösztradiollal (Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) (*Ö10*)
(ii) 10 nM 17β-ösztradiollal + 3 μM NE-100-zal (*Ö10+NE100*)
(iii) izotóniás sóoldattal, kontroll csoport (*K*).

3.3 Funkcionális laboratóriumi vizsgálatok

A legelterjedtebb vesefunkciós vizsgálatokat, azaz a *Krea, CN* és *AST* szintek mérését a mintavétel során nyert vérből Hitachi-712 automatizált spektrofotométeren (Diagnosticum Ltd., Budapest, Magyarország), fotometriás módszerrel végeztük el.

3.4 Szövettani vizsgálatok

A hagyományos hisztológiai vizsgálatokhoz a vesék egy részéből formalinban fixálást, majd paraffinba ágyazást követően 5 μm-es metszeteket készítettünk, Perjódsav-Schiff (Periodic acid-Schiff, PAS) illetve hematoxilin-eozin (HE) festést végeztünk. A metszetek kiértékelését számkódolva, két egymástól független vizsgáló végezte Zeiss Axio Imager A1 fénymikroszkóp (Zeiss, Jena, Németország) segítségével.

Az **I/R modell első sorozatának** hisztológiai kiértékelése egy pontskála alapján történt szemikvantitatív módon (Heemann és mtsai 2000), ahogy azt munkacsoportunk korábbi közleményei is részletesen ismertetik (Fekete és mtsai 2004, Fekete és mtsai 2006, Vannay és mtsai 2009, Rusai és mtsai 2011). A vesekárosodás mértékét öt tényező alapján értékeltük, mindegyiket egyenként 0-2, 0-3 illetve 0-4 közötti skálán, állatonként két 200-szoros nagyítású látótér vizsgálatával. A *glomerulus károsodás*át a hipercellularitás és kollapszus jellemzi. A kollapszust értékeltük:
- glomerulus kollapszus: 0 - nincs
1 - enyhe (a sejtek <30%-ában van)
2 - közepes (a sejtek 30-60%-ában van)

3 - súlyos (a sejtek több mint 60%-ában van)

A *tubuláris károsodás*t az epitél sejtek károsodása, a hámban és a tubulusban lévő hialin felszaporodása jellemzi. Értékeltük a sejtek károsodását és a lumenben felszaporodó hialin mennyiségét:

- tubulus nekrózis: 0 - nincs károsodás
  1 - sejt duzzadás, vakuolizáció, kefeszegély eltűnése
  2 - sejt nekrózis a sejtek <30%-ában
  3 - sejt nekrózis a sejtek 30-60%-ában
  4 - sejt nekrózis a sejtek több, mint 60%-ában
- tubulus hialinizáció: 0 - nincs
  1 - kevés
  2 - sok

Az *intersticium lézió*ját kiszélesedése, a benne lévő sejtek átalakulása, felszaporodása jellemzi. Mi az ödémás kiszélesedést értékeltük ki:

- intersticiális lézió: 0 - nincs ödéma
  1 - enyhe ödéma
  2 - közepes ödéma
  3 - súlyos ödéma

Végül a vesekárosodásban szerepet játszó *inflammációs folyamatok* mértékét a leukocita infiltráció értékelésével határoztuk meg:

- leukocita infiltráció: 0 - nincs infiltráció
  1 - kevesebb, mint 10 infiltráló sejt/ látótér
  2 - 11-50 infiltráló sejt/ látótér
  3 - 51-100 infiltráló sejt/ látótér
  4 – több, mint 101 infiltráló sejt/ látótér.

A **második I/R kísérletsorozatban**, tekintettel arra, hogy az iszkémiás inzultusra a tubulusok reagálnak legérzékenyebben, a hisztológiai kiértékelést leegyszerűsítve csak a *tubulus nekrózis*t vizsgáltuk a Rong *és mtsai* 2011-es közleményében leírt módszerrel, mely lényegét tekintve megegyezik az általunk korábban használt tubulus nekrózis kiértékelési sémájával (Rong és mtsai 2011):

- tubulus károsodás: 0 - nincs károsodás

1 - sejt duzzadás, vakuolizáció, kefeszegély eltűnés, sejt nekrózis a sejtek <25%-ában

2 - sejt nekrózis a sejtek 25-50%-ában

3 - sejt nekrózis a sejtek 50-75%-ában

4 - sejt nekrózis a sejtek több, mint 75%-ában.

A **transzplantációs kísérletsorozat** mintáinak értékeléséhez a tubulus károsodásakor észlelhető lumen kitágulást vettük alapul (Rafieian-Kopaei és mtsai 2012, Nasri és mtsai 2014). Ezt az ismert jelenséget az epitélsejtek nekrózisa és degradációja, valamint a sérült víz visszaszívás miatt a lumenbe jutó nagyobb mennyiségű folyadék és törmelék okozza. A károsodás mértékét jól jelzi szövettani metszeten a lumen átmetszetek területének változása. Szintén PAS festett metszeteket vizsgálva, állatonként 6 látótérben 20-20 tubulus lumen területét mértük le Adobe Photoshop szoftver (Adobe Systems, San José, USA) használatával, az állatonként mért összterület nagyságát μm^2-ben adtuk meg. A nagyobb lumen terület súlyosabb károsodásra utal.

3.5 Western blot analízis

A fehérje izolátumot 4-szeres Laemmli pufferben (12,5 mM TRIS-HCl pH=6,7, 4% szódium dodecil szulfát (SDS), 4% merkaptoetanol, 15% glicerol, 0,01% brómfenolkék) denaturáltuk, majd 12%-os SDS-poliakrilamid gélen (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, California, USA) szobahőmérsékleten, 200 V áramerősségen futtattuk. A blottolás során a fehérjéket az SDS-poliakrilamid gélről nitrocellulóz membránra (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, California, USA) transzferáltuk gyorsblottoló készülékkel (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, California, USA). A fehérjetranszfer sikerességét 1% Ponceau-S (Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország), 25% ecetsav (Reanal Kft., Budapest, Magyarország) tartalmú festékkeverékkel ellenőriztük.

Veseszövet vizsgálata esetén a minta előállításához 100 mg veseszövetet hűtött (4°C) lizáló pufferben (pH: 7,4; 1 M tris(hidroximetil)aminometán, 0,5 M etilénglikol-tetraecetsav, 1% Triton X-100, proteáz és foszfatáz inhibitorok: 1 mg/ml approtinin, 5 mg/ml leupeptin, 0,5 M fenilmetánszulfonil fluorid, 0,25 M nátrium-fluorid, 0,5 M nátrium orthovanadát; Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) homogenizáltunk.

A membránokat 1 órán keresztül szobahőmérsékleten specifikus primer antitestekkel inkubáltuk (1:1000): anti-**S1R** antitest (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA), anti-**pAkt** antitest (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA), anti-**HSF-1** antitest (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), anti-**HSP-72** antitest (Dr. László L. adománya, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, Magyarország), anti-**HSP-27** antitest (Novus Biologicals, Cambridge, Egyesült Királyság), és **NKA α1** elleni antitest (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA).

A membránokat ezután a megfelelő, torma-peroxidázzal (horseradish-peroxidase, HRP) jelölt szekunder *goat* anti-*mouse* vagy *goat* anti-*rabbit* ellenanyag (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA) 1:2000 higítású oldatával 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk.

Sejtek vizsgálata esetén a membránokat a specifikus primer ellenanyagokkal egész éjszaka inkubáltuk: humán anti-**S1R** antitest (1:300; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA); anti-**pAkt** (foszfo-Akt) antitest (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA), anti-**HSF-1**antitest (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), anti-**HSP-72** antitest (1:9000; Dr. László L.adománya, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, Magyarország), anti-**pHSP-27** (foszfo-HSP-27) antitest (1:1000; Novus Biologicals, Cambridge, Egyesült Királyság).

A membránokat ezután a megfelelő, HRP-vel jelölt szekunder *goat* anti-*mouse* (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) illetve *goat* anti-*rabbit* ellenanyaggal (1:2000-1:5000; Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA) 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk.

A membránokat kemilumineszcens technikával hívtuk elő (AP-Biotech, Buckinghamshire, Egyesült Királyság) és Gel-Pro Analyzer 3.2 szoftver segítségével, denzitometriával értékeltük ki. Az értékeket integrált optikai sűrűségként (integrated optical density, IOD) a háttér kivonása után kaptuk meg. Az IOD-t Ponceau festésre és belső kontrollra normalizáltuk, hogy korrigáljuk a fehérje felvitelből és a futtatásból adódó különbségeket. Az eredményeket kontroll-százalékban tüntettük fel.

3.6 Immunhisztokémiai vizsgálat

A HK-2 sejteket szövettenyésztő kamrában (Sarstedt Kft., Budapest, Magyarország) 24 órán át FCS mentes médiumban tenyésztettük, majd 24 óráig előkezeltük 10 μM 17β-ösztradiollal (Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) ill. 3 μM NE-100-zal (Tocris Bioscience, Bristol, Egyesült Királyság). Az immunfluoreszcens festést szobahőmérsékleten végeztük. A kezelést követően a sejteket hideg PBS-sel mostuk, majd PBS - 4% paraformaldehid (Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) pufferel fixáltuk 15 percig. Ismételt mosások után PBS - 0,1 % Triton X-szel permeábilizáltuk 10 percig, végül 60 perces PBS - 5% marha szérum albumin (bovine serum albumin – BSA) kezeléssel blokkoltuk. A sejteket ezután specifikus primer *mouse* **S1R** antitesttel (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) illetve *rabbit* **HSF-1** antitesttel (1:100; Novus, Cambridge, Egyesült Királyság) inkubáltuk egy éjszakán át, 4 ºC-on. Másnap PBS-sel történő mosást követően szekunder, fluoroforral konjugált ellenanyaggal (Alexa Fluor 488 *anti-mouse* és Alexa Fluor 568 *anti-rabbit;* 1:100; Invitrogen, Waltham, MA, USA) inkubáltuk. A sejtmagokat Hoechst DNS festékkel (1μg/ml, 10 perc; Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) jelöltük. Ismételt mosást követően a sejtekre Pro Long Antifade Mountant (Invitrogen, Waltham, MA, USA) fedőmédiumot és fedőlemezt helyeztünk.

Kontrollként olyan minták szolgáltak, ahol csak szekunder antitestet alkalmaztunk. A metszeteket Zeiss LSM 510 Meta konfokális lézermikroszkóppal (Zeiss Kft., Jena, Németország), 100-szoros nagyításban elemeztük.

3.7 Apoptózis vizsgálat TUNEL teszttel

A terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) vizsgálatot a hisztológiai vizsgálatnál leírt módon elkészített, 5 μm vastagságú metszeteken végeztük. Deparaffinizálást követően használtuk az Apoptag Peroxidase In situ Apoptosis Detection S7100 Kit-et (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), a gyártó protokollját követve. Röviden, a mintákat 15 percig proteináz K enzimmel előkezeltük, majd 2x2 percig desztillált vízzel mostuk. Az endogén peroxidáz aktivitást 5 perces 3%-os hidrogén peroxid (H_2O_2) kezeléssel blokkoltuk. Ezt követte a metszetek equilibráló puffer 30%-os

oldatával való 5 perces kezelése, majd 1 órás 30% terminális deoxynucleotidyl transzferáz (TdT) enzim tartalmú reakció-pufferel történő inkubálás. Ezután a metszeteket Stop-pufferrel mostuk át, majd 30 percig anti-digoxigeninnel inkubáltuk. A metszeteket 3,3'-diaminobenzidin(DAB)-peroxidáz festéssel hívtuk elő. Az apoptotikus, TUNEL pozitív sejtmagokat 200-szoros nagyítással, állatonként 3 látótéren számoltuk Zeiss Axio Imager A1 fénymikroszkóp (Zeiss Kft., Jena, Németország) segítségével.

3.8 Kvantitatív reverz transzkriptáz PCR

A teljes RNS-t kivontuk a veseszövetből az RNeasy RNA Isolation Kit (Quiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével. Meghatároztuk a duplikátumokban a ***bcl-2***, ***bax*** és 18S rRNS (riboszomális RNS) mRNS expresszióját reverz transzkiptáz polimeráz láncreakció (RT-PCR) segítségével, SYBR Green I Master Enzyme Mix (Invitrogen, Budapest, Magyarország) és specifikus primerek használatával. A primerek szekvenciáit a **3. táblázat** mutatja. Az eredményeket Light Cycler 480 SYBR Green I Light Cycler rendszer (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) segítségével értékeltük. A *bcl-2* és *bax* mRNS expressziót 18S rRNS expresszióra, mint háztartási génre (housekeeping gene) normalizáltuk.

3. táblázat A PCR (polimeráz láncreakció) során használt primerek nukleotid szekvenciái (bcl-2: B-cell lymphoma-2, bax: bcl-2 associated X-protein, rRNS: riboszomális ribonuklein sav)

Primerek	Szekvenciák
r bcl-2 forward	5’ ATG GCG CAA GCC GGG AGA ACA G
r bcl-2 reverse	5’ TGG CGA CAA GGG GCC GTA GAG G
r bax forward	5’ AGC CGC CCC AGG ACG CAT CCA
r bax reverse	5’ CAG CCG CTC CCG GAG GAA GTC CAG
18S rRNS forward	5’ GCG GTC GCC GTC CCC CAA CTT CTT
18S rRNS reverse	5’ GCG CGT GCA GCC CCG GAC ATC TA

3.9 Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzést GraphPad Prism szoftver (6.0 verzió; GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) statisztikai programmal végeztük. A parametrikus adatokat átlag±SEM (standard error of mean: standard hiba) értékkel, a nem-parametrikus adatokat

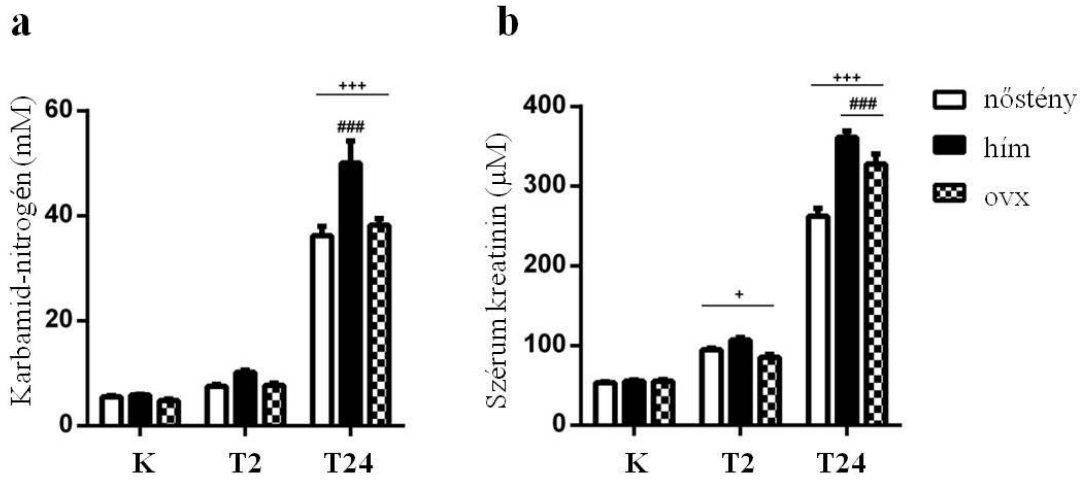
középérték±szórás értékekkel adtuk meg. Normális eloszlás esetén egyutas faktoriális varianciaanalízist (ANOVA, Analysis of variance) és Bonferroni *post hoc* tesztet használtunk. A nem parametrikus adatoknál Kruskal-Wallis és Dunns illetve Fisher féle *post hoc* tesztet alkalmaztunk. Statisztikailag szignifikánsnak minden esetben a $p<0,05$ értéket tekintettük.

4. Eredmények

4.1 Nemi különbségek a vese I/R károsodásában

4.1.1 Nőstényekben mérsékeltebb a vesefunkció romlása

A vese 50 perces iszkémiáját követően az állatok Krea és CN szintjei a hímeknél, a nőstényeknél és az ovx nőstényeknél egyaránt emelkedtek. 2 órával a reperfúziót követően (T2) még csak diszkrét emelkedés látszott, azonban a 24 órás mérésekben (T24) jelentős volt a növekedés, tehát kialakult az AKI ($p<0,05$ K vs.T2; $p<0,001$ T24 vs. K; T2 minden csoportban). Nőstényekben azonban a vesefunkciós értékek mérsékeltebb károsodást mutattak (Krea: 262,3±9,9 µM, CN: 36,1±1,8 mM; $p<0,001$) mind a hímekhez (Krea: 361,3±7,8 µM, CN: 50,1±4,1 mM), mind az ovx nőstényekhez (Krea: 327,5±12,8 µM, CN: 38,3±1,2 mM) képest (**14. ábra**).



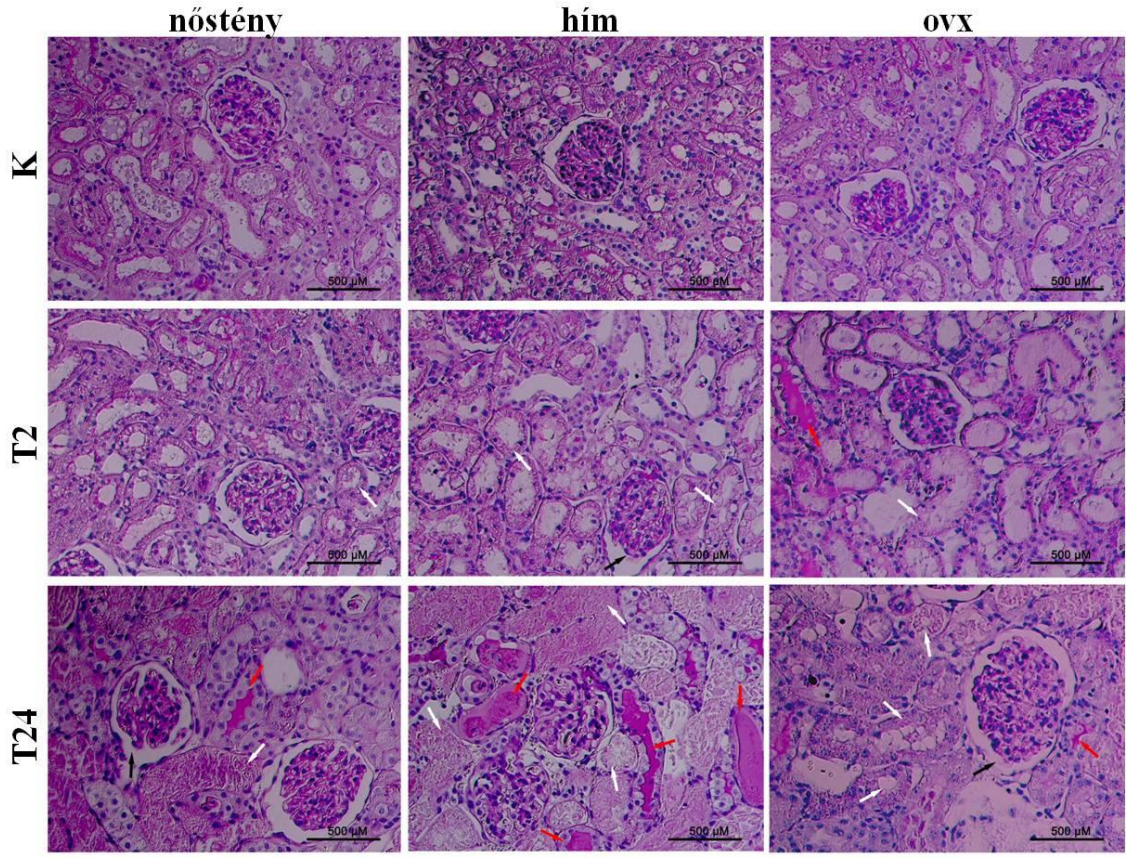
14. ábra A vesefunkció romlása iszkémia/reperfúziós inzultust követően
a: karbamid-nitrogén, **b:** szérum kreatinin szintek alakulása áloperált kontroll állatokban (*K*), 2 (*T2*) valamint 24 órával (*T24*) az inzultust követően *nőstény*ekben, *hím*ekben és ovariektomizált nőstényekben (*ovx*) (+$p<0,05$ vs. K; +++$p<0,001$ vs. K, T2; ###$p<0,001$ vs. nőstény). Az oszlopok az átlag±SEM-et jelölik. Az adatokat one-way ANOVA és Bonferroni post hoc teszttel elemeztük. (n=8/csoport)

4.1.2 A strukturális károsodás enyhébb a nőstény állatok veséjében

PAS illetve HE festett metszetek vizsgálatával a nőstények strukturális vesekárosodása enyhébb volt a hímekhez képest. Az I/R inzultus után 2 órával (T2) mindhárom csoportban kisebb fokú károsodást tapasztaltunk, *intersticiális lézió* csak a hímekben volt megfigyelhető ($p<0,05$ hím vs. nőstény, T2). 24 órával az inzultust követően (T24) minden csoportban súlyos károsodás alakult ki ($p<0,05$ T24 vs. T2, mindhárom csoport), azonban a *glomerulus kollapszus*, a *leukocita infiltráció* és az *intersticiális lézió* is a hímekben súlyosabb mértékű volt ($p<0,05$ hím vs. nőstény, T24). A pontszámokat a **4. táblázat** ismerteti, míg a **15. ábra** minden csoportból egy-egy jellemző hisztológiai képet mutat be.

4. táblázat A vesekárosodás mértéke iszkémia/reperfúziós inzultust követően A hisztopatológiai változások szemikvantitatív értékelése pontskálán (*glomerulus kollapszus* (0-3), *tubulus nekrózis* (0-4), *tubulus hialinizáció* (0-2), *leukocita infiltráció* (0-3) és *intersticiális lézió* (0-4)) áloperált kontroll (*K*), valamint iszkémia/reperfúziós károsodást követő 2 (*T2*) illetve 24 óra (*T24*) múlva *nőstény*, *hím* és ovariektomizált nőstény (*ovx*) patkányokban (+p<0,05 vs. K; *p<0,05 vs. nőstény T2; #p<0,05 vs. nőstény T24; §p<0,05 vs. T2). A számok a median (minimum-maximum) értékeket jelölik. Az adatokat Kruskal-Wallis teszttel elemeztük Fisher's multiplex páros összehasonlító teszttel kiegészítve. (n=8/csoport)

		Glomerulus kollapszus	**Tubuláris nekrózis**	**Tubulus hialinizáció**	**Leukocita infiltráció**	**Interstici-ális lézió**
K	**nőstény**	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	hím	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	ovx	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
T2	**nőstény**	1 (0-2) $^{+}$	1 (0-1) $^{+}$	1 (0-2) $^{+}$	1 (1-2) $^{+}$	0 (0-1)
	hím	2 (0-2)$^{+,*}$	1 (0-2)$^{+}$	1 (0-1)	1 (0-1)$^{+}$	1 (0-2)$^{+,*}$
	ovx	1 (0-2)$^{+}$	1 (0-1)$^{+}$	1 (0-2)$^{+}$	1 (0-2)$^{+}$	0 (0-1)
T24	**nőstény**	0 (0-1)	3 (1-4)§	2 (1-2)§	1 (1-2)	1 (0-2)
	hím	2 (2-2)$^{\#}$	3 (2-4)§	2 (2-2)§	2 (1-3)$^{\#,\S}$	3 (0-3)$^{\#,\S}$
	ovx	0 (0-2)	3 (1-4)§	2 (1-2)§	1 (1-2)	0 (0-2)



15. ábra A vese iszkémia/reperfúziós inzultus következtében kialakult strukturális károsodása A vese szövettani szerkezete Perjódsav-Schiff (PAS) festett metszetek reprezentatív képén áloperált kontroll (*K*) állatokban, 2 órával (*T2*) illetve 24 órával (*T24*) az inzultust követően *nőstény*, *hím* valamint ovariektomizált nőstény (*ovx*) csoportokban. (A *fekete nyilak* a glomerulus kollapszusra, a *fehér nyilak* a nekrotikus tubulusokra, a *piros nyilak* a hialin akkumulációra mutatnak.) Nagyítás: ×400, lépték: 500 µm

4.1.3 Nemi különbségek az S1R, pAkt, hősokk fehérjék és NKA szintekben

4.1.3.1 Az S1R szintje nőstényekben gyorsan emelkedik

Az S1R fehérje szint már kontroll nőstényekben is valamivel magasabb volt a hímekénél (a különbség nem érte el a szignifikancia szintet). Az I/R inzultust követően 2 órával (T2) nőstényekben az S1R szintje jelentősen emelkedett ($p<0,05$ K vs. T2; nőstény), míg a hímekben és az ovx csoportban nem változott ($p<0,001$ vs. hím; $p<0,01$ vs. ovx; T2). T24-re mindhárom csoportban visszatért a kiindulási szintre. (**16.a ábra**)

4.1.3.2 Az alap- és a posztiszkémiás pAkt, hősokk fehérje és NKA szintek nőstényekben magasabbak

Szintén vizsgáltuk a feltételezetten S1R által aktivált jelátviteli útvonal fehérjéinek (Akt, HSF-1, HSP-27, HSP-72, NKA) szintjét I/R inzultust követően. Az Akt esetében annak foszforilált - aktivált - formáját mértük (pAkt).

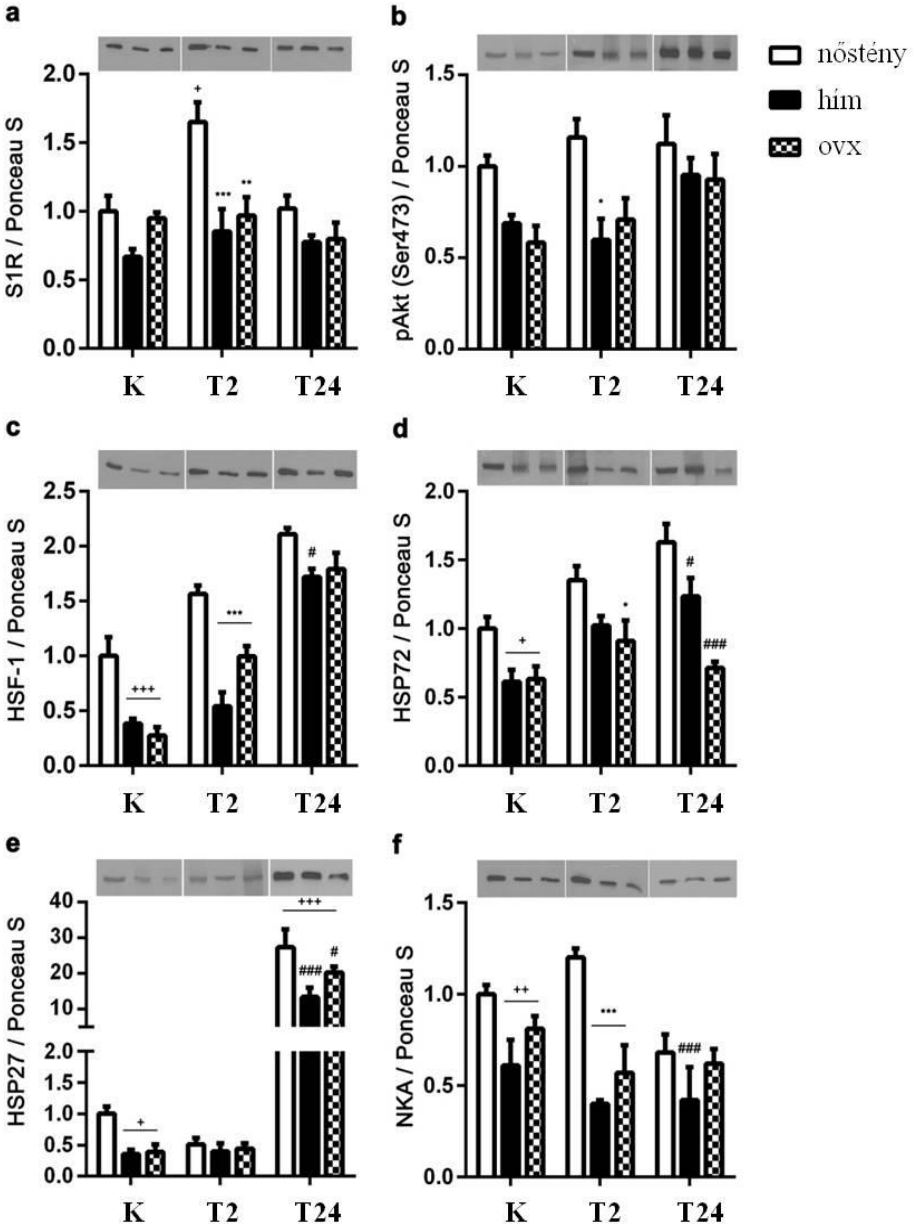
A **pAkt** (Ser473) protein szintje már alaphelyzetben kissé magasabb volt nőstényekben, majd az inzultust követően gyorsan emelkedett, 2 óra elteltével (T2) a hímek és ovx nőstények értékének dupláját érte el ($p<0,05$ vs. hím; T2). Hímekben és az ovx csoportban a pAkt lassabban és kisebb mértékben emelkedett, maximumát csak T24-ben érte el. (**16.b ábra**)

Hasonlóképpen a **HSF-1** szintje már a kontroll nőstényekben szignifikánsan magasabb volt ($p<0,001$ vs. hím, ovx; K), és az inzultust követően gyorsabban és jelentősebb mértékben emelkedett a hímekhez és az ovx állatokhoz képest ($p<0,001$ vs. hím, ovx; T2). T24-ben a különbség csökkent, de változatlanul nőstényekben maradt a legmagasabb ($p<0,05$ vs. hím; T24). (**16.c ábra**)

A **HSP-72** alapszintje nőstényekben szignifikánsan magasabb volt a hímek és ovx nőstények értékéhez képest ($p<0,05$ vs. hím, ovx; K). Bár a fehérje szintje hímekben is egyenletesen emelkedett, a nőstényekhez képest lassabban és alacsonyabb értékre ($p<0,05$ vs. hím, $p<0,001$ vs. ovx; T24). (**16.d ábra**)

A **HSP-27** eltérő posztiszkémiás dinamikát mutatott. Bár alapszintje nőstényekben magasabb volt ($p<0,05$ nőstény vs. hím, ovx; K), T2-re a hímek/ovx állatok szintjére csökkent az érték. Csak T24-ben emelkedett meg mindhárom csoportban jelentősen, de nőstényekben ekkor is magasabb értékeket mértünk ($p<0,001$ vs. hím, $p<0,05$ vs. ovx; T24). (**16.e ábra**)

Az **NKA** alapszintje nőstényekben a többi fehérjéhez hasonlóan magasabb volt a többi csoporthoz képest ($p<0,01$ vs. hím, ovx; K), és ez a különbség T2-re jelentősen növekedett ($p<0,001$ vs. hím, ovx; T2). 24 óra elteltével (T24) szintje csökkent, de még továbbra is a hímekénél magasabb maradt ($p<0,001$ vs. hím; T24). Az inzultus hatására a hímek és az ovx nőstények csoportjában az NKA szintje lényegében nem változott. (**16.f ábra**)



16. ábra Sigma-1-receptor, foszforilált protein kináz B, hősokk faktor-1, hősokk fehérje-72, hősokk fehérje-27 és Na^+/K^+ATPáz szintek változása iszkémia/reperfúziós károsodás hatására

a: sigma-1-receptor (S1R), **b:** foszforilált protein kináz B (pAkt) (Ser473), **c:** hősokk faktor-1 (HSF-1), **d:** hősokk fehérje-72 (HSP72), **e:** hősokk fehérje-27 **(**HSP27), **f:** Na^+/K^+ATPáz (NKA) fehérje szintek áloperált (*K*), valamint 2 (*T2*) illetve 24 órával (*T24*) az iszkémia/reperfúziós inzultust követően *nőstény*, *hím* és ovariektomizált nőstény (*ovx*) állatokban. (+p<0,05 vs. nőstény; K; ++p<0,01 vs. nőstény; K; +++p<0,001 vs. nőstény; K; *p<0,05 vs. nőstény; T2; **p<0,01 vs. nőstény; T2; ***p<0,001 vs. nőstény; T2; #p<0,05 vs. nőstény; T24; ###p<0,001 vs. nőstény; T24). A blottolt membránokat Ponceau S festésre normalizáltuk, minden oszlop felett egy reprezentatív membrán részletet mutatunk be. Az oszlopok az átlag±SEM-et jelzik. Az adatokat one-way ANOVA Bonferroni összehasonlító teszttel elemeztük. (n=8/csoport)

4.2 Az S1R szerepe a vese I/R károsodásában

Szintén 50 perces I/R modellen vizsgáltuk az S1R szerepét a vesekárosodás valamint a hősokk válasz létrejöttében S1R agonista Flu, illetve a Flu-val együtt adott specifikus S1R antagonista NE-100 előkezelést követően.

4.2.1 Az S1R agonista fluvoxamin (Flu) mérsékli a vesefunkció romlását

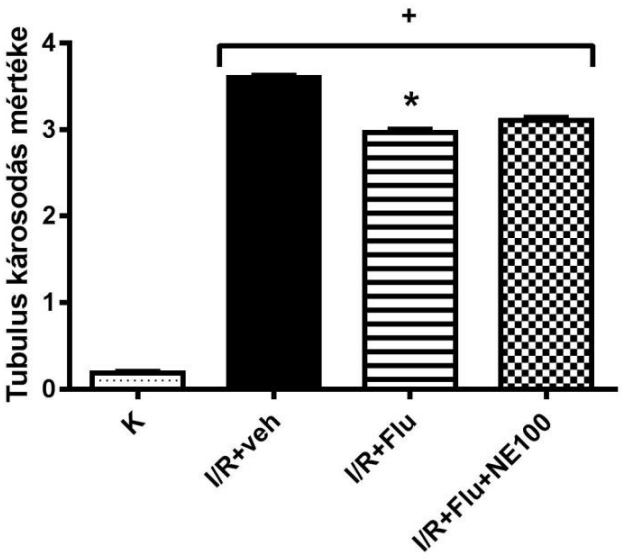
Az akut vesekárosodásnak megfelelően a kontroll csoporthoz képest az I/R inzultust követően romlott az állatok vesefunkciója ($p<0,05$ K vs. mindhárom csoport; mindhárom paraméter). Azonban a Flu-val kezelt csoportban a Krea, CN és AST értékek is szignifikánsan alacsonyabbak voltak a vehikulummal kezelt (I/R+veh) állatokhoz képest ($p<0,05$ I/R+Flu vs. I/R+veh; mindhárom paraméter). Ezt a protektív hatást az antagonista NE-100 kezelés meggátolta ($p<0,05$ I/R+Flu+NE100 vs. I/R+Flu; Krea, CN), mely a vesefunkció megkímélésének S1R mediált módjára utal. A laborvizsgálat eredményeit az **5. táblázat** ismerteti.

5. táblázat Fluvoxamin (Flu) hatása az iszkémia/reperfúziós inzultust követő vesefunkcióra Szérum kreatinin (*Krea*), karbamid-nitrogén (*CN*) és aszpartát transzamináz (*AST)* szintek áloperált kontroll (*K*), valamint iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodást követően 24 órával vehikulum (*I/R+veh*), fluvoxamin (*I/R+Flu*) illetve fluvoxamin és S1R antagonista NE-100 (*I/R+Flu+NE100*) kezelést követően (*$p<0,05$ vs. I/R+veh, +$p<0,05$ vs. K, §$p<0,05$ vs. I/R+Flu). A számok a laboradatok átlag±SEM értékét jelentik. Az adatokat one-way ANOVA Bonferroni összehasonlító teszttel elemeztük. (n=6-8/csoport)

	K	**I/R+veh**	**I/R+Flu**	**I/R+Flu+NE100**
Krea (µM)	55,6±2,42	356,7±16,82 $^{+}$	318,1±5,01 $^{*+}$	343,0±12,34 $^{§+}$
CN (mM)	7,12±0,12	46,42±0,96 $^{+}$	40,48±0,87 $^{*+}$	54,13±3,06 $^{§+}$
AST (IU/l)	233,9±14,14	642,5±43,61 $^{+}$	418,5±48,74 $^{*+}$	451,5±35,03^{+}

4.2.2 Flu hatására enyhébb az I/R okozta strukturális károsodás

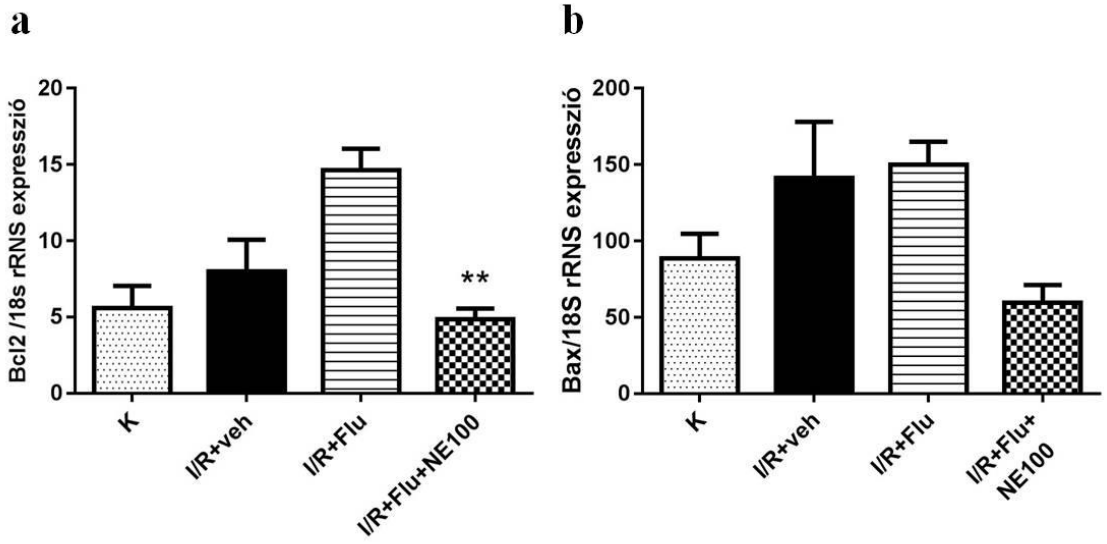
Az inzultust követően a károsodás mindhárom csoportban kifejezett volt ($p<0,05$ K vs. mindhárom csoport), de a Flu-val kezelt csoportban enyhébb fokban ($p<0,05$ I/R+Flu vs. I/R+veh). (**17. ábra**)



17. ábra A tubulus károsodás változása fluvoxamin (Flu) kezelés hatására A tubulus károsodás szövettani metszeten történt szemikvantitatív elemzése egy 0-4 közötti skálán mutatja a károsodás mértékét áloperált kontroll (*K*), valamint iszkémia/reperfúziós (I/R) inzultust követően 24 órával vehikulummal (*I/R+veh*), fluvoxaminnal (*I/R+Flu*) és Flu-val és S1R antagonista NE-100-zal (*I/R+Flu+NE100*) kezelt csoportokban *$p<0,05$ vs. I/R+veh, +$p<0,05$ vs. K). Az oszlopok a középérték±szórást mutatják. Az adatokat Kruskal–Wallis teszttel, Dunn féle korrekcióval elemeztük. (n=6/csoport)

4.2.3 A Flu antiapoptotikus hatású

A Flu-val kezelt csoportban az antiapoptotikus hatású *bcl-2* gén expressziója nem szignifikáns mértékben emelkedett, míg az NE-100 kezelés hatására az expresszió csökkent ($p<0,001$ I/R+Flu+NE100 vs. I/R+Flu) (**18.a ábra**).
A Flu kezelés az apoptotikus *bax* gén expresszióján nem változtatott (**18.b ábra**).

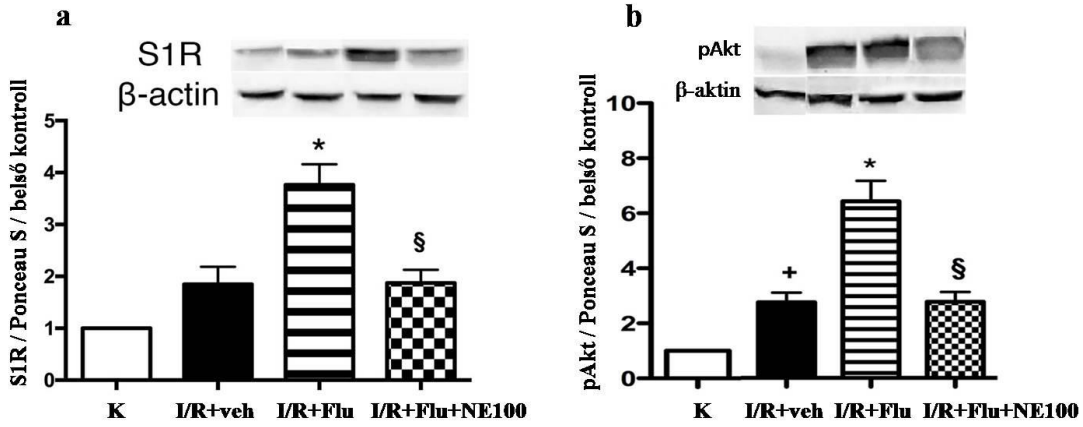


18. ábra A fluvoxamin (Flu) kezelés hatása az antiapoptotikus *B-cell lymphoma-2 (bcl-2)* gén és az apoptotikus *bcl-2 associated X-protein (bax)* gén expressziójára A *bcl-2* (**a**) és a *bax* (**b**) expressziója kontroll (*K*), valamint iszkémia/reperfúziós (I/R) inzultust követően 24 órával vehikulummal (*I/R+veh*), Flu-val (*I/R+Flu*) és Flu-val + S1R antagonista NE-100-zal (*I/R+Flu+NE100*) kezelt csoportokban (**p<0,001 vs. I/R+Flu). A mintákat 18s mRNS-re normalizáltuk. Az oszlopok az átlag±SEM-et jelölik. Az adatokat one-way ANOVA Bonferroni összehasonlító teszttel elemeztük. (n=6/csoport)

4.2.4 Flu hatására emelkedik az S1R és a pAkt szintje

A Flu-val kezelt csoportban az S1R szint magasabb volt, és ezt a hatást az NE-100 meggátolta (p<0,05 I/R+Flu vs. I/R+veh, I/R+Flu+NE100) (**19.a ábra**).

Az S1R-hez hasonlóan változott az általa indukált pAkt szintje is; iszkémiás hatásra emelkedett, de a Flu-val kezelt állatokban magasabb szintet ért el, melyet az NE-100 adása meggátolt (**19.b ábra**).



19. ábra A fluvoxamin (Flu) kezelés hatása a sigma-1 receptor (S1R) és a protein kináz B (Akt) szintjére a: sigma-1-receptor (S1R), **b:** foszforilált protein kináz B (pAkt) szintje kontroll (*K*), valamint iszkémia/reperfúziós (I/R) inzultust követően 24 órával vehikulummal (*I/R+veh*), Flu-val (*I/R+Flu*) és Flu-val + S1R antagonista NE-100-zal (*I/R+Flu+NE100*) kezelt csoportokban (*p<0,05 vs. I/R+veh, §p<0,05 vs. I/R+Flu, +p<0,05 vs. K). A mintákat Ponceau S-re és belső kontrollra normalizáltuk. Reprezentatív blottokat is bemutatunk összehasonlító β-aktin membránokkal. Az oszlopok az átlag±SEM-et jelölik. Az adatokat one-way ANOVA Bonferroni összehasonlító teszttel elemeztük. (n=5–7/csoport)

4.3 Az S1R szerepe a vese károsodásában transzplantációs modellen

Tekintve, hogy a vese I/R károsodása a vesetranszplantáció elengedhetetlen velejárója, vizsgálatainkat a klinikai használathoz közelítve, az S1R aktiválásának hatását transzplantációs állatmodellen is vizsgáltuk. Hím patkányok autotranszpantációját végeztük 2 órás hideg iszkémiás idővel, úgy, hogy a prezervációs folyadékba Flu-t adagoltunk. 24 órával az átültetést követően vizsgáltuk a változásokat.

4.3.1 Flu hatására mérséklődik a vesefunkció romlása

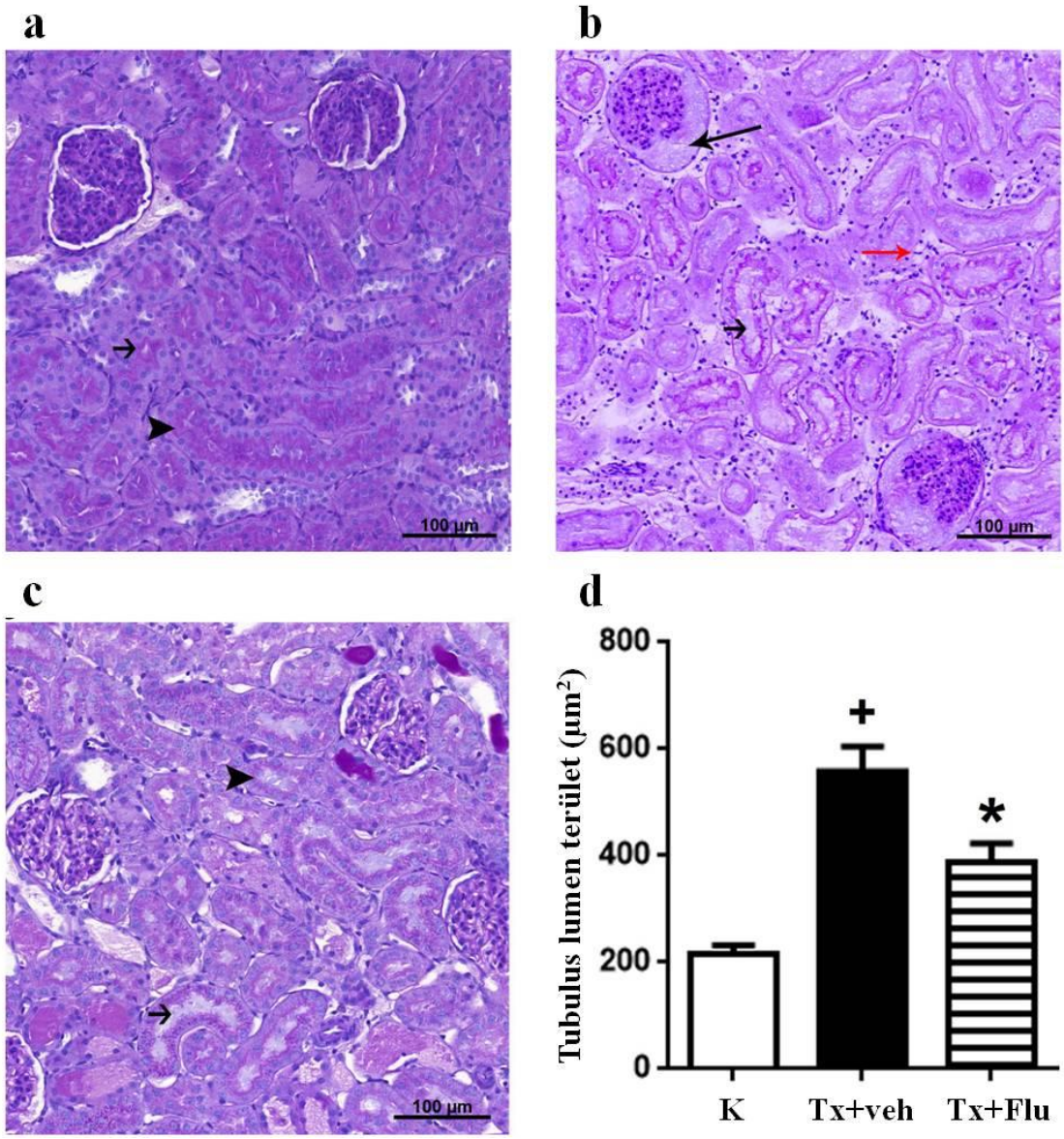
A vesekárosodásnak megfelelően a kontroll állatokhoz (K) képest a transzplantáción átesett állatok vesefunkciója romlott (p<0,05 Tx+veh, Tx+Flu vs. K, mindhárom paraméter), azonban a Krea és AST szintek 24 órával a transzplantációt követően alacsonyabbak voltak a Flu-val kezelt csoportban (p<0,05 Tx+Flu vs. Tx+veh; Krea, AST). A CN szintek egyformán változtak mindkét csoportban (**6. táblázat**).

6. táblázat A prezervációs folyadékhoz adott fluvoxamin vesefunkcióra gyakorolt hatása transzplantációs modellen Szérum kreatinin (*Krea*), karbamid-nitrogén (*CN*) és aszpartát transzamináz (*AST*) szintek áloperált kontroll (*K*), valamint autotranszplantációt követően 24 órával, a prezervációs folyadékba adott fluvoxamin (Tx+Flu) illetve vehikulum (Tx+veh) kezelést követően (*p<0,05 vs. Tx+veh, +p<0,05 vs. K). A számok a laboradatok átlag±SEM értékét jelentik. Az adatokat one-way ANOVA Bonferroni összehasonlító teszttel elemeztük. (n=7-8/csoport)

	K	**Tx+veh**	**Tx+Flu**
Krea (µM)	28,38±2,2	361,7±15,88 $^{+}$	308,3±15,05 *
CN (mM)	7,53±0,65	55,5±2,44 $^{+}$	55,59±2,65 $^{+}$
AST (IU/l)	224,3±12,01	532,2±63,99^{+}	290,8±37,01 *

4.3.2 Flu hatására enyhébb a transzplantáció okozta strukturális károsodás

A transzplantált vesék strukturális változását PAS festett metszeteken vizsgáltuk. A károsodás a Flu-val kezelt csoportban enyhébb volt a vehikulummal kezeltekhez képest: kisebb mértékű volt a glomerulus kollapszus, a tubulusok kefeszegélye részben megmaradt, több megtartott sejtszerkezet és kevesebb kitágult tubuluslumen látszott, ahogy ezt a **20. ábra a-c** részében feltüntetett reprezentatív metszeti képek is mutatják. A Flu mérsékelte az inzultust követő lumenterület növekedését, mely így enyhébb károsodásra utal (p<0,05 Tx+Flu vs. Tx+veh) (**20.d ábra**).

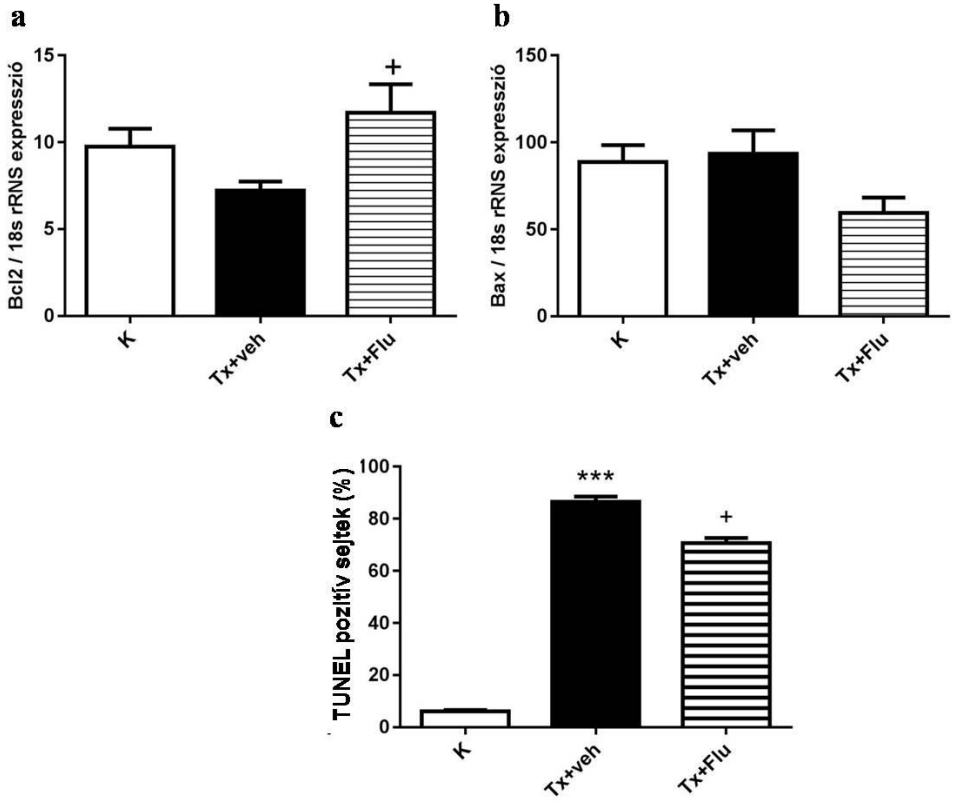


20. ábra A fluvoxamin hatása a transzpantációt követő strukturális károsodásra
A vese szövettani szerkezete Perjódsav-Schiff (PAS) festett metszetek reprezentatív képén 24 órával az iszkémia/reperfúziós inzultust követően áloperált kontroll (*K*) (**a**), vehikulummal kezelt (*Tx+veh*) (**b**), valamint a prezervációs folyadékba adott fluvoxaminnal kezelt (*Tx+Flu*) (**c**) állatokban. (A *fekete nyílhegyek* a megtartott kefeszegélyre, a *hosszabb fekete nyilak* a glomerulus kollapszusra, a *rövid fekete nyilak* a tubulus lumenre, a *piros nyilak* a piknotikus sejtmagokra mutatnak.) (Nagyítás: 200x, lépték:1000 µm.) A tubulus lumen terület változását ezekben a csoportokban a (**d**) ábra mutatja (+p<0,05 vs. K, *p<0,05 vs. Tx+veh). Az oszlopok az átlag±SEM-et jelölik. Az adatokat one-way ANOVA Bonferroni összehasonlító teszttel elemeztük. (n=8/csoport)

4.3.3 A Flu prezervációs folyadékban adva is antiapoptotikus hatású

A Flu-val kezelt csoportban emelkedett az antiapoptotikus hatású *bcl-2* gén expressziója ($p<0,05$ Tx+Flu vs. Tx+veh) (**21.a ábra**), valamint nem szignifikáns mértékben csökkent az apoptotikus hatású *bax* gén expressziója (**21.b ábra**).

TUNEL apoptózis vizsgálat elvégzésével jól látszott, hogy a transzplantációt követően jelentősen megemelkedett az apoptotikus sejtek aránya ($p<0,0001$ Tx+Flu, Tx+veh vs. K), azonban a prezervációs folyadékba adott Flu hatására az apoptózis mértéke enyhébb volt ($p<0,05$ Tx+Flu vs. Tx+veh) (**21.c ábra**).



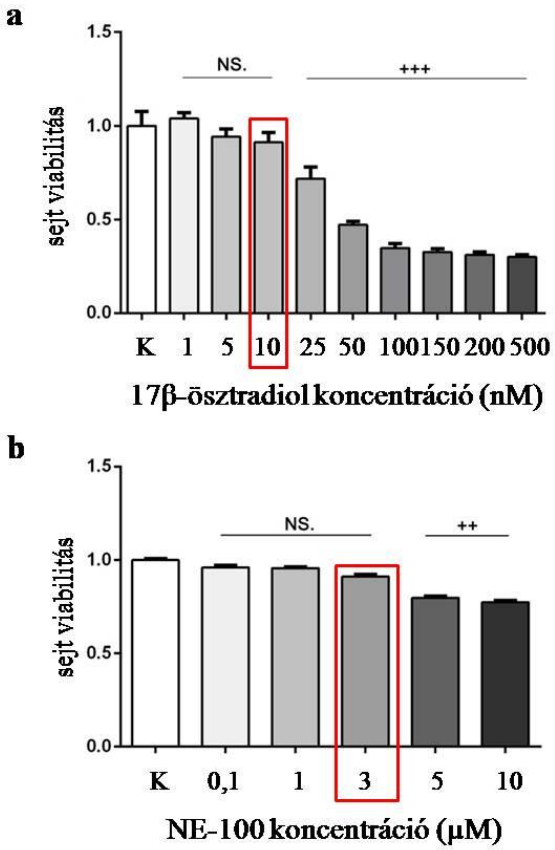
21. ábra A fluvoxamin hatása az apoptózisra transzplantáció során
a: *B-cell lymphoma-2 (bcl-2)* expresszió, **b:** *bcl-2 associated X-protein (bax)* expresszió, **c:** TUNEL pozitív (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) sejtek aránya áloperált kontroll (*K*), vehikulummal (*Tx+veh*) illetve a prezervációs folyadékban adott fluvoxaminnal (*Tx+Flu*) kezelt csoportokban traszplantációt követően 24 órával (***$p<0,0001$ vs. K, +$p<0,05$ vs. Tx+veh). A mintákat 18s mRNS-re normalizáltuk. Az oszlopok az átlag±SEM-et jelzik. Az adatokat one-way ANOVA Bonferroni összehasonlító teszttel elemeztük. (n=6-9/csoport)

4.4 A nemi hormonok szerepe az S1R mediált hősokk válasz kialakulásában

A továbbiakban HK-2 humán proximális tubulus sejtvonalon *in vitro* vizsgáltuk a 17β-ösztradiol hatását az S1R valamint a HSF-1, HSP-72, HSP-27 hősokk fehérjék szintjére. A változások S1R mediált voltának kimutatásához a sejtek egy csoportját 17β-ösztradiol mellett NE-100-zal, az S1R magas affinitású, szelektív antagonistájával is kezeltük. A 17β-ösztradiol és az NE-100 hatásos, még nem toxikus dózisát MTT sejtviabilitás és proliferációs teszt segítségével állapítottuk meg.

4.4.1 Sejt viabilitás és proliferációs tesztek

A kísérletek előtt a sejtekhez adott anyagok (17β-ösztradiol, NE-100) nem toxikus dózisát MTT teszttel (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) választottuk ki. A sejt viabilitást a gyártó ajánlásának megfelelő protokollal határoztuk meg.
Az irodalmi adatok alapján kipróbált koncentrációs sort a **22. ábra** mutatja be. A teszt eredményei alapján azt a legnagyobb koncentrációt választottuk ki, mely még nem befolyásolta a sejtek életképességét, így a *17β-ösztradiol*t 10 nM koncentrációban, az *NE-100*-at 3 μM koncentrációban alkalmaztuk a kísérletek során.



22. ábra A sejtek viabilitási vizsgálata methyl-thiazoletetrazolium (MTT) teszttel a 17β-ösztradiol és az NE-100 nem toxikus koncentrációjának kiválasztásához A 17β-ösztradiolt (**a**) valamint az NE-100-at (**b**) különböző koncentrációkban a sejtekhez adva kiválasztottuk a legnagyobb, még a sejteket nem károsító dózist, melyet a későbbiekben a kísérletekben használtunk (*piros keret*) (++ $p<0,001$ vs. K, +++ $p<0,001$ vs. K, NS: nem szignifikáns). (K: kontroll). Az oszlopok az átlag±SEM-et jelölik. A statisztikai analízist one-way ANOVA teszttel hasonlítottuk össze Bonferroni post-hoc teszttel kiegészítve. (n=6/csoport)

4.4.2 A 17β-ösztradiol hatása a sejtek S1R és HSF-1 szintjeire és lokalizációjára

A sejtek 24 órás, 10 nM koncentrációjú 17β-ösztradiollal történő inkubálása után az **S1R** fehérjék szintje nem különbözött a kontroll sejtek szintjétől (**23.a ábra**).

Immunhisztokémiai festéssel azonban az S1R eltérő sejten belüli lokalizációját mutattuk ki az egyes csoportoknál. Míg a kontroll sejtekben az S1R perinukleárisan fordult elő, a 17β-ösztradiollal kezelt sejtekben intracellulárisan és a sejtmagban is mindenhol

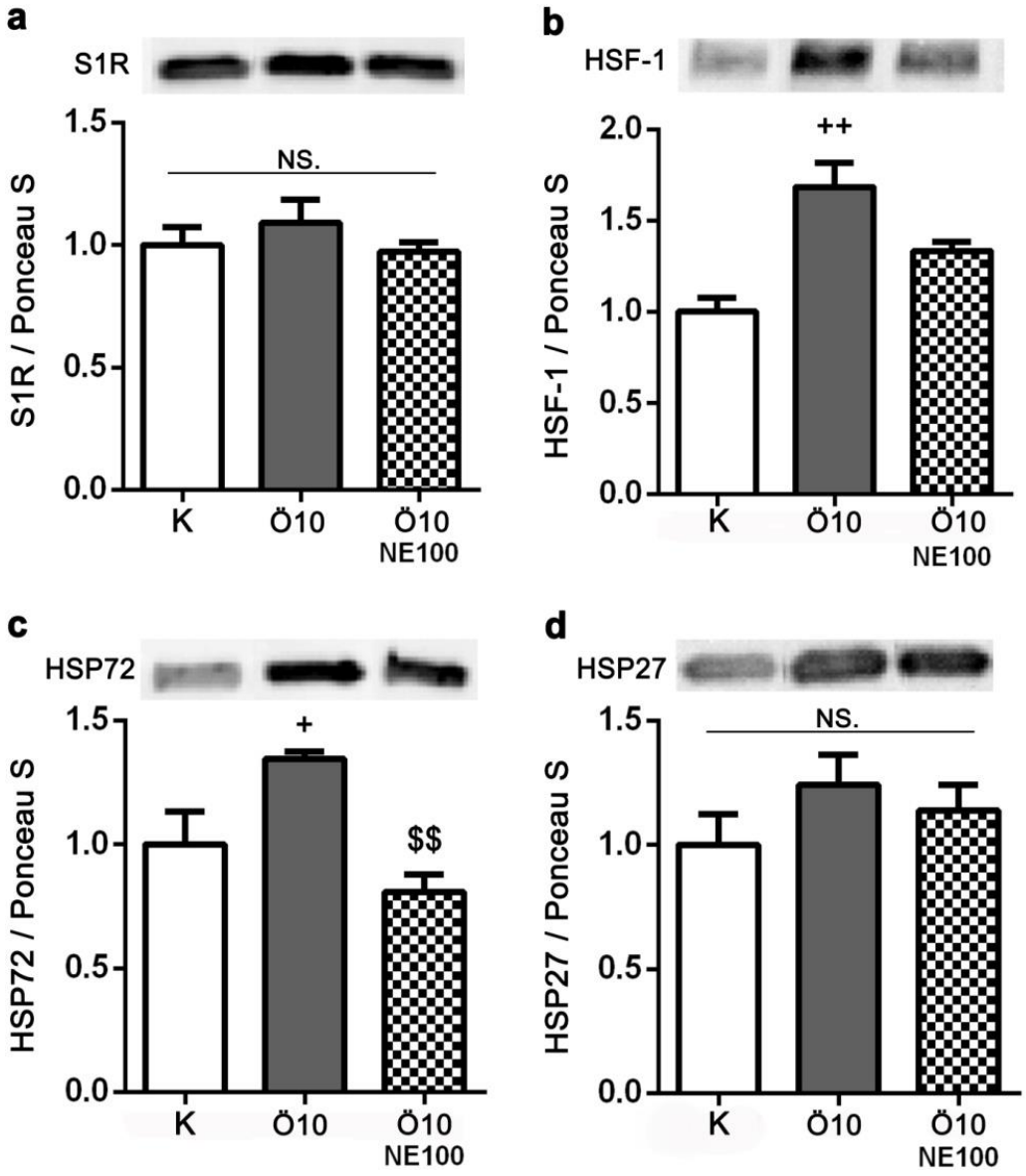
megjelent, mely a receptor aktiválódására utal. Az NE-100-zal kiegészített kezelést követően a transzlokáció kisebb mértékű volt (**24. ábra**).

A **HSF-1** fehérje alapszintje magasabb volt 17β-ösztradiollal kezelt sejtekben (**23.b ábra**). Emellett, az S1R-rel párhuzamosan, immunhisztokémiai festéssel a HSF-1 sejtmagba történő transzlokációját mutattuk ki a 17β-ösztradiollal kezelt sejtekben, mely a HSF-1 aktiválódását jelzi. A folyamat S1R mediált voltát mutatja, hogy az NE-100-zal történő kezelés a fehérjeszint növekedését és a transzlokációt is gátolta (**24. ábra**).

4.4.3 A 17β-ösztradiol hatása a sejtek hősokk fehérje szintjeire

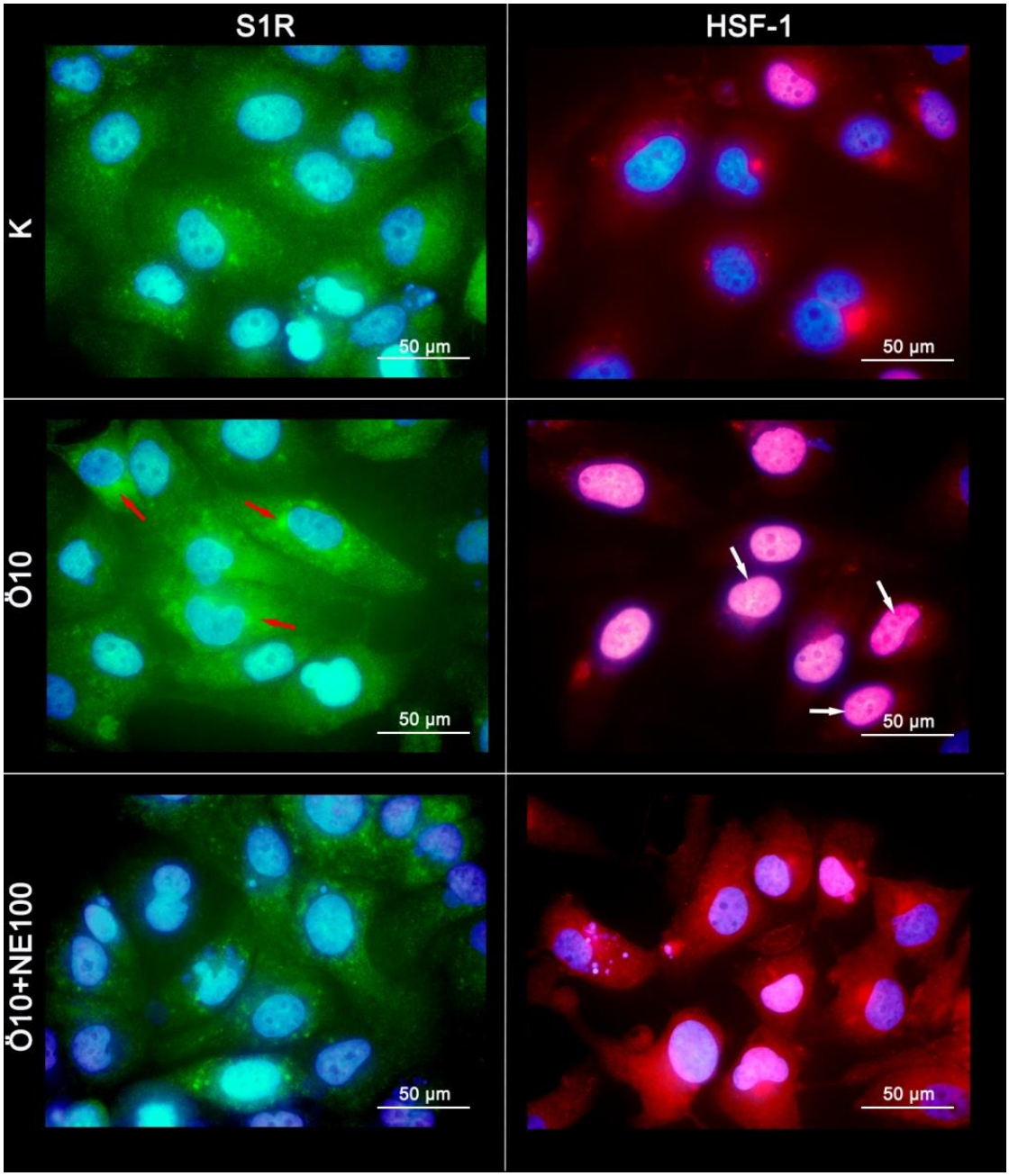
A **HSP-72 szintje** 17β-ösztradiol kezelés hatására megemelkedett ($p<0,05$ Ö10 vs. K), és ezt az NE-100 kezelés gátolta ($p<0,001$ Ö10+NE100 vs. Ö10) (**23.c ábra**).

A **HSP-27** szintjét a többi hősokk fehérjével ellentétben a 17β-ösztradiol kezelés nem befolyásolta (**23.d ábra**).



23. ábra 17β-ösztradiol kezelés hatása a human kidney-2 sejtek sigma-1 receptor, hősokk faktor-1, hősokk fehérje-72 és hősokk fehérje-27szintjeire

a: sigma-1-receptor (S1R), **b:** hősokk faktor-1 (HSF-1), **c:** hősokk fehérje-72 (HSP72),**d:** hősokk fehérje-27 **(**HSP27) szintek human kidney-2 (HK-2) sejtekben (*K*), 17β-ösztradiol (*Ö10*) valamint 17β-ösztradiol+NE-100 (*Ö10+NE100*) 24 órás előkezelést követően (+$p<0,05$ vs. K, ++$p<0,01$ vs. K, $^{\$\$}p<0,01$ vs. Ö10, NS.: nem szignifikáns). Az oszlopok az átlag±SEM-et jelölik. Minden oszlop felett egy reprezentatív membrán részletet mutatunk be. Az adatokat one-way ANOVA Bonferroni összehasonlító teszttel elemeztük. (n=6/csoport)



24. ábra A 17β-ösztradiol a sigma-1 receptor (S1R) és a hősokk faktor-1 (HSF-1) transzlokációját váltja ki a proximális tubulus sejteken A sejtek immunhisztokémiai festésének reprezentatív képei kontroll (*K*), 24 órás 17β-ösztradiol előkezelés (*Ö10*) valamint a 17β-ösztradiol és NE-100 előkezelést (*Ö10+NE100*) követően. *Zöld*: anti-S1R, *piros*: anti-HSF-1, *kék*: sejtmag festés. A piros nyilak a citoplazmában található S1R-re, a fehér nyilak a sejtmagban található HSF-1-re mutatnak. Nagyítás: 100x, lépték: 50 µm.

5. Megbeszélés

Számos humán- és állatkísérlet bizonyította már, hogy nemi különbségek vannak különböző szervek iszkémiás sérülékenységében (Knowlton és mtsai 2001, Harada és mtsai 2003, Wang és mtsai 2008, Manwani és mtsai 2011), így a vesebetegségek, vesekárosodás létrejöttében is (Mehta és mtsai 2002, Kher és mtsai 2005, Xue és mtsai 2006). Többek mellett munkacsoportunk is kimutatta korábban a nőstény patkányok jobb túlélését és kisebb mértékű vesekárosodását I/R inzultust követően (Muller és mtsai 2002, Fekete és mtsai 2004, Fekete és mtsai 2006, Hu és mtsai 2009). Emellett a vesetranszplantációk számának fokozatos emelkedésével világszerte egyre nagyobb figyelem irányul a vese átültetés alatti I/R károsodására is, mely a rövid- és hosszútávú graft túlélés egyik legjelentősebb faktora (Legendre és mtsai 2014, USRDS 2017). Hogy mi az oka és célja ezeknek a nemi különbségeknek, azt ezidáig senkinek sem sikerült megfejtenie. A molekuláris folyamatok alaposabb megismerésével azonban új terápiás eszközöket fedezhetünk fel, míg végül talán az ok és cél felderítéséhez is eljutunk.

Az S1R az utóbbi években került a figyelem középpontjába az iszkémiás károsodások tekintetében, elsősorban az agyban (Ajmo és mtsai 2006, Mavlyutov és mtsai 2010, Deplanque és mtsai 2011) és a szívben (Ela és mtsai 1994, Bhuiyan és mtsai 2011). Jelenlétét a proximális tubulus sejtekben valamint renoprotektív szerepét I/R inzultus esetén elsőként munkacsoportunk igazolta a közelmúltban (Hosszu és mtsai 2017).

Az S1R szerepét a nemi különbségek kialakulásában szintén többen vizsgálták idegsejtekben (Cobos és mtsai 2008, Dhir és mtsai 2008, Vogler és mtsai 2016), azonban hatását a vese iszkémiás károsodásában észlelt nemi különbségre jelen vizsgálataink tanulmányozzák elsőként.

Kutatásainkban bebizonyítottuk, hogy a vesében a nőstény nem nyújtotta védelem részben a hősokk válasz aktiválódásán keresztül valósul meg, melyet az ovariektómia a hímekkel egyező szintre csökkent. Továbbá igazoltuk, hogy mind az exogén S1R agonista Flu, mind az endogén S1R agonista ösztrogén hatására aktiválódik a hősokk válasz, enyhébb az I/R károsodás.

Az első két kísérletsorozatban a leggyakrabban használt *I/R patkány modell*t használtuk, a vese 50 perces iszkémiájával (Muller és mtsai 2002, Rusai és mtsai 2011).

A patkány *transzplantációs modell*t az irodalomban használt modellek segítségével állítottuk be, ahol a meleg iszkémiás idő általában 20-40 perc közötti (Li és mtsai 2009, Shihab és mtsai 2009, Imamura és mtsai 2010, Cicora és mtsai 2012, Fuller és mtsai 2012, Sener és mtsai 2013, Lin és mtsai 2014), míg a hideg iszkémiás idő szélesebb skálán mozog, 0-26 óra között van. Az időtartam attól függ, hogy az adott vizsgálatban mit kívánnak modellezni (Shihab és mtsai 2009, Li és mtsai 2009, Imamura és mtsai 2010, Cicora és mtsai 2012, Fuller és mtsai 2012, Sener és mtsai 2013). Lin *és mtsai* vizsgálatukban több hideg iszkémiás időt kipróbáltak az I/R károsodás optimális modellezéséhez. A 2 órás intervallum alatt minimális szöveti károsodást találtak, míg 18 óra elteltével teljes elhalást tapasztaltak (Lin és mtsai 2014). Kísérletünkben az irodalmi adatok ismeretében a *hideg iszkémiás idő*t 2 órában határoztuk meg, mely jól összevethető a humán graft prezervációs folyadékban eltöltött maximum 12-24 órás idejével.

A vesekárosodást laboratóriumi és hisztológiai vizsgálatokkal értékeltük.

A *vesefunkció* megítélésére az általánosan elterjedt Krea és CN értékeket használtuk. Ismert, hogy e fehérjék vesében történő kiválasztása a GFR függvénye, a GFR csökkenésével szérumszintjük emelkedik, mely elsősorban a glomerulus funkció károsodását jelzi. Ez az emelkedés általában a károsodást követően 24-36 órával figyelhető meg.

Emellett a ritkábban használt, de a vese I/R károsodásában bizonyítottan kórjelző AST a reperfúzió során a szöveső tubulussejtekből szabadul fel, így elsősorban a reperfúzió és a tubulus károsodás markere mind szérumban, mind vizeletben mérve (Thiemermann és mtsai 2003, Rong és mtsai 2011). A második és harmadik kísérletsorozatban az AST szint meghatározását is elvégeztük.

Közelmúltban megjelent közleményünkben a Krea, CN és AST értékek mellett egyéb AKI specifikus molekulák szintjeit is meghatároztuk a Flu kezelés hatásának méréséhez, melyben a KIM-1, HIF-1α, NGAL szintek a vesefunkciós értékekkel korrelálva a Flu renoprotektív hatását jelezték (Hosszu és mtsai 2017). Mivel jelen értekezés legfőbb célja nem az S1R agonizmus védő szerepének bizonyítása, így itt elegendőnek találtuk az alap paraméterek meghatározását.

A *vesestruktúra* károsodását az első kísérletsorozatban korábbi protokolljainknak megfelelő pontrendszer használatával szemikvantitatív módon értékeltük ki mind a glomerulusok, mind a tubulusok és az intersticum károsodásának részletes elemzésével (Heemann és mtsai 2000, Fekete és mtsai 2004, Vannay és mtsai 2009, Rusai és mtsai 2011). További

kísérleteinkben, tekintve, hogy az I/R károsodás mértéke jól korrelál a tubulusok károsodásával, csak ezek állapotát határoztuk meg szemikvantitatív pontrendszer segítségével, illetve a tubuluslumen terület változásának értékelésével. A tubulus károsodás mértékét jól jelzi a lumen területének növekedése, amennyiben a sejtek nekrózisa és degradációja, valamint a lumenbe jutó nagyobb mennyiségű folyadék és törmelék következtében a lumen kitágul (Rafieian-Kopaei és mtsai 2012, Nasri és mtsai 2014).

Első kísérletsorozatunkban egyrészt arra kerestük a választ, hogy a **női hormon (ösztrogén) hiánya** súlyosbítja-e a vese I/R károsodását.

A vese I/R károsodásában tapasztalható *nemi különbség*et már többen vizsgálták (Muller és mtsai 2002, Park és mtsai 2004, Fekete és mtsai 2004, Fekete és mtsai 2006, Satake és mtsai 2008, Hu és mtsai 2009, Rusai és mtsai 2011, Hutchens és mtsai 2012, Hutchens és mtsai 2014, Aufhauser és mtsai 2016). A *női hormonok* védő szerepét feltételezik azon kísérletek, melyekben a vese diszkrétebb károsodását mutatták ki hím, kasztrált hím illetve ovx nőstények ösztrogén kezelésével (Muller és mtsai 2002, Satake és mtsai 2008, Hutchens és mtsai 2012, Hutchens és mtsai 2014).

Jelen vizsgálatunk a női nem védő szerepe mellett (a hímek károsodása súlyosabb volt a nőstényekénél), a női hormonok hiánya okozta fokozott vesekárosodást (az ovx csoport károsodása szintén súlyosabb a nőstényekénél) mutatott ki.

A károsodást jól jelezték mind a vesefunkciós laboreredmények, mind a vesestruktúra hisztológiai változásai. A laboreredmények a vártnak megfelelően minden csoportban 24 óra elteltével emelkedtek jelentősebben, míg a vesestruktúrában enyhébb változások már 2 órával a reperfúziót követően is megfigyelhetők voltak.

Az S1R **renoprotektív hatását** a második kísérletsorozatban vizsgáltuk. Az S1R szerepe különböző központi idegrendszeri folyamatokban már évtizedek óta ismert. Jelenlétét a vese tubulussejtekben, valamint renoprotektív szerepét I/R károsodás esetén elsőként munkacsoportunk igazolta (Hosszu és mtsai 2017). Számos agonista és antagonista hatású ligandja ismert. A Flu egy SSRI típusú antidepresszáns, melyről kimutatták, hogy a szív iszkémiájában valamint nyomástúlterhelés okozta szívkárosodásban protektív hatású (Bhuiyan és mtsai 2010). Nagy affinitással kötődik a receptorhoz, komolyabb mellékhatása nem ismert, így alkalmazásával jól vizsgálható az S1R szerepe a különböző folyamatokban. Mivel a Flu elsődlegesen a szerotonin receptorhoz kötődik, illetve kisebb

affinitással egyéb receptorokhoz (dopamin receptor, noradrenalin receptor) is, az S1R-en keresztül kifejtett hatás bizonyítására egy szintén magas affinitású S1R antagonistát, az NE-100-at használtuk. Kimutattuk az S1R agonizmus vesekárosodást csökkentő hatását, amennyiben mind a vesefunkciós értékek, mind a tubulus károsodás mértéke a Flu-val kezelt csoportban alacsonyabb volt, melyet az NE-100 adása meggátolt.

Mivel az S1R protektív mechanizmusai között ismert antiapoptotikus hatása is (Yang és mtsai 2007, Tchedre és mtsai 2008), vizsgálatunkat a *bcl-2* és *bax* mRNS szintek mérésével is kiegészítettük, melyek az apoptózis folyamatában játszanak fontos szerepet. Az antiapoptotikus *bcl-2* mRNS expressziója a Flu-val kezelt állatokban kifejezettebb volt, az antagonista kezelés a védő hatást felfüggesztette. Vizsgálatunk leginkább az S1R antagonista (NE-100) apoptotikus hatását bizonyította, mely Tchedre és *mtsai* 2008-as közleményében is felmerült. Ők *in vitro* retinasejtek glutamát kiváltotta károsodását vizsgálták, és míg S1R agonista adásával a *bax* gén expressziója nem csökkent, antagonista hozzáadásával a *bax* jelentősen emelkedett (Tchedre és mtsai 2008). Egyéb közlemények eredményei szintén ellentmondásosak az S1R agonista és antagonista szerek *bcl-2* és *bax* gének expresszióját befolyásoló szerepéről, melynek magyarázataként a ligandok szelektív és variábilis hatásmechanizmusai merültek fel (Meunier és mtsai 2010).

Az S1R **szerepe a nemi különbség létrejöttében** szintén számos kutatás tárgya. Ismert, hogy több szteroid hormonnak (DHEA, progeszteron) (Cobos és mtsai 2008), így az ösztrogénnek is nem-specifikus receptora (Dhir és mtsai 2008, Vogler és mtsai 2016).

Az S1R fehérje **szintjét** mindkét I/R modellben, valamint *in vitro* is vizsgáltuk. Alaphelyzetben az S1R szintje a nemek között nem különbözött egymástól. Szintén nem tapasztaltunk változást a sejtek 17β-ösztradiol kezelésekor sem. I/R inzultus hatására azonban a nőstények S1R szintjének jelentős emelkedését találtuk 2 órával a reperfúziót követően, mely a női hormonok inzultust követő S1R szintézist fokozó hatását feltételezi. Jelen kísérleteinkben a szintek T24-re visszatértek a kiindulási értékekre, míg korábbi vizsgálatainkban Flu kezelés hatására az I/R-t követően 24 órával az S1R szintjének emelkedését tapasztaltuk (Hosszu és mtsai 2017). A két eredmény egymásnak nem mond ellent, hátterében több okot feltételezhetünk. Egyrészt, ha a Flu-nak az ösztrogénnél erősebb az S1R affinitása/aktiváló hatása, és ezzel együtt inzultust követően az S1R szintézist fokozó hatása is, a Flu-val kezeltek S1R szintjében nagyobb kiugrás

következhet be, mely T24-re még nem cseng le (ezen csoport S1R szintje T2-ben nem ismert). Másfelől az ösztrogén és a Flu S1R-en való kötődésének eltérő helye miatt feltételezhetjük akár a hatásuk eltérő dinamikáját is (míg az ösztrogén hamar kifejti hatását és 24 óra alatt lecseng, addig a Flu esetleg hosszabb ideig hat). A két lehetőség közti válaszhoz további csoportok vizsgálata szükséges (pl. T2, T48).

Az S1R sejten belüli **lokalizációja** központi idegrendszeri, neuronalis sejtek vizsgálataiból ismert. Döntően az ER-ben helyezkedik el, stimulus hatására helyeződik át a citoszolba vagy a sejtmembránra, sejtmagba (Hayashi és mtsai 2003, Hayashi és mtsai 2011). Az S1R tubulus epitél sejteken belüli lokalizációját (*in vivo* és *in vitro*) elsőként munkacsoportunk mutatta ki, melyben az idegrendszeri vizsgálatokkal megegyezően a stimulust megelőzően a receptort perinukleárisan (feltehetően az ER-ben), míg oxidatív stressz, illetve agonista általi aktiváció (Flu kezelés) hatására a citoszolban diffúzan és a sejtmagban találtuk (Hosszu és mtsai 2017). Jelen vizsgálatainkban *in vitro* HK-2 proximális tubulus sejteken szintén kimutattuk az S1R perinukleáris lokalizációját, valamint 17β-ösztradiol előkezelést követően transzlokációját a citoplazmába. Ezt a transzlokációt az antagonista megakadályozta, vagyis a 17β-ösztradiol az S1R-en keresztül hatva aktiválta azt.

Az S1R számos **jelátviteli útvonal**at beindíthat, melyek közül a legtöbb vizsgálatban az **Akt** aktiválását - foszforilációját - írták le (Bhuiyan és mtsai 2011, Fukunaga és mtsai 2011, Hosszu és mtsai 2017). Az Akt fontos szerepét a sejt I/R inzultusra beinduló stressz válaszában többen kimutatták (Kher és mtsai 2005, Basile és mtsai 2012). Többen leírtak nemi különbséget is az Akt aktivitásában. Az Akt szintje magasabb nőstényekben, valamint emelkedik hímekben kasztráció vagy 17β-ösztradiol adása után, továbbá csökken nőstényekben ovariektómia vagy tesztoszteron adás hatására. I/R inzultusra az Akt aktivitása és szintje nőstényekben tovább emelkedik (Park és mtsai 2004, Kher és mtsai 2005, Hutchens és mtsai 2008). Vizsgálatunkban megerősítettük az irodalmi adatokat: a pAkt szintje nőstényekben már alaphelyzetben is magasabb volt, 2 órával az inzultust követően pedig a hímek és az ovx állatok duplájára emelkedett, bizonyítva ezzel az Akt ösztrogén mediálta fokozott aktivációját.

Mivel korábbi vizsgálatainkból és az irodalomból is ismert a HSP-k fontos szerepe az I/R károsodásban, felmerült az S1R és a HSP-k közötti összefüggés lehetősége is. Carpenter

és mtsai kimutatták a **HSF-1** Akt mediált aktiválását emlődaganat sejtekben (Carpenter és mtsai 2015). Ismert, hogy a sejt stresszre adott válaszának kulcsfontosságú szereplői, a chaperon funkciójú HSP-k aktiválásában kizárólag a HSF-1 vesz részt (Knowlton és mtsai 2001). Ez a transzkripciós faktor inaktív állapotban a citoszolban található, stresszhatásra a sejtmagba jut, ahol beindítja a HSP-k transzkripcióját (Morano és mtsai 1999, Eickelberg és mtsai 2002). A nemi hormonok befolyása a HSF-1 szintjére már szintén felmerült. Knowlton *és mtsai* a szívben kimutatták, hogy a nemi hormonok hatással vannak a HSF-1-re, mivel a hím állatok ösztrogén kezelése fokozta a faktor aktivitását (Knowlton és mtsai 2001). Vizsgálatunkban ezzel megegyező eredményre jutottunk a vesében, azaz a nőstény állatok HSF-1 szintje már az inzultust megelőzően is magasabb volt, és a károsodást követően 2 majd 24 órával tovább emelkedett mind a hímekhez, mind az ovx nőstényekhez képest. Ezzel szintén egybevág, hogy *in vitro* is a sejtek emelkedett HSF-1 értékét mértük 17β-ösztradiol kezelés hatására, továbbá kimutattuk a faktor sejtmagba való transzlokációját – így aktiválódását - is. Emellett a folyamat S1R mediált voltát mutatja, hogy NE-100 adása mind a fokozott szintézist, mind a transzlokációt felfüggesztette.

A HSF-1 által aktivált HSP-k közül a **HSP-27**-nek legfontosabb chaperon funkciója az aktinhoz való kötődése, mellyel segíti az aktin citoszkeleton stabilizálását, így jelentős szerepe van a tubulussejtek funkciójának megőrzésében a károsodást követően (Smoyer és mtsai 2000). Ismert, hogy e citoszkeleton stabilizációt az I/R károsodást követően a proximális tubulus sejtekben a nemi hormonok is befolyásolják (Kher és mtsai 2005, Hutchens és mtsai 2008). Vizsgálatunkban a nőstényeknél magasabb HSP-27 értékeket mértünk mind a hímekkel, mind az ovx állatokkal szemben. Szintje kissé eltérő dinamikát mutatott a többi fehérjéhez képest, maximumát mindhárom csoportban T24-ben érte el. Eredményünk korrelál Smoyer *és mtsai* méréseivel, melyben hím patkányok veséjében iszkémiás inzultust követően 5 órával még alapszintű, míg 24 óra után magasabb HSP-27 szinteket mértek döntően a proximális tubulusokban (Smoyer és mtsai 2000). A sejtek 17β-ösztradiol kezelésével nem értünk el változást a HSP-27 szintjében, mely esetleges eltérő aktiválódási mechanizmusára utalhat, szintézise feltehetően csak stressz hatására fokozódik.

Az I/R károsodásban a másik legtöbbet vizsgált hősokk fehérje a **HSP-72**, szerepét az I/R károsodás mérséklésében többen bizonyították, Marber *és mtsai* szívben, míg

munkacsoportunk a vesében (Marber és mtsai 1995, Prokai és mtsai 2011). Egyik legfontosabb szerepe az NKA-hoz való kötődése és annak stabilizálása a bazális membránban (Aufricht és mtsai 1998, VanWhy és mtsai 1998, Bidmon és mtsai 2002, Riordan és mtsai 2005, Fekete és mtsai 2006, Basile és mtsai 2012). Változása nemi különbséget is mutat, munkacsoportunk korábban igazolta a nőstények emelkedett bazális és posztiszkémiás HSP-72 szintjét hímekkel szemben (Fekete és mtsai 2006). A HSP-72 értékének ösztrogén általi befolyásolását bizonyítja, hogy Voss *és mtsai* csökkent HSP-72 szintet találtak a szívben ovx nőstényekben, melyet ösztrogén kezeléssel ki tudtak védeni (Voss és mtsai 2003). Vizsgálatunkban ismételten igazoltuk, hogy nőstényekben magasabb az alap és az inzultust követő HSP-72 szint a hímekhez képest, valamint bizonyítottuk, hogy az ovariektómia a hímek szintjére csökkenti mennyiségét a vesében. A nemi hormonok szerepét támasztja alá a 17β-ösztradiollal kezelt sejtek emelkedett HSP-72 szintje is. Emellett bizonyítottuk a hatás S1R mediált voltát is, mivel az NE-100 kezelés a HSP-72 szintjének emelkedését megakadályozta.

A proximális tubulus sejtek működésében kulcsfontosságú csatorna, az **NKA** funkciójának megőrzéséhez elengedhetetlen a bazális membránban való lokalizációja. Ezt segíti elő a HSP-27 a citoszkeleton stabilizálásával, valamint a HSP-72 az NKA-hoz való kötődéssel és fixálásával a membránban (Aufricht és mtsai 1998, VanWhy és mtsai 1998, Bidmon és mtsai 2002, Riordan és mtsai 2005, Fekete és mtsai 2006, Basile és mtsai 2012). Szintje a sejtben és lokalizációja szintén nemi különbséget mutat, melyet korábban munkacsoportunk igazolt (Fekete és mtsai 2004, Fekete és mtsai 2006). Jelen vizsgálatunkban a korábbi nemi különbség bizonyítása mellett azt találtuk, hogy a nőstényekben mért emelkedett NKA szint az ovx állatokban a hímek szintjére esett vissza, igazolva az ösztrogén szerepét a változásban.

A vese I/R inzultusának egyik gyakori, előre tervezhető esete a vese**transzplantáció**. A vese átültetés közben elszenvedett iszkémiás károsodását teszik felelőssé a DGF kialakulásáért, mely a szerv hosszútávú túlélését is befolyásolja (Legendre és mtsai 2014). A graft szállítás alatti jobb, hosszabb életben tarthatósága végett fejlesztették ki a különböző összetételű prezervációs folyadékokat, melyeknek köszönhetően a vese akár 24 óráig is eltartható a kivételt követően (Catena és mtsai 2013). Állandó kutatások tárgya olyan szerek kipróbálása (pl. cyclosporin, anti-ICAM-1, thymoglobulin, IGF-1, EPO-beta), melyek a

prezervációs folyadékba adva tovább javítják a graft rövid- és hosszútávú túlélését, mivel így kivédhető az adott szerek szisztémás mellékhatása, valamint kadaver donáció esetén - amikor a donor kezelése nem lehetséges - is biztosítja a graft előkezelését (Cavaillé és mtsai 2013). Ezt a lehetőséget próbáltuk ki a Flu-val is, miután renoprotektív hatása I/R inzultust követően szisztémás adásával bizonyítást nyert. Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a prezervációs folyadékba adott Flu hatására mind a vesefunkció (Krea, AST), mind a vesestruktúra károsodása (tubulus lumen terület növekedése) kisebb mértékű volt a nem kezeltekhez képest, vagyis a Flu protektív hatása ezúton is érvényesült. Emellett érvényesült a Flu antiapoptotikus hatása is, mivel az antiapoptotikus *bcl-2* mRNS expresszió, az I/R-s modellhez hasonlóan, a Flu-val kezelt csoportban emelkedett, valamint TUNEL teszttel ebben a csoportban az apoptotikus sejtek száma alacsonyabb volt. A változások S1R mediált voltára a megelőző I/R-s modell eredményeiből következtethetünk, mivel a transzplantációs modellben NE-100-zal kiegészített kezelési csoportot nem alkalmaztunk, annak nehezebb és költségesebb kivitelezhetősége miatt.

A továbbiakban tervezzük az S1R által feltételezetten aktivált egyéb renoprotektív útvonalak feltérképezését, a fehérjék változásának pontosabb időbeni megfigyelését több mintavételi időpont vizsgálatával, valamint az ösztrogén *in vitro* sejten kifejtett direkt hatásának kimutatását hipoxiás stressz esetében is.

Összefoglalva igazoltuk az S1R szerepét a nemi különbség kialakulásában. Kimutattuk az S1R által mediált védő funkció egy új útvonalát, a hősokk válasz aktivációját, valamint az ösztrogén direkt S1R-en kifejtett hatását a hősokk válaszra, így közelebb jutottunk a nemi különbség rejtélyének felgöngyölítéséhez. Igazoltuk továbbá az S1R agonista prezervációs folyadékba adásának jótékony hatását a vesetranszplantáció kimenetelére, mely a jövőben egy új terápiás lehetőség lehet a graft túlélésének javításában.

6. Következtetések

1. Kimutattuk a női nem szerepét a vese funkciójának és struktúrájának kisebb mértékű károsodásában, valamint az ovariektómia negatív hatását a vesefunkcióra I/R inzultus esetén.

2. Elsőként igazoltuk a HSP-27 magasabb szintjét nőstény patkányok veséjében alapállapotban, valamint az S1R és a HSP-27 további emelkedését I/R inzultust követően.

3. Igazoltuk a 17β-ösztradiol S1R és HSF-1 transzlokáció általi aktiváló hatását *in vitro* tubulus epitél sejteken, mely hatást az S1R antagonista adása felfüggesztette. Bizonyítottuk, hogy a 17β-ösztradiol serkenti az S1R, valamint a HSF-1 és HSP-72 hősokk fehérjék termelődését.

4. Kimutattuk az S1R aktivációjának antiapoptotikus hatását a vese I/R és transzplantációs modelljében egyaránt.

5. Az S1R agonista Flu renoprotektív hatását bizonyítottuk transzplantáció esetén a prezervációs folyadékba adva is.

7. Összefoglalás

A végstádiumú vesebetegség prevalenciája világszerte 8-16% között van és rohamosan nő. A betegek vesepótló kezelést igényelnek, a definitív megoldást a vesetranszplantáció jelenti. A donorhiány mellett komoly kihívást jelent a beültetett vese hosszútávú működésének javítása is, melyben jelentős szerepet játszik a vese transzplantáció során elszenvedett iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodásának csökkentése.

A nők alacsonyabb rizikója a férfiakhoz képest több szerv iszkémiás kórképében ismert (pl. miokardiális infarktus, stroke, vesebetegségek). Korábban munkacsoportunk kimutatta, hogy a nőstény patkányok renális I/R károsodása enyhébb a hímekénél és ez részben a hősokk válasz fokozott aktivációjának köszönhető.

Munkacsoportunk a közelmúltban egy új jelátviteli útvonalat azonosított a vesében, mely a sigma-1 receptor (S1R) aktivációján keresztül serkenti a vazodilatatív nitrogén monoxid termelődését, és ezáltal protektív I/R károsodással szemben. Az S1R-nek számos ligandja ismert: például antidepresszáns szerek (fluvoxamin (Flu), sertralin), endogén szteroidok (dehidroepiandroszteron, ösztrogén).

Jelen értekezés témája a női nem valamint az S1R védő funkciójának ismeretében az S1R-nek a nemi különbség létrejöttében betöltött szerepének, valamint a hősokk fehérjék aktiválásán keresztüli protektív hatásának kimutatása *in vivo* I/R és transzplantációs állatmodellen, valamint *in vitro* sejttenyészet vizsgálatával egyaránt.

Igazoltuk az S1R szerepét a nemi különbség kialakulásában. Kimutattuk az S1R által mediált védő funkció egy új útvonalát, a hősokk válasz aktivációját, valamint az ösztrogén direkt S1R-en kifejtett hatását a hősokk válaszra. Igazoltuk továbbá az S1R agonista Flu prezervációs folyadékba adásának jótékony hatását a vesetranszplantáció kimenetelére. Végül kimutattuk az S1R aktivációjának antiapoptotikus hatását a vese I/R és transzplantációs modelljében egyaránt.

Összefoglalva eredményeink az ösztrogén eddig ismeretlen renoprotektív útvonalának felderítése mellett új terápiás területeket nyithatnak egyes, már törzskönyvezett antidepresszánsok számára, ezzel bővítve a transzplantáció során használt készítmények kelléktárát. Emellett a prezervációs folyadékba adott szer a transzplantáció során nagyobb dózisban, még kevesebb mellékhatással, szélesebb körben (kadaver donor esetén is használható) alkalmazható lehet.

8. Summary

The prevalence of end stage kidney disease is currently between 8-16% and is rapidly increasing worldwide. These patients require renal replacement therapy, the definitive treatment being kidney transplantation. Reducing ischemia/reperfusion (I/R) injury of the graft during the renal transplantation procedure to improve long term graft survival, as well as shortage of donor organs pose a major challenge.

The lower risk of females compared to males in ischemic diseases (e.g. myocardial infarct, stroke, renal diseases) is well-known. We previously showed that female rats are more protected against renal I/R injury than males, which is partly attributed to their more pronounced heat shock response.

Our group has recently identified a novel molecular signaling pathway in the kidney, which is protective against I/R injury by the activation of Sigma-1 receptor (S1R) and subsequent vasodilatative nitric oxide production.

S1R has many different ligands, e.g. antidepressants (Fluvoxamin (Flu), Sertralin), endogenic steroids (dehydroepiandrosterone, estrogen).

Knowing the protective role of female sex and S1R, this dissertation investigates the connection between S1R and sex-releted differences in renal I/R injury. Furthermore, the protective effect of S1R through heat shock response activation was studied both *in vivo* in I/R injury and autotransplantation models, and *in vitro* using proximal tubular cell cultures.

We confirmed the role of S1R in the development of sex-related differences. We identified a new pathway of S1R mediated heat shock response activation and subsequent renoprotection, and the direct role of estrogen in activating the heat shock response through S1R. Furthermore we showed the beneficial effect of S1R agonist Flu added to the preservation solution on the outcome of transplantation. Finally we also demonstrated the anti-apoptotic effect of S1R activation in both I/R injury and transplantation.

In summary, beside the identification of a novel protective pathway of estrogen, our data can open new therapeutic fields to some registered antidepressant drugs and expand the list of drugs used during transplantation. In addition, Flu added to the preservation solution can be used in a higher dose, with less side effects and in a wider spectrum (e.g. it can be used in the case of cadaver donors as well).

9. Irodalomjegyzék

Abuelo JG. (2007) Normotensive Ischemic Acute Renal Failure N Engl J Med, 357: 797-805.

Acunzo J, Katsogiannou M, Rocchi P. (2012) Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), αB-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. Int J Biochem Cell Biol,44 (10): 1622-1631.

Ajmo CT, Vernon DO Jr, Collier L, Pennypacker KR, Cuevas J. (2006) Sigma receptor activation reduces infarct size at 24 hours after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. Curr Neurovasc Res, 3: 89-98.

Alejandro VS, Nelson WJ, Huie P, Sibley RK, Dafoe D, Kuo P, Scandling JD, Myers BD. (1995) Postischemic injury, delayed function and Na+/K(+)-ATPase distribution in the transplanted kidney. Kidney Int, 48: 1308-1315.

Aragno M, Cutrin JC, Mastrocola R, Perrelli MG, Restivo F, Poli G, Danni O, Boccuzzi G. (2003) Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: attenuation by dehydroepiandrosterone. Kidney Int,64: 836-843.

Aufhauser DD Jr, Wang Z, Murken DR, Bhatti TR, Wang Y, Ge G, Redfield RR 3rd, Abt PL, Wang L, Svoronos N, Thomasson A, Reese PP, Hancock WW, Levine MH. (2016) Improved renal ischemia tolerance in females influences kidney transplantation outcomes. J Clin Invest, 2;126 (5): 1968-1977.

Aufricht C, Lu E, Thulin G, Kashgarian M, Siegel NJ, Van Why SK. (1998) ATP releases HSP-72 from protein aggregates after renal ischemia. Am J Physiol Renal Physiol, Vol. 274, no. 2: F268-F274.

Ayhan S, Tugay C, Norton S, Araneo B, Siemionow M. (2003) Dehydroepiandrosterone protects the microcirculation of muscle flaps from ischemia-reperfusion injury by reducing the expression of adhesion molecules. Plast Reconstr Surg, 111: 2286-2294.

Bagshaw SM. (2008) Novel biomarkers for early diagnosis of acute kidney injury. Expert Opinion on Medical Diagnostics, 2:9: 1041-1054.

Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. (2012) Pathophysiology of Acute Kidney Injury. Compr Physiol, 2 (2): 1303–1353.

Berg UB. (2006) Differences in decline in GFR with age between males and females. Reference data on clearances of inulin and PAH in potential kidney donors. Nephrol Dial Transplant, 21: 2577-2582.

Bhuiyan MS, Fukunaga K. (2011) Targeting sigma-1 receptor signaling by endogenous ligands for cardioprotection. Expert Opin Ther Targets, 15: 145-155.

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

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

Bhuiyan S, Fukunaga K. (2010) Stimulation of Sigma-1 receptor by dehydroepiandrosterone ameliorates hypertension-induced kidney hypertrophy in ovariectomized rats. Experimental Biology and Medicine, 235: 356–364.

Bidmon B, Endemann M, Muller T, Arbeiter K, Herkner K, Aufricht C. (2002) HSP-25 and HSP-90 stabilize Na,K-ATPase in cytoskeletal fractions of ischemic rat renal cortex. Kidney International, 62: 1620-1627.

Bonventre JV. (2008) Pathophysiology of Acute Kidney Injury. Nephrology Rounds, Volume 6/issue 7.

Bonventre JV. Mechanisms of Acute Kidney Injury and Repair. In: Jörres A, Ronco C, Kellum JA, Management of Acute Kidney Problems.Springer, Berlin, Heidelberg, 2010: 13-20.

Bonventre JV, Yang L. (2011) Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. J Clin Invest, 121 (11): 4210-4221.

Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. (2005) Sex hormones and the immune response in humans. Hum Reprod Update, 11: 411–423.

Brune S, Pricl S, Wunsch B. (2013) Structure of the sigma1 receptor and its ligand binding site. J Med Chem, 56: 9809-9819.

Buvat J. (2003) Androgen therapy with dehydroepiandrosterone. World J Urol, 21: 346-355.

Camper-Kirby D, Welch S, Walker A, Shiraishi I, Setchell KD, Schaefer E, Kajstura J, Anversa P, Sussman MA. (2001) Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males. Circ Res, 25;88 (10): 1020-1027.

Carpenter RL, Paw I, Dewhirst MW, Lo HW. (2015) Akt phosphorylates and activates HSF-1 independent of heat shock, leading to Slug overexpression and epithelial-

mesenchymal transition (EMT) of HER2-overexpressing breast cancer cells. Oncogene, 34: 546-557.

Catena F, Coccolini F, Montori G, Vallicelli C, Amaduzzi A, Ercolani G, Ravaioli M, Del Gaudio M, Schiavina R, Brunocilla E, Liviano G, Feliciangeli G, Pinna AD. (2013) Kidney preservation: review of present and future perspective. Transplant Proc, 45 (9): 3170-3177.

Cavaillé-Coll M, Bala S, Velidedeoglu E, Hernandez A, Archdeacon P, Gonzalez G, Neuland C, Meyer J, Albrecht R. (2013) Summary of FDA workshop on ischemia reperfusion injury in kidney transplantation. Am J Transplant**,** 13 (5): 1134-1148.

Chambliss KL, Shaul PW. (2002) Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. Endocr Rev, 23 (5): 665-686.

Chen J, Liang Q, Huaa H, Wanga Y, Luoa G, Hub M, Nab Y. (2009) Simultaneous determinations of 15 steroids in rat blood via gas chromatography-mass spectrometry to evaluate the impact of emasculation on adrenal. Talanta, 80: 826-832.

Cheng ZX, Lan DM, Wu PY, Zhu YH, Dong Y, Ma L, Zheng P. (2008) Neurosteroid dehydroepiandrosterone sulphate inhibits persistent sodium currents in rat medial prefrontal cortex via activation of sigma-1 receptors. Exp Neurol, 210: 128-136.

Chu UB, Ruoho AE. (2016) Biochemical Pharmacology of the Sigma-1 Receptor. Molecular pharmacology, 89: 142-153.

Cicora F, Roberti J, Lausada N, González P, Guerrieri D, Stringa P, Cicora P, Vásquez D, González I, Palti G, Intile D, Raimondi C. (2012) Donor preconditioning with rabbit anti-rat thymocyte immunoglobulin ameliorates ischemia reperfusion injury in rat kidney transplantation.Transpl Immunol, 27 (1): 1-7.

Cobos EJ, Entrena JM, Nieto FR, Cendán CM, Del Pozo E. (2008) Pharmacology and Therapeutic Potential of Sigma1 Receptor Ligands. Current Neuropharmacology, 6: 344-366.

Dhir A, Kulkarni SK. (2008) Antidepressant-like effect of 17beta-estradiol: involvement of dopaminergic, serotonergic, and (or) sigma-1 receptor systems. Can J Physiol Pharmacol, 86: 726-735.

Deplanque D, Venna VR, Bordet R. (2011) Brain ischemia changes the long term response to antidepressant drugs in mice. Behavioural brain research, 219: 367-372.

Devarajan P. (2005) Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis. Curr Opin Pediatr, 17 (2): 193-199.

Devarajan P. (2010) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. Biomark Med, 4(2): 265–280.

Eickelberg O, Seebach F, Riordan M, Thulin G, Mann A, Reidy KH, Van Why SK, Kashgarian M, Siegel N. (2002) Functional Activation of Heat Shock Factor and Hypoxia-Inducible Factor in the Kidney. J Am Soc Nephrol, 13: 2094–2101.

Ela C, Barg J, Vogel Z, Hasin Y, Eilam Y. (1994) Sigma receptor ligands modulate contractility, Ca++ influx and beating rate in cultured cardiac myocytes. J Pharmacol Exp Ther, 269: 1300-1309.

Erdely A, Greenfeld Z, Wagner L, Baylis C. (2003) Sexual dimorphism in the aging kidney: Effects on injury and nitric oxide system. Kidney Int, 63 (3): 1021-1026.

Fekete A, Vannay A, Ver A, Vasarhelyi B, Muller V, Ouyang N, Reusz G, Tulassay T, Szabo AJ. (2004) Sex differences in the alterations of Na(+), K(+)-ATPase following ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney. J Physiol, 555: 471-480.

Fonyó Attila, Az orvosi élettan tankönyve, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 1997: 19-61. és 509-559.

Foster BJ, Dahhou M, Zhang X, Platt RW, Samuel SM, Hanley JA. (2011) Association between age and graft failure rates in young kidney transplant recipients. Transplantation, 92: 1237–1243.

Förstermann U, Sessa WC. (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J, 33: 829-837, 837a-837d.

Fuller TF, Kusch A, Chaykovsa L, Catar R, Pützer J, Haller M, Troppmair J, Hoff U, Dragun D. (2012) Protein Kinase C Inhibition Ameliorates Posttransplantation Preservation Injury in Rat Renal Transplants. Transplantation, Vol 94, No7: 679-686.

Gellai M, Jugus M, Fletcher T, DeWolf R, Nambi P. (1994) Reversal of postischemic acute renal failure with a selective endothelin A receptor antagonist in the rat. J Clin Invest, 93 (2): 900-906.

Gratwohl A, Döhler B, Stern M, Opelz G. (2008) H-Y as a minor histocompatibility antigen in kidney transplantation: A retrospective cohort study. Lancet, 372: 49–53.

Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. (2002) Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. Kidney International, 62: 237–244.

Harada H, Pavlick KP, Hines IN, Lefer DJ, Hoffman JM, Bharwani S, Wolf RE, Grisham MB. (2003) Sexual dimorphism in reduced-size liver ischemia and reperfusion injury in mice: Role of endothelial cell nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci USA, 21;100 (2): 739-744.

Hayashi T, Esaki T, Muto E, Kano H, Asai Y, Thakur NK, Sumi D, Jayachandran M, Iguchi A. (2000) Dehydroepiandrosterone retards atherosclerosis formation through its conversion to estrogen. The possible role of nitric oxide. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 20: 782-792.

Hayashi T, Su TP. (2003) Intracellular dynamics of sigma-1 receptors (sigma (1) binding sites) in NG108-15 cells. J Pharmacol Exp Ther, 306: 726-733.

Hayashi T, Su TP. (2007) Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. Cell, 131: 596-610.

Hayashi T, Su TP. (2011) Targeting ligand-operated chaperone sigma-1 receptors in the treatment of neuropsychiatric disorders. Expert Opin Ther Targets, 15 (5): 557–577.

Heemann U, Szabo A, Hamar P, Müller V, Witzke O, Lutz J, Philipp T. (2000) Lipopolysaccharide pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury: possible connection to an interleukin-6-dependent pathway.Am J Pathol, 156 (1): 287-293.

Hellewell SB, Bruce A, Feinstein G, Orringer J, Williams W, Bowen WD. (1994) Rat liver and kidney contain high densities of sigma 1 and sigma 2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling. Eur J Pharmacol, 268: 9-18.

Hosszu A, Antal Z, Lenart L, Hodrea J, Koszegi S, Balogh DB, Banki NF, Wagner L, Denes A, Hamar P, Degrell P, Vannay A, Szabo AJ, Fekete A. (2017) σ1 receptor agonism protects against renal ischemia-reperfusion injury. J Am Soc Nephrol, 28 (1): 152-165.

Hu H, Wang G, Batteux F, Nicco C. (2009) Gender differences in the susceptibility to renal ischemia-reperfusion injury in BALB/c mice. Tohoku J Exp Med, 218 (4): 325-329.

Hutchens MP, Fujiyoshi T, Komers R, Herson PS, Anderson S. (2012) Estrogen protects renal endothelial barrier function from ischemia-reperfusion in vitro and in vivo. Am J Physiol Renal Physiol, 303: F377-F385.

Hutchens MP, Kosaka Y, Zhang W, Fujiyoshi T, Murphy S,Alkayed N, Anderson S. (2014) Estrogen-mediated renoprotection following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation is robust to GPR30 gene deletion. PLoS One, 12;9 (6): e99910.

Hutchens MP, Dunlap J, Hurn PD, Jarnberg PO. (2008) Renal ischemia: does sexmatter? Anesth Analg, 107 (1): 239-249.

Idris AI. (2012) Ovariectomy/orchidectomy in rodents. Methods Mol Biol, 816: 545-51.

Imamura R,Isaka Y, Sandoval RM, Ori A, Adamsky S, Feinstein E, Molitoris BA, Takahara S. (2010) Intravital two-photon microscopy assessment of renal protection efficacy of siRNA for p53 in experimental rat kidney transplantation models. Cell Transplant, 19 (12): 1659-1670.

Keith DS, Cantarovich M, Paraskevas S, Tchervenkov J. (2006) Recipient age and risk of chronic allograft nephropathy in primary deceased donor kidney transplant. Transpl Int, 19: 649–656.

Kher A, Meldrum KK, Wang M, Tsai BM, Pitcher JM, Meldrum DR. (2005) Cellular and molecular mechanisms of sex differences in renal ischemia-reperfusion injury. Cardiovasc Res, 67: 594-603.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. (2012) KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. Kidney Inter Suppl, 2: 1–138.

Kim J, Kil IS, Seok YM, Yang ES, Kim DK, Lim DG, Park JW, Bonventre JV, Park KM. (2006) Orchiectomy attenuates post-ischemic oxidative stress and ischemia/reperfusion injury in mice. A role for manganese superoxide dismutase. J Biol Chem, 21;281 (29): 20349-20356.

Kim M, Park SW, Kim M, Chen SWC, Gerthoffer WT, D'Agati VD, Lee1 HTD. (2010) Selective renal overexpression of human heat shock protein 27 reduces renal ischemia-reperfusion injury in mice. Am J Physiol Renal Physiol, 299: F347–F358.

Klein SL, Marriott I, Fish EN. (2015) Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. Trans R Soc Trop Med Hyg, 109: 9–15.

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

Knowlton AA, Sun L. (2001) Heat-shock factor-1, steroid hormones, and regulation of heat-shock protein expression in the heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 280: H455-464.

Kulcsár Imre (2014) Dialíziskezelés Magyarországon. Hypertónia. 2014/4

Labrie F, Luu-The V, Bélanger A, Lin SX, Simard J, Pelletier G, Labrie C.Is dehydroepiandrosterone a hormone? (2005) J Endocrinol, 187: 169-196.

Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J.(2001) DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. Front Neuroendocrinol, 22: 185-212.

Layton AT, Vallon V, Edwards A. (2015) Modeling oxygen consumption in theproximaltubule: effects of NHE and SGLT2 inhibition. Am J Physiol Renal Physiol, 308: F1343-1357.

Legendre C, Canaud G, Martinez F. (2014) Factors influencing long-term outcome after kidney transplantation. Transpl Int, 27: 19-27.

Lepeytre F, Dahhou M, Zhang X, Boucquemont J, Sapir-Pichhadze R, Cardinal H, Foster BJ.(2017) Association of Sex with Risk of Kidney Graft Failure Differs by Age.J Am Soc Nephrol, 28: 3014–3023.

Li H, Klein G, Sun P, and Buchan AM. (2001) Dehydroepiandrosterone (DHEA) reduces neuronal injury in a rat model of global cerebral ischemia. Brain Res, 888: 263-266.

Li Z, Nickkholgh A, Yi X, Bruns H, Gross ML, Hoffmann K, Mohr E, Zorn M, Büchler MW, Schemmer P. (2009) Melatonin protects kidney grafts from ischemia/reperfusion injury through inhibition of NF-kB and apoptosis after experimental kidney transplantation. J Pineal Res, 46 (4): 365-372.

Lin Y, Manning PT, Jia J, Gaut JP, Xiao Z, Capoccia BJ, Chen CC, Hiebsch RR, Upadhya G, Mohanakumar T, Frazier WA, Chapman WC. (2014) CD47 Blockade Reduces Ischemia-Reperfusion Injury and Improves Outcomes in a Rat Kidney Transplant Model. Transplantation, 98 (4): 394-401.

Liu D, Dillon JS. (2002) Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha (i2,3). J Biol Chem, 277 (24): 21379-21388.

Liu D, Dillon JS. (2004) Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. Steroids, 69 (4): 279-289.

Lucas G, Rymar VV, Sadikot AF, Debonnel G. (2008) Further evidence for an antidepressant potential of the selective sigma1 agonist SA 4503: electrophysiological, morphological and behavioural studies. Int J Neuropsychopharmacol, 11: 485-495.

Mahgoub S. (2017) Heat Shock Protein 27 (HSP27) in Kidney Disease: Potentials for Diagnosis and Therapy. JAPR, 1 (2): 137-142.

Maninger N, Wolkowitz OM, Reus VI, Epel ES, Mellon SH. (2009) Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). Front Neuroendocrinol, 30 (1): 65-91.

Manwani B, McCullough LD. (2011) Sexual dimorphism in ischemic stroke: lessons from the laboratory. Womens Health (Lond), 7 (3): 319-339.

Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH. (1995) Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. J Clin Invest, 95: 1446-1456.

Martin-Fardon R, Maurice T, Aujla H, Bowen WD, Weiss F. (2007) Differential effects of sigma1 receptor blockade on self-administration and conditioned reinstatement motivated by cocaine vs natural reward. Neuropsychopharmacology, 32: 1967-1973.

Maurice T, Urani A, Phan VL, Romieu P. (2001) The interaction between neuroactive steroids and the sigma1 receptor function: behavioral consequences and therapeutic opportunities. Brain Res Brain Res Rev, 37: 116-132.

Mavlyutov TA, Epstein ML, Andersen KA, Ziskind-Conhaim L, Ruoho AE. (2010) The sigma-1 receptor is enriched in postsynaptic sites of C-terminals in mouse motoneurons. An anatomical and behavioral study. Neuroscience, 167: 247-255.

Mavlyutov TA, Epstein M, LW. (2015) Subcellular Localization of the Sigma-1 Receptor in Retinal Neurons - an Electron Microscopy Study. Sci Rep, 5: 10689.

Mayer MP, Bukau B. (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. CMLS Cell Mol Life Sci, 62: 670–684.

Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A. (2007) Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. Critical Care, 11 (2): R31.

Mehta RL, Pascual MT, Gruta CG, Zhuang S, Chertow GM. (2002) Refining predictive models in critically ill patients with acute renal failure. J Am Soc Nephrol, 13 (5): 1350-1357.

Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Leavey SF, Hanson JA, Leichtman AB, Magee JC, Cibrik DM, Kaplan B. (2001) Gender differences in the risk for chronic renal allograft failure. Transplantation, 71: 429–432.

Meunier J, Hayashi T. (2010) Sigma-1 receptors regulate Bcl-2 expression by reactive oxygen species dependent transcriptional regulation of nuclear factor kappa B. J Pharmacol Exp Ther, 332 (2): 388-397.

Morano KA, Thiele DJ. (1999) Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals. Gene Expr, 7 (4-6): 271-282.

Mori T, Hayashi T, Hayashi E, Su TP. (2013) Sigma-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival. PloS One, 8: e76941.

Munshi R, Hsu C, Himmelfarb J. (2011) Advances in understanding ischemic acute kidney injury. BMC Medicine, 2;9: 11.

Müller V, Losonczy G, Heemann U, Vannay A, Fekete A, Reusz G, Tulassay T, Szabó AJ. (2002) Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: possible role of endothelin. Kidney Int, 62: 1364-1371.

Müller V, Szabó A, Viklicky O, Gaul I, Pörtl S, Philipp T, Heemann UW. (1999) Sex hormones and gender-related differences: their influence on chronic renal allograft rejection. Kidney Int, 55: 2011-2020.

Mymrikov EV, Seit-Nebi AS, Gusev NB. (2011) Large potentials of small heat shock proteins. Physiol Rev, 91: 1123–1159.

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

Narita N, Hashimoto K, Tomitaka S, Minabe Y. (1996) Interactions of selective serotonin reuptake inhibitors with subtypes of sigma receptors in rat brain. Eur J Pharmacol, 307: 117-119.

Nasri H, Tavakoli M, Ahmadi A, Baradaran A, Nematbakhsh M, Rafieian-Kopaei M. (2014) Ameliorative effect of melatonin against contrast media induced renal tubular cell injury. Pak J Med Sci, 30(2): 261-265.

Ortega-Roldan JL, Ossa F, Amin NT, Schnell JR. (2015) Solution NMR studies reveal the location of the second transmembrane domain of the human sigma-1 receptor. FEBS Letters, 589: 659–665.

Ostermann M, Joannidis M. (2016) Acute kidney injury 2016: diagnosis and diagnostic workup. Critical Care, 20: 299.

Park KM, Cho HJ, Bonventre JV. (2005) Orchiectomy reduces susceptibility to renal ischemic injury: a role for heat shock proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications, 328: 312-317.

Park KM, Kim JI, Ahn Y, Bonventre AJ, Bonventre JV. (2004) Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury. J Biol Chem, 10;279 (50): 52282-52292.

Park SW, Chen SW, Kim M, D'Agati VD, Lee HT. (2009) Human heat shock protein 27-overexpressing mice are protected against acute kidney injury after hepatic ischemia and reperfusion. Am J Physiol Renal Physiol, 297: F885-F894.

Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, Baur J, Celestin F, Chen X, Michael A, Haq S, Nuedling S, Grohe C, Force T, Mendelsohn ME, Karas RH. (2004) 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling. Circ Res, 1;95 (7): 692-699.

Pelissier MA, Trap C, Malewiak MI, and Morfin R. (2004) Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone and 7alpha-hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat colon, intestine and liver. Steroids, 69: 137-144.

Peters F, Westphal C, Kramer A, Westerman R. (2018) Is the Rise inthe Prevalence of Renal Replacement Therapy at Older Ages the Price for Living Longer? Front Public Health, 6: 138.

Prokai A, Fekete A, Bánki NF, Müller V, Vér A, Degrell P, Rusai K, Wagner L, Vannay A, Rosta M, Heemann U, Langer RM, Tulassay T, Reusz G, Szabó AJ. (2011)

Renoprotective effect of erythropoietin in rats subjected to ischemia/reperfusion injury: gender differences. Surgery, 150: 39-47.

Rafieian-Kopaei M, Nasri H, Nematbakhsh M, Baradaran A, Gheissari A, Rouhi H, Ahmadi Soleimani SM, Baradaran-Ghahfarokhi M, Ghaed-Amini F, Ardalan MR. (2012) Erythropoietin ameliorates gentamycin-induced renal toxicity: A biochemical and histopathological study. J Nephropathology, 1 (2): 109-116.

Riordan M, Sreedharan R, Wang S, Thulin G, Mann A, Stankewich M, Van Why S, Kashgarian M, Siegel NJ. (2005) HSP70 binding modulates detachment of Na-K-ATPase following energy deprivation in renal epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol, 288: F1236-1242.

Robert R, Ghazali DA, Favreau F, Mauco G, Hauet T, Goujon JM. (2011) Gender difference and sex hormone production in rodent renal ischemia reperfusion injury and repair. J Inflamm (Lond), 9;8: 14.

Rogoz Z, Skuza G, Maj J, Danysz W. (2002) Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. Neuropharmacology, 42: 1024-1030.

Romero-Calvo I, Ocon B, Martinez-Moya P, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, de Medina FS. (2010) Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. Analytical biochemistry, 401: 318-320.

Rong S, Park JK, Kirsch T, Yagita H, Akiba H, Boenisch O, Haller H, Najafian N, Habicht A. (2011) The TIM-1:TIM-4 pathway enhances renal ischemia-reperfusion injury. J Am Soc Nephrol, 22: 484-495.

Rosivall László. Veseelégtelenség. In: Szollár Lajos (szerk.) Kórélettan. Semmelweis Kiadó, Budapest, 1996: 12. fejezet

Rusai K, Fekete A, Szebeni B, Vannay A, Bokodi G, Müller V, Viklicky O, Bloudickova S, Rajnoch J, Heemann U, Reusz G, Szabó A, Tulassay T, Szabó AJ. (2008) Effect of inhibition of neuronal nitric oxide synthase and L-arginine supplementation on renal ischaemia-reperfusion injury and the renal nitric oxide system. Clinical and experimental pharmacology & physiology, 35: 1183-1189.

Rusai K, Prókai A, Szebeni B, Mészáros K, Fekete A, Szalay B, Vannay Á, Degrell P, Müller V, Tulassay T, Szabó AJ. (2011) Gender differences in serum and glucocorticoid

regulated kinase-1 (SGK-1) expression during renal ischemia/reperfusion injury. Cell Physiol Biochem, 27 (6): 727-738.

Rusai K, Wagner B, Roos M, Schmaderer C, Strobl M, Boini KM, Grenz A, Kuhl D, Heemann U, Lang F, Lutz J. (2009) The serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 in hypoxic renal injury. Cell Physiol Biochem, 24 (5-6): 577-584.

Sandweiss AJ, Cottier KE, McIntosh MI, Dussor G, Davis TP, Vanderah TW, Largent-Milnes TM. (2017) 17-β Estradiol induces spreading depression and pain behavior in alert female rats. Oncotarget, 9;8 (69): 114109-114122.

Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. (2004) Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis and therapy. J Clin Invest, 114: 5-14.

Schrier RW, Wang W. (2004) Acute renal failure and sepsis. N Engl J Med, 8;351 (2): 159-169.

Sener A, Tra KC, Deng JP, Garcia B, Lan Z, Liu W, Sun T, Arp J, Salna M, Acott P, Cepinskas G, Jevnikar AM, Luke PP. (2013) Carbon Monoxide Releasing Molecules Inhibit Cell Death Resulting from Renal Transplantation Related Stress. J Urol, 190: 772-778.

Sharma SP. (2004) Nitric oxide and the kidney. Indian Journal of Nephrology, 14: 77-84.

Shihab FS, Bennett WM, Andoh TF. (2009) Donor preconditioning with a calcineurin inhibitor improves outcome in rat syngeneic kidney transplantation. Transplantation, 87 (3): 326-329.

Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. (2011) Delayed graft function in the kidney transplant. Am J Transplant, 11 (11): 2279–2296.

Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. Nature, 28;407 (6803): 538-541.

Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Varone G, Caruso A, Genazzani AR. (2003) Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms. Endocrinology, 144: 3449-3455.

Smoyer WE, Ransom R, Harris RC, Welsh MJ, Lutsch G, Benndorf R. (2000) Ischemic acute renal failure induces differential expression of small heat shock proteins. J Am Soc Nephrol, 11 (2): 211-221.

Soriani O, Le Foll F, Galas L, Roman F, Vaudry H, Cazin L. (1999) The sigmaligand (+)-pentazocine depresses M current and enhances calcium conductances in frog melanotrophs. Am J Physiol, 277: E73-80.

Tagashira H, Bhuiyan MS, Shioda N, Fukunaga K. (2014) Fluvoxamine rescues mitochondrial Ca2+ transport and ATP production through sigma(1)-receptor in hypertrophic cardiomyocytes. Life Sci, 95: 89-100.

Takaoka M, Yuba M, Fujii T, Ohkita M, Matsumura Y. (2002) Oestrogen protects against ischaemic acute renal failure in rats by suppressing renal endothelin-1 overproduction. Clinical science, 48: 434s-437s.

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

Tanaka R, Tsutsui H, Kobuchi S, Sugiura T, Yamagata M, Ohkita M, Takaoka M, Yukimura T, Matsumura Y. (2012) Protective effect of 17β-estradiol on ischemic acute kidney injury through the renal sympathetic nervous system. Eur J Pharmacol, 15;683 (1-3): 270-275.

Tchedre KT, Yorio T. (2008) Sigma-1 receptors protect RGC-5 cells from apoptosis by regulating intracellular calcium, Bax levels, and caspase-3 activation. Invest Ophthalmol Vis Sci, 49: 2577-2588.

Thiemermann C, Patel NS, Kvale EO, Cockerill GW, Brown PA, Stewart KN, Cuzzocrea S, Britti D, Mota-Filipe H, Chatterjee PK. (2003) High density lipoprotein (HDL) reduces renal ischemia/reperfusion injury. J Am SocNephrol, 14: 1833–1843.

United States Renal Data System. (2017) Annual Data Report.

Van Why SK, Siegel NJ. (1998) Heat shock proteins in renal injury and recovery. Curr Opin Nephrol Hypertens, 7: 407-441.

Vannay A, Fekete A, Langer R, Tóth T, Sziksz E, Vásárhelyi B, Szabó AJ, Losonczy G, Adori C, Gál A, Tulassay T, Szabó A. (2009) Dehydroepiandrosterone pretreatment alters the ischaemia/reperfusion-induced VEGF, IL-1 and IL-6 gene expression in acuterenal failure. Kidney Blood Press Res, 32 (3): 175-184.

Vogler S, Winters H, Pannicke T, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A. (2016) Sigma-1 receptor activation inhibits osmotic swelling of rat retinal glial (Müller) cells by transactivation of glutamatergic and purinergic receptors. Neurosci Lett, 1;610: 13-18.

Wang M, Crisostomo PR, Markel T, Wang Y, Lillemoe KD, Meldrum DR. (2008) Estrogen receptor beta mediates acute myocardial protection following ischemia. Surgery, 144 (2): 233-238.

Wilbert-Lampen U, Seliger C, Trapp A, Straube F, Plasse A. (2005) Female sex hormones decrease constitutive endothelin-1 release via endothelial sigma-1/cocaine receptors: an action independent of the steroid hormone receptors. Endothelium: journal of endothelial cell research, 12: 185-191.

Yang S, Bhardwaj A, Cheng J, Alkayed NJ, Hurn PD, Kirsch JR. (2007) Sigma receptor agonists provide neuroprotection in vitro by preserving bcl-2. Anesth Analg, 104: 1179-1184.

Zeier M, Döhler B, Opelz G, Ritz E. (2002) The effect of donor gender on graft survival. J Am Soc Nephrol, 13 (10): 2570-2576.

Zhai P, Eurell TE, Cotthaus R, Jeffrey EH, Bahr JM, Gross DR. (2000) Effect of estrogen on global myocardial ischemia reperfusion injury in female rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 279: H2766–H2775.

Zou AP, Cowley AW. (1999) Role of nitric oxide in the control of renal function and salt sensitivity. Curr Hypertens Rep, 1: 178-186.

Zuk A, Bonventre JV. (2016) Acute Kidney Injury. Annu Rev Med. 67: 293-307.

Xue JL, Daniels F, Star RA, Kimmel PL, Eggers PW, Molitoris BA, Himmelfarb J, Collins AJ. (2006) Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001. J Am Soc Nephrol, 17 (4): 1135-1142.

Weight SC, Bell PRF, Nicholson ML. (1996) Renal ischemia-reperfusion injury. Br J Surg, 83: 162-170.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Hosszu A, **Antal Z**, Veres-Szekely A, Lenart L, Balogh DB, Szkibinszkij E, Illesy L, Hodrea J, Banki NF, Wagner L, Vannay A, Szabo AJ, Fekete A. The role of Sigma-1 receptor in sex-specific heat shock response in an experimental rat model of renal ischemia/reperfusion injury. TRANSPLANT INTERNATIONAL 31:(11) pp. 1268-1278. (2018). **IF: 3,196**
2. Hosszu A, **Antal Z**, Lenart L, Hodrea J, Koszegi S, Balogh DB, Banki NF, Wagner L, Denes A, Hamar P, Degrell P, Vannay A, Szabo AJ, Fekete A. Sigma 1-Receptor Agonism Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY 28:(1) pp. 152-165. (2017). **IF: 8,655**

Más témában megjelent publikációk

1. **Antal Z**, Kovacs T, Voros P, Verebely T. Gastric Transposition after Duodenoduodenostomy in Infants with Combined Esophageal and Duodenal Atresia-Report of Three Cases. EUROPEAN JOURNAL OF PEDIATRIC SURGERY 22:(6) pp. 470-472. (2012). **IF: 0,839**
2. **Antal Zsuzsanna**, Pintér András, Verebély Tibor, Molnár Dénes, Tulassay Tivadar. Újszülöttkori urológiai beavatkozások: Két gyermeksebészeti centrum tízéves beteganyagának feldolgozása és a műtéti indikációk áttekintése. GYERMEKGYÓGYÁSZAT 60:(4) pp. 149-153. (2009)
3. Verebély Tibor, Kálmán Attila, Kiss Imre, Vörös Péter, **Antal Zsuzsanna**. Új eljárások a gyermeksebészetben. GYERMEKGYÓGYÁSZAT 60:(1) pp. 91-97. (2009)

11. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani Fekete Andreának, témavezetőmnek. Azért, hogy 8 évvel ezelőtt látott bennem lehetőséget, és helyet adott nekem a csapatában. Azért, hogy úgy tanított, hogy közben hagyta a saját gondolataimat is kibontakozni. Azért, ahogy bíztatott, amikor nem úgy alakultak a kísérletek, ahogy vártuk. Azért, hogy végül a vizsgálataimat olyan mederbe terelte, mely végül sikert hozott. Azért, hogy a csapatunkban olyan légkört teremtett, ahol jó érzés volt dolgozni. Azért, mert a nekem eddig ismeretlen és félelmetes területet, a kutatást élvezetessé tette számomra. Végül azért, hogy mindeközben kezdeti kapcsolatunk mély barátsággá formálódhatott.

Köszönettel tartozom munkacsoportunk minden korábbi és jelenlegi tagjának, amiért önzetlenül befogadtak és vállalták egyéni munkabeosztásomat. Büszke vagyok rá, hogy egy ilyen pozitív gondolkodású, lendületes és elfogadó csapat tagja lehettem. Külön ki kell emelnem Hosszú Ádámot, akivel a legtöbbet dolgoztunk együtt és a legtöbbet segítette munkám minden fázisát. Nagyon sok támogatást és jó tanácsot kaptam Hodrea Judittól és Lénárt Lillától. Végül köszönöm a többieknek, Kőszegi Sándornak, Szkibinszkij Edgárnak, Balogh Dórának és Bánki Fanninak a vizsgálatok tervezésében, elvégzésében és értékelésében nyújtott segítségüket.
Szintén hálás vagyok Bernáth Máriának a kísérletek kivitelezésében való részvételéért.

Hálával tartozom Hamar Péternek a transzplantációs modell felállításában nyújtott hatalmas segítségéért, valamint a Kórélettani Intézet többi munkatársának, hogy biztosították ehhez számomra a helyet, a feltételeket és az időt.

Köszönöm Degrell Péternek, a Pécsi Tudományegyetem patológusának a szövettani vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Szabó Attila és Tulassay Tivadar professzor uraknak, hogy támogatták, hogy Ph.D. munkámat a klinika kutató laboratóriumában végezzem.

Hálás vagyok gyermeksebész kollégáimnak, Kálmán Attilának, Verebély Tibornak, Kiss Imrének, Vörös Péternek és Tallós Zsuzsának, hogy jelenlétemet nélkülözték a kutatómunkám alatt, valamint érdeklődésükkel és időnként szarkasztikus megjegyzéseikkel lelkesítettek.

Végül köszönöm családomnak is a kedves bíztatásukat és támogatásukat.